

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

На правах рукописи

Бураков Антон Владимирович

ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СИСТЕМА ПУТЕЙ
ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА В КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант

д.б.н., проф. Надеждина Елена Сергеевна

Москва – 2014

1. ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Оглавление.....	2
2. Введение.....	6
История вопроса, актуальность работы.....	6
Цели.....	9
Задачи.....	10
Научная новизна и практическая ценность работы.....	10
Степень достоверности и апробация результатов.....	12
Положения, выносимые на защиту.....	14
3. Обзор литературы.....	15
Тубулиновая транспортная система.....	15
Микротрубочки – общие сведения.....	15
Динамические свойства микротрубочек.....	16
Центросома. Процессы организации микротрубочек: нуклеация и заякоривание.....	18
Позиционирование центросомы в клетке.....	20
Связь центросомы с клеточным ядром.....	23
Плюс-концевой транспорт по микротрубочкам: кинезины.....	30
Минус-концевой транспорт по микротрубочкам: динеин.....	33
Строение молекулы динеина и динактинового комплекса.....	33
Регуляция активности динеина и динактина.....	36
Транспортные функции динеина.....	37
Роль динеина в процессах организации микротрубочек.....	39
Двунаправленность транспорта по тубулиновой транспортной сети.....	41
Актиновая транспортная система. Миозины.....	44
4. Материалы и методы исследования.....	49
Клеточные культуры.....	49
Способы фиксации клеток.....	49
Метод непрямой иммунофлуоресценции.....	51
Методы прямой флуоресценции.....	52
Антитела и красители.....	54
Вещества и специфические ингибиторы.....	55
Получение цитопластов.....	56
Трансфекция клеток млекопитающих плазмидной ДНК.....	57
Деполимеризация и реполимеризация микротрубочек.....	59

Локальная разборка микротрубочек.....	59
Сборка микротрубочек на центросомах <i>in vitro</i>	60
Изучение движения меланосом в системе <i>in vitro</i>	61
Создание ДНК-конструкций.....	61
Выделение плазмидной ДНК.....	63
Выделение тубулина для экспериментов по сборке микротрубочек в системе <i>in vitro</i>	64
Выделение рекомбинантных белков.....	65
Белковый электрофорез и иммуноблотинг.....	65
Проверка киназной активности.....	66
Приборы для световой микроскопии.....	67
Электронная микроскопия.....	67
Анализ изображений и видео.....	68
5. Результаты и обсуждение.....	81
Часть 1. Изучение механизмов позиционирования центросом	
в интерфазных клетках млекопитающих.....	81
§ 1. Прижизненное наблюдение микротрубочек.....	81
§ 2. Экспериментальная модель локального разрушения микротрубочек.....	82
§ 3. Перемещение центросомы в клетках и цитопластах при локальном разрушении микротрубочек.....	84
§ 4. Роль актомиозиновой сократимости в перемещении центросомы.....	87
§ 5. Роль динеина в перемещении центросомы.....	91
§ 6. Работа динеина по перемещению центросомы регулируется ГТФазой Cdc42.....	92
§ 7. Участие динамики плюс-концов микротрубочек в процессе позиционирования центросомы.....	94
§ 8. Цитопласты как модель для изучения центрирующих сил динеина.....	95
§ 9. Микротрубочки утрачивают радиальность по мере старения цитопластов.....	96
§ 10. Хаотизация микротрубочек в стареющих цитопластах не связана с дисфункцией центросом.....	99
§ 11. Хаотизация микротрубочек в стареющих цитопластах не связана со стабилизацией микротрубочек.....	100
§ 12. В стареющих цитопластах меняется поведение микротрубочек на краю клетки.....	102
§ 13. Кортекс стареющих цитопластов содержит меньше динактина.....	105
§ 14. Положение центросом в цитопластах не зависит от взаимодействия	

микротрубочек с кортексом.....	106
§ 15. Предпосылки для построения модели центрирования.....	109
§ 16. Качественный анализ данных: дестабилизирующее влияние плюс-концов микротрубочек.....	114
§ 17. Баланс сил на центросоме обладает центрирующим эффектом в случае, когда тянущая сила динеина достаточно велика.....	118
§ 18. При пространственных изменениях системы микротрубочек центросома претерпевает сдвиг из центральной области.....	120
§ 19. Оценка приложенных к центросоме сил и её мобильности в предложенной модели центрирования.....	123
§ 20. Механизмы центрирования в клетках разной формы и размера.....	125
§ 21. Способен ли связанный с микротрубочками кинезин генерировать децентрирующую силу?.....	129
§ 22. Резюме.....	130
Часть 2. Изучение роли протеинкиназы LOSK и динеина в формировании радиальной системы микротрубочек.....	134
§ 1. Изучение ферментативной активности киназы LOSK <i>in vitro</i>	135
§ 2. Полноразмерная LOSK частично солокализуется с микротрубочками, а N-концевой фрагмент LOSK диффузно распределён по цитоплазме.....	136
§ 3. Оверэкспрессия доминантно-негативного каталитического домена LOSK приводит к нарушению радиальности микротрубочек в клетках линии Vero.....	138
§ 4. Деплеция LOSK посредством РНК-интерференции также нарушает радиальность микротрубочек.....	142
§ 5. Доминантно-негативный каталитический домен LOSK нарушает радиальность микротрубочек в различных типах клеток.....	143
§ 6. Подавление активности LOSK не влияет на целостность центросомы и нуклеацию на ней микротрубочек, но нарушает процесс заякоривания.....	145
§ 7. Ингибирование LOSK нарушает поляризацию аппарата Гольджи на краю экспериментальной раны монослоя.....	147
§ 8. Изменение способности клеток к локомоции может служить индикатором нарушений внутриклеточного транспорта.....	150
§ 9. Ингибирование LOSK замедляет движение клеток и снижает его направленность, а также стабилизирует фокальные контакты.....	151
§ 10. Выбор экспериментальной системы для изучения роли динеина, находящегося на центросоме.....	155

§ 11. Проверка ингибирующей активности p150Glued-CC1.....	157
§ 12. Экспрессия в клетках p150Glued-CC1 приводит к хаотизации микротрубочек и к диспергированию аппарата Гольджи.....	158
§ 13. Экспрессия в клетках p150Glued-CC1 нарушает радиальность восстановленных после разборки микротрубочек.....	160
§ 14. Ингибирование динеина незначительно влияет на сборку микротрубочек из экзогенного тубулина в системе <i>in vitro</i>	161
§ 15. Ингибирование динеина приводит к быстрому нарушению радиальности микротрубочек в живых клетках.....	164
§ 16. Активность динеина присутствует на центросоме на протяжении всей интерфазы.....	167
§ 17. Роль динеина на центросоме не сводится к доставке других центросомных белков.....	169
§ 18. Динеин отвечает не за нуклеацию, а за удержание микротрубочек на центросоме.....	169
§ 19. Возможный механизм работы центросомного динеина.....	173
§ 20. К вопросу об эффективности внутриклеточного транспорта.....	175
§ 21. Резюме.....	179
Часть 3. Изучение механизмов миозин-зависимого транспорта мембранных органелл по актиновым микрофиламентам.....	180
§ 1. Стабилизация актина влияет на диспергирование пигментных гранул, не влияя на их агрегацию.....	181
§ 2. Динамика актина необходима для миозин-зависимого транспорта органелл.....	182
§ 3. Анализ движения меланосом и изучение динамики актина методом FRAP.....	185
§ 4. Стабилизация актина не связана со структурной перестройкой актинового цитоскелета.....	187
§ 5. Джасплакинолид не ингибирует активность миозина Va.....	189
§ 6. Динамика актина содействует миозин-зависимому транспорту.....	189
§ 7. Механизм транспорта по актину.....	192
6. Выводы.....	197
7. Заключение.....	198
8. Список видео.....	201
9. Список статей, опубликованных по теме диссертации.....	202
10. Список литературы.....	204

2. ВВЕДЕНИЕ

ИСТОРИЯ ВОПРОСА, АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ

Возникнув более трёх миллиардов лет назад, живые клетки непрерывно претерпевали изменения в ходе эволюции. От предков архей до современных растений и животных был пройден долгий эволюционный путь, в результате которого возникли все типы клеток, живущих сейчас на Земле. В итоге строение современной клетки животных представляет собой замечательный механизм чрезвычайной сложности, предоставляющий широкое поле деятельности для клеточных биологов.

В результате увеличения размеров и усложнения внутреннего строения клеток животных по сравнению с клетками прокариот, в ходе эволюции у них появились специализированные транспортные системы для перемещения многочисленных органелл по цитоплазме. Очевидно, что быстрый и эффективный транспорт необходим любой клетке, а не только специализированным клеткам вроде нейронов, столбчатого эпителия или активно фагоцитирующих макрофагов, поскольку его роль не ограничивается функциями эндо- и экзоцитоза. Поляризация любой животной клетки в ответ на воздействие внешних сигналов, а также клеточная локомоция требуют активной согласованной работы внутриклеточных транспортных систем. Процессы поляризации и последующего движения клеток обеспечивают заживление ран, развитие воспалительных процессов, обеспечивают нормальное протекание эмбриогенеза и рост сосудов. Наряду с этим, поляризация и локомоция клеток могут играть определяющую роль при малигнизации опухолей в процессе канцерогенеза. Всё это невозможно без эффективного транспорта по цитоплазме. Таким образом, внутриклеточный транспорт определяет ряд ключевых процессов, жизненно важных как для самой клетки, так и для всего организма в целом.

Регулируемый направленный внутриклеточный транспорт осуществляется моторными белками, перемещающими органеллы вдоль элементов цитоскелета. Цитоскелет клеток животных представлен тремя основными типами филаментов, расположенных в цитоплазме – актиновыми микрофиламентами, промежуточными филаментами и микротрубочками. При этом длинные и беспорядочно расположенные промежуточные филаменты в основном обеспечивают жёсткость клетки, и помогают удерживать митохондрии в определённых клеточных компартментах. Таким образом, промежуточные филаменты не принимают участия в процессах внутриклеточного транспорта. Перемещение органелл по цитоплазме осуществляется вдоль микротрубочек и актиновых микрофиламентов посредством моторных белков, относящихся к семействам кинезинов, динеинов и миозинов.

Моторные белки являются молекулами, использующими химическую энергию гидролиза АТФ для осуществления своих конформационных изменений, что приводит к последовательным «шагам» такой молекулы по микротрубочке или микрофиламенту. При этом каждый моторный белок движется в одном строго заданном направлении. Поэтому наличие на поверхности органеллы нескольких сайтов связывания с разными моторными белками, а также выборочная активация нужных моторов позволяет осуществлять направленный транспорт по цитоплазме.

Благодаря исключительной важности процессов внутриклеточного транспорта для жизнедеятельности клеток, исследования в этой области в настоящее время являются в высшей степени актуальными и за последние два десятилетия вопросу их изучения было уделено много внимания. В частности, были расшифрованы структура моторных белков, проведена 3D-реконструкция их молекул и описан механизм их перемещения по элементам цитоскелета. Однако ряд фундаментальных вопросов об организации внутриклеточного транспорта до сих пор оставался без ответа и не давал возможности объединить все известные факты в одну непротиворечивую схему. Данная работа раскрывает ряд механизмов, которые определяют архитектуру тубулиновой транспортной системы клетки и отвечает на вопрос о том, чем обусловлена одно- или двунаправленность транспорта по цитоплазме при помощи моторных белков. Исследования, приведённые в работе, подразделяются на три основные части.

Первая и вторая части работы посвящены исследованию основной транспортной системы клетки, которая представлена системой микротрубочек и соответствующими моторными белками. Хорошо известно, что именно транспорт по микротрубочкам в интерфазных клетках животных играет определяющую роль в процессах эндоцитоза и экзоцитоза, а также обеспечивает перемещение мембранных везикул между цистернами эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. Это достигается благодаря двунаправленному перемещению органелл по радиально расположенным микротрубочкам, пронизывающим всю цитоплазму клетки по направлению от центра к периферии. Очевидно, что подобное расположение микротрубочек в виде звезды геометрически наиболее выгодно, поскольку обеспечивает доставку грузов из околоядерной области до края клетки и обратно по кратчайшему пути, максимально быстро и с наименьшими энергозатратами.

Действительно, транспорт грузов по запутанным микротрубочкам требует большего расхода АТФ, поскольку удлиняется путь, пройденный вдоль микротрубочки моторным белком. Помимо этого, радиальное расположение микротрубочек обеспечивает существование механизма *search and capture*, который является одним из способов регуляции внутриклеточного транспорта. Этот механизм предполагает наличие множества

динамичных плюс-концов микротрубочек, обращённых к периферии клетки и непрерывно «исследующих» цитоплазму в поисках объекта для перемещения. Итак, классическое радиальное расположение микротрубочек с центром организации, расположенным в центральном районе клетки, оптимальным образом приспособлено для осуществления внутриклеточного транспорта.

Очевидно, что подобная архитектура сети микротрубочек возможна лишь при соблюдении двух обязательных условий, а именно:

- 1) центр организации микротрубочек должен располагаться в геометрическом центре клетки
- 2) центр организации должен эффективно удерживать минус-концы динамичных микротрубочек, непрерывно поддерживая таким образом радиальность всей системы.

Чаще всего в качестве центра организации микротрубочек выступает центросома – единственная немембранная органелла у большинства клеток позвоночных. Ещё в 70-х годах XX века было показано, что именно её активность обуславливает формирование радиальной системы микротрубочек в клетках животных. Центросома может быть тесно связана с ядром, но может и отдаляться от него на значительное расстояние. Хотя эта органелла впервые была описана Теодором Бовери ещё в 1887 году и позднее получила своё название именно благодаря центральному расположению в клетке, механизмы её позиционирования оставались неизвестными.

Белковый состав центросомы весьма сложен. Известно, что 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 микротрубочек как системы радиальных путей для моторных белков. Это происходит в результате нуклеации на центросоме новых микротрубочек и заякоривания уже существующих. Иногда два этих процесса могут быть пространственно разобщены, как это происходит в столбчатом эпителии, в клетках которого заякоривающая активность смещается с центросомы на апикальный полюс, что приводит к формированию системы нецентросомных микротрубочек, выстроенных вдоль апикально-базальной оси. Такое не радиальное, а продольно ориентированное строение тубулиновой транспортной сети обусловлено специфическими функциями этих клеток. Процесс заякоривания микротрубочек на центросоме до сих пор недостаточно изучен. Известно, что это сложный процесс, требующий слаженной работы большого количества белков, организованных в некие функциональные белковые комплексы переменного состава. Кроме того, открытым остаётся вопрос о регуляции данного процесса.

Помимо обеспечения оптимального расположения путей для моторных белков, существует и другая проблема, также имеющая фундаментальное значение для понимания

процессов внутриклеточного транспорта. На протяжении длительного времени оставался открытым вопрос, чем обусловлено направление перемещения органелл по элементам цитоскелета. Общеизвестно, что по микротрубочкам транспорт органелл идёт в обе стороны, в то время как по актиновым микрофиламентам лишь в одну. При описании внутриклеточного транспорта часто прибегают к аналогии с поездами, бегущими по рельсам. Кажется очевидным, что направленность транспорта зависит от наличия в клетке соответствующих «поездов», то есть моторных белков. Однако это не так: актиновый моторный белок миозин VI, обильно представленный в цитоплазме на поверхности мембранных органелл, в системе *in vitro* перемещается к минус-концам актиновых микрофиламентов – но в клетках не существует минус-концевого транспорта по актину. Возникает противоречие – ведь если направление транспорта зависит лишь от наличия соответствующих моторов, то в клетках должен присутствовать и минус-концевой транспорт по актину. Значит, исходное предположение об определяющей роли моторов является неверным, и возможность двунаправленного транспорта определяется некими иными факторами.

Исходя из всего вышесказанного, в данной 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.

Для достижения поставленных целей в работе были сформулированы следующие экспериментальные **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 И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ

В результате проведённых исследований, описанных в данной работе, была впервые продемонстрирована совокупность механизмов позиционирования центросомы в интерфазных клетках животных. Эти механизмы оставались невыясненными с момента открытия центросомы в 1887 году. Сочетание методов прижизненной флуоресцентной видеомикроскопии с воздействиями различных ингибиторов и с локальным разрушением участка радиальной системы микротрубочек позволило получить новые оригинальные данные, которые легли в основу компьютерной модели, описывающей все аспекты центрирования. В результате данный процесс теперь полностью изучен: выявлены силы, непосредственно воздействующие на микротрубочки, а также белки-регуляторы данного процесса. Выяснен также относительный вклад каждого из участников, и сведены воедино

геометрические параметры системы (расположение и направление векторов сил, жёсткость отдельных микротрубочек, форма клетки) и размерность физических величин (тянущие силы отдельных молекул моторных белков). Полученные результаты объясняют, как выполняется первое из двух обязательных условий существования радиально-симметричной тубулиновой транспортной системы клетки, а именно условие о центральном расположении centrosомы.

Второе условие – выполнение centrosомой функции заякоривания микротрубочек. Эта функция centrosомы остаётся до конца неизученной до сих пор, хотя уже показано участие целого ряда белков в данном процессе. В настоящей работе было впервые продемонстрировано участие в процессе удержания микротрубочек на centrosоме двух совершенно различных белков – динеина и протеинкиназы LOSK. Моторный белок динеин до этого был подробно описан в качестве минус-концевого моторного белка, перемещающего грузы по микротрубочкам. Его роль в качестве структурно-образующего элемента цитоскелета показана здесь впервые. Серин-треониновая протеинкиназа LOSK была ранее описана как белок, связанный с микротрубочками и centrosомой, и функции этого белка как участника процесса заякоривания также впервые продемонстрирована в данной работе. В обоих случаях данные прижизненных экспериментов *in vivo* полностью подтверждались затем результатами экспериментов *in vitro*.

Суммируя данные, изложенные в первой и второй частях работы, можно заключить, что открытие механизма центрирования, а также двух новых участников процесса заякоривания микротрубочек на centrosоме позволили существенно углубить имеющиеся представления об архитектуре тубулиновой транспортной сети и способах её формирования и поддержания.

В заключительной части работы дан ответ на вопрос о механизмах транспорта по актину, до этого остававшийся открытым. Ранее проведённые исследования на молекулярном уровне показали наличие в клетках миозина VI и его способность к минус-концевому транспорту *in vitro*. На клеточном же уровне, в системе *in vivo*, минус-концевой транспорт по актину никогда не наблюдался, что вступает в противоречие с предыдущими данными, если придерживаться традиционной концепции о моторных белках как «паровозах», везущих грузы по цитоскелетным «рельсам». В настоящей работе применено сочетание различных молекулярно-биологических и цитологических методов исследования: методы прижизненной цитраферной видеомикроскопии, иммунофлуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии, метод восстановления флуоресценции после выжигания и система *in vitro motility assay*, с последующим компьютерным моделированием. Благодаря комплексному применению всех этих методов удалось впервые установить, что столь фундаментальное свойство внутриклеточного транспорта, как его одно- или

двунаправленность, зависит не от наличия/отсутствия в клетке соответствующих моторных белков, а от динамики филаментов, составляющих транспортную сеть. Эти данные впервые позволили построить непротиворечивую схему внутриклеточного транспорта по актиновым микрофиламентам. Это стало возможным благодаря тому, что в настоящей работе была подвергнута сомнению общепринятая аналогия микрофиламентов с «рельсами», хотя она с успехом применяется при описании транспорта по микротрубочкам. Оказалось, что в случае миозина его можно сравнить разве что с путеукладчиком, перед которым постоянно строятся новые рельсы, при этом вдобавок разбирающиеся позади него. В этом случае становится совершенно очевидно, что даже если прицепить к такому составу второй «паровоз», готовый тянуть его в обратном направлении, это не приведёт к появлению двунаправленного транспорта.

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

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные положения диссертационной работы были представлены на Всероссийском симпозиуме «Клеточная биология на пороге XXI века» (Санкт-Петербург, 2000); конференции EMBO/EMBL “Centrosomes and spindle pole bodies” (Гейдельберг, 2002); I и II съездах Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003, 2007); практической конференции EMBO/FEBS по изучению цитоскелета (Госау, 2003); IX Международной конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005), Международном симпозиуме «Biological motility: basic research and practice» (Пушино, 2006); летней конференции

ASCB/ECF (Дижон, 2007), Международной конференции “Protein biosynthesis, structure and function” (Пушино, 2007), Международном симпозиуме «Biological motility: achievements and perspectives» (Пушино, 2008); школе-семинаре по проблемам организации внутриклеточного транспорта, цитоскелета и путей передачи сигнала (Санкт-Петербург, 2009); Международном симпозиуме “Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies” (Пушино, 2010), I Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2011); Международном симпозиуме “Biological motility. Fundamental and Applied Science”(Пушино, 2012); на XXXVIII-м конгрессе FEBS (Санкт-Петербург, 2013); на Всероссийском симпозиуме по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2013); на LXVI-м заседании Московского семинара по клеточной биологии 27.10.2002. и на заседаниях того же семинара 22.10.2009. и 02.10.2013., а также на ежегодных научных конференциях Института Белка РАН в Пушино в 2000г., 2002г., 2003г., 2008г., 2011г., 2013г., и на ежегодных конференциях Американского Общества Клеточной Биологии (ASCB) в 2001г., 2002г., 2005г., 2009г., 2010г., 2013г.

Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями в отечественных и зарубежных реферируемых научных журналах (см. список на стр. 202-203), а также показателями их цитируемости в международной системе Web of Science.

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, односторонность транспорта по актину определяется свойствами элементов цитоскелета, образующих транспортную сеть, а не наличием или отсутствием в цитоплазме соответствующих моторных белков.

3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Итак, внутриклеточный транспорт – это активный процесс перемещения мембранных органелл, везикул и отдельных белковых комплексов по элементам цитоскелета посредством моторных белков. Считается, что этот процесс является одним из фундаментальных свойств эукариотических клеток (Cramer, 2008). Как уже упоминалось во введении, в клетках животных параллельно существуют две транспортные сети: система микротрубочек, двунаправленный транспорт по которым осуществляется динеином и кинезинами; и, кроме того, сеть актиновых микрофиламентов, по которым грузы перемещаются лишь в одном направлении посредством миозинов. На примере процесса дисперсии пигментных гранул в меланофорах земноводных и рыб хорошо видно, что транспорт по этим двум цитоскелетным системам могут быть сопряжены друг с другом и осуществляется согласованно и одновременно (Rodionov et al, 1998).

В предлагаемом обзоре литературы освещены основные вопросы об устройстве тубулиновой и актиновой транспортной сетей, а также о работе моторных белков, перемещающих по ним органеллы. Часть опубликованных к настоящему времени работ, посвящённых данным вопросам, будут рассмотрены в обзоре литературы, а при обсуждении результатов, поскольку авторы данных работ использовали в качестве отправной точки для своих исследований наши результаты, изложенные ниже в соответствующем разделе диссертации.

ТУБУЛИНОВАЯ ТРАНСПОРТНАЯ СИСТЕМА

Основная транспортная система клеток животных состоит из так называемых микротрубочек, упорядоченных в цитоплазме благодаря работе центра организации, в роли которого обычно выступает центросома. Микротрубочки всех эукариот – животных, грибов и растений – сходны между собой по своим основным свойствам.

МИКРОТРУБОЧКИ – ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Глобулярный белок тубулин, из которого построена стенка микротрубочки, обладает кислыми свойствами и в деполимеризованном виде он представляет собой димер, состоящий из двух гомологичных субъединиц с молекулярной массой около 55 кДа каждая. Тубулин является ГТФазой, в процессе поляризации тубулина в микротрубочки стимулируется его ГТФазная активность, причём только в одной из субъединиц димера, которая получила

название β -субъединицы. Другая субъединица в тубулиновом димере получила, соответственно, название α -субъединицы (Davis et al, 1994). Длинная цепочка глобулярных молекул тубулина, в которой чередуются между собой α - и β -субъединицы, называется протофиламентом, который служит структурной основой для различных типов тубулиновых полимеров (Downing and Nogales, 1998; Mandell and Banker, 1995; Wade and Hyman, 1997). При полимеризации *in vivo* или *in vitro* в условиях, близких к физиологическим, тубулин образует микротрубочки; в то время как при изменении ионного состава среды при полимеризации *in vitro* тубулин может образовывать полимеры иной морфологии – плоские листы, закрученные нити и пр.

В микротрубочки может полимеризоваться только тубулин, содержащий ГТФ или его негидролизуемый аналог. Некоторые из белков, взаимодействующих с микротрубочками, например, белки кинетохоров хромосом, способны отличать ГТФ- и ГДФ-тубулин и предпочтительно связываются с участками микротрубочек, содержащими ГТФ-тубулин (Severin et al., 1997, Blocker et al., 1998). Энергия гидролиза ГТФ запасается в пространственной структуре микротрубочки и высвобождается при её разборке (Hyman and Karsenti, 1996). Растущая микротрубочка развивает силу в несколько пиконьютонов, направленную по ходу её роста (Dogterom and Yurke, 1997) – данный факт имеет большое значение для интерпретации ряда экспериментальных данных, приведённых ниже в данной работе.

ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРОТРУБОЧЕК

Микротрубочки *in vivo* находятся в динамическом равновесии со свободным тубулином клеток. *In vitro* микротрубочки полимеризуются в растворах тубулина, и система также быстро приходит к динамическому равновесию. В больших концентрациях тубулина возможно нарастание микротрубочки с обоих концов, что реализуется, вероятно, при начале сборки микротрубочки *in vitro*. Существует интервал концентраций тубулина, в котором на плюс-конце микротрубочки идёт в основном присоединение субъединиц, а на минус-конце – в основном отсоединение. При этом наблюдается псевдопередвижение микротрубочек – тредмиллинг, когда каждая точка микротрубочки неподвижна, но сама микротрубочка передвигается в направлении своего плюс-конца. Английское слово «treadmilling» переводится как хождение лошади по кругу при производстве, например, молотбы хлеба или при откачке воды из шахты. Реальное существование тредмиллинга микротрубочек было показано сначала *in vitro* (Hotani and Horio, 1988), а затем и *in vivo* (Rodionov and Borisov, 1997) при прижизненных наблюдениях микротрубочек в клетках, инъецированных

флуоресцентно меченым тубулином. *In vivo* тредмиллингу, скорость которого достигает 10 $\mu\text{м/мин}$, подвержены все микротрубочки в искусственно полученных фрагментах клеток (цитопластах) (Rodionov and Borisov, 1997a), и в некоторых клетках, искусственно лишённых centrosомы. Тредмиллинг оказывается, таким образом, естественным состоянием микротрубочки после достижения равновесия системы в концентрации тубулина, существующей *in vivo*.

При более низкой концентрации свободного тубулина наблюдается так называемая динамическая нестабильность микротрубочек – периодическая сборка и разборка, происходящие на плюс-конце. Нарастание плюс-концов микротрубочки, сменяющееся через 10-30 секунд их укорочением, а затем вновь нарастанием, является основным способом обмена микротрубочек практически во всех исследованных клетках, имеющих centrosому (например, Waterman-Storer and Salmon, 1997). Минус-конец большинства микротрубочек при этом закреплён на centrosоме, что снижает равновесную концентрацию тубулина в системе по сравнению с системой с двумя свободными концами микротрубочки. Минус-конец свободных микротрубочек в клетках, имеющих centrosому, почти постоянно находится в состоянии разборки. Часто в клетках можно наблюдать тредмиллинг отдельных свободных микротрубочек, сменяющийся через некоторое время их разборкой с обоих концов и исчезновением (Vorobjev et al, 1997; Waterman-Storer and Salmon, 1997). Это показывает, что тредмиллинг и динамическая нестабильность могут существовать в одной системе и вопрос состоит только в том, насколько плюс-конец микротрубочки в тех или иных условиях оказывается способным к разборке. Было показано, что динамика микротрубочек может выполнять в клетке механическую работу (Inoue and Salmon, 1995).

Концентрация тубулина в не-нервных клетках составляет, по приблизительным данным, около 1-2 мг/мл , в нейронах – несколько больше. В системах *in vitro* при такой концентрации соотношение микротрубочки/тубулин резко сдвинуто в сторону свободного тубулина, однако в клетках оно обычно составляет 3/1 – 1/1, то есть, сдвинуто в сторону микротрубочек (Zhai and Borisov, 1994). Скорость сборки и разборки микротрубочек при тредмиллинге и динамической нестабильности *in vivo* значительно больше, чем *in vitro* – иногда в несколько сот раз (Hotani and Horio, 1988). Поэтому сборка и разборка микротрубочек в клетках модулируется множеством различных белков, взаимодействующих с микротрубочками. Большинство таких белков расположены в так называемых центрах организации микротрубочек. Классическим центром организации микротрубочек в большинстве клеток животных является centrosома.

Centrosома (т.е. центральное тельце) была описана в более века назад Теодором Бовери (Boveri, 1888), и получила позднее своё название именно благодаря своему

центральному расположению в клетках. Уже тогда было выяснено, что centrosома фокусирует концы тонких оптически плотных цитоплазматических тяжей в интерфазных клетках и биполярные веретёна в клетках митотических.

ЦЕНТРОСОМА. ПРОЦЕССЫ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК: НУКЛЕАЦИЯ И ЗАЯКОРИВАНИЕ

Центросома – это единственная немембранная органелла в большинстве клеток позвоночных. Она занимает в клетке незначительный объём - 1-2 мкм³, и состоит из пары центриолей, окружённых перичентриолярным материалом, являющимся местом нуклеации (или затравки) микротрубочек (Gould and Borisy, 1990). Одни элементы перичентриолярного материала обеспечивают структурную поддержку для других белков, вовлечённых, в частности, в процесс нуклеации (Moritz *et al.*, 1995; Dichtenberg *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1997). Сами центриоли осуществляют собирание вместе и организацию компонентов centrosомы в соматических клетках – их разрушение антителами против стабилизированных центриолярных микротрубочек провоцирует дисперсию ассоциированного перичентриолярного материала (Bobinnec *et al.*, 1998). Микротрубочки стенок центриолей состоят в основном из α , β -тубулина, и γ -тубулин также выявляется как в микротрубочках триплетов, так и в центральной части центриолей (Moudjou *et al.*, 1996). В стенке центриолей содержится тектин, от которого, вероятно, зависит стабилизация микротрубочек (Steffen *et al.*, 1994).

Центросома является чрезвычайно сложной органеллой по своей ультраструктуре; кроме того, она поражает количеством образующих её белков, которых известно к настоящему времени уже более трёхсот (Воробьёв и Надеждина, 1987; Зиновкина и Надеждина, 1996).

Хотя centrosома выполняет в том числе и некоторые регуляторные функции – например, регуляция перехода из G1 в S-фазу клеточного цикла, мониторинг повреждений ДНК и пр., с точки зрения внутриклеточного транспорта она интересует нас именно как центр организации микротрубочек. В связи с этим нас интересуют осуществляемые ею функции нуклеации и заякоривания микротрубочек.

Основным белком, ответственным за нуклеацию, является γ -тубулин, расположенный на минус-конце микротрубочек (Keating and Borisy, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Wiese and Zheng, 2000). Ген γ -тубулина был идентифицирован как супрессор мутаций гена β -тубулина в *Aspergillus nidulans*. γ -тубулин имеет около 30% гомологичных аминокислотных остатков с α - и β -тубулинами и сходен с ними по предполагаемой вторичной и третичной структуре

(Oakley and Oakley, 1989). Содержание γ -тубулина в клетках составляет около 0,1% от α - и β -тубулинов. В настоящее время γ -тубулин найден у всех исследованных эукариот, хотя оказалось, что это менее консервативный белок, чем α - и β -тубулины.

У животных γ -тубулин локализован в основном в центросомах, а именно, в перицентриолярном материале в основании отходящих от центросомы микротрубочек. После экспериментальной разборки микротрубочек в перицентриолярном материале становятся видны колечки диаметром около 25 нм, содержащие γ -тубулин (Moritz et al., 1995). Цитоплазматический γ -тубулин обычно входит в состав сложных белковых комплексов. Комплексы γ -тубулина с другими белками, с молекулярной массой более 2000 кДа, были выделены из ооцитов *Xenopus*. Они имеют структуру открытых колечек – левозакрученных спиралей, состоящих из полутора витков, и имеющих диаметр около 25 нм, что совпадает с диаметром микротрубочки. Морфологически они очень похожи на содержащие γ -тубулин колечки в перицентриолярном материале (Zheng et al., 1995). Такие комплексы γ -тубулина называли γ -tubulin ring complex - γ TuRC или γ -сомой (гаммасомой). γ TuRC можно выделить и из других источников, возможно, они встречаются в клетках повсеместно. γ -тубулин образует комплексы и с другими клеточными белками – шаперонами TCP-1, с которыми одновременно также связаны α , β -тубулины и актин (Brown et al., 1996).

Хотя выделенные γ TuRC способны нуклеировать микротрубочки *in vitro*, для сборки их на центросомах необходимы дополнительные факторы (Moritz et al., 1998; Gunawardane et al., 2000). Добавление белка Asp (abnormal spindle protein) у *Drosophila melanogaster* вместе с выделенными γ TuRC восстанавливает нуклеацию микротрубочек на обработанной солью центросоме – следовательно, этот белок может служить для заякоривания γ TuRC на центросоме во время митоза (do Carmo Avides and Glover, 1999). Интересна роль киназ Polo и Aurora, локализованных на центросоме и необходимых для поддержания её целостности и для её деления, соответственно (Nigg, 2001). Мутация *polo* у *Drosophila melanogaster* нарушает организацию митотических веретён и связывание γ -тубулина с центросомой (Donaldson et al., 2001; Do Carmo Avides et al., 2001). Экстракты Polo-мутантных эмбрионов не могут вернуть обработанным солью центросомам образовывать звёзды микротрубочек. Однако, это можно сделать добавлением фосфорилированного Asp или активной киназы Polo. Asp и Polo со-иммунопреципитируются друг с другом и с γ -тубулином (Feng et al., 1999). Кроме того, Polo фосфорилирует Asp *in vitro* (Do Carmo Avides et al., 2001). Следовательно, возможным механизмом сборки митотической центросомы является активированная посредством Polo связывание и заякоривание белком Asp γ -

тубулина на центросомах. Известно также, что белок перицентрин тоже вовлечён в соби́рание γ TuRC на центросомах клеток позвоночных (DICTENBERG *et al.*, 1998).

Процесс заякоривания микротрубочек на центросоме, по-видимому, очень сложен. Во множестве работ описывается неупорядоченная система микротрубочек в клетках с нормальной нуклеирующей активностью центросом. Список белков, ингибирование которых (путём антител, RNAi, доминантно-негативных конструкторов и т.п.) приводит к хаотизации микротрубочек, включает в себя центросомные белки PCM-1 (Dammermann and Merdes, 2002), найнеин (Dammermann and Merdes, 2002; Delgehyr *et al.*, 2005), BBS4 (Kim *et al.*, 2004), Cep135 (Uetake *et al.*, 2004), изоформу 4.1R (Perez-Ferreiro *et al.*, 2004), Nlp (Casenghi *et al.*, 2005), а также CAP350 и FOP (Yan *et al.*, 2006). В целом, можно сказать, что процесс заякоривания микротрубочек на центросоме ещё недостаточно изучен.

Некоторые центросомные белки доставляются к центросоме посредством моторного белка динеина (Young *et al.*, 2000; Dammermann and Merdes, 2002; Casenghi *et al.*, 2005; Fumoto *et al.*, 2006). Динактин вместе с EB-1 является частью перицентриолярного скэффолда центросом (Quintyne *et al.*, 1999; Askham *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2006) и связывается с функционально важными белками, такими как Cep135, BBS4 и CAP350/FOP (Kim *et al.*, 2004; Uetake *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). Существует пул динеина, также связанный с центросомой и способный взаимодействовать с динактином (Quintyne and Schroer, 2002). Роль этого моторного белка в процессах организации микротрубочек будет рассмотрена ниже.

ПОЗИЦИОНИРОВАНИЕ ЦЕНТРОСОМЫ В КЛЕТКЕ

Хорошо известно, что позиционирование и ориентация ядер (Burke and Roux, 2009), мембранных органелл (Wada and Suetsugu, 2004) и митотических веретён (Grill *et al.*, 2001) в клетках исключительно важны для их жизнедеятельности как в норме так и при различных патологиях. Сходным образом, локализация центросомы играет существенную роль при дифференцировке нейронов и эпителия, при поляризации клетки, при позиционирования и ориентации веретена деления, а также контролирует клеточную подвижность (Manneville and Etienne-Manneville, 2006). Какие механизмы этим управляют – до последнего времени оставалось фундаментальным вопросом клеточной организации. В широком смысле, три фактора могут отвечать за пространственную организацию клетки, обеспечивая принцип обратной связи – архитектурная гетерогенность клетки, сигнальные механизмы диффузии и механика цитоскелетной сети (Mullins, 2010). В этой работе рассматривается частная проблема – как именно центросома находит клеточный центр в интерфазной клетке

животных. Выяснилось, что в данном случае третий фактор, механика цитоскелета, играет решающую роль (см. ниже в разделе «результаты и обсуждение»). Что же было известно про позиционирование центросомы до этого?

Итак, данная органелла получила своё название благодаря тому, что в животной клетке всегда расположена в её геометрическом центре. Логично предположить, что для подобного расположения центросомы необходима работа специализированных клеточных механизмов, активно его поддерживающих. Ранее было показано, что для правильного центрирования центросомы требуется поляризованная радиальная сеть цитоплазматических микротрубочек (Euteneuer and Schliwa, 1992; Koonce *et al.*, 1999). Таким образом, правильное положение центросомы к клетке, по-видимому, зависит от сил, приложенных к астральным микротрубочкам, заякоренных на центросоме.

Чтобы поддерживать местоположение центросомы в клеточном центре, несколько различных сил, приложенных к комплексу центросома-микротрубочки, могут действовать поодиночке или в комбинации друг с другом. На этот счёт различными авторами было сделано несколько предположений. В частности, предполагалось, что силами, действующими на цитоплазматические микротрубочки, являются толкающие силы, генерируемые на их растущих плюс-концах за счёт «упирания» их в плазмалемму (Inoue and Salmon, 1995). Другие авторы полагали, что это может быть тянущее усилие, генерируемое заякоренными в клеточном кортексе моторами (Dujardin and Vallee, 2002; Gundersen, 2002) или же моторами, заякоренными где-либо в цитоплазме (Hamaguchi and Hiramoto, 1986). Множество авторов склонялось к мысли, что движение центросомы может быть актин-зависимым (Mikhailov and Gundersen, 1995; Waterman-Storer and Salmon, 1997; Yvon and Wadsworth, 2000; Salmon *et al.*, 2002). Соответственно, одна или несколько из этих сил могли бы быть ответственны за поддержание центральной позиции центросомы.

Как известно, рост микротрубочек может продуцировать значительное механическое усилие (Dogterom and Yurke, 1997). Свободные дистальные (плюс-) концы микротрубочек, демонстрирующие динамическую нестабильность, могут надавливать на плазматическую мембрану и создавать толкающую силу, перемещающую центросому с прикреплёнными микротрубочками прочь от краёв клетки. Так как в среднем большее количество микротрубочек достигнет ближнего к центросоме участка кортекса, результирующая толкающая сила будет сильнее в участках, более проксимальных по отношению к краю клетки. Соответственно, если центросома занимает позицию в клеточном центре, противонаправленные силы будут сбалансированы. Было доказано, что полимеризации микротрубочек достаточно для центрирования звёзд микротрубочек *in vitro* в микроячейках

(Faivre-Moskalenko and Dogterom, 2002) или для позиционирования митотических веретён в клетках дрожжей (Tran *et al.*, 2001).

Центральная позиция centrosомы также может быть обусловлена толкающим усилием на микротрубочки со стороны актомиозиновой системы. Микротрубочки физически контактируют с актиновым цитоскелетом и, следовательно, подвержены силам, продуцируемым центростремительным током актина. Непрерывный рост актиновых филаментов на краю клетки, возможно, сопряжённый с активностью миозиновых моторов, приводит к образованию ретроградного тока актиновых филаментов по направлению к центру клетки (Cramer, 1997; Wittmann and Waterman-Storer, 2001). Для существования центростремительного тока требуется сократимость актиновой сети, которая зависит от активности миозина и регулируется малой GTPазой RhoA (Cramer, 1997; Wittmann and Waterman-Storer, 2001). Такой центростремительный ток может создавать значительное механическое усилие. Было показано, что он в состоянии перемещать к центру клетки микротрубочки, заякоренные на актиновых филаментах (Salmon *et al.*, 2002).

Микротрубочки также могут подтягиваться минус-концевыми моторами, заякоренными в клеточном кортексе или в цитоплазме, такими, как динеин. Динеин, заякоренный в клеточном кортексе (на плазмалемме), может связывать микротрубочки и пытаться передвигаться по ним к их расположенному в центре клетки минус-концу. Но это приводит лишь к натяжению самой микротрубочки, поскольку кортекс механически прочен. Механизмы связывания динеина с плазмалеммой (кортексом) пока не изучены. Однако ясно, что натягивание клеточных микротрубочек – важная функция динеина. Так, динеин содержится в клеточном кортексе у дрожжей, где он тянет на себя микротрубочки, связанные с ядром, и тем самым втягивает делящееся ядро в почку во время митоза (Kahana *et al.*, 1998; Adams, Cooper, 2000). В этом процессе динеин активируется белком Pac1 - дрожжевым аналогом белка LIS1 (Lee *et al.*, 2003). Динеиновые моторы вовлечены в реориентацию centrosомы во время поляризации клетки и в асимметричное расположение митотических веретён у *S. cerevisiae* и *C. elegans* (Eshel *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Skop and White, 1998; Gonczy *et al.*, 1999).

Динеин вовлечён также в позиционирование астральных микротрубочек и митотических веретён в клетках млекопитающих и у *Dictyostelium amoeba* (Koonce *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; O'Connell and Wang, 2000). В свободно движущихся амёбах *Dictyostelium* позиция centrosомы постоянно изменяется с интервалом в несколько секунд, следуя за выдвиганием псевдоподий (Ueda *et al.*, 1997), и таким образом сохраняя свою позицию в центре клетки. При ингибировании динеина centrosома не утрачивает связи с микротрубочками, но смещается из своего центрального положения в клетке к периферии и

начинает кругами перемещаться по клетке. При этом за ней тянется шлейф микротрубочек, напоминающий хвост кометы (Koonce et al., 1999). Считается, что при ингибировании динеина исчезают некие растягивающие силы, приложенные к радиально отходящим от centrosомы и взаимодействующим с кортексом микротрубочкам, что и заставляет centrosому свободно перемещаться по клетке под действием каких-то других моторных белков. Более подробно баланс сил, приложенных к centrosоме, будет рассмотрен ниже в разделе «Результаты и обсуждение».

В заключение данного раздела нельзя не упомянуть ещё об одном явлении, которое способно в ряде случаев определять положение centrosомы в клетке – а именно, о существовании связи centrosома-ядро.

СВЯЗЬ ЦЕНТРОСОМЫ С КЛЕТОЧНЫМ ЯДРОМ

Мысль о существовании некой структурной связи между ядром и centrosомой выдвигалась довольно давно, и подобное предположение было основано на ряде экспериментальных фактов. Во-первых, обычно в клетках животных centrosома находится поблизости от ядра, и движение этих органелл скоординировано. В качестве примеров можно привести завершение синцитиальной стадии развития эмбриона дрозофилы (Archambault and Pinson, 2010) или же процесс формирования глаза у той же дрозофилы (Mosley-Bishop et al., 1999; Patterson et al., 2004; Kracklauer et al., 2007), когда centrosома движется вслед за ядром в апикальную часть клетки. Во-вторых, препараты выделенных ядер зачастую содержат также и centrosомы, в особенности если процедуру гомогенизации клеток проводить в щадящих условиях (Nadezhdina et al., 1979). И, наконец, в-третьих, во время поздней интерфазы и профазы митоза дочерняя и материнская centrosомы разделяются и перемещаются вдоль ядерной оболочки. Вплоть до разрушения ядерной оболочки, centrosомы тесно ассоциированы с ней в ходе этого процесса «разъезжания» друг от друга, даже когда находятся уже на противоположных сторонах ядра (Gonczy et al., 1999). Ядра, искусственно перемещаемые в сторону от профазных звёзд микротрубочек, притягиваются к ним обратно после окончания такого воздействия (Aronson, 1971).

В принципе, можно предположить, что никакой специфической физической связи между ядром и centrosомой нет, просто обе эти органеллы расположены в центре клетки и перемещаются одновременно, под действием сходных сил. Если же такая связь существует, то можно предположить два различных варианта её происхождения:

(а): Centrosома связана с ядром посредством отходящих от неё микротрубочек и прикрепленных к ним моторных белков; (б): Существуют некие специальные фибриллы,

связывающие центросому и ядро. Какие существуют экспериментальные подтверждения такой связи, какова бы не была её природа?

Известно, что в интерфазных фибробластоподобных клетках часто можно наблюдать вращение ядер, причём это вращение непосредственно зависит от микротрубочек и динеина (Levy and Holzbaur, 2008; Gerashchenko et al., 2009; Wu et al., 2011). Подобное вращение наблюдали также на ранних стадиях развития эмбрионов *C.elegans* (Fridolfsson and Starr, 2010). Было показано, что силы, вращающие ядро, возникают как результат ассиметрии звезды микротрубочек, расположенных поблизости от него (Wu et al., 2011), и генерируются связанными с ядром молекулами моторного белка динеина, который стремится сдвинуть ядро по направлению к минус-концам отходящих от центросомы микротрубочек. Следует особо отметить, что во время такого вращения ядер центросомы остаются на месте (Levy and Holzbaur, 2008), и это говорит о том, что специфический линкер между центросомой и ядром либо в высшей степени динамичен, либо просто недостаточно крепок, чтобы противостоять таким силам.

Физическая связь между ядром и центросомой была выявлена *in vitro* после разборки микротрубочек. После выделения ядер из печени крыс (Bornens, 1977; Nadezhdina et al., 1979) или из культивируемых клеток (Gould and Borisy, 1977; Maro and Bornens, 1980; Kuriyama and Borisy, 1981), вокруг ядер оставались цитоплазматические фрагменты, не содержащие микротрубочек, но содержащие при этом центросомы. В этих случаях центриоли были окружены неким фибриллярным материалом, и эти фибриллы достигали поверхности ядер. После обработки детергентом количество центриолей в препаратах ядер не уменьшалось, хотя обе мембраны ядерной оболочки при этом исчезали полностью. В этих препаратах были обнаружены некие филаменты диаметром около 10 нм, расположенные непосредственно между центросомами и ядрами (Nadezhdina et al, 1979). Интересно, что если предварительно обработать клетки цитохалазином Б, комплекс ядро-центросома в дальнейшем легко разрушить в системе *in vitro* путём центрифугирования в сахарозе (Maro and Bornens, 1980). Это говорит о том, что в связи ядра и центросомы принимают участие актиновые филаменты или ещё некие актин-содержащие структуры. Более того, центрифугирование живых клеток при добавлении цитохалазина Б приводит к чёткому разделению центросом и ядер – центросомы остаются в безъядерных цитопластах, а так называемые кариопласты содержат ядра без центросом (Shay et al., 1974). Предположили, что центросомы удерживаются в цитопластах системой микротрубочек – и действительно, после воздействия на клетки одновременно цитохалазина Б и колцемида (или нокодазола) и последующего центрифугирования, центросомы оказываются в кариопластах вместе с ядром.

Смещение ядер в клетках после центрифугирования клеток в монослое приводит также к смещениям центросом. Расстояние, на которое смещается центросома, не зависит в данном случае от микротрубочек, и, более того, смещения центросом не наблюдается после разрушения актиновых филаментов (Fais et al., 1984). Эти данные противоречат идее о том, что микротрубочки являются единственным связующим звеном между центросомой и ядром и говорят о роли актина или взаимодействующих с ним белков в этом процессе.

За последние годы было получено множество экспериментальных данных о возможном участии целого ряда белков в осуществлении непосредственной связи центросома-ядро. Перечень этих белков с данными, на основании которых был сделан вывод об их участии в такой связи, приведён в таблице 1. Среди белков, вовлечённых в осуществление взаимодействия ядра и цитоскелетных структур, особенно следует выделить белки семейств KASH (от Klarsicht, ANC-1 и Syne-1) и SUN (от Sud1 и Unc-84). Белки, содержащие SUN-домен, локализованы на внутренней ядерной оболочке и рекрутируют белки, содержащие KASH-домен, которые в свою очередь выходят из ядра наружу в цитоплазму и взаимодействуют непосредственно с элементами цитоскелета (Crisp et al., 2006; McGee et al., 2006; Padmakumar et al., 2005). Таким образом, белки KASH и SUN образуют своеобразные мостики между двумя мембранами ядерной оболочки – LINK-комплексы (Razafsky and Hodzic, 2009). Многие из KASH белков содержат почти 9000 аминокислотных остатков и теоретически могут достигать в длину 25 микрометров. Конечно, в клетках эти полипептидные цепи фолдированы, и их фактическая длина гораздо меньше предсказанной по первичной структуре – но, тем не менее, молекулы столь длинных белков легко могут образовать 2-микрометровый мостик между ядром и центросомой (рис.1).

Итак, сам по себе эффект связывания ядра с центросомой был описан более 40 лет назад (Aronson, 1971; Bornens, 1977), но до сих пор имеющихся экспериментальных данных явно недостаточно для описания всех аспектов этого явления. В целом, можно предположить, что связь центросомы с ядром может осуществляться в клетках животных при помощи различных механизмов, и многообразие способов такого связывания обеспечивает возможность регуляции перемещения и позиционирования как ядра, так и центросомы в каждом конкретном случае. Нередко прямая связь центросомы и ядра отсутствует, и они взаимодействуют лишь посредством заякоренного на ядерной оболочке динеина, движущегося по отходящим от центросомы микротрубочкам. Это требует, помимо всего прочего, специальной регуляции активности динеина в различных компартментах клетки, и в частности – локальной регуляции динеина у поверхности ядра. Различные механизмы связи могут пересекаться друг с другом – в частности, часть динеина связывается с ядерной оболочкой посредством LINC. LINC-связанный динеин может соперничать с

KASH белками и/или актином за осуществление такой связи с центросомой; с другой стороны, нельзя исключать возможность и участия самого динеина в осуществлении такой структурной связи.

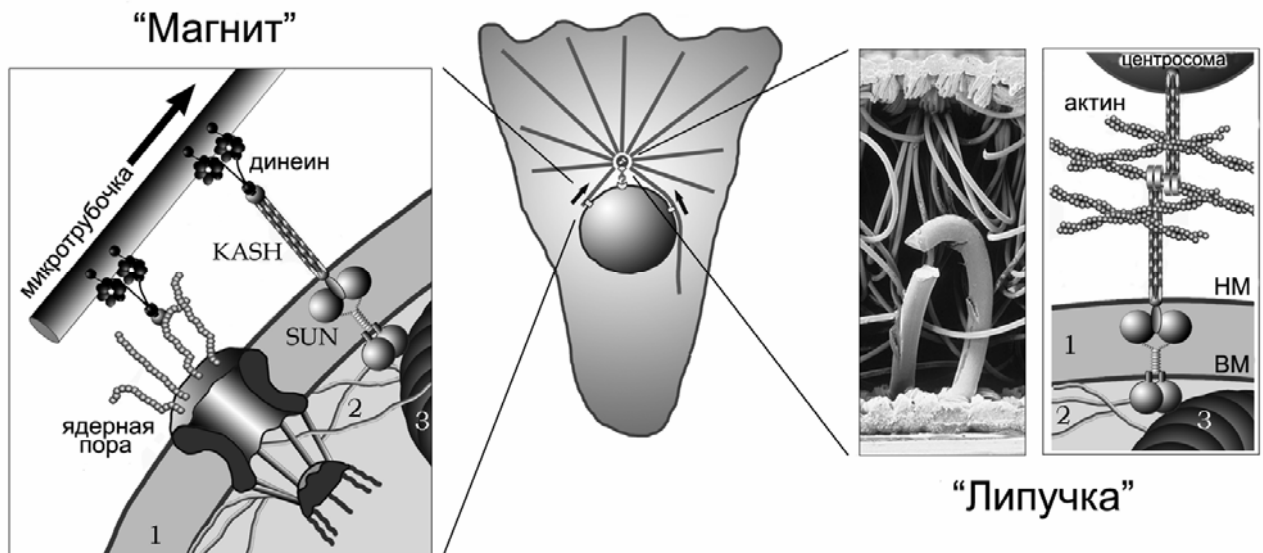


Рисунок 1. Схема, иллюстрирующая два возможных варианта связи между ядром и центросомой – так называемые «магнит» и «липучка».

Чёрными стрелками показано направление тянущих сил, генерируемых динеиновыми моторами и приложенных к микротрубочкам. 1 – перинуклеарное пространство 2 – ламины 3 – хроматин НМ – наружная мембрана ядерной оболочки ВМ – внутренняя мембрана ядерной оболочки

На схеме показано, что участие белков KASH/SUN в одном из двух вероятных механизмов взаимодействия между ядром и центросомой не исключает автоматически их участия в другом – следовательно, эти механизмы не являются взаимоисключающими. Микрофотография застёжки-«липучки», которая иллюстрирует аналогию с множеством запутанных фибрилл, цепляющихся за крючки на противоположной поверхности, взята из базы SCIENCE PHOTO LIBRARY/BARCROFT MEDIA.

ТАБЛИЦА 1. БЕЛКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В СВЯЗИ ЯДРА И ЦЕНТРОСОМЫ

Название белка	Почему отнесён к белкам, участвующим в связи ядро-центросома	Специфическая функция в клетке (если известна)	Источник
Актин	Разборка актиновых филаментов нарушает связь ядра и центросомы	Образует тонкие филаменты повсеместно в цитоплазме	Shay et al, 1974; Hubert et al., 2011
DISC1	В случае нарушения работы DISC1 увеличивается расстояние между ядром и центросомой и нарушается миграция нейронов	Структурный белок, связанный с динеин-динактиновым комплексом	Eastwood et al., 2010
Продукт экспрессии гена <i>Asp</i>	Мутации приводят к многочисленным свободным центросомам в эмбрионах <i>Drosophila</i>	Структурный белок с неизвестными функциями	Gonzalez et al., 1990; Wakefield et al., 2001
BICD2, NudE/EL	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Структурный белок, связанный с динеин-динактиновым комплексом	Splinter et al., 2010; Tanenbaum et al., 2010; Bolhy et al., 2011
CENP-F	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Адаптерный белок для прикрепления динеин/динактина к мембране ядерной оболочки (известен также как митозин)	Bolhy et al., 2011
Киназа Chk2/Mnk	При нарушениях появляются свободные центросомы в эмбрионах <i>Drosophila</i>	Киназа, активируемая повреждениями ДНК	Sibon et al., 2000; Takada et al., 2003
Динеин	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Минус-концевой моторный белок микротрубочек	Splinter et al., 2010
Эмерин (Emerin)	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Белок ламины ядерной оболочки	Salpingidou et al., 2007

Митотическая киназа Greatwall/MAST-L	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Антагонист киназы Polo	Archambault et al, 2007
Hook3	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой в мигрирующих нейронах	Ортолог ZYG12 у млекопитающих. Длинный фибриллярный белок	Walenta et al., 2001
Катанин (katanin) p60	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Белок, разрезающий микротрубочки	Toyo-Oka et al., 2005
Клароид (klaroid)	Мутации приводят к откреплению центросомы от ядра, которое располагается в базальной части после миграции центросомы к апикальной поверхности глазного диска	Белок семейства SUN, партнёр Klarsicht	Kracklauer et al, 2007
Klarsicht	То же, что и Klaroid	Белок семейства KASH, партнёр Klaroid	Mosley-Bishop et al, 1999
Map205	Ингибирование приводит к откреплению центросомы от ядра	Партнёр Polo, секвестрирующий киназу. То же, что и greatwall/MAST-L	Archambault et al, 2008
Продукт экспрессии гена <i>Mars</i>	Мутации приводят к откреплению центросом от митотических веретён в эмбрионах <i>Drosophila</i>	Структурный белок с неизвестными функциями	Bennett, Alphey, 2004; Zhang X et al., 2009
Несприн 1/2 (Nesprin-1/2), или Syn-1/2	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Связывается с динеин/динактином и с кинезином и соединяет их с ядерной оболочкой. Экспрессируется в предшественниках нервных клеток	Zhang X et al., 2010
Несприн 3 (Nesprin-3)	Ингибирование увеличивает расстояние между ядром и центросомой	Организует перинуклеарный цитоскелет в клетках эндотелия аорты человека	Morgan et al., 2011

PCM-1	Связан с Hook3 Длинный фибриллярный белок перичентриольного материала		Ge et al., 2010
Киназа Polo	Ингибирование у <i>Drosophila</i> приводит к откреплению центросомы от ядра	Митотическая киназа	Sunkel, Glover, 1988
RanBP2/Nup358, Nup133	Прикрепляет динеин/динактин к ядерной оболочке	Белок ядерного порового комп- лекса. Связывается с динеином и динак- тином.	Bolhy et al., 2011
Spag4/Giacomo	Связывается с Yuri Gagarin Необходим для связи базального тельца жгутика с ядром сперматиды		Kracklauer et al., 2010
SUN-1	Белок семейства SUN; выступает партнёром ZYG-12 в качестве KASH-белка		Minn et al., 2009
TBCCD1	Ингибирование приводит к быст- рому увеличению расстояния между центросомой и ядром	Содержит домен 1 кофактора тубулина C (TBCC-домен)	Goncalves et al., 2010
Юрий Гагарин (Yuri Gagarin)	Мутации приводят к абберациям миграции ядер во время спермато- генеза у <i>Drosophila</i>	Связывается с наружной ядерной оболочкой, вовле- чён также в орга- низацию актина.	Texada et al., 2008; Kracklauer et al, 2010
ZYG-12	Мутации приводят к дефектам мигра- ции пронуклеуса в зиготах <i>C.elegans</i>	Димер связывается с ядерной оболочкой: одна из молекул с наружной мембра- ной и одна с внутренней	Malone et al., 2003.

ПЛЮС-КОНЦЕВОЙ ТРАНСПОРТ ПО МИКРОТРУБОЧКАМ: КИНЕЗИНЫ

Ещё в начале восьмидесятых годов прошлого века прижизненное исследование аксонов нейронов посредством световой микроскопии, совмещённое с биохимическими исследованиями аксонального транспорта, продемонстрировало, что в аксонах присутствуют быстро движущиеся мембранные органеллы (Grafstein and Forman, 1980). Электронно-микроскопические исследования показали присутствие неких коротких структур, образывавших как бы мостики между такими органеллами и микротрубочками. Подобные мостики и стали кандидатами в так называемые моторные белки, осуществляющие транспорт по микротрубочкам (Hirokawa, 1982). Результатом более поздних исследований с применением усиленной дифференциально-контрастной видеомикроскопии, совмещённой с биохимическим анализом, стало открытие связывающегося с микротрубочками белка кинезина, который оказался микротрубочки-активируемой аденозин-трифосфатазой (т.е. АТФазой) весом в 380 кДа (Brady et al, 1982; Vale et al, 1985).

Молекула кинезина состоит из двух тяжёлых цепей по 120 кД каждая, и двух 64-килодальтонных лёгких цепей (Vale et al, 1985; Brady, 1985; Schnapp et al, 1985; Bloom et al, 1988). У этой молекулы есть палочковидная структура, состоящая из двух глобулярных так называемых голов (10 нм в диаметре); кроме того, присутствует ножка и веерообразное окончание молекулы – которая в общей сложности имеет в длину 80 нм. Глобулярные головы состоят из тяжёлых цепей кинезина, которые связываются с микротрубочками (Hirokawa et al., 1989; Scholey et al, 1989), а лёгкие цепи образуют веерообразную оконечность молекулы (Hirokawa et al., 1989). гДНК тяжёлой цепи кинезина дрозофилы кодирует белок в 975 аминокислотных остатков, в котором N-концевые 350 остатков образуют моторный домен, связывающийся с микротрубочками, затем альфа-спиральный, обогащённый суперскрученными участками черенковый домен, который участвует в образовании димера; и, наконец, хвостовой домен (Yang et al, 1989).

Многочисленные исследования показали, что кинезин является плюс-концевым моторным белком микротрубочек, осуществляющим антероградный транспорт мембранных органелл (Pfister et al, 1989; Hirokawa et al, 1991; Brady et al, 1990). Систематические молекулярно-биологические исследования генов суперсемейства кинезинов, которые кодируют белки, содержащие АТФ-связывающие и микротрубочки-связывающие последовательности, привели к открытию новых белков этого суперсемейства, также имеющих отношение к транспорту органелл – одиннадцать из мозга мыши (Hirokawa, 1996; Aizawa H. et al, 1992) и три из дрозофилы (Endow and Hatsumi, 1991). Более того, были выявлены соответствующие моторные белки у мутантов *C. Elegans*, обладающих либо

плохим и нескоординированным движением – в частности, Unc104 (Hall and Hedgecock, 1991; Otsuka et al, 1991), либо нарушенным хемотаксисом, в частности Osm3 (Tabish et al, 1995). Другие моторные белки (KRP_{85/95}) были идентифицированы в экстрактах морского ежа (Gibbons et al, 1994), крысы (Tanaka et al, 1995) и человека (Vaisberg et al, 1996).

Суперсемейство кинезинов включает в себя три основных типа белков, отличающихся расположением моторного домена в молекуле: это N-тип (с моторным доменом, расположенным на N-конце), C-тип (с моторным доменом, расположенным на C-конце), и M-тип (от англ. middle), где моторный домен расположен посередине молекулы. Рассмотрим вкратце представителей всех трёх типов.

Оригинальным свойством белков C-типа, являющихся неканоническими представителями этого суперсемейства, является то, что они представлены моторами,двигающимися по направлению к минус-концам микротрубочек, что обуславливает их участие в процессах митоза и мейоза (Endow et al, 1990; McDonald and Goldstein, 1990; McDonald et al, 1990, Meluh and Rose, 1990). Это, в частности, белок Kar3 у дрожжей и *ncd* у дрозофилы. Белок KIFC2 находится в соме и в дендритах нейронов и перемещает мембранные органеллы (Saito et al, 1997).

Единственный белок M-типа, экспрессирующийся практически во всех тканях, особенно в развивающихся аксонах на ранних стадиях роста – KIF2. Он имеет в длину 716 аминокислотных остатков и образует димер – глобулу диаметром 16 нм; функция его заключается в том, что он транспортирует везикулы, локализованные преимущественно в конусе роста нейронов (Aizawa et al, 1992; Hirokawa, 1993). N-концевой домен KIF2, содержащий 189 а/к, также как и центральный моторный домен, имеют глобулярную структуру; а C-концевой участок содержит альфа-спиральные последовательности.

Большинство представителей суперсемейства кинезинов, относятся к белкам N-типа. Кинезины N-типа обладают тканеспецифичной экспрессией – в частности, человеческий KIF5B и мышинный HsuKHC экспрессируются повсеместно, тогда как человеческие KIF5A, KIF5C и мышинный HsnKHC экспрессируются лишь в нервной ткани (Aizawa et al, 1992; Hirokawa, 1993; Hirokawa, 1996; Nakagawa et al, 1997; Navone et al, 1992; Niclas et al, 1994). Было показано, что кинезин, в качестве плюс-концевого моторного белка микротрубочек, участвует в таких процессах как аксональный антероградный транспорт (Gho et al, 1992; Hirokawa et al, 1991), распределение по цитоплазме митохондрий (Tanaka et al, 1998), транспорт везикул между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи (Lippincott-Schwartz, 1995), базолатеральный транспорт в эпителиальных клетках (98) и вытягивание лизосом (Hollenbeck and Swanson, 1990; Nakata and Hirokawa, 1995). Представитель кинезинов N-типа, белок Unc104 в *C. elegance* является нейрон-специфичным

мотором, предназначенным для антероградного транспорта синаптических пузырьков вдоль аксональных микротрубочек (Hall and Hedgecock, 1991; Otsuka et al, 1991). Его аналог KIF1A, специфически экспрессирующийся в нейронах мышей (Okada et al, 1995), является самым быстрым плюс-концевым микротрубочковым мотором млекопитающих, осуществляющим антероградный транспорт в аксонах. Его скорость, измеренная в системе *in vitro*, достигала полутора микрометров в секунду. В отличие от KIF1A, транспортирующего предшественники синаптических везикул, другой белок этого семейства, KIF1B, служит для осуществления антероградного транспорта других органелл, а именно митохондрий (Nangaku et al, 1994).

Помимо семейства белков Unc/KIF1, к N-типу кинезинов относятся также белки семейства KIF3/KRP_{85/95}. Гетеродимер KIF3A/KIF3B, соединяясь с белком KAP3, образует функционально активную гетеротримерную молекулу, которая перемещается в качестве плюс-концевого мотора по микротрубочкам со скоростью 0,3 мкм/с (Aizawa et al, 1992; Hirokawa, 1993; Kondo et al, 1994; Yamazaki et al, 1995; Yamazaki et al, 1996). Подобные кинезины осуществляют антероградный транспорт мембранных органелл диаметром 90-160 нм, которые не транспортируются обычным кинезином и KIF2 (Kondo et al, 1994; Yamazaki et al, 1995).

К N-типу кинезинов относится белок плодовой мушки дрозофилы Klp67A, который является митотическим плюс-концевым мотором, отвечающим за локализацию митохондрий в области полюса митотического веретена (Pereira et al, 1997).

Ещё одно семейство N-концевых кинезинов – KIF4 – находятся в интерфазе на мембранах органелл в цитоплазме фибробластов и в конусе роста дифференцирующихся нейронов; а во время митоза локализованы с мембранными органеллами в митотическом веретене (Sekine et al, 1994). Описанный у цыплят аналог KIF4 – хромокинезин – связывается с хромосомами и работает в качестве митотического мотора, грузом для которого является ДНК (Wang and Adler, 1995). KIF4 также содержит ДНК-связывающий домен, сходный с таковым у хромокинезина, и поэтому может иметь дополнительную функцию, такую, например, как транспорт мРНК.

В целом, можно сделать вывод, что транспорт по направлению к динамичным плюс-концам микротрубочек, расходящихся от центросомы по направлению к клеточной периферии, осуществляется в клетках кинезинами. Таким образом, молекулярные моторы кинезины, наряду с динеинами, по сути отвечают за все перемещения вдоль микротрубочек в цитоплазме животных клеток

МИНУС-КОНЦЕВОЙ ТРАНСПОРТ ПО МИКРОТРУБОЧКАМ: ДИНЕИН

Динеины являются одним из двух известных семейств белков-моторов, перемещающих грузы вдоль микротрубочек за счёт гидролиза АТФ. У позвоночных существует примерно пятнадцать форм динеина, большинство из которых являются «аксонемными», то есть играющими роль в движении ресничек и жгутиков. Лишь две формы динеина являются «цитоплазматическими». Одна из них, изначально названная MAP1C (белок 1C, ассоциированный с микротрубочками) (Paschal et al., 1987), впоследствии получила название цитоплазматического динеина 1. Динеин 1 обильно экспрессируется в клетках и выполняет многочисленные функции - транспорт клеточных органелл, некоторые аспекты поведения хромосом, ориентация митотического веретена, перемещение ядра, клеточная локомоция, которые ниже будут рассмотрены подробно.

Другая форма цитоплазматического динеина (динеин 1b или динеин 2), имеет очень ограниченные функции (Pazour et al., 1999). В тканях он встречается практически исключительно в клетках с ресничками и в различных подвижных и неподвижных ресничных структурах (Mikami et al., 2002). Вероятнее всего, динеин 2 отвечает за транспорт из дистального в проксимальный конец аксонемных структур, что необходимо для удаления изношенных компонентов ресничек или жгутиков. Кроме того, в сетчатке глаза быстрый ретроградный транспорт белка трансдукцина в ответ на световое воздействие, по всей видимости, осуществляется при помощи динеина 2 (Sokolov et al., 2002). В любом случае, основную роль в цитоплазме клетки играет цитоплазматический динеин 1, о котором и пойдёт речь в дальнейшем.

СТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ ДИНЕИНА И ДИНАКТИНОВОГО КОМПЛЕКСА

Цитоплазматический динеин (dynein cytoplasmic, DC) – это мультисубъединичный комплекс (Рис. 2). Общая молекулярная масса белка достигает 1,2 МДа. В состав комплекса входят две тяжёлые цепи (dynein cytoplasmic heavy chain - DCHC или просто DHC) по 530 кДа каждая, три промежуточных цепи (dynein cytoplasmic intermediate chain - DCIC или DIC) по 74 кДа, четыре лёгкие промежуточные цепи (dynein cytoplasmic light intermediate chain - DCLIC или DLIC) по 55 кДа, а также несколько лёгких цепей (dynein cytoplasmic light chain - DCLC или DLC) массой по 8-20 кДа (Hirokawa, 1998).

Динеин относится к классу AAA-белков (ATPase Associated with diverse cellular Activities). В каждом его моторном домене, входящем в состав DHC, локализовано 6 AAA-доменов, первые четыре из которых способны гидролизовать АТФ. Обычно в роли АТФ-азы

выступают домены AAA1 и AAA3, аффинность которых к АТФ значительно выше, чем у остальных. AAA-домены образуют тороидальную структуру, и между четвертым и пятым AAA доменами находится выступ из 325 аминокислот длиной 15 нм, на конце которого расположен сайт связывания с микротрубочками. Гидролиз АТФ приводит к вращению тора AAA-доменов и смещению выступа. Именно таким путём осуществляется перемещение динеина по микротрубочкам (Vallee et al., 2004; Mallik and Gross, 2004).

В 1991 году впервые было замечено, что для перемещений *in vitro* мембранных пузырьков вдоль микротрубочек на длинные расстояния с помощью динеина необходим специфический активатор, содержащийся в цитозоле (Schroer, Sheetz, 1991). Дальнейшие исследования показали, что этот активатор - мультипептидный комплекс, названный динактином (Gill et al., 1991; Steffen et al., 1997). Большинство известных на сегодняшний день процессов, в которых участвует динеин, требуют присутствия динактина. Таким образом, динактин можно рассматривать как кофактор динеина. Динеин резко увеличивает процессивность динеина, т.е. длину трека непрерывного движения динеина вдоль микротрубочки (King, Schroer, 2000). Он служит также адаптором для взаимодействия динеина с различными грузами. Более того, в отсутствие динактина в клетках одна из DLC подвергается фосфорилированию, и динеин ингибируется (Kumar et al., 2000). Динактин может связываться и с другими микротрубочковыми моторами – кинезином-2 (Deacon et al., 2003) или кинезин-подобным белком HsEg5 (Blangy et al., 1997). Вероятно, и в этих случаях динактин модулирует активность моторов или служит посредником для связывания грузов.

Динактиновый комплекс состоит из двух функционально различных частей – «плеча» и «руки» (Рис.2). «Плечо» - это короткий филамент, октамер белка Arp1, называемого еще центрактином. Белок Arp1 - гомолог актина. Филаменты, образуемые Arp1, короче и более стабильные, чем актиновые. Октамер Arp1, входящий в состав динактина, кэпирован с заостренного конца димером белка CapZ, а с оперенного конца – специфическими белками p62, p25 и p27, а также одной молекулой белка Arp11, другого гомолога актина (Schroer, 2004). Белок Arp1 имеет высокое сродство к β III-спектрину. Полагают, что «плечо» динактина связывается со спектриновым скелетом на мембранных органеллах, что обуславливает взаимодействие динеина с этими органеллами (Holleran et al., 2001).

«Рука» динактина представляет собой димер крупного белка p150Glued, называемого также динактин-1. P150Glued взаимодействует со множеством других белков и пептидов и является центральным белком динактина. Именно p150Glued связывается с динеином через DIC (Vaughan, Vallee, 1995). Молекула p150Glued на N- конце имеет глобулярный CAP-Gly (Cytoskeleton Associated Protein - Gly-rich) домен, а в остальной части фибриллярна. Аналогичный CAP-Gly домен встречается также в ряде белков, проявляющих шаперонную

активность в отношении тубулина, и в структурных белках CLIP-170 и CLIP-115, где он является сайтом взаимодействия с тубулином (Li et al., 2002). CAP-Gly домен в p150Glued *in vitro* может взаимодействовать с тубулином, но *in vivo* p150Glued связывается с микротрубочками преимущественно через CLIP-170, ассоциируясь с С-концевой частью последнего (Coquelle et al., 2002; Lansbergen et al., 2004; Akhmanova, Hoogenraad, 2005). CAP-Gly домен p150Glued, кроме того, связывается с белком EB-1 (Akhmanova, Hoogenraad, 2005). И CLIP-170, и EB-1 имеют большее сродство к ГТФ-тубулину, находящемуся на конце растущей микротрубочки, чем к ГДФ-тубулину, образуемому в микротрубочке через некоторое время после ее полимеризации. Поэтому в клетках динактин концентрируется на плюс-концах растущих микротрубочек.

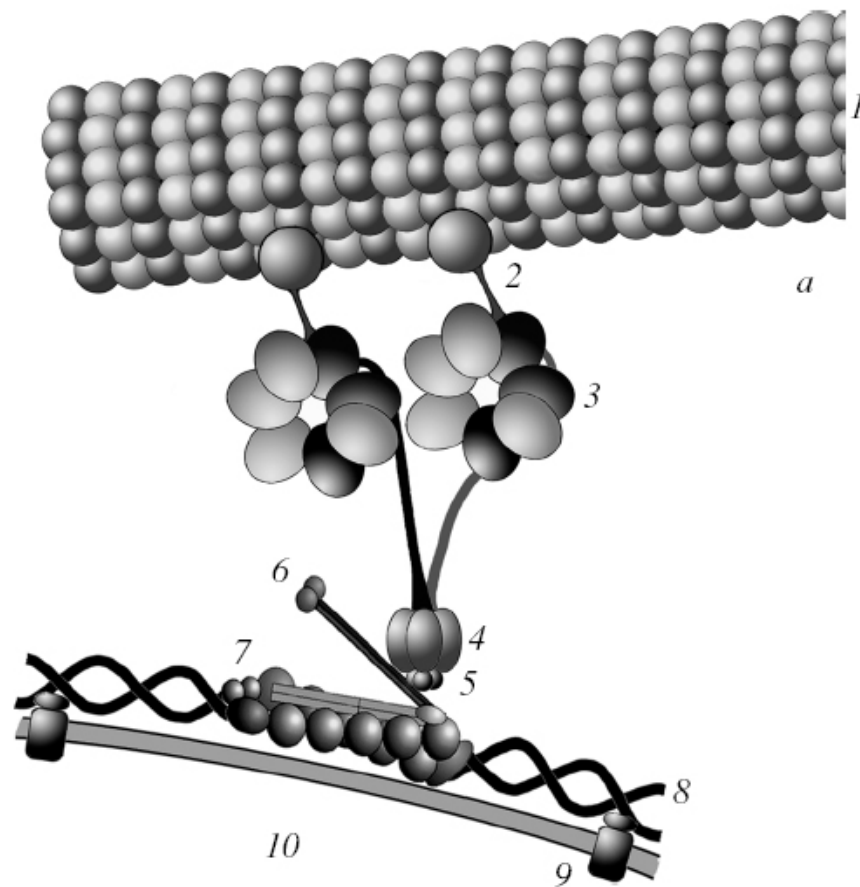


Рисунок 2. Строение молекул цитоплазматического динеина и динактина.

А - взаимодействие молекул динеина и динактина с микротрубочкой и с транспортируемой везикулой. 1 – микротрубочка, показаны димеры тубулина; 2 – выступ моторного домена динеина, связывающийся с микротрубочкой; 3 – моторный домен динеина (разной насыщенностью тона показаны различные ААА-домены); 4 – промежуточные цепи динеина; 5 – легкие цепи динеина; 6 – «рука» динактина, белок p150Glued; 7 – «плечо» динактина, включающее филамент из белка Arp1; 8 – спектрин; 9 – трансмембранный белок; 10 – полость везикулы.

Микротрубочки в клетках, постоянно разбираясь и собираясь, как бы сканируют пространство своими растущими плюс-концами. Динактин, сидящий на растущих плюс-концах, может захватывать динеин, локализованный на органеллах, и тем самым способствовать началу динеин-зависимого движения органелл по микротрубочкам. Это так называемый механизм поиска-захвата (search-capture) (Vaughan et al., 2002).

Фибриллярная часть p150Glued несет два участка со структурой типа скрученной спирали (coiled coil). Первый из них, coiled coil -1 (CC1), высокоаффинно взаимодействует с N-концевой частью DIC. В присутствии избытка CC1, например, при его сверхэкспрессии в клетках, взаимодействие динактина и динеина нарушается. P150Glued имеет, однако, дополнительные, низкоаффинные, участки взаимодействия с DIC (Vaughan et al., 2002; King et al., 2003).

С-концевая половина p150Glued тесно связана с «плечом» динактина. Во взаимодействии «плеча» и p150Glued динактина участвует белок динамитин (p50), а также еще один член динактинового комплекса - белок p22/24. Динамитин в динактине присутствует в виде тетрамера (Schroer, 2004). При экспрессии в клетках избытка динамитина динактиновый комплекс распадается (Echeverri et al., 1996).

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ДИНЕИНА И ДИНАКТИНА

В клетке динактин и динеин функционально связаны настолько тесно, что не представляется возможным говорить о функционировании одного из них, не упоминая другого. В настоящее время существует несколько способов экспериментально заингибировать активность динеина в клетках, и в основном они связаны с ингибированием взаимодействия динеина с динактином. Для предотвращения взаимодействия динеина и динактина используют рекомбинантные белки: фрагмент p150Glued-CC1, о котором говорилось выше (конкурентное подавление связи динеина с динактином), N-концевую часть DIC (то же), избыток DIC (то же), избыток динамитина (он вызывает развал динактина). Также активность динеина ингибируется в присутствии моноклональных антител 74.1 к DIC. Взаимодействие p150Glued с микротрубочками можно подавить при помощи антител к его N-концевой части. Динеин *in vitro* также может быть селективно ингибирован УФ-облучением в присутствии ванадата (Lee-Eiford et al., 1986). Такая обработка вызывает расщепление молекулы динеина по одному из AAA-доменов. Однако для расщепления динеина требуется большая доза облучения, что делает метод неприемлемым для систем *in vivo*. Наконец, динеиновые и динактиновые пептиды можно

убрать из клетки с помощью РНК-интерференции (Goshima et al., 2005; Zhu et al., 2005). Фармакологических агентов, ингибирующих динеин, пока не найдено.

Взаимодействие динеин-динактинового комплекса с микротрубочками и с транспортируемыми грузами регулируется несколькими специфическими белками. Группа таких белков, названных Nud (от nuclear distribution) была идентифицирована у *Aspergillus nidulans* при исследовании мутантов с нарушениями миграции ядер. В высших организмах были найдены гомологи этих белков. Белок NudF оказался гомологом белка LIS1, впервые описанного при исследовании мутаций, вызывающий лизэнцефалию (врожденное отсутствие извилин коры головного мозга) у человека. LIS1/NudF связывается с DHC, DIC, с динамитином и с CLIP-170. Синтез в клетках мутантных LIS1/NudF или инъекции антител к этим белкам приводят к серьезным и многочисленным нарушениям миграции клеток, внутриклеточного транспорта и митоза. По-видимому, LIS1/NudF укрепляют взаимодействие динеина со своими грузами и с микротрубочками (Faulkner et al., 2000; Coquelle et al., 2002; Dujardin et al., 2003; Xiang et al., 2003; Akhmanova, Hoogenraad, 2005; Rehberg et al., 2005). У дрожжей ортолог Lis1/NudF получил название Pac1, и этот белок необходим для миграции ядра в почку (Lee et al., 2003). Другой белок, NuDEL (Ndel1), ассоциируется с LIS1 и DHC и дополнительно усиливает их взаимодействие (Sasaki et al., 2000; Li et al., 2005). Возможно, что LIS1 и NuDEL временно вытесняют динактин, связанный на микротрубочке, из комплекса с динеином, что позволяет ему совершить перемещение (Lansbergen et al., 2004).

ТРАНСПОРТНЫЕ ФУНКЦИИ ДИНЕИНА

Динеин был впервые описан именно как белок, необходимый для ретроградного транспорта вдоль микротрубочек (Pashal and Vallee, 1987). Он ответственен за транспорт самых разных внутриклеточных грузов, таких как мембранные органеллы или хромосомы (Vallee et al, 2004; King, 2000). Динеин-зависимый транспорт мембранных органелл обычно требует активности динактинового белкового комплекса (Gill et al, 1991)(см.выше), который опосредует прикрепление динеина к грузам, а также увеличивает продолжительность непрерывных минус-концевых пробежек вдоль микротрубочек (Culver-Hanlon et al, 2006; Waterman-Storer et al, 1995; King and Schroer, 2000), связываясь с ними посредством независимых от динеина сайтов связывания (Waterman-Storer et al, 1995). Динеин и динактин связаны с пузырьками аппарата Гольджи, а также с ранними и поздними эндосомами (Habermann et al., 2001). Ингибирование динеина тем или иным способом приводит к диспергированию этих структур по направлению к клеточной периферии (Burkhardt et al.

1997, Harada et al., 1998; Valetti et al. 1999; Faulkner et al., 2000). Прижизненные видеомикроскопические исследования подтвердили, что транспортные пузырьки, курсирующие от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи (Presley et al., 1997), поздние эндосомы (Valetti et al., 1999) и пигментные гранулы меланоцитов (Deacon et al., 2003) полностью прекращают движение в клетках с разрушенным динактином. Ингибирование динеина/динактина блокирует также движение митохондрий (Ebner et al., 1998) и пероксисом (Schrader et al., 2000).

Ассоциации динеина и динактина с мембранами способствует множество разнообразных факторов. Динактин способен связываться непосредственно с кислыми фосфолипидами и β III спектринном (Muresan et al., 2001; Holleran et al., 2001) – что может являться основным механизмом его взаимодействия с многочисленными мембранными грузами. Связывание как динеина, так и динактина регулируется белком Rab6 (Matanis et al., 2002; Short et al., 2002). Другими белками, опосредующими взаимодействие динеина и динактина с мембранами, являются Bicaudal. Мутации Bicaudal у дрозофилы вызывают нарушение anteriально-постериальной асимметрии зародыша. В клетках млекопитающих ингибирование функций Bicaudal ведет к нарушению функционирования аппарата Гольджи (Hoogenraad et al., 2001; 2003; Matanis et al., 2002). В связывании динеин/динактина с поздними эндосомами участвует белок Rab7 и его эффектор, RILP (Rab-interacting lysosomal protein) (Cantalupo et al., 2001; Jordens et al., 2001). Сверхэкспрессия RILP приводит к тому, что лизосомы и динеин накапливаются в клеточном центре. Однако непосредственное взаимодействие RILP с динеином или динактином пока не изучено.

Не окружённые мембранами частицы, например, липидные или белковые комплексы, также способны двигаться вдоль микротрубочек по направлению их минус-концу при помощи динеина и динактина. Например, это транспорт определенных РНП к переднему полюсу ооцитов *Drosophila* (Wilkie, Davis, 2001; Januschke et al., 2002; MacDougall et al., 2003). Липидные капли (Valetti et al., 1999), комплексы промежуточных филаментов (Helfand et al., 2002), нейрофиламенты, микротрубочки (He et al., 2005) и компоненты centrosомы (Young et al., 2000, Zimmerman, Doxsey, 2000) также используют для своего перемещения вдоль микротрубочек динеин/динактиновый комплекс. Наконец, и компоненты вирусов перемещаются от периферии к центру клетки с помощью динеина (Dohner et al., 2002; Kelkar et al., 2004).

РОЛЬ ДИНЕИНА В ПРОЦЕССАХ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК

Информация о роли динеина в обеспечении радиальности организации микротрубочек по большей части была получена в ходе исследований процесса образования полюсов митотических веретён (Hyman and Karsenti, 1996; Merdes and Cleveland, 1997; Compton, 1998; Karsenti and Vernos, 2001; Scholey et al, 2003). В митотических клетках динеин, динактин и белок NuMa образуют белковый комплекс, который содержит множественные копии молекул динеина и таким образом способен связывать одновременно несколько микротрубочек и транспортировать их (Merdes et al, 1996; Gaglio et al, 1996). Однонаправленный динеин-зависимый транспорт микротрубочек сводит вместе их минус-концы и выливается в образование сфокусированной звезды микротрубочек с комплексами динеин-динактин-NuMa в центре (Verde et al, 1991; Heald et al, 1996). Такая организация микротрубочек стабилизируется перекрёстным связыванием их минус-концов посредством NuMa и динактина, обладающих разными сайтами связывания с микротрубочками. Для поддержания полюсов митотического веретена также требуется непрерывающаяся активность цитоплазматического динеина. Динеин доставляет в центр звезды микротрубочек динактин и NuMa и кроме того подтягивает туда свободные микротрубочки, чтобы интегрировать их в радиальную звезду. Следовательно, динеин организует и поддерживает полюса митотического веретена посредством транспорта, направленного к минус-концам, как самих микротрубочек, так и белковых комплексов, которые заякоривают их минус-концы (Gaglio et al, 1997; Echeverri et al, 1996; Merdes et al, 2000; Dionne et al, 1999; Goshima et al, 2005; Morales-Mulia and Scholey, 2005; Rusan et al, 2002).

Роль цитоплазматического динеина в поддержании радиальной звезды микротрубочек в интерфазных клетках изучена гораздо меньше. Зависимый от динеина транспорт белков – компонентов периферического материала происходит в течение интерфазы и является основным процессом, необходимым для дупликации centrosомы (Lange, 2002; Schroer, 2004). Вдобавок к структурным компонентам centrosомы и γ -TuRCs в centrosому доставляются регуляторные молекулы, контролирующие протекание клеточного цикла (Lange, 2002). Большинство, если не все, этих молекул транспортируется при помощи динеина. Таким образом, динеин собирает на centrosому белки, необходимые для её функционирования.

Подавление активности динеина посредством его длительного ингибирования приводит к дезорганизации радиальной системы микротрубочек (Young et al, 2000; Zimmerman and Doxsey, 2000; Dammermann and Merdes, 2002; Koonce and Samsø, 1996; Ma et al, 1999; Quintyne et al., 1999; Quintyne, Schroer, 2002), однако лежащие в основе этого

механизмы непонятны. Подобный фенотип наблюдали также при ингибировании ряда других белков (EB-1, Nlp, найнеин) но внимательный анализ показывает, что во всех этих случаях обнаруживалось также нарушение внутриклеточной локализации динеина и динактина, что может быть основной причиной наблюдаемых изменений системы микротрубочек (Askham et al., 2002; Dammermann, Merdes, 2002; Perez-Ferreiro et al., 2004; Delgehyr et al., 2005). Интересно, что перестройка сети микротрубочек из радиальной в хаотическую происходит при ряде вирусных инфекций и, вероятно, также связана с подавлением активности динеина, вызванным вирусными белками (Ploubidou et al., 2000).

Долговременная утрата активности динеина часто коррелирует с уменьшением уровня centrosomных белков, напрямую или косвенно вовлечённых в процессы нуклеации и закоривания микротрубочек, таких как γ -тубулин (Young et al, 2000; Purohit et al, 1999; Quintyne et al, 1999), найнеин (Dammermann and Merdes, 2002; Casenghi et al, 2005), динактиновый комплекс (Quintyne et al, 1999), перицентрин (Young et al, 2000; Purohit et al, 1999), PCM-1 (Dammermann and Merdes, 2002; Balczon et al, 1999) и BBS-4 (Kim et al, 2004) – что доказывает тезис о том, что динеин обеспечивает структурную целостность centrosомы путём доставки ключевых белков centrosомы по микротрубочкам. Однако результаты других исследований противоречат утверждению о возможности того, что динеин-зависимый транспорт centrosomных белков, таких как γ -тубулин, участвует в их привлечение на centrosому (Dammermann and Merdes, 2002; Khodjakov and Rieder, 1999; Hannak et al, 2001).

Исследования *in vitro* показали, что очищенный динеин обладает значительной микротрубочки-нуклеирующей активностью (Malikov et al, 2004), из чего может следовать, что динеин участвует в образовании радиальной системы микротрубочек в интерфазе путём нуклеации микротрубочек на centrosоме. В пользу этой идеи говорят также исследования бесcentrosomных фрагментов цитоплазмы, в которых динен-зависимая нуклеация микротрубочек играет важную роль в образовании и поддержании радиальной организации микротрубочек (Malikov et al, 2004; Vorobjev et al, 2001). Однако, степень участия динеина в процессе нуклеации микротрубочек на centrosоме остаётся неясной, поскольку centrosома содержит другие молекулы, обладающие сильной микротрубочки-нуклеирующей активностью (в частности, γ -тубулин).

Итак, динеин в принципе способен нуклеировать микротрубочки, а поскольку p150Glued также связывается с микротрубочками, он, в свою очередь, способен их закоривать. Динеин и динактин присутствуют в centrosоме в значительном количестве (Gill et al., 1991; Clark, Meyer, 1992; Askham et al., 2002; Dammermann, Merdes, 2002; Casenghi et al., 2005) как на протяжении интерфазы (Quintyne, Schroer, 2002), так и в митозе, где их

особенно много (Gaglio et al., 1997). Динеин связан с перицентрином через DLIC (Purohit et al., 1999), а динактин связывается с Сер135 через динамитин (Uetake et al., 2004). Как уже говорилось, ингибирование динеина приводит к распаду радиальной системы микротрубочек клетки, и при этом содержание динеина и динактина в центросоме заметно уменьшается. Центросома в таких клетках, однако, сохраняет способность нуклеировать микротрубочки (Quintyne et al., 1999; Quintyne, Schroer, 2002). В некоторых экспериментальных системах - при избытке гомолога найнеина белка Nlp (Casenghi et al., 2005), или при экспрессии N-концевой части Bicaudal (Hoogenraad et al., 2003) центросомы накапливают много динактина и динеина, но на системе микротрубочек клетки это не отражается. Эти данные говорят о том, что нуклеация микротрубочек, скорее всего, зависит именно от γ -TuRC, а динеин и динактин, по-видимому, могут участвовать в заякоривании микротрубочек на центросоме.

Обобщая всё вышесказанное, можно утверждать, что в то время как существующие экспериментальные свидетельства подтверждают несомненную важность активности динеина в процессе организации интерфазной радиальной звезды вокруг центросомы, конкретная роль (или роли) этого микротрубочкового мотора в процессе организации микротрубочек остаётся невыясненной.

ДВУНАПРАВЛЕННОСТЬ ТРАНСПОРТА ПО ТУБУЛИНОВОЙ ТРАНСПОРТНОЙ СЕТИ

При обсуждении тубулиновой транспортной системы, образованной расходящимися к периферии микротрубочками с движущимися по ним моторными белками, нельзя обойти молчанием одно из важнейших свойств этой системы – а именно, двунаправленность такого транспорта. Эта двунаправленность обеспечивается работой различных моторных белков: цитоплазматический динеин перемещает грузы по направлению к минус-концам микротрубочек, в то время как различные представители суперсемейства кинезинов – в основном по направлению к плюс-концам микротрубочек. В последнее время активно обсуждается вопрос, за счёт чего осуществляется регуляция работы моторных белков, позволяющая осуществлять двунаправленный транспорт. Теоретически существует два возможных механизма подобной регуляции. Первый из них – это координация работы моторов, предполагающая, что в каждый конкретный момент времени активен лишь один тип моторных белков, а моторы противоположной направленности неактивны. Второй возможный механизм – это конкуренция, или так называемое «перетягивание каната», предполагающая конкуренцию моторных белков противоположной направленности,

активных в одно и то же время. Какой же из этих механизмов определяет двунаправленный транспорт по микротрубочкам в живой клетке?

В системе *in vitro* в отсутствие груза моторные белки противоположной направленности перемещаются по микротрубочкам независимо друг от друга; если же их силы приложены к одному и тому же объекту одновременно, то движение этого груза замедляется. Этот феномен был проиллюстрирован опытами *in vitro*, когда микротрубочки двигались гораздо медленнее в системе с совместно иммобилизованными на стекле кинезином и динеином, чем в аналогичных опытах, где к поверхности стекла был пришит лишь один какой-то моторный белок (Vale et al, 1992).

Оставалось неясным, несут ли реальные органеллы в клетках на своих поверхностях белки обоих типов? Это было выяснено экспериментами Хендрикса с соавторами (Hendricks et al, 2010), которые выделили транспортные везикулы из нейронов и изучили их перемещение вдоль предварительно собранных *in vitro* микротрубочек. Выяснилось, что в течение короткого промежутка времени (около 40 секунд) более 80% везикул самопроизвольно изменяли направление своего движения в отсутствие какого-либо дополнительного внешнего сигнала. Дальнейший биохимический анализ в совокупности с данными, полученными методом фотообесцвечивания, показал, что каждая такая везикула несёт на себе в среднем $2,8 \pm 1,6$ молекул динеина; $3,5 \pm 1,9$ молекул динактина; и $1,7 \pm 1,0$ молекул кинезина-2 (Hendricks et al, 2010). Таким образом, моторы противоположной направленности способны одновременно связываться с одной органеллой, и это стохастическое связывание способно определять направление движения без какой-либо дополнительной стимуляции извне. Стоит, однако, отметить, что подавляющее большинство везикул *in vitro* перемещаются лишь на короткие дистанции и часто меняют направление своего движения, в то время как в цитоплазме клеток везикулы движутся, как правило, длительно время в одном и том же направлении. Это говорит о том, что для перемещения *in vivo* на длинные дистанции, вероятно, необходимы всё же какие-то регуляторные факторы.

В некоторых случаях в живых клетках можно наблюдать одновременное и быстрое смещение большого количества органелл по микротрубочкам в одном направлении – это, например, перемещение меланосом при стимуляции пигментных клеток к агрегации либо дисперсии. В этом случае логично было бы предположить существование скоординированной регуляции активности различных моторов, нежели простое «перетягивание каната», в случае которого моторы противоположной направленности попросту мешали бы работе друг друга. Другой пример синхронизированного транспорта органелл можно наблюдать в эмбрионах дрозофилы, в которых система микротрубочек организована необычным образом: плюс-концы микротрубочек обращены в центр эмбриона,

в то время как минус-концы направлены к периферии. Гросс с соавторами (Gross et al, 2002) пытались определить, скоординирована ли регуляция микротрубочковых моторов в этой системе. Если все моторы активны в одно и то же время, то ингибирование одних будет способствовать работе моторов противоположной направленности, поскольку они смогут развивать в итоге большую результирующую силу, которую можно измерить при помощи оптического пинцета. Однако ингибирование минус-концевой моторной активности приводило к уменьшению также и плюс-концевых тянущих сил, равно как и к уменьшению скоростей и средних дистанций плюс-концевого движения (Gross et al, 2002). Это говорит в пользу гипотезы о скоординированной работе моторов, и против гипотезы «перетягивания каната». Аналогичный вывод был сделан позднее при изучении движения пероксисом, измеренном с нанометровой точностью методом FIONA (Kural et al, 2005).

Несмотря на все перечисленные наблюдения, механизм «перетягивания каната» всё же существует в природе, и его можно непосредственно наблюдать, в частности, в клетках *Dictyostelium*, в которых ранние эндосомы, движущиеся в одном направлении, могут периодически останавливаться и рывками начать удлиняться, как если бы они оттягивались некими силами в противоположном движению направлении (Soppina et al, 2009). Такое «оттягивание» заканчивается или разделением эндосомы на две части, или же сменой направления движения на противоположное. Сходное поведение было также продемонстрировано для эндосом в системе *in vitro*. Было обнаружено, что динеин в клетках *Dictyostelium* гораздо слабее кинезина, и продуцирует силу примерно $1,1 \pm 0,3$ pN по сравнению с $5,5 \pm 1,2$ pN, которые развивает кинезин DdUnc104 (Soppina et al, 2009). Во время «перетягивания каната» органелла одновременно подтягивается одним кинезином и как минимум пятью более слабыми динеинами.

Не стоит упускать из внимания, что такая конкуренция нескольких молекул моторов противоположной направленности увеличивает процессивность транспорта. Известно, что одиночный моторный белок остаётся прикрепленным к микротрубочке крайне непродолжительное время (около 1 секунды), и связывание органеллы с микротрубочкой сразу несколькими моторами (пусть и разнонаправленными) существенно увеличивает процессивность. В частности, путём математического моделирования было показано, что органелла, привязанная к микротрубочке сразу четырьмя кинезинами и четырьмя динеинами, будет оставаться прикрепленной к ней на протяжении более чем 2 минуты и теоретически будет способна преодолеть дистанцию более 100 микрометров (Muller et al, 2010).

Таким образом, моторы противоположной направленности постоянно конкурируют друг с другом. Тем не менее, для процессивного транспорта в клетке на большие расстояния

необходимо, чтобы одна группа моторов каким-то образом преодолела сопротивление другой. Элегантный механизм координации моторов был обнаружен в эмбрионах дрозофилы. Динеин и кинезин в этой системе регулируются комплексом нескольких белков: Klar, Halo и LSD-2. В отсутствие белка Klar, который образует скэффолд для всего комплекса, ингибируется движение в обоих направлениях (Welte et al, 1998). В то же время элиминация Halo оказывает различный эффект на плюс- и минус-концевой транспорт: это уменьшает длину плюс-концевых пробежек и соответствующие силы, и увеличивает аналогичные параметры для минус-концевого транспорта (Gross et al, 2003). В присутствии Halo количество активных кинезинов увеличивается, а активных динеинов уменьшается (Gross et al, 2003). В эмбрионах, деплецированных по LSD-2 подавлено накопление липидных капель, осуществляющееся посредством плюс-концевого транспорта, хотя количество моторных белков, связанных с органеллами, остаётся тем же. Это означает, в свою очередь, что LSD-2 регулирует не количество связанных с грузом моторов, а их активность (Welte et al, 2005).

Итак, мембранные органеллы, перемещающиеся по микротрубочкам, несут на своей поверхности моторы противоположной направленности. При конкуренции этих моторов движение органелл замедляется или вовсе останавливается, и направленное движение возобновляется, как только какая-то из групп моторов «возьмёт верх» над другой. Однако активность «побеждённых» моторов при этом не исчезает полностью, а остаётся на некоем остаточном уровне, способствующем эффективности транспорта. Эта активность «побеждённой стороны» обеспечивает процессивность транспорта за счёт увеличения времени связывания органеллы с микротрубочкой. С одной стороны, такой механизм выглядит напрасной тратой энергии, однако он позволяет быстро изменить направление движения на противоположное при поступлении извне соответствующего сигнала. Таким образом, оба механизма взаимодействия моторов противоположной направленности – координация их работы и конкуренция – существуют в клетке параллельно и работают скорее совместно, нежели противостоят друг другу (Bryantseva and Zhapparova, 2012).

АКТИНОВАЯ ТРАНСПОРТНАЯ СИСТЕМА. МИОЗИНЫ

Помимо основной транспортной системы клетки – тубулиновой, которая представлена микротрубочками с движущимися по ним молекулами динеина и кинезинов, цитоскелет клеток животных образует ещё одну. Это беспорядочная сеть динамичных актиновых микрофиламентов, по которым органеллы перемещаются при помощи миозиновых моторов.

Актиновые филаменты имеют форму двойной спирали толщиной 10 нанометров (Pollard, 1990). Таким образом, это самые тонкие из элементов цитоскелета, благодаря чему они и названы микрофиламентами. Было показано, что эти филаменты высокодинамичны, как и микротрубочки, и что мономеры актина в их составе постоянно обмениваются с мономерами, находящимися вокруг в цитоплазме, путём конкурентного роста и укорочения микрофиламентов на противоположных концах (Pollard and Borisy, 2003). Помимо собственно транспортной сети, представленной одиночными микрофиламентами, актиновые филаменты способны образовывать структуры более высокого уровня организации. В цитоплазме клеток животных выделяют такие структуры, состоящие из актиновых филаментов, как стресс-фибриллы, ламеллоподии, филоподии и другие (Small, 1988). Примером сложно организованных актиновых структур со смешанной полярностью могут служить стресс-фибриллы, в которых плюс-концы отдельных микрофиламентов направлены в обе стороны. Стресс-фибриллы состоят из пучков биполярных филаментов – как актиновых, так и состоящих из миозина II (Herman et al, 1981; Svitkina et al, 1995). Эти структуры образуются при прикреплении клетки к субстрату и обладают свойством сократимости (Nobes and Hall, 1995).

В целом, форма клеток и их локомоция в значительной степени зависят от актинового цитоскелета, структура которого в клетке сложным регулируется – в частности, малыми ГТФазами семейства Rho. Так, например, белок этого семейства Rac1 отвечает за образование ламеллоподий, в то время как для образования филоподий необходима активация другого белка этого же семейства – Cdc42 (Ridley et al, 1992; Nobes and Hall, 1995). Следует отметить, однако, что все эти процессы не имеют отношения к внутриклеточному транспорту по актиновой транспортной сети, который осуществляется по одиночным микрофиламентам миозиновыми моторными белками.

Впервые внутриклеточный транспорт по актину был описан Кузнецовым с соавторами (Kuznetsov et al, 1992). В дальнейшем ряд других исследователей показал, что транспорт синаптических везикул, эндоплазматического ретикулума и других внутриклеточных частиц в нейронах также осуществляется посредством актин-зависимого транспорта (Morris and Hollenbeck, 1995; Evans et al, 1998; Bridgman, 1999; Prekeris and Terrian, 1997; Takagishi, et al, 1996; Tabb et al, 1998). Одним из классических модельных объектов для изучения актин-зависимого транспорта сегодня является транспорт меланосом в пигментных клетках (Rodionov et al, 1998; Rogers and Gelfand, 1998; Wu et al, 1998). В этом случае, как и во многих других, процессы внутриклеточного транспорта осуществляются с участием обеих транспортных систем – актиновой и тубулиновой. В настоящее время детально описаны процессы актин-зависимого транспорта митохондрий (Krendel et al, 1998), экзоцитозных

везикул (Fath et al, 1994) и гранул в синцитийной бластодерме эмбрионов дрозофилы (Mermall et al, 1994; Mermall and Miller, 1995). Разнообразные грузы перемещаются по актиновым микрофиламентам посредством миозиновых моторных белков.

Как и в случае с кинезиновыми моторными белками, миозины образуют обширное миозиновое суперсемейство, характерным признаком членов которого является наличие тяжёлой цепи с консервативным каталитическим доменом массой в 80 кДа. Всего существует пятнадцать классов тяжёлых цепей миозина (Berg et al, 2001), которые подразделяют на разные классы, исходя из последовательностей моторного домена (Cheney et al, 1993; Brown, 1999). Соответственно, наибольшей гомологией моторного домена обладают представители миозинов одного класса. Рассмотрим вкратце представителей миозинов I, II, V и VI классов.

Молекулы миозинов I класса являются мономерами и содержат тяжёлую цепь молекулярной массой 110-130 кДа и несколько лёгких кальмодулиновых цепей, количество которых варьирует от одной до шести; при этом длина и аминокислотный состав тяжёлых цепей могут варьировать. В результате альтернативного сплайсинга образуется множество изоформ миозинов I класса (Hasson and Mooseker, 1994), которые дополнительно подразделяются на четыре подкласса в соответствии с гомологией внутри головного домена (Coluccio et al, 1997). Миозины I класса хронологически были первыми миозинами, для которых было экспериментально показано участие во внутриклеточном транспорте (Adams and Pollard, 1986).

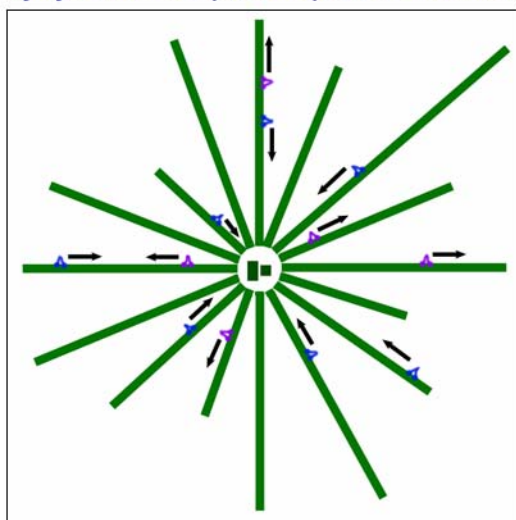
Участие же во внутриклеточном транспорте миозинов II было показано относительно недавно (Musch et al, 1997; Stow et al, 1998). Ранее изучалась роль представителей этого класса суперсемейства миозинов лишь в таких процессах как клеточная поляризация и локомоция, а также цитокинез. В состав молекул миозинов II входят мышечный миозин и его ближайший аналог из немышечных клеток. Миозины II класса состоят из двух тяжёлых 240 кДа цепей и двух пар лёгких цепей массой по 15-20 кДа. Головной домен тяжёлой цепи обеспечивает моторную функцию белка, а хвостовой необходим для взаимодействия с другими молекулами миозинов II.

Ведущая роль во внутриклеточном транспорте мембранных органелл по актиновой транспортной сети принадлежит белкам из семейства миозина V (Минин и Кулик, 2004). Именно такой миозин осуществляет транспорт пигментных гранул в мышечных меланоцитах и меланофорах ксенопуса (Provance et al, 1996; Rogers and Gelfand, 1998; Wu et al, 1998; Rogers et al, 1999). Кроме того, миозин V транспортирует в нейронах синаптические везикулы по направлению к синапсу (Bridgman, 1999; Prekeris and Terrian, 1997). Молекулы миозинов V включают в себя две тяжёлые и двенадцать лёгких цепей (Cheney et al, 1993).

Тяжёлая цепь миозина V при этом структурно подразделяется на три домена: глобулярная N-концевая голова, альфа-спиральная шея и стержневой домен с глобулой на С-конце, которая, как считается, служит для связывания миозина с грузом (Catlett and Weisman, 1998; Wu et al, 1998; ReckPeterson et al, 1999; Schott et al, 1999). Белок, названный миозином Va, впервые был выделен из мозга кур (Cheney et al, 1993) и отличается от других миозинов высоким сродством к актину в присутствии АТФ (Nascimento et al, 1996); и кроме того, миозин Va связан с актином большую часть АТФазного цикла (Leibler and Huse, 1993; Howard, 1997). Димерная молекула миозина Va может двигаться вдоль актинового микрофиламента, попеременно связываясь с актином то одним, то другим доменом. Считается, что во время движения миозины V делают более длинные «шаги» вдоль микрофиламентов, нежели миозины II, за счёт более длинных шейных участков молекулы (Brown, 1999).

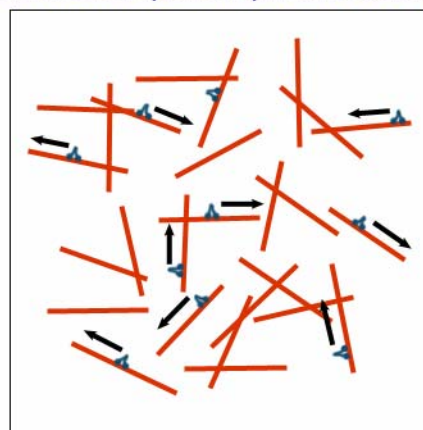
В многочисленных работах, посвящённых миозин-зависимому транспорту мембранных органелл, актиновым филаментам отводится роль «рельсов», по которым перемещаются молекулярные моторы (Berg et al, 2001; Krendel and Mooseker, 2005; Mooseker and Cheney, 1995; Tuxworth and Titus, 2000). В связи с этим следует обратить особое внимание на тот факт, что актиновая транспортная сеть отличается от тубулиновой не только отсутствием правильной организации элементов цитоскелета, которые её образуют. Вторым фундаментальным отличием является однонаправленность транспорта по актину, в отличие от двунаправленного транспорта по микротрубочкам (рис 3).

Тубулиновая транспортная система



Включает: систему микротрубочек, кинезины, динеин
Особенности: геометрически правильное строение, двунаправленный транспорт

Актиновая транспортная система



Включает: сеть актиновых микрофиламентов, миозины
Особенности: хаотичное расположение, транспорт в одном направлении

Рисунок 3. Схематичное изображение тубулиновой и актиновой транспортных систем

Вопрос одно- или двунаправленности перемещения органелл по элементам цитоскелета при помощи моторных белков является ключевым при определении эффективности внутриклеточного транспорта (подробнее см. в разделе Результаты и обсуждение», ч.2, §20). При описании транспорта грузов по микротрубочкам двунаправленность традиционно выводится как следствие присутствия на поверхности мембранных органелл плюс- и минус-концевых моторных белков, то-есть кинезинов и динеина. В свете этого особенно интересным выглядят представители ещё одного, последнего, класса миозинов, а именно, миозины VI.

Миозин VI является минус-концевым актиновым моторным белком, который в системе *in vitro* перемещается по направлению к минус-концам актиновых микрофиламентов (Hasson and Mooseker, 1994; Buss et al, 1998). Этот моторный белок имеет множество изоформ благодаря альтернативному сплайсингу, и экспрессируется практически повсеместно. Его присутствие, в частности, показано на поверхности пигментных гранул меланофоров – модельном объекте для изучения внутриклеточного транспорта. Однако несмотря на то, что в системе *in vitro* миозин VI движется по направлению к минус-концам актиновых микрофиламентов, в живых клетках признаков двунаправленного транспорта по актиновым микрофиламентам, аналогичным описанным для микротрубочек (см. стр. 41 и далее), до сих пор никто не наблюдал. Следовательно, присутствие в цитоплазме клеток минус-концевых миозинов не обеспечивает само по себе наличия в этих клетках двунаправленного транспорта по актиновой транспортной сети. Таким образом, логично сделать предположение, что направленность внутриклеточного транспорта определяется не только наличием/отсутствием необходимых моторных белков, а ещё какими-то неизвестными до сих пор факторами. Одной из задач данной работы и стало изучение миозин-зависимого транспорта по актину и выяснение того, что же на самом деле определяет одно- или двунаправленность внутриклеточного транспорта по актиновым микрофиламентам.

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ

В работе были использованы клетки различных линий млекопитающих, земноводных и рыб. В частности, использовались клетки трёх линий, выделенных из зелёной мартышки: CV-1 (фибробласты почки), BS-C-1 (эпителий почки), Vero (фибробластоподобные клетки эпителиального происхождения из почки). Кроме того, использовались клетки китайского хомячка CHO-K1 (фибробластоподобные клетки яичника), человеческие HeLa (карцинома шейки матки), свиные PE (эмбриональные клетки почки). Также использовали клетки постоянной клеточной линии меланофоров ксенопуса (Kashina et al, 2004) и первичные меланоциты тернеции, которые получали как описано ранее (Gyoeva et al, 1987).

Клеточные культуры млекопитающих выращивали при стандартных условиях (температура 37°C, содержание углекислого газа в среде 5%). Клетки CV-1, Vero, BS-C-1, PE и HeLa растили на смеси (1:1) культуральных сред DMEM и Ham's F10, клетки CHO-K1 – на среде F12 (Flow Laboratories). В среду добавляли 80-100 мг/мл антибиотиков (гентамицина или пенициллина и стрептомицина) и 7,5-10% сыворотки новорождённых телят или эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия; «ПанЭко», Россия; «Sigma», США; «Serva», США). Для пересева клеток использовали смесь трипсин/версен («ПанЭко», Россия).

Клетки постоянной клеточной линии меланофоров Xenopus культивировали в специальной культуральной среде (70% -я среда L15 с антибиотиками, 20% фетальной бычьей сыворотки и 5 мкг/мл инсулина) при 27°C. Чтобы индуцировать агрегацию или дисперсию пигмента, клетки помещали в бессывороточную среду за 1 час до добавления необходимого гормона. Агрегацию пигментных гранул индуцировали 10^{-8} М мелатонина. Чтобы индуцировать дисперсию пигмента, клетки отмывали 3-5 раз бессывороточной средой для того чтобы удалить остатки мелатонина и обрабатывали 10^{-8} М меланоцит-стимулирующего гормона

СПОСОБЫ ФИКСАЦИИ КЛЕТОК

Для различных видов прямой и непрямой световой флуоресцентной микроскопии использовались разные типы фиксации. В зависимости от поставленной задачи и от конкретного объекта дальнейшего исследования, методики фиксации могли значительно отличаться друг от друга. Наиболее часто использовались фиксация клеток метанолом,

параформальдегидом (в различных модификациях), метанолом/формалином и глютаровым альдегидом.

Фиксация параформальдегидом с предварительной пермеабиллизацией

Клетки троекратно споласкивались PBS от остатков культуральной среды, затем помещались на 90 сек в моделирующий раствор (4 М глицерин с 0,5% Triton X-100 в буфере М). Затем клетки промывались буфером М (0.5 М имидазола, 0.5М KCl, 1мМ ЭДТА, 5мМ MgCl₂, 10мМЭГТА, 1мМ меркаптоэтанола; pH=6.7) и помещались в 3% раствор параформальдегида на PBS на 5-20 мин при комнатной температуре. В дальнейшем производилась отмывка остатков фиксатора в PBS троекратно по 15 мин или в течение двукратного времени фиксации.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания на p150^{Glued} клетки пермеабиллизировали в течение 2 минут 0,5% Triton-X-100 на буфере PEM (100 мМ PIPES, 1мМ EGTA и 0,5 мМ MgCl₂, pH 6.9), а затем фиксировали 4% формальдегидом.

Фиксация параформальдегидом с одновременной пермеабиллизацией

По этой методике клетки после ополаскивания от культуральной среды помещались в 3% раствор параформальдегида на PBS комнатной температуры с предварительно добавленными 0,5 – 1% Triton X-100 и 2мМ ЭГТА.

Фиксация параформальдегидом с последующей пермеабиллизацией

Для выявления актинового цитоскелета путём окрашивания родамин-меченым фаллоидином, клетки последовательно помещали на 10 минут в 3,7% раствор параформальдегида, свежеразведённый из 37% раствора; а затем на 1 мин в 0,2% раствор Triton X-100, также свежеразведённый из 10% раствора, после чего клетки отмывались в PBS в течение 10 минут.

По другой методике клетки (или цитопласты) фиксировали 3% параформальдегидом на PBS (при +4°C, 15 мин) и пермеабиллизировали 0,5% Triton X100 (1 мин при комнатной температуре), затем окрашивали TRITC-меченым фаллоидином (Sigma-Aldrich).

Фиксация метанолом

Для окраски клеток антителами на γ -, ϵ - и Туг-тубулин, найнеин и перицентрин был использован стандартный метод фиксации метанолом: после ополаскивания клеток PBS от остатков культуральной среды покровные стёкла с клетками помещались в морозильную

камеру в 100% метанол температуры -20°C на 5-10 минут. Затем клетки отмывались от фиксатора в PBS комнатной температуры в течение 10 минут.

Фиксация метанолом-формалином

Для окрашивания клеток антителами к γ -тубулину клетки сначала фиксировали 20 минут 4% формальдегидом и затем 5 минут ледяным метанолом (-20°C).

В других случаях клетки (или цитопласты) фиксировали метанолом (-20°C) в течение 5 мин, затем постфиксировали 3% параформальдегидом на PBS ($+4^{\circ}\text{C}$, 5 мин) и пермеабелизовали 0,5% Triton X100 в течение 1 минуты при комнатной температуре.

Фиксация глутаровым альдегидом

Для покраски клеток антителами anti-LOS_K использовали метод фиксации клеток глутаровым альдегидом. Для этого после удаления культуральной среды и ополаскивания клеток PBS их помещали на 90 секунд в моделирующий раствор, затем промывали буфером М и помещали на 15-20 минут в 0,5% раствор глутарового альдегида на PBS комнатной температуры. Затем проводили отмывку клеток от излишков глутаральдегида сначала PBS (трижды по 15 мин), потом свежеприготовленным борогидридом натрия NaBH_4 (2,5 мг/мл на PBS) – дважды по 15 мин, тщательно следя, чтобы многочисленные образующиеся пузыри не привели к подсыханию клеток. После этого борогидрид натрия удалялся путём двукратной 15-минутной промывки клеток PBS.

В других случаях клетки (или цитопласты) обрабатывали раствором, содержащим 4М глицерина и 0,5% Triton X100 в 50 мМ имидазола pH 6,8, 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭГТА, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1% β -меркаптоэтанола в течение 90 секунд; и затем фиксировали 0,5% глутаровым альдегидом.

МЕТОД НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Метод непрямой иммунофлуоресценции использовался при окрашивании фиксированных клеток различными моно- и поликлональными антителами. Для этого предварительно зафиксированные необходимым для конкретной покраски фиксатором клетки отмывали от фиксатора, не допуская их подсыхания. Покровные стёкла с клетками помещали клетками вниз на лист парафильма с нанесёнными каплями первых антител, разведённых PBS до необходимой концентрации. Лист парафильма содержался в камере с искусственно поддерживаемым высоким уровнем относительной влажности во избежание испарения раствора антител и подсыхания клеток. Инкубацию проводили при комнатной

температуре в течение 30 мин – 1 часа. Затем покровные стёкла с клетками прополаскивали в PBS и отмывали от несвязавшихся антител в PBS при комнатной температуре дважды по 15 мин. Инкубацию клеток со вторыми антителами проводили аналогично первой, разница состояла лишь в том, что во избежание преждевременного выцветания камеру с покровными стёклами накрывали листом бумаги, защищая от света. Далее производили отмывку, аналогичную первой и после этого клетки заключались в Мовиол (Mowiol 4-88 и PBS с глицерином), или в эльванол.

МЕТОДЫ ПРЯМОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

На разных этапах работы были использованы следующие методы прямой флуоресценции: прижизненные микроинъекции в клетки флуоресцирующих актина и тубулина, изучение свечения экспрессируемых в клетках EGFP-слитых конструкторов, окрашивание в клетках актина и хроматина, а также метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP).

Микроинъекции флуоресцирующих тубулина и актина

Для визуализации системы микротрубочек в живых клетках BS-C-1 за час до начала экспериментов клетки микроинъектировали раствором тубулина, полученного из мозга крупного рогатого скота и конъюгированного с Cy3 (Amersham) по стандартной методике (Rodionov et al, 2001). В составе буфера для микроинъекций тубулина было 114 mM KCl, 20 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ и 3 mM Na₂HPO₄; pH=7,0. Концентрация раствора тубулина составляла 6-7 мг/мл. Для работы использовались микроинжектор и микроманипулятор фирмы Eppendorf. Клетки были инкубированы в течение как минимум 1 часа в CO₂ инкубаторе для того чтобы меченый тубулин включился в состав микротрубочек.

Для прижизненной флуоресцентной микроскопии актинового цитоскелета в клетки инъектировали меченый родамином мышечный G-актин (Cytoskeleton Inc.), при этом концентрация раствора в капилляре микроинжектора составляла 15 мкМ.

Перед началом наблюдения в культуральную среду чашек Петри с инъектированными клетками для уменьшения фотоповреждения клеток добавляли раствор оксиразы (Oxurase Company) и необходимый для её работы субстрат – молочную кислоту.

При работе с пигментными клетками, для того чтобы пометить актиновые филаменты, меланофоры были инъектированы родамин-меченым кроличьим актином скелетных мышц (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO), разведённым буфером для микроинъекций (1 mM HEPES, 0.2 mM MgCl₂, 0.2 mM ATP, pH 7.5) до конечной концентрации 1,3 мг/мл.

Флуоресцентные латексные бусины (Fluoresbrite NYO microspheres D = 0.22 мкм, Polysciences, Inc., Warrington, PA) были инъецированы в меланофоры после разведения 2,5% суспензии 1:100.

Лизосомы в беспигментных меланофорах ксенопуса для прижизненного наблюдения были помечены флуоресцентным красителем LysoTracker Green DND-26 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) в соответствии с инструкциями производителя.

Окрашивание актина и хроматина

Для окрашивания F-актина после фиксации клеток (как описано выше) проводили их инкубацию с фаллоидином, конъюгированным с тетраметилродаминизотиоцианатом (Sigma, раствор 1:100 в метаноле хранится при -20°C), при комнатной температуре в течение 30 минут. После этого клетки отмывали от излишков фаллоидина в PBS при комнатной температуре в течение 10-20 минут и заключали в мовиол или эльванол.

В некоторых случаях для визуализации ядра использовали окрашивание ДНК красителями DAPI или Hoechst 3325.

Изучение свечения экспрессируемых EGFP-слитых конструктов.

При экспрессии в клетках белков, трансляционно слитых с зеленым флуоресцентным белком (GFP), зелёное свечение продукта экспрессии хорошо выявлялось при прижизненном наблюдении клеток и при фиксации трансфицированных клеток параформальдегидом.

Метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP).

Для экспериментов по фотообесцвечиванию, актиновые филаменты в амеланотических меланофорах (Rogers et al, 1999) были помечены путём инъекций родамин-актина (см. выше). Для выжигания флуоресценции актина, на клетки затем фокусировали пучок лучей 1W ион-аргонового лазера (Laser Physics, Inc., West Jordan, UT), введённого в оптическую эпи-иллюминационную систему инвертированного микроскопа Nikon Diaphot 300. Была установлена цилиндрическая линза, чтобы сфокусировать луч лазера через 100 $\times$, 1.25 апертурный объектив в полосу ~ 3 мкм шириной на фокальной плоскости. Лазер функционировал с параметрами длины волны 514 нм при мощности 100 мW. Съёмка зоны обесцвечивания производилась посредством Andor iXon EMCCD камеры (Andor Technology, Windsor, CT). Обработка данных по фотообесцвечиванию производилась с использованием программного обеспечения Metamorph. Обесцвеченный участок обводили прямоугольником, и внутри него высчитывали средний уровень

флуоресценции. После вычитания уровня фона и внесения поправки на выгорание в процессе видеосъёмки, данные были представлены в виде процентного графика уровня флуоресценции, восстанавливающегося после обесцвечивания. При этом за 100% был принят уровень интенсивности флуоресценции в этом участке непосредственно перед обесцвечиванием. Данные анализировали и откладывали в виде графика, используя программное обеспечение Origin (OriginLab Corp., Northampton, MA).

АНТИТЕЛА И КРАСИТЕЛИ

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клеток в работе были использованы следующие антитела:

Первичные мышинные моноклональные:

к α -тубулину DM-1A («Sigma» или «Cedarlane Laboratories»), те же антитела, конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом («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).

Первичные крысиные моноклональные к α -тубулину YOL1/34 (Abcam).

Первичные кроличьи поликлональные к перичентрину и к найнеину (Abcam Inc.), к маннозидазе II (Covance, Abcam), pol3D2 к структурному домену LOSK (получены ранее в нашей лаборатории, см. Zinovkina et al., 1997), 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 коммерческие козы и овечьи антитела к иммуноглобулинам мыши, кролика и крысы, конъюгированные с флуорохромами FITC, TRITC, Alexa 488, Cy3, Cy5, AMCA. Вторичные антитела были приобретены 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.

Для визуализации микротрубочек в живых клетках флуорохром Cy3 был конъюгирован с выделенным тубулином в соответствии с методикой производителя.

Мышиные моноклональные антитела 74.1 («Covance», США) и мышинные неиммунные IgG, используемые для микроинъекций, очищали на протеин-A-агарозе.

ВЕЩЕСТВА И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ

Для специфического подавления активности малых ГТФаз семейства Rho – RhoA и Cdc42 использовались микроинъекции в экспериментальные клетки специфических ингибиторов. В случае RhoA использовали бактериальный токсин С3-трансферазу в концентрации 0,1 мг/мл (Cytoskeleton Inc.) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для ингибирования Cdc42 использовали доминантно негативный Cdc42, N17Cdc42 в концентрации 0,75 мг/мл (Cytoskeleton Inc.) – как это было описано в статье Аллена с соавторами (Allen et al, 1998).

Активность киназы лёгких цепей миозина подавлялось добавлением в культуральную среду ингибитора киназы лёгких цепей миозина ML7 в концентрации 50 мкМ (Sigma).

Ингибирование активности цитоплазматического динеина проводили спустя час после микроинъекций флуоресцентно-меченым тубулином клетки путём повторных микроинъекций ингибиторами динеина, в частности: моноклональными антителами 74.1 (Covance Research Products Inc.), рекомбинантным фрагментом субъединицы p150Glued динактинового комплекса CC1 (концентрация в игле 10 мг/мл) и рекомбинантной субъединицей p50 динактинового комплекса (для разобщения динактинового комплекса (Echeverri et al, 1996)). Контрольные инъекции проводили неиммунными мышиными IgG (Sigma Chemical Co.).

Специфическое подавление динамики микротрубочек достигалось воздействием на клетку сверхнизких доз таксола и нокодазола (120 и 600 наномоль соответственно), которые в данных концентрациях не воздействовали на другие процессы в клетке.

Окадаевая кислота (EMD Biosciences-Calbiochem, Madison, WI) добавлялась на два часа в концентрации 0,5 мкМ.

Для стабилизации актиновых филаментов в меланофорах, джасплакинолид добавляли в культуральную среду до конечной концентрации 1мкМ (Cramer, 1999) на 5 минут. Раствор фаллоидина (100 мкМ) микроинъектировали в меланофоры, используя установку для микроинъекции, описанную ранее (Vorobjev et al, 2001).

Для оценки пролиферации клеток использовали МТТ-тест, основанный на превращении живыми клетками желтого МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид) в водонерастворимый сине-окрашенный формазан под действием сукцинатдегидрогеназы, локализованной в мембранах митохондрий.

ПОЛУЧЕНИЕ ЦИТОПЛАСТОВ

Для получения цитопластов клетки рассаживали на специально изготовленные подложки для центрифугирования, основу которых составляли маркированные стёкла Bellco. Эти стёкла прикрепляли к кольцам, вырезанным из пластиковой чашки Петри, при помощи расплавленного парафила или эпоксидного клея. Клетки культуры, доросшей до состояния субконфлуентного монослоя, подвергали воздействию:

а) Для экспериментов по движению цитопластов – цитохалазина D (Sigma) в концентрации 1 мкг/мл и нокодазола (Sigma) в концентрации 1 мкг/мл в течение 2-3 часов

б) Для экспериментов по позиционированию centrosомы – латрункулина В в концентрации 2 мкМ в течение 2 часов.

После этого подложку с клетками помещали клетками вниз в центрифужные пробирки с той же средой и пробирки центрифугировали в течение 1 часа при 3000 об/мин при температуре 37°C. Затем клетки промывали в двух сменах культуральной среды и помещали в чистую среду, которую через 1 час заменяли на новую. В результате наряду с клетками, сохранившими ядро, получали также цитопласты, т.е. фрагменты клеток без ядра.

По другой методике клетки рассаживали на 9-мм круглые покровные стёкла, прикреплённые расплавленным парафином к пластиковым кружкам того же размера. Перед экспериментом клетки подвергали воздействию цитохалазина Б (2 мкг/мл, 1 час). В эппендорфы, заполненные культуральной средой с цитохалазином Б в концентрации 2 мкг/мл., помещали пластиковые кольца, на которые клетками вниз – наши покровные стёкла, и преинкубировали эппендорфы в течение 20 мин при 37°C. Пластиковые кольца служили дополнительной опорой для покровных стёкол во время центрифугирования. Центрифугирование проводили в центрифуге Eppendorf 5414, нагретой до 35°C при помощи фена, при 14 000 об/мин в течение 10 минут.

После центрифугирования стёкла отмывали свежей ростовой средой и инкубировали при +37°C в течение 2-17 часов. В некоторых экспериментах клетки инкубировали в течение 1 часа при 0°C для деполимеризации микротрубочек, и затем проводили их восстановление, помещая клетки в +37°C на 5-120 минут. В других экспериментах микротрубочки деполимеризовали нокодазолом (1 мкг/мл).

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

В работе использовались три основных способа трансфекции клеток: при помощи липосом, посредством электропорации и при помощи микроинъекций ДНК в клетки.

Липосомная трансфекция

Трансфекция культивируемых клеток Vero необходимыми конструктами как правило производили с помощью реагента Unifectin M (Институт биоорганической химии, Москва). В отдельных случаях использовали реагент Unifectin-56, результаты трансфекции которым не отличались от результатов трансфекции основным реагентом.

Накануне трансфекции клетки рассаживали примерно по 3×10^5 клеток на 2 мл культуральной среды в 30 мм чашку Петри или в каждую лунку 6-луночной плашки.

При +37°C в CO₂-инкубаторе клетки дорастивали до 50-80% монослоя.

1 мкг ДНК растворяли в 100 мкл буфера (10мМ Hepes, 0.9% NaCl, pH=7.4).

Добавляли 2 мкл энхансерного раствора (прилагаемого изготовителем), размешивали, инкубировали 5 мин при комнатной температуре.

В отдельном эппендорфе смешивали 7.5 – 10 мкл раствора Унифектина с буфером до достижения конечного объема 100 мкл.

Сливали содержимое обоих эппендорфов, бережно перемешивали и оставляли на 10 – 15 минут при комнатной температуре для образования в растворе липосом.

Добавляли 200 мкл полученной смеси к 2 мл культуральной среды с клетками, осторожно перемешивали и помещали в CO₂-инкубатор. Как правило, замена культуральной среды на новую не требовалась. Результаты трансфекции начинали наблюдать через 16 – 48 часов.

В отдельных случаях клетки трансфицировали при помощи трансфектанта LipfectAmine 2000 (Invitrogen). 24-48 часов спустя после трансфекции клетки рассаживали на круглые покровные стёкла для приготовления цитопластов (см. выше). Иногда для трансфекции использовали трансфицирующий агент TransIT-LT1 (Mirus Bio LLC, США) согласно методике производителя

В некоторых случаях фракцию клеток с экспрессией EGFP отделяли, используя систему FACSVantage SE (BD Biosciences, San Jose, CA).

Электропорация

Для ряда экспериментов требовалось трансфицировать большое количество клеток, не прибегая к технике липосомной трансфекции. В таких случаях использовалась методика

электропорации с использованием электропоратора (Multiporator) производства фирмы Eppendorf.

Клетки 80 – 90% монослоя снимали со дна культуральных флаконов раствором трипсина на PBS (0.02% p-p), по 3 мл на флакон, в течение 10 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе.

В каждый флакон добавляли по 8 мл культуральной среды DMEM с 10% сыворотки, взвеси клеток сливали вместе и клетки осаждали центрифугированием (1000 об/мин, в течение 3 мин). Среду, содержащую трипсин, удаляли; клетки разбавляли культуральной средой с сывороткой и их количество оценивали с помощью камеры Горяева. Затем приготавливали порции по 5 мл взвеси, содержащие примерно 3×10^6 клеток каждая.

Каждую порцию осаждали центрифугированием, осадок клеток растворяли в 400 мкл фирменного раствора для электропорации (Hypoosmolar Electroporation Buffer «Eppendorf»), затем добавляли по 15 мкл раствора ДНК и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

Электропорацию производили двумя импульсами по 570V длительностью 50 мксек.

После завершения электропорации клетки 10 мин инкубировали в кюветах при комнатной температуре, переносили взвесь клеток в 5 мл восстанавливающего раствора на основе DMEM с 10% сыворотки, содержащего 5мМ MgCl₂ и 5мМ ЭГТА. После этого проводили инкубацию при +37°C в течение 35 минут. После инкубации клетки осаждали центрифугированием, суспендировали каждую порцию в 13 мл культуральной среды до достижения концентрации клеток примерно 2.3×10^5 кл/мл и рассаживали на покровные стёкла для дальнейших экспериментов.

Микроинъекция ДНК в клетки

Иногда для трансфекции клеток применяли методику внутриядерных микроинъекций раствора ДНК в культивируемые клетки млекопитающих, используя микроманипулятор и микроинъектор фирмы Eppendorf.. В этом случае появление в клетках продуктов экспрессии наблюдалось, как правило, намного раньше, чем при трансфекциях с помощью липосом или путём электропорации. В отдельных случаях появление продуктов экспрессии наблюдали в клетках уже спустя 6 часов после инъекций. Следует отметить, что экспрессия наблюдалась также и при инъекциях ДНК в цитоплазму клеток – такие клетки начинали экспрессировать нужный белок на несколько часов позже, чем инъецированные непосредственно в ядро.

ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ И РЕПОЛИМЕРИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК

Для идентификации типа наблюдаемых цитопластов, при изучении влияния ингибирования LOSK на нуклеирующую активность centrosомы, и в ряде других случаев, мы использовали метод разборки микротрубочек в клетке на холоду с их последующей сборкой. Микротрубочки разбирали путём охлаждения клеток до 0°C (на льду) в течение 30 мин, а затем восстанавливали при помещении клеток на 13-15 мин в термостат при 37°C. Затем клетки фиксировали 3%-ным раствором параформальдегида в буфере PBS. Микротрубочки выявляли путём иммунофлуоресцентного окрашивания клеток по стандартной методике.

В ряде других экспериментов по восстановлению микротрубочек, клетки охлаждали на ледяной бане в течение 2 часов, затем добавляли 1,5 мкг/мл нокодазола (Sigma, St. Louis, MO), клетки нагревали до +37°C и отмывали нокодазол в течение различных промежутков времени (см. подписи к соответствующим иллюстрациям в разделе «Результаты»).

Иногда разборку микротрубочек в клетках для их последующего восстановления проводили добавлением в культуральную среду нокодазола в концентрации 2 мкг/мл, без охлаждения клеток.

ЛОКАЛЬНАЯ РАЗБОРКА МИКРОТРУБОЧЕК

Чтобы внести асимметрию в радиальную систему centrosомных микротрубочек, мы разработали принципиально новую экспериментальную модель воздействия на тубулиновый цитоскелет. Для того, чтобы деполимеризовать тубулин в составе микротрубочек на одном из краёв клетки, оставив интактными микротрубочки на противоположном краю, к ламелле подносили микрокапилляр с раствором нокодазола в культуральной среде (10 мкг/мл), причём таким образом, чтобы ток жидкости из капилляра был направлен в сторону от клетки. Такое направление капилляра предотвращало возможность механистического воздействия тока жидкости на ламеллу и микротрубочки в ней, препятствовало значительному поджиманию клетки и уменьшало диффузию нокодазола по направлению к дистальному краю клетки.

Для того, чтобы непрерывно контролировать интенсивность тока нокодазола через конец микрокапилляра на всём протяжении эксперимента, в раствор нокодазола добавляли флуоресцеин в низкой концентрации (1 мкг/мл).

СБОРКА МИКРОТРУБОЧЕК НА ЦЕНТРОСОМАХ *IN VITRO*

Для исследования *in vitro* активности centrosом при ингибировании киназы LOSK, клетки рассаживали на покрытые поли-L-лизином покровные стёкла и на следующий день трансфицировали посредством микроинъекций смеси конструкторов pEGFP-LamB с LOSK-ΔT либо LOSK-K63R-ΔT. Спустя 20-22 часа после микроинъекций клетки обрабатывали 1мкг/мл нокодазолом в течение 3 часов и пермеабелизовали 1% Tritin X-100, разведенном в буфере PEM. Полученные клеточные тени инкубировали с раствором 1,2 мкг/мл тубулина крысиных мозгов на буфере PEM с добавленными 1 mM ГТФ при 37°C в течение 30 минут, или с тубулином и очищенным GST-LOSK-ΔT; а затем фиксировали 1% глutarовым альдегидом (Merck, Rahway, NJ) в течение 5 минут и окрашивали антителами к тубулину.

Для исследования *in vitro* активности centrosом при ингибировании динеина, клетки также рассаживали на покровные стекла, покрытые полилизинном. На следующий день клетки обрабатывали нокодазолом (2 мкг/мл, 3 ч), промывали холодным PBS с 1 mM PMSF и лейпептином, затем помещали в PEM, содержащий 0,5% Triton X-100 и набор ингибиторов протеаз Complete EDTA-Free («Roche Applied Science», США) на 3 мин. Пермеабелизованные клеточные тени инкубировали во влажной камере с PEM с ингибиторами протеаз, содержащим мышиные моноклональные антитела 74.1 («Covance», США) в концентрации 0,25 мг/мл, или GST-p150(Glued)-CC1 (1 мг/мл), в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем замещали раствор на такой же, но с добавлением 1 mM GTP и ~1,2 мг/мл тубулина, инкубировали 40 мин при 37°, промывали PEM и фиксировали 0,5%-ным глutarовым альдегидом (рис. 4).

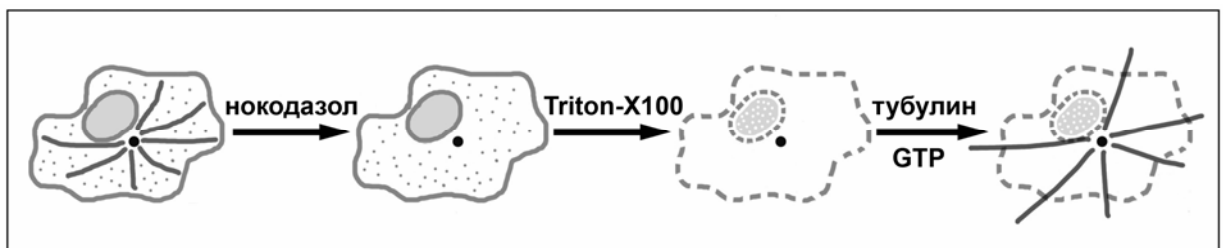


Рисунок 4. Схема постановки эксперимента по сборке микротрубочек из экзогенного тубулина на centrosомах клеточных «теней».

ИЗУЧЕНИЕ ДВИЖЕНИЯ МЕЛАНОСОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Для экспериментов по изучению движения пигментных гранул в системе *in vitro* из клеток была выделена суспензия пигментных гранул. Эта суспензия затем была перфузирована в проточную камеру с флуоресцентно мечеными актиновыми филаментами, абсорбированными на покрытое нитроцеллюлозой покровное стёкло (Sellers and Jiang, 1998). Выделение пигментных гранул осуществляли как было описано ранее (Kashina et al, 2004), за исключением того, что в ИМВ буфер, используемый для ресуспендирования финального осадка пигментных гранул, был добавлен 1мМ DTT, 1 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (type I, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) и 25 мМ GTP-γ-S. 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). Собранная проточная камера была последовательно перфузирована блокирующим раствором (20 мМ MOPS pH 7.2, 125 мМ NaCl, 0.1 мМ EGTA, 1 мМ DTT, 10 мг/мл BSA), промывочным раствором (20 мМ MOPS pH 7.2, 80 мМ KCL, 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ EGTA, 5 мМ DTT), суспензией пигментных гранул, и *motility buffer* (промывочный раствор с добавленными 1 мМ АТФ, 2.5 мг/мл глюкозой, 0.1 мг/мл глюкозооксидазой, и 0.02 мг/мл каталазой). Видеосъёмку актиновых филаментов с пигментными гранулами осуществляли с интервалами 3 секунды между кадрами, с использованием набора родаминовых фильтров. Чтобы изучить воздействие джасплакинолида на движение пигментных гранул, в *motility buffer* было добавлено 1мкМ джасплакинолида. В ряде экспериментов актиновые филаменты были собраны из родамин-меченого актина и стабилизированы джасплакинолидом вместо родамин-фаллоидина.

СОЗДАНИЕ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ

Все использованные в работе кДНК киназы LOSK соответствуют последовательности кДНК белка KIAA0204 (человеческий вариант LOSK), номер доступа NCBI – NM_014720. кДНК каталитического домена LOSK-ΔТ (аминокислоты с 1 по 342, рис. 32А, см. раздел Результаты и обсуждение) была получена путём ПЦР из библиотеки кДНК человеческого мозга. Чтобы сделать мутацию K63R, кДНК мутировали при помощи QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRatagene, La Jolla, CA). Для создания делеционного мутанта ΔNΔТ (аминокислоты 94-342) использовали внутренний сайт XbaI. кДНК LOSK (661-1018 аминокислотные фрагменты) была получена посредством ПЦР, используя библиотеку

кДНК клеток HeLa. Фрагмент кДНК, кодирующий аминокислоты 779-1018 (фрагмент M2f, рис. 32А) был вырезан, используя внутренний сайт EcoR V. Полноразмерная кДНК человеческой LOSK была любезно предоставлена Исследовательским Институтом ДНК Kazuza (Япония). Используя эту кДНК, посредством ПЦР были получены фрагмент с 339 по 663 а/к (M1f, рис 32А) и фрагмент LOSK-Ct (994-1235 а/к, рис 32А).

Полноразмерная кДНК человеческого динактина-1 (p150Glued) была любезно предоставлена Dr. W. Steffen (Медицинская школа Ганновера, Германия). кДНК были клонированы в вектора pQE30 (Qiagen, Hilden, Germany), pEGFPC2, pEGFPC1 и pDsRed-Monomer-C1 (Clontech, Palo Alto, CA), pGEX2T и pGEX4T (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Плазида pEGFP-LamB для экспрессии в клетках млекопитающих EGFP-слитого ламина Б была любезно предоставлена С. Курчашовой (НИИ ФХБ МГУ, Москва, Россия). Все итоговые конструкторы были проверены посредством автоматического секвенирования.

Для деплеции посредством RNAi использовали вектор pG-Shin2, любезно предоставленный Dr. S.-I. Kojima, Northwestern University, Chicago, IL. Этот вектор содержит кассету синтеза shRNA под H1 промотором, и кДНК зелёного флуоресцентного белка (GFP) под цитомегаловирусным промотором CMV (Kojima et al., 2004). Праймеры были сконструированы в соответствии с инструкциями производителя и включали 19-нуклеотидные (nt) target последовательности, выбранные в открытой рамке считывания LOSK (ORF; 278-297 и 3202-3221 nt). Получившиеся конструкторы были названы соответственно pG-Shin2-4.1 и pG-Shin2-6.1. Рестриктные эндонуклеазы и прочие ферменты для клонирования были заказаны в фирмах Сибэнзим (Новосибирск, Россия) и в Fermentas International (Burlington, Canada).

Вектор pCDNA3Zeo+ с полноразмерной кДНК белка p150Glued человека был любезно предоставлен В. Штеффеном. Для клонирования фрагментов кДНК использовали ПЦР с праймерами, несущими сайты для рестриктаз. Праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Для клонирования кДНК p150Glued-CC1 в pEGFP-C2 («Clontech», США) использовали праймеры 5'-aaagaattcgaggagggaagggt и 5'-aaaggtaccaggtgctgctgtgtgcct, для клонирования междоменного участка p150Glued (а.о. 550 - 923, p150Glued-ID) в тот же вектор - праймеры 5'-ttagaattcccagagaccttgactt и 5'-ttaggtaccccggtggaggctgctg (клонировали по сайтам EcoRI и KpnI). Для клонирования кДНК p150Glued-CC1 в вектор pGEX-4T3 («GE Healthcare», Великобритания) - праймеры 5'-aaaggtaccgaggagggaagggt и 5'-aaagtcgacaggtgctgctgttgc (клонировали по сайтам BamHI и SalI). ПЦР проводили с помощью набора реактивов GenePak PCR Core («Изоген», Россия). Рестриктазы приобретали в фирме «MBI Fermentas» (Литва). Полученные

конструкты верифицировали автоматическим секвенированием в Центре коллективного пользования «Геном» (Россия).

кДНК паксиллина, использованная для создания конструкции pmCherry-Pax, кодирующей слитый с красным флуоресцентным белком паксиллин (маркёрный белок фокальных контактов), была любезно предоставлена проф. И.Кавериной, США.

Плазида GFP-EB1 любезно предоставлена проф. А. Ахмановой, США. Плазида GFP-centrin2 была любезно предоставлена Dr. G. Borisy, США

В работе использовали также ДНК, кодирующую MST-GFP, т.е. GFP-слитый транкированный миозин Va (Rogers et al, 1999), или экспрессионный вектор pGFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA).

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

После наращивания необходимого количества бактериальной культуры при 37°C в среде LB, содержащей необходимый антибиотик, суспензию клеток центрифугировали 10 минут на скорости 4000 об/мин и затем удаляли супернатант. Осадок клеток растворяли в буфере P1 путём вортексирования. Затем проводили лизис, добавляя 0.5 объёма буфера P2, осторожно перемешивая и инкубируя при комнатной температуре ровно 5 минут. Добавляли аналогичный объём охлаждённого буфера P3, перемешивали и инкубировали на льду 15-20 минут. Затем центрифугировали при 4°C в течение 30 минут на скорости 13 000 об/мин и быстро переносили супернатант в новые центрифужные пробирки. Повторно центрифугировали при 4°C в течение 15 минут на скорости 13 000 об/мин., опять немедленно переносили супернатант в новые пробирки. После эквilibрирования колонки QIAGEN-tip-100 четырьмя миллилитрами буфера QBT, заливали в него полученный в результате центрифугирования раствор и после того, как он прокапает в поддон, промывали колонку при помощи 10 мл буфера QC - 2 раза. Элюировали ДНК при помощи 5 мл буфера QF и помещали раствор ДНК в лёд, после чего осаждали ДНК добавлением 0.7 объёма изопропанола комнатной температуры. Немедленно центрифугировали при 4°C в течение 30 минут на скорости 11 000 об/мин, удаляли супернатант, промывали ДНК 70% C₂H₅OH, высушивали её, удаляя остатки спирта и растворяли в буфере TE с pH=8.0. При проведении вышеперечисленных процедур использовали следующие растворы:

Среда Luria-Bertani (LB): в бидистилляте 1% NaCl, 1% бакто-триптона, 0.5% дрожжевого экстракта; pH довели до 7.0 добавлением 5N NaOH

Буфер P1 (ресуспензионный): 50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 10 mM ЭДТА, 100 мкг/мл РНКазы А.

Буфер Р2 (лизисный): 200 мМ NaCl, 1% SDS

Буфер Р3 (нейтрализационный): 3 М ацетат калия, pH=5.5

Буфер QBT (эквilibровочный): 750 мМ NaCl, 50 мМ MOPS (pH=7.0), 15% C₂H₅OH, 0.15% TritonX100.

Буфер QC (промывочный): 1М NaCl, 50 мМ MOPS (pH=7.0), 15% C₂H₅OH

Буфер QF (элюировочный): 1.25 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH=8.5), 15% C₂H₅OH

В большинстве случаев для очистки плазмидной ДНК использовали стандартные коммерческие наборы QIAprep Spin Miniprep Kit и Midiprep Kit, а также EndoFree Plasmid Maxi Kit и Endo Free Plasmid Mega Kit (Qiagen, Chatsworth, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Состав буферов различного года выпуска мог претерпевать незначительные изменения.

ВЫДЕЛЕНИЕ ТУБУЛИНА ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО СБОРКЕ МИКРОТРУБОЧЕК В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Для экспериментов с тубулином использовали буфер PEM (80 мМ PIPES, pH 6,7, 20 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА, 0,1 мМ ЭДТА). Микротрубочки выделяли из головного мозга свиней или крыс и очищали тубулин по ранее описанной методике (Шанина с соавт., 2001; Castoldi and Popov, 2003). Вкратце, мозги гомогенизировали в равном объеме холодного 50 мМ KCl, 50 мМ имидазола pH=7.2, 1 мМ MgCl₂, 0.1 мМ ЭДТА. Гомогенат затем центрифугировали при +4°C и супернатант переносили в 4М глицерин, 1мМ ЭГТА, 0.1 мМ ГТФ и 1 мМ АТФ, и затем нагревали до 37°C. Полученные за один цикл деполимеризации–полимеризации микротрубочки суспендировали в буфере, содержащем 0,5 М PIPES, pH 6,8, 20 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 2 мМ ЭГТА, 1 мМ GTP на холоду, осветляли центрифугированием, к супернатанту добавляли DMSO до 5% и прогревали 30 мин при 37°. Образовывалась суспензия микротрубочек аномального строения, обедненных ассоциированными с тубулином белками. Суспензию наносили на слой 4 М глицерина на том же буфере в роторе 45 Ti центрифуги L-8 Spinco (Beckman, США) и осаждали центрифугированием (35000 об./мин, 60 мин). Осадок суспендировали в буфере PEM (50 мМ PIPES pH=6.8, 50 мМ KCl, 1мМ ЭГТА и 1мМ MgCl₂)с 1 мМ GTP и осветляли центрифугированием. Раствор тубулина замораживали в жидком азоте или немедленно использовали для дальнейших экспериментов.

ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Для экспрессии рекомбинантного белка GST-p150Glued-CC1, последовательность мышинового CC1 была, используя метод ПЦР, клонирована в вектор pGEX, экспрессирована в *Escherichia coli* и очищена путём хроматографии на колонке с глутатион-агарозой («Sigma») в соответствии с инструкциями производителя. Для наработки и очистки свободного GST использовали пустой вектор.

Субъединица динактина p50 была экспрессирована в бактериях и очищена путём MonoQ хроматографии, как это было описано ранее (Wittmann and Hyman, 1999).

БЕЛКОВЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ И ИММУНОБЛОТИНГ

Для разделения белков использовали метод ступенчатого градиентного электрофореза в денатурирующих условиях в системе Лэммли (Laemmli, 1970). Для приготовления проб для электрофореза, монослой культивируемых клеток споласкивали PBS, затем ещё раз быстро споласкивали водой, клетки соскабливали в sample buffer и нагревали до 100°C в течение 3 минут. Клетки, прошедшие флуоресцентно-активированную сортировку (FACS), незамедлительно растворяли в двукратном sample buffer и нагревали до 100°C в течение 5 минут. Денатурирующий форез как клеточных гомогенатов, так и смесей киназной реакции проводили в 6-12% градиентных гелях.

Для иммуноблотинга белки из геля переносили на нитроцеллюлозный фильтр Hybond C (Amersham Pharmacia Biotech) методом полусухого переноса (Kyhse-Andersen, 1984). На пластину угольного электрода (пользовались прибором для полусухого переноса белков из геля на мембраны фирмы LKB) помещали три листа фильтровальной бумаги, смоченных в буфере А (0.3 М Трис, 20% C₂H₅ОН), затем шесть листов фильтровальной бумаги, смоченной буфером В (25 mM Трис, 20% C₂H₅ОН). Затем помещали на них нитроцеллюлозный фильтр, и после этого клали гель. Сверху его накрывали шестью листами фильтровальной бумаги, смоченной в буфере С (25 mM Трис, 40 mM аминокaproновой кислоты, 20% C₂H₅ОН). Электроперенос проводили 1 час при напряжении 15 В и силе тока 230-250 мА. Нитроцеллюлозу окрашивали 0,5% Ponsae S (Serva) 1 мин. Избыток красителя отмывали водой. Забивку проводили 2% раствором Tween-20 на TBS 2 минуты. Затем избыток Tween-20 отмывали три раза по 10 минут TBS с 0,05% Tween-20. Инкубацию с первыми антителами проводили в течение ночи при температуре 4°C. Антитела разводили на TBS с 0,05% Tween-20, использовали поликлональные антитела pol3D2 с концентрацией 0,0005 мг/мл (концентрацию антител

определяли по оптической плотности). После этого фильтры промывали TBS с 0,05% Tween-20 три раза по 10 минут, затем инкубировали их со вторыми антителами, которые использовали в разведении 1:500-1:1000 для конъюгатов антител с пероксидазой хрена и 1:10000-1:50000 для конъюгатов антител с щелочной фосфатазой. Затем вновь отмывали TBS с 0,05% Tween-20 три раза по 10 минут.

Проявку в случае конъюгата с щелочной фосфатазой проводили смесью 5 мл NBT (Nitro Blue Tetrasoleum, Sigma) (0,34 мг/мл в TBM:0,1 М Трис, 0,1 М хлористого натрия, 0,05 М хлористого магния) и 50 мкл BCIP (5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат, Sigma, 17,5 мг/мл в ДМСО) до появления фиолетового окрашивания. В случае использования пероксидазного конъюгата для проявки фильтры инкубировали в 5 мг/мл DAB (3,3'-диаминобензидин) на 100 мМ Трис, pH 7.6 с добавлением 0,03% перекиси водорода до появления коричневой окраски.

По другой методике белки методом полусухого переноса переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану HyBond-C (GE Healthcare), проводили забивку TBS с 0,02% Tween20 и 0,1% cold water fish желатином (Sigma; TBS/Tween/gelatin) в течение ночи, затем отмывали TBS/Tween, инкубировали с первыми антителами, разведёнными на TBS/Tween/желатине, отмывали TBS/Tween, инкубировали с козьими анти-кроличьими или анти-мышинными IgG антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Imtech, Москва, Россия), разведёнными на TBS/Tween/желатине, и затем отмывали TBS. Пероксидаза была в виде раствора 3,3'-диаминобензидина с H₂O₂.

ПРОВЕРКА КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Каталитический фрагмент слитой с глутатион-S-трансферазой (GST) LOSK-ΔT был очищен на колонке с глутатион-агарозой (Sigma). Неспецифический субстрат LOSK – основной белок миелин (MBP) был получен из фирмы Sigma. Киназную реакцию проводили в буфере, содержащем 50 мМ HEPES, pH=7.6, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl и 1мМ EGTA, а также белки, указанные на подписях к рисункам и 36 нМ γ³²P-АТФ (5000 Ci/mM, FEI Research Center, Обнинск, Россия). Реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Для того чтобы остановить реакцию, добавляли 0,5 объёма трёхкратного sample buffer (1% SDS, 50 мМ TrisHCl pH=6.6, 10% глицерина и 50 мМ 2-меркаптоэтанола) и затем нагревали смесь до 100°C в течение 3 минут, после чего наносили пробы на фореz. Форезные гели окрашивали Coomassie G-250, высушивали и проводили радиоавтографию.

ПРИБОРЫ ДЛЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Для наблюдения клеток, проведения микроинъекций различных ингибиторов и плазмидной ДНК, для осуществления локальной разборки микротрубочек и наблюдения экспериментов в системе *in vitro*, а также для проведения фото- и видеосъёмки на разных этапах работы были использованы:

1). Флуоресцентный микроскоп Axiophot (Zeiss) с объективами Neofluar и Plan-Apo 40× и 63× 1.25 NA, снабжённый 12-битной 1 МГц охлаждаемой CCD-камерой MicroMax 782Y (Princeton Instruments), управляемой программным обеспечением WinView32 (Princeton Research Instruments, Princeton, NJ).

2). Инвертированный флуоресцентный микроскоп ICM-405 (Opton), с фазовоконтрастным суховоздушным объективом 32× и подогревом предметного столика.

3). Инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200M (Zeiss), снабжённый комплексной системой термостатирования и 12-битной цифровой видеокамерой AxioCamHR, управляемой программой AxioVision.

4). Инвертированный флуоресцентный микроскоп Diaphot 300 (Nikon), с системой терморегуляции Biortech, 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 живых клеток перед началом наблюдений и видеосъёмки в культуральную среду добавляли раствор поглотителя кислорода оксиразы (Oxurase, Company) и её субстрат – молочную кислоту, как описано ранее (Rodionov et al, 2001).

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Препараты для электронномикроскопических исследований платиновых реплик изготавливали, как было описано ранее (Svitkina, 2007). Для идентификации актиновых филаментов последние были декорированы субфрагментами миозина S1 или тяжёлым меромиозином во время приготовления препаратов, как было описано ранее (Rodionov et al, 1998). Электронномикроскопические снимки были получены с использованием

трансмиссионного электронного микроскопа JEOL 1200EX при 120 kV. Для стереоэлектронной микроскопии, пары снимков одного и того же поля зрения брались с наклоном 10° . Плотность актиновых микрофиламентов в контрольных и обработанных джасплакинолидом клетках определяли путём оценки общей длины актиновых филаментов внутри участков 2.5×2.5 мкм, выбранных примерно на полпути между центром клетки и её краем.

АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ И ВИДЕО

Анализ степени упорядоченности микротрубочек

Для оценки радиальности системы микротрубочек мы применяли три различных способа анализа цифровых фотографий фиксированных клеток, окрашенных антителами к тубулину. Во-первых, это была визуальная оценка: оценивали само наличие и степень выраженности центра организации микротрубочек как участка с максимальной интенсивностью флуоресценции тубулина в центре клетки, от которого к периферии отходят микротрубочки. Для нахождения геометрического центра (центроида) клеток и цитопластов в ряде случаев была использована программа Autodesk Inventor 9 (Autodesk).

Вторым способом была оценка радиальности с помощью программы Metamorph версии 4.6 (Universal Imaging Corporation, США). В этом случае измеряли среднюю флуоресценцию по всей площади клетки и затем отдельно в её центральной области. За центральную область принимали круг с центром, расположенном в центроиде клетки, площадь которого составляла 15% от всей площади клетки. Затем вычисляли коэффициент радиальности, представляющий собой отношение этих двух величин. Если коэффициент радиальности был больше 1,5, считали, что система микротрубочек в клетке радиальна, если меньше 1,5 - что радиальность микротрубочек в клетке нарушена (Рис.5а).

Третий способ оценки радиальности был основан на измерении падения флуоресценции микротрубочек по мере удаления от центра клетки, подобно тому, как это впервые было описано в статье Смуровой с соавторами (Смурова с соавт., 2002). Наконец, радиальность расположения микротрубочек оценивали с помощью программы Fluorescence, написанной в нашей лаборатории специально для этой цели (рис.5б). Эта программа позволяет измерить падение флуоресценции по мере удаления от центра клетки. При этом пользователю необходимо только открыть необходимый файл с микрофотографией, курсором отметить центр клетки и точки на её крае, к которым будут автоматически проведены радиусы, и задать размер участков измерения флуоресценции и шаг измерения. Полученные данные программа записывает в виде log-файла, при этом единицы измерения

флуоресценции автоматически переводятся в проценты от максимального уровня флуоресценции в центральной точке. Когда система микротрубочек в клетке строго радиальна, происходит резкое падение флуоресценции от центра к краю клетки. Если система микротрубочек неупорядочена, после некоторого понижения уровня флуоресценции, график выходит на плато. С помощью программы Fluorescence проводили проверку случайно выбранных клеток на радиальность в них микротрубочек, и во всех случаях оценка программы Fluorescence совпадала с таковой как при анализе с помощью программы Metamorph v.4.6.

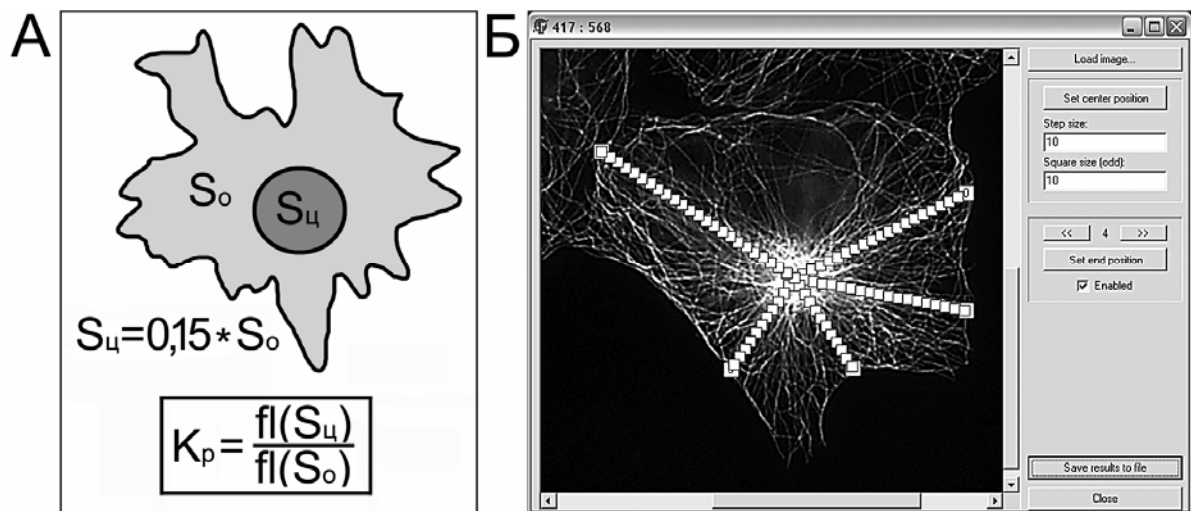


Рисунок 5. (А) Схема оценки радиальности микротрубочек при помощи программы Metamorph. После иммунофлуоресцентного окрашивания клеток антителами к тубулину вычисляется общая флуоресценция по всей площади клетки S_o и в центральной области $S_{\text{ц}}$. Коэффициент радиальности представляет собой отношение этих двух величин. (Б) Рабочее окно программы Fluorescence. После указания центральной точки клетки и направлений радиусов, шага измерения и площади измеряемых областей, программа автоматически записывает в журнал числовые данные для построения графика по флуоресценции микротрубочек в направлении от центра к краю клетки.

Обсчёт динамики микротрубочек.

Видеосъёмка флуоресценции клеток, инъецированных Су3-тубулином (контрольных или экспериментальных), велась при большом увеличении (объектив 100x) с интервалом между кадрами 2 секунды. Каждый видеоролик продолжительностью 2 минуты содержал изображение индивидуальной микротрубочки, причём её динамичный (плюс-) конец всё время находился в поле зрения. С помощью программы Metamorph вычерчивались треки, позволяющие оценить удлинение или укорочение микротрубочки, происходящее при смене очередного кадра. Используя объект-микрометр, чтобы оценить эти изменения длины в микрометрах, были получены такие характеристики динамики микротрубочек, как средние

скорости роста и укорочения, частоты спасений и катастроф, а также средние продолжительности фаз роста и укорочения микротрубочек. При подавлении динамики микротрубочек использовались сверхнизкие (наномолярные) концентрации нокодазола и таксола в культуральной среде. Для каждой выборки использовались как минимум 20 индивидуальных микротрубочек из нескольких клеток.

Прижизненный анализ нуклеирующей активности centrosомы

Чтобы оценить и сравнить между собой интенсивность нуклеации микротрубочек на centrosомах различных клеток, получали стопки последовательных кадров клеток, трансфицированных кодирующей GFP-EB1 кДНК, сделанных через 3-секундные временные интервалы между кадрами. Затем количество комет EB1, вылетающих из области centrosомы за единицу времени, подсчитывалось для каждой клетки.

Анализ содержания белков centrosомы и количества динамитина

Уровень содержания различных белков centrosомы оценивали, подсчитывая среднюю интенсивность флуоресценции в centrosомной области. Снимки centrosом получали, используя объектив x100 1.25 NA, затем при помощи программного обеспечения Metamorph очерчивали круг диаметром 1 мкм, обозначающий область centrosомы, и в нём определяли среднюю интенсивность флуоресценции. Чтобы определить средний уровень фонового свечения в цитоплазме, определяли флуоресценцию в десяти таких же кругах вне области centrosомы, затем усредняли результат и полученное значение вычитали из показателя centrosомной флуоресценции. Для каждого из экспериментов подобные данные о флуоресценции в области centrosомы подсчитывали минимум для 30 клеток, чтобы обеспечить необходимую степень достоверности результатов.

Для оценки соотношения флуоресценции динамитина и актина в цитопластах, зафиксированные и окрашенные антителами цитопласты фотографировали и затем измеряли интенсивность флуоресценции в полосках шириной 1,3 мкм, перпендикулярных краю ламеллы, используя программу ScionImage. При этом вычитали фоновую флуоресценцию и записывали значения получившихся пиков. Диаграммы и графики, представленные в разделе «Результаты», были построены с помощью программы Sigma Plot 7.0 (SPSS Inc.).

Измерение перемещения centrosомы в клетках

В наших экспериментах изучали смещение centrosомы в неподвижной клетке относительно её геометрического центра (центроида). Центроид представляет собой точку,

равноудалённую от множества точек, лежащих по периметру клетки, взятых попарно и соединённых диаметром клетки. Координаты центроида высчитывали с помощью программы Metamorph после обведения периметра клетки вручную на мониторе компьютера.

После съёмки видеоролика клетки с перемещающейся центросомой, фиксировали координаты начального положения центросомы (на первом кадре), конечного положения центросомы (на последнем кадре) и координаты центра пятна нокодазола (конца микрокапилляра), которые не изменялись на протяжении эксперимента. Пятно нокодазола, как было описано выше, визуализировали путём добавления к раствору флуоресцеина. Центроид также высчитывали для первого и последнего кадров видеоролика. Для статистики отбирали лишь неподвижные клетки, в которых начальные и конечные координаты центроида менялись незначительно.

Полученные данные наносились на общую систему координат (см. рис.6).

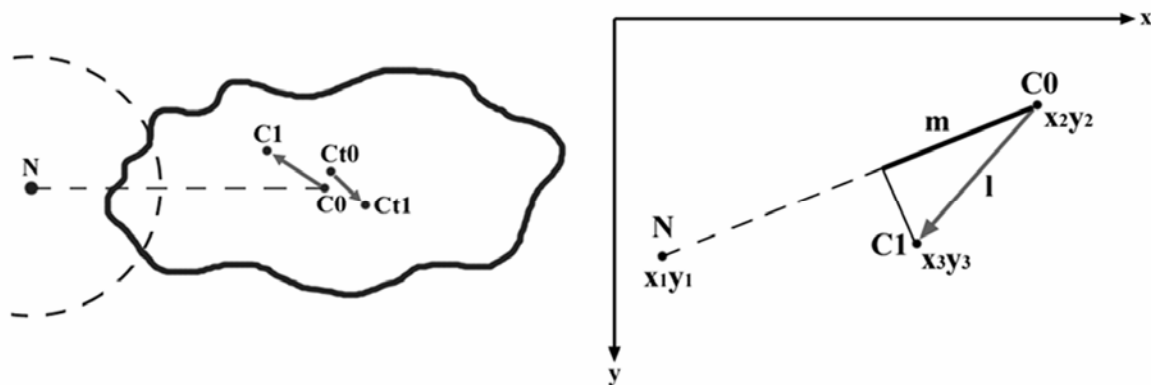


Рисунок.6 . Слева – схема измерений при изучении перемещения центросомы в клетке. N – центр пятна нокодазола, C0 и C1 – начальное и конечное положение центросомы соответственно. Ct0 и Ct1 – начальное и конечное положение центроида клетки (вычисляемый компьютерной программой Metamorph). Справа показано, каким образом вычисляли перемещение.

x_1y_1 – координаты центра пятна нокодазола

x_2y_2 – координаты начального положения центросомы

x_3y_3 – координаты конечного положения центросомы

Длину вектора l вычисляли по формуле: $l = \sqrt{(x_2 - x_3)^2 + (y_2 - y_3)^2}$

Длину вектора m (проекция смещения центросомы на линию, соединяющую её начальное положение и центр пятна нокодазола) вычисляли по формуле:

$$m = \frac{(x_3 - x_2)(x_1 - x_2) + (y_3 - y_2)(y_1 - y_2)}{\sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}}$$

Аналогичным способом вычисляли смещение центроида клетки, если он было (для статистики отбирали клетки, у которых смещение центроида было незначительным). После этого, чтобы вычислить смещение центросомы относительно центроида, вектора их смещения суммировали по правилам сложения векторов. При этом направление к нокодазолу брали как положительное, а от него – отрицательное.

Далее расчёт проводили с использованием приведённой на рис.6 формулы (обозначения см. на подписи к рисунку) для того, чтобы высчитать перемещение центросомы относительно центроида клетки. Поскольку продолжительность экспериментов различалась (наблюдение за клетками прекращали, как только клетка начинала подтягивать ламеллу или если динамика микротрубочек на дистальном конце начинала меняться), для сравнения результатов все данные были усреднены: продолжительность взята равной 10,5 минутам. В действительности же большое количество экспериментов превышало длительностью 15-17 минут непрерывного наблюдения.

Выбор модели позиционирования центросомы

Мы разработали как непрерывную детерминистическую модель, так и дискретную стохастическую. В обеих моделях плоская клетка воспроизведена в качестве диска радиусом около 20 мкм – размер был подобран нами, исходя из микроскопических снимков. В непрерывной модели мы поместили центросому на дистанции x от клеточного центра. Из соображений симметрии, итоговая сила, приложенная ко всем центросомным микротрубочкам, направлена вдоль оси x по направлению к клеточному центру (рис 7). Мы рассматриваем индивидуальную микротрубочку (рис. 7) и три силы, приложенные к ней: толкающая сила f_{push} , действующая на её плюс-конец и направленная к минус-концу; сила динеина f_{dyn} , тянущая микротрубочки в направлении плюс-конца; и сила, продуцируемая током актина f_{act} , которая тащит за собой микротрубочки по направлению к клеточному центру. Исходные динеиновая и толкающая сила равны, в то время как волокущая сила актина увеличивается от центра к краям клетки, поскольку ток актина уменьшается по направлению от периферии к центру. Мы просуммировали динеиновую и актиновую силы вдоль длины каждой из микротрубочек и затем объединили результаты по всем микротрубочкам с тем, чтобы получить суммарную силу, воздействующую на центросому.

В процессе объединения мы допустили, что существует постоянное число моторов на единицу длины микротрубочки, что силы моторов аддитивны, и что сила каждого мотора независима от движения микротрубочки. Последние два допущения полностью правомерны, поскольку микротрубочки движутся гораздо медленнее, чем скользят свободные динеиновые моторы, так что каждый динеиновый мотор работает со своей нормальной скоростью.

В непрерывной модели мы допустили, что звезда микротрубочек радиально симметрична вокруг центросомы. Мы применили теорию динамической неустойчивости (Dogterom and Leibler, 1993), чтобы отыскать находящееся в состоянии устойчивого равновесия распределение плюс-концов микротрубочек, используемое нами при

интегрировании. Когда на клетку локально воздействуют нокодазолом, мы принимаем, что любая микротрубочка, достигающая края зоны воздействия нокодазолом, претерпевает катастрофу, и что в пределах данной зоны микротрубочек нет. Все описанные вычисления мы повторили для эллиптических клеток и одномерных (1D) клеток. Мы также приняли во внимание гипотетические силы, приложенные кинезином вдоль микротрубочек, и силы динеина на краях клетки.

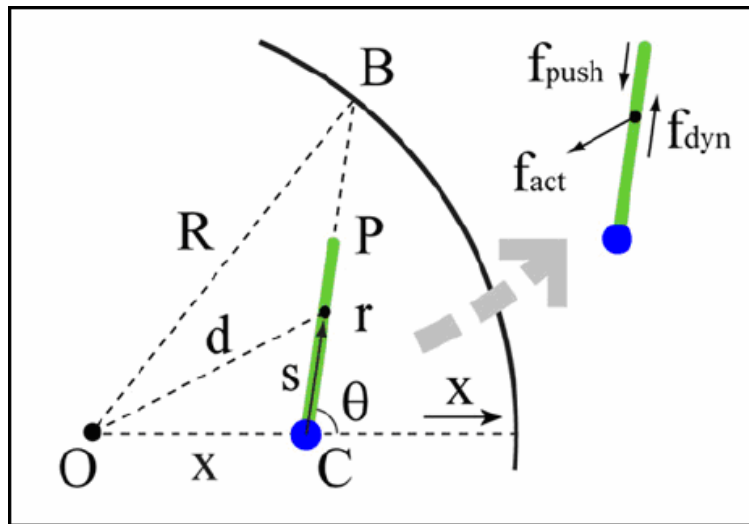


Рисунок 7. Геометрия возникновения сил, действующих на центросому.

Три основные силы, воздействующие на одиночную микротрубочку (показана в виде зелёной линии), имеющую в длину r , в клетке с радиусом R : зависящая от длины микротрубочки сила тянущих наружу динеинов f_{dyn} , зависящая от собственно потока и длины микротрубочки сила f_{act} , продуцируемая центростремительным током актина, и толкающая внутрь сила f_{push} . Центросома (синяя точка) смещена из клеточного центра на величину x . O , C , P , B , d , s и θ - геометрические переменные, характеризующие позицию и ориентацию микротрубочки, используемые для вычислений сил.

Поскольку число микротрубочек по экспериментальным оценкам составляет порядка 100, и известная временная шкала динамической нестабильности менее чем на порядок быстрее, нежели характерная временная шкала перемещения центросомы, стохастические эффекты также должны учитываться. Соответственно, мы разработали дискретную стохастическую модель, для того чтобы сверять с ней результаты непрерывной модели и создать визуальную презентацию нашего моделирования – как это показано в видеороликах 8–11.

В стохастической модели индивидуальные микротрубочки и их динамическая нестабильность подробно рассмотрены, как это описано у Пауля с соавторами (Paul et al, 2009). Микротрубочки нуклеируются на центросоме с постоянной скоростью. На

протяжении каждого временного отрезка они растут или укорачиваются с постоянными скоростями. Переход между фазами роста и укорочения происходит случайно, с наблюдаемой константой частоты катастроф или спасений. На каждом временном отрезке сила, приложенная к каждой микротрубочке, вычислялась в цифровом отношении в соответствии с формулами из непрерывной модели, и силы от всех текущих микротрубочек суммировались, с тем чтобы получить общую силу воздействия на центросому. Потом центросома смещалась в соответствии с уравнением

$$d\vec{x} / dt = \mu F$$

(Civelekoglu-Scholey and Scholey, 2010), где $\vec{x}$ это координаты центросомы в двух измерениях, F это суммарная текущая сила, приложенная к центросоме, и μ – это подвижность центросомы. Предварительные оценки показали, что создание полностью стохастической модели с введённым случайным миганием включения-выключения сил качественным образом никак не влияет на получаемые результаты.

Определение скорости роста актиновых филаментов по данным FRAP

Чтобы оценить скорость роста актиновых филаментов, мы анализировали данные, полученные методом FRAP, считая восстановление флуоресценции в обесцвеченной зоне результатом роста актиновых филаментов. Такая модель предполагает, что все филаменты растут с одинаковой скоростью, и что углы, под которыми филаменты входят в выжженную зону, распределены равномерно. Формула, следующая из этой модели для интенсивности флуоресценции до насыщения

$$F(t) = F_0 \psi(t / t_0)$$

где функция $\psi(x)$ определяется как

$$\psi(x) = \begin{cases} x, & \text{if } 0 \leq x \leq 1 \\ x[1 - \frac{2}{\pi} (\arccos(1/x) + (1/x) \ln(x - \sqrt{x^2 - 1}))], & \text{if } x > 1 \end{cases}$$

Параметр t_0 связан со скоростью роста v соотношением

$$t_0 = h / v \quad \text{где } h \text{ обозначает ширину зоны обесцвечивания (} h = 3 \text{ мкм).}$$

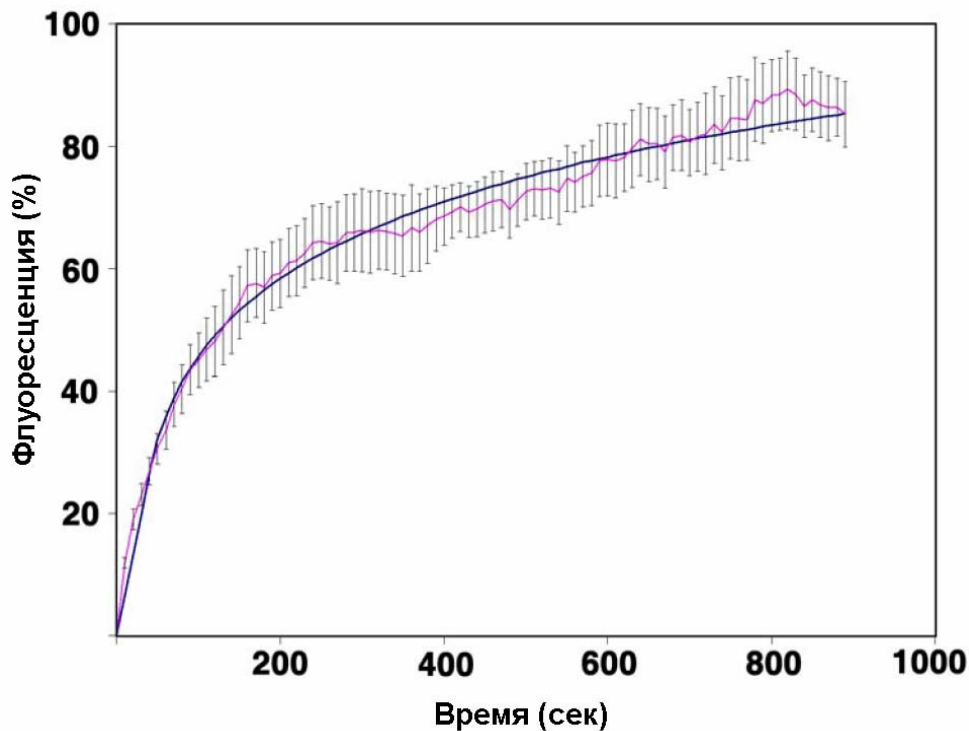


Рисунок 8. Подгонка вычисленных компьютером параметров восстановления флуоресценции к реальным экспериментально полученным данным FRAP (розовая линия) путём изменения величин t_0 и F_0 . Наилучшее совпадение (синяя линия) получается при $t_0 \sim 42$ сек, что соответствует скорости роста актиновых филаментов 4,3 мкм/мин. Погрешность обозначает $\pm SD$ экспериментальных данных.

Отладку модели производили путём минимизирования среднеквадратичной разницы между экспериментальными данными и теорией, изменяя при этом параметры t_0 и F_0 . Оптимизацию проводили, используя вычислительную программу Microsoft Excel, базирующуюся на обобщённом методе уменьшающегося градиента (Liebman et al, 1986), т.е. на грубой версии алгоритма Бroyдена-Флетчера-Гольдфарба-Шанно (Press et al, 1999). Кривая с наилучшим совпадением, показанная на (рис 8), даёт результат $t_0 \sim 42$ сек, что соответствует скорости роста актиновых филаментов 4.3 мкм/мин.

Определение характеристик линейных пробежек меланосом и лизосом

Чтобы вычлениить линейные перемещения пигментных гранул и лизосом по актиновым филаментам и определить основные характеристики их актин-зависимого движения (длину, продолжительность и скорость одиночных пробежек, а также долю от общего времени, проведённую в движении по филаменту), мы разложили траектории пигментных гранул на линейные пробежки и периоды случайных движений, напоминающих диффузию. Мы

приняли движение органелл в цитоплазме как перемещение точки по двумерной плоскости в соответствии с уравнением:

$$d\mathbf{x} = A c dt + (1-A) v d\mathbf{W}_t \quad (*)$$

где $\mathbf{x}(t) = (x_1(t), x_2(t))$ – координаты точки;

$\mathbf{c}(t) = (c_1(t), c_2(t))$ – вектор, описывающий геометрию актиновых филаментов

$\mathbf{W}_t$ – стандартное двумерное Броуновское движение, $v > 0$

$A(t)$ – индикатор актиновых пробежек: $A(t)=1$ в случае, когда гранула расположена на актиновом филаменте, и равна нулю в противном случае.

Если актиновые филаменты линейны, то $\mathbf{c}$ является константой в течение единичной актиновой пробежки; изогнутая форма актиновых филаментов может отражаться в изменении $\mathbf{c}$ с течением времени. Мы рассматриваем одномерную проекцию координат точки $\mathbf{x}$ на линию наименьших квадратов, используя координаты точек во время хода эксперимента. Выравнивание динамики проекций является одномерным аналогом уравнения (*) со скалярными параметрами.

Основная идея разложения траектории органеллы на составные части заключается в том, что за один и тот же временной интервал органелла, движущаяся вдоль актинового филамента, осуществит более длинную пробежку, нежели диффундирующая органелла. В самом деле, если актиновые филаменты не изогнуты чрезмерным образом (то есть, если $\mathbf{c}(t)$ приблизительно постоянна во время одиночной пробежки по актину), то среднестатистическая длина одиночной пробежки по актину за время T будет пропорциональна T , в то время как средняя длина смещения путём диффузии за то же время будет пропорциональна $\sqrt{T}$. Если длительность пробежек достаточно велика, то можно различить две субпопуляции пробежек: «высокоскоростные», которые соответствуют пробежкам по актину, и «низкоскоростные», которые соответствуют диффузии.

Таким образом, проблема идентификации пробежек уменьшается до разделения высоко- и низкоскоростных сегментов одномерного движения. Эта проблема эффективно решается посредством так называемого *Multiscale Trend Analysis* (MTA) – набору статистических методов, специально созданных для вычленения характерных величин во временных рядах (Zaliapin et al, 2004). В данном исследовании мы применили версию MTA, которая до этого была успешно использована нами для определения плюс/минус пробежек, а также пауз во время транспорта по микротрубочкам (Zaliapin et al, 2005). Вкратце, MTA находит наилучшее приближение с линейно-ломаной характеристикой к временной последовательности одномерных координат гранулы. Каждый линейный участок этого приближения соответствует единичной пробежке. Распределение скоростей всех замеченных пробежек объединяется с экспертным мнением, помогающим выбрать

пороговую величину V_0 , которая отделяет пробежки по актину от смещений путём диффузии. Единственным другим параметром алгоритма является шкала времени T_0 приближения с линейно-ломаной характеристикой (сколько приблизительно линейных сегментов использовать), которая выбирается исходя из МТА спектра экспериментальных данных (Zaliarin et al, 2004).

Чтобы гарантировать стабильность наших результатов, мы определили индивидуальные пробежки с 400 различными сочетаниями параметров, и смоделировали статистику пробегачастицы для каждого случая. Мы обнаружили, что соотношения между средними величинами в контрольных и обработанных джасплакинолидом клетках являются стабильным, и очень близкими к тем, что показаны в таблице 4 (см. ч.3 раздела Результаты и обсуждение). Это свидетельствует о том, что наши выводы не зависят от выбора двух параметров алгоритма.

Анализ движения мембранных органелл и пластиковых зёрен по актину и микротрубочкам в живых клетках

Актин-зависимое движение пигментных гранул изучали в меланофорах с разрушенными цитоплазматическими микротрубочками, получаемых путём обработки нокодазолом (10 мкг/мл), как описано ранее (Rodionov et al, 1994). Движение индивидуальных пигментных гранул, лизосом или пластиковых зёрен записывали, используя объектив 100× 1.25 NA Plan Apochromat. Последовательности кадров движения пигментных гранул записывали с 10-секундными интервалами между кадрами. Движение индивидуальных частиц отслеживали, используя модуль *tracking* программы Metamorph, и данные откладывали на графике как изменение с течением времени среднего квадрата расстояния, пройденного из исходной точки. Коэффициенты диффузии для движения пигментных гранул в различных экспериментальных условиях высчитывали, как было описано ранее (Slepchenko et al, 2007). В качестве альтернативы, X-Y координаты пигментных гранул использовали для построения траекторий движения пигментных гранул и их разложения в дальнейшем на периоды прямолинейного актин-зависимого движения и случайного перемещения путём диффузии, используя *Multiscale Trend Analysis* (см. выше).

Чтобы определить параметры транспорта по микротрубочкам, были прослежены траектории пигментных гранул в клетках с интактными микротрубочками на границе расхождения (при дисперсии) или схождения (при агрегации) в одно целое общей массы пигмента – там, где можно было отследить индивидуальные пигментные гранулы. Движение пигментной гранулы вдоль оси микротрубочки было затем проанализировано путём разбиения перемещения на периоды непрерывных пробежек к минус-концу

микротрубочки (к центру клетки), к плюс-концу (к периферии), и на паузы - используя алгоритм *multiscale trend analysis*, описанный подробно в (Zaliapin et al, 2005).

Измерение скорости и направленности выпоlzания клеток и цитопластов в экспериментальную рану монослоя.

Экспериментальную рану монослоя наносили с помощью наконечника для микропипетки спустя 16-19 часов после энуклеации клеток. Наблюдение за цитопластами или содержащими ядро клетками начинали спустя 2 часа после нанесения раны.

Путём наложения последовательных кадров получали прорисовки движения отдельных клеток, позволяющие измерять длины выдвижения ламелл движущихся клеток и углов, под которыми клетки вползали в рану монослоя. Для этого проводили векторы выдвижения ламеллы за каждый час и вектор максимального выдвижения за всё время наблюдения (на рис.9 дан пример вектора максимального выдвижения за время наблюдения, равное 3 часам). Длину векторов сравнивали с длиной измерительной линейки оптической системы микроскопа и получали таким образом величину выпоlzания, выраженную в микрометрах.

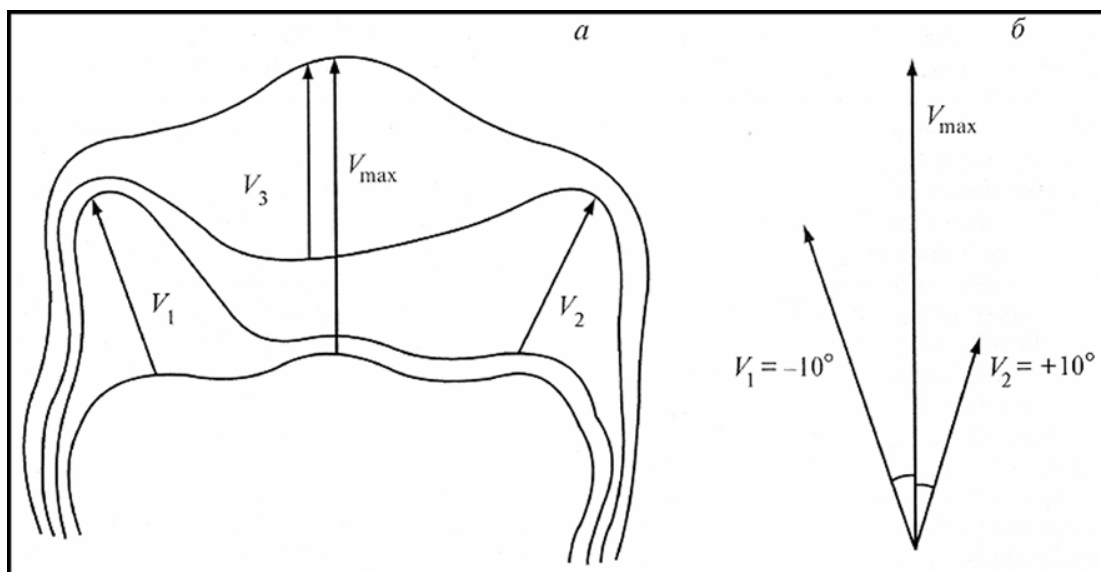


Рисунок 9. Измерение длин векторов выдвижения клеток и цитопластов (а) и углов между ними (б).

V_1 , V_2 , V_3 – выдвижение ламеллоподии за 1, 2 и 3-й часы движения соответственно. Угол между вектором максимального выдвижения ламеллоподии V_{max} и вектором выдвижения, отклоняющимся от V_{max} влево (V_1), считается отрицательным, а угол между V_{max} и вектором, отклоняющимся от V_{max} вправо (V_2) – положительным.

Отклонение часовых векторов от вектора максимального выдвижения ламеллы выражали в градусах, принимая угол вектора максимального выдвижения за ноль (рис.10). Таким образом оказалось возможным измерять изменение направления движения клетки за каждый час наблюдения и выяснять, насколько прямолинейно движутся различные клетки. Для большей наглядности вычисляли среднее часовое отклонение за всё время наблюдения.

Измерение направления движения в целом проводили следующим образом. Стопку последовательных кадров располагали так, чтобы монослой клеток оказался внизу, а просвет экспериментальной раны – над ним. После этого проводили прямую между наиболее выступающими частями соседних с изучаемой клеток, (на рисунке изучаемая клетка заштрихована). Относительно этой прямой и измеряли угол вектора максимального выдвижения ламеллы изучаемой клетки. В том случае, когда такой угол равнялся 90° , это означало, что клетка вползает прямо в рану. В случае отклонений от этого направления угол вектора максимального выдвижения был соответственно больше или меньше 90° (на рисунке приведён угол 70°).

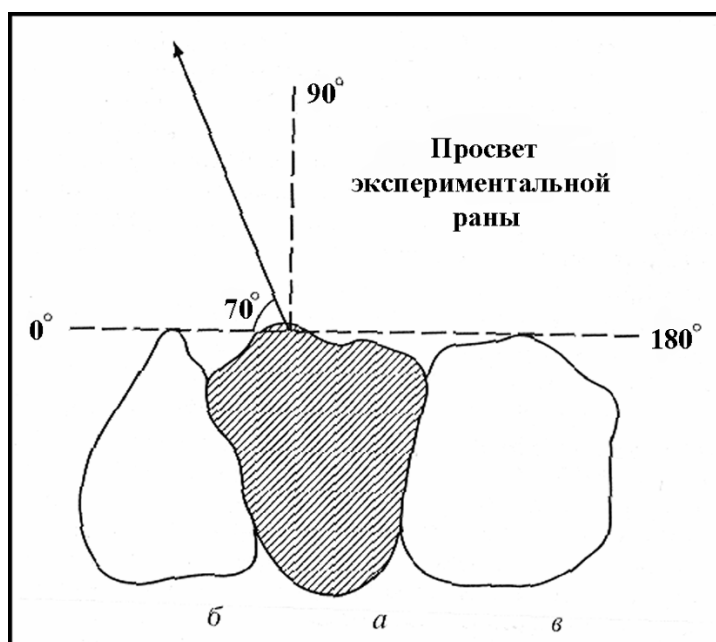


Рисунок 10. Измерение направления движения клеток и цитопластов.
а – изучаемая клетка (цитопласт); *б*, *в* – соседние клетки (цитопласты).

Для того чтобы вычислить среднюю скорость движения клетки, расстояние, пройденное клеткой за всё время наблюдения (равное длине вектора максимального выдвижения, выраженной в микрометрах) делили на всё время наблюдения и получали таким образом среднюю скорость движения клетки. Для того чтобы измерить скорость движения клетки за каждый час наблюдения, аналогичные действия производили с

вектором выдвижения ламеллы за этот час. Результаты измерений обсчитывали и графики получали с помощью компьютерной программы «Origin 5.0». В разделе «Результаты и обсуждение» наряду со средними значениями параметров приводятся стандартные отклонения распределений.

5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЧАСТЬ 1. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕНТРОСОМ В ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Первая часть данной работы посвящена изучению механизмов, определяющих центральную симметрию основной транспортной системы клетки, которой является система клеточных микротрубочек. Радиальная симметричность интерфазных микротрубочек, расходящихся в виде звезды от centrosомы, позволяет максимально эффективно осуществлять транспорт мембранных органелл по цитоплазме. С точки зрения геометрии такое расположение путей внутриклеточного транспорта оказывается наиболее выгодным. С одной стороны, вся цитоплазма клетки пронизана длинными микротрубочками, по которым можно транспортировать органеллы без пересадок во время пути; с другой стороны, проходимый органеллами путь минимизирован благодаря отсутствию петель и изгибов, неизбежных при любом другом расположении длинных микротрубочек в цитоплазме. Нетрудно заметить, что радиальность интерфазных микротрубочек определяется центральным положением centrosомы. Механизмы позиционирования этой органеллы оставались неизученными с момента её описания более ста двадцати лет назад до последнего времени. Приводимая ниже глава посвящена описанию этих механизмов.

§ 1. ПРИЖИЗНЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ МИКРОТРУБОЧЕК

Для осуществления наших экспериментов было необходимо использовать систему, в которой можно было бы наблюдать за centrosомой и отходящими от неё микротрубочками в живых клетках. Структурная организация комплекса centrosома-микротрубочки в культивируемых клетках BS-C-1 была визуализирована нами посредством внутриклеточных микроинъекций флуоресцентно меченого γ -3 тубулина, как это описано в разделе материалов и методов. В дальнейшем велась прижизненная видеосъёмка флуоресцирующих микротрубочек (рис. 11, центральная панель).

Месторасположение centrosомы легко прослеживалось в фокусе сходящихся астральных микротрубочек в виде хорошо заметной точки. Для того, чтобы проверить, что эта точка является именно centrosомой, нами было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных клеток BS-C-1 с помощью антител к ϵ -, γ -, и α -тубулину. Как и ожидалось, оно подтвердило, что, точка локального схождения микротрубочек соответствует реальной позиции centrosомы. Кроме того, было продемонстрировано, что, как и в других

типах клеток, микротрубочки прикреплялись к менее подвижной материнской центриоли. Эта материнская центриоль, к которой крепится большинство интерфазных микротрубочек клетки, в дальнейшем тексте и будет называться центросомой.

§ 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЛОКАЛЬНОГО РАЗРУШЕНИЯ МИКРОТРУБОЧЕК

Из предыдущих работ по данной теме было известно, что балансирование центросомы в области клеточного центра каким-то образом зависит от системы цитоплазматических микротрубочек (Euteneuer and Shliwa, 1992). Интерфазные микротрубочки расположены в клетке в виде симметричной звезды. Закономерно возникает вопрос, сохранит ли центросома своё центральное положение в клетке, если нарушить симметрию системы клеточных микротрубочек? В самом деле, в том случае, если силы, воздействующие на центросому, действительно приложены к микротрубочкам, это непременно должно произойти из-за возникающего дисбаланса сил.

Для того, чтобы внести дисбаланс в центрирующие силы, влияющие на центросому, нами была разработана экспериментальная модель, позволяющая нарушить симметричное расположение микротрубочек в клетке. Мы локально разрушали цитоплазматические микротрубочки путём поднесения к одному из краёв клетки микрокапилляра с разрушающим микротрубочки веществом нокодазолом в концентрации 10 мкг/мл. Прижизненная видеосъёмка системы флуоресцирующих микротрубочек в такой клетке наглядно продемонстрировала, что сразу после поднесения капилляра на проксимальном по отношению к микрокапилляру краю клетки микротрубочки начинали быстро деполимеризоваться, и уровень растворённого тубулина возрастал (рис.11, слева; видео 1). Не менее важным является также тот факт, что микротрубочки на дистальном по отношению к нокодазолу краю клетки оставались интактными на протяжении как минимум 20 минут после начала воздействия нокодазолом. Более того, параметры динамики микротрубочек на дистальном краю экспериментальных клеток не отличались от таковых в контрольных клетках, что было позднее подтверждено дополнительными экспериментами (рис.11, справа; видео 2; таблица 2).

Чтобы подтвердить локальность эффекта обработки нокодазолом, была разработана компьютерная модель разрушения микротрубочек нокодазолом, используя программную оболочку Virtual Cell. Результаты моделирования продемонстрировали, что концентрация нокодазола на дистальном по отношению к микрокапилляру краю клетки составила менее чем 1 наномоль после двадцати минут локального воздействия нокодазола (видео 3).

Следовательно, концентрация нокодазола, действительно, была ниже того минимального уровня, который, как было показано ранее, способен воздействовать на динамику микротрубочек (Vasques et al., 1997).

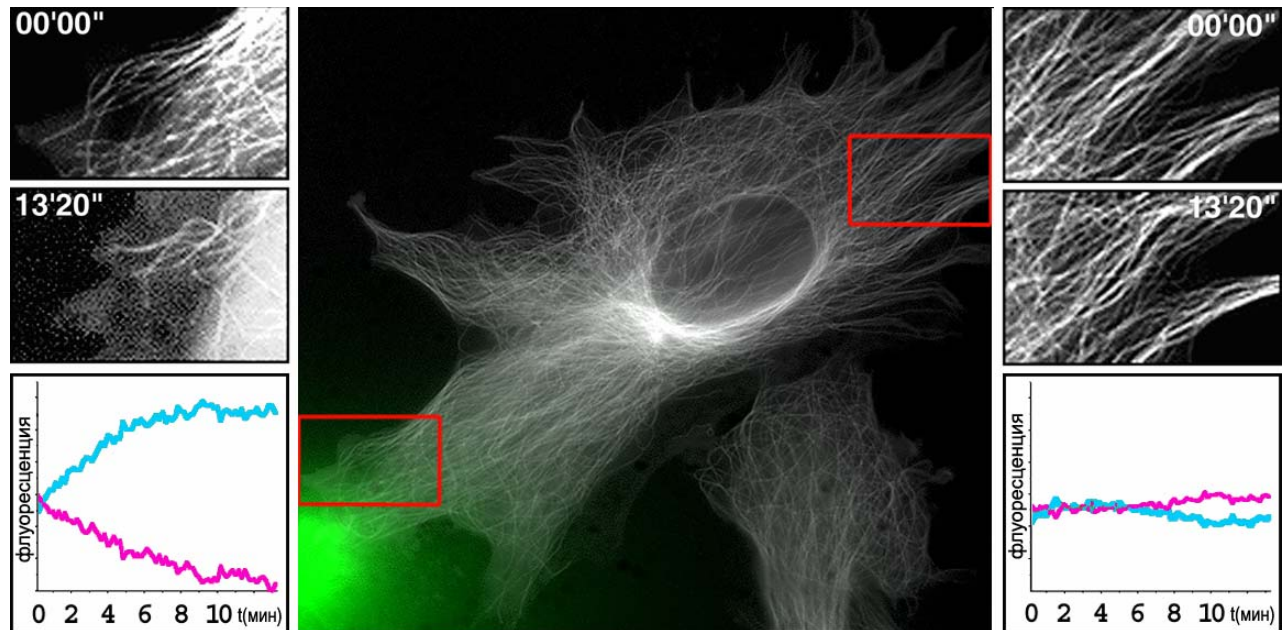


Рисунок 11. Локальное разрушение микротрубочек клетки путём поднесения микрокапилляра с нокодазолом.

Центральная панель: прижизненная флуоресцентная микрофотография клетки, инъецированной флуоресцентно меченым тубулином; малое увеличение. Снимок сделан сразу после поднесения микрокапилляра с нокодазолом; область распространения раствора нокодазола показана зелёным. Фотографии на левой и правой панелях показывают при большем увеличении микротрубочки в областях, ограниченных красными прямоугольниками. При этом верхние снимки демонстрируют микротрубочки в начале, а нижние – в конце наблюдения. Левая и правая панели соответствуют видеороликам 1 и 2. Графики показывают динамику изменения концентрации мономерного (голубые линии) и полимерного (лиловые линии) тубулина на проксимальном (слева) и дистальном (справа) по отношению к микрокапилляру с нокодазолом краях клетки.

Масштабная линейка – 20 мкм.

Таким образом, мы могли быть уверены, что нарушаем симметричное строение звезды микротрубочек в клетке, при этом не влияя на динамику микротрубочек в удалённых от микрокапилляра областях. После этого мы приступили к наблюдениям за поведением centrosom в клетках с нарушенной симметрией расположения микротрубочек.

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ ДИНАМИКИ МИКРОТРУБОЧЕК.

(±)=Sd	Контрольные клетки	Дистальные края экспериментальных клеток	Клетки после инъекций антителами 74.1	Клетки после обработки ML-7
Скорость роста (мкм/мин)	7.25±3.83	7.33±3.97	7.38±4.08	10.26±6.51
Среднее время роста (сек)	6.11±4.53	6.48±5.02	5.83±4.54	8.83±9.21
Скорость укорочения (мкм/мин)	-15.78±13.58	-14.08±12.52	-15.33±13.84	-17.35±13.22
Среднее время укорочения (сек)	4.79±3.17	4.66±3.51	4.55±2.77	5.56±3.93
Спасений/мин	3.85±0.95	3.95±0.93	3.90±0.93	3.56±1.46
Катастроф/мин	2.54±1.23	2.26±0.96	2.26±1.02	2.15±0.91

§ 3. ПЕРЕМЕЩЕНИЕ ЦЕНТРОСОМЫ В КЛЕТКАХ И ЦИТОПЛАСТАХ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ РАЗРУШЕНИИ МИКРОТРУБОЧЕК

Результатом локального воздействия раствора нокодазола явилось наблюдаемое нами быстрое (примерно 0.3 мкм/мин) движение центросомы по направлению к микрокапилляру. Это явление наблюдалось во всех без исключения экспериментальных клетках (n=9) (рис.12; видео 4). В качестве контрольного эксперимента, мы подносили к клеткам микрокапилляр с культуральной средой без нокодазола. Как и следовало ожидать, это не приводило к деполимеризации микротрубочек вблизи микрокапилляра, а также к сколько-нибудь

заметному изменению centrosомой своей первоначальной позиции. В самом деле, если в контрольных экспериментах смещение centrosомы составило в среднем $-0,2 \pm 0,3$ мкм ($n=10$), то в экспериментах с поднесением нокодазола оно было $2,8 \pm 0,8$ мкм ($n=9$) (см. в разделе «Материалы и методы», а также таблицу 3).

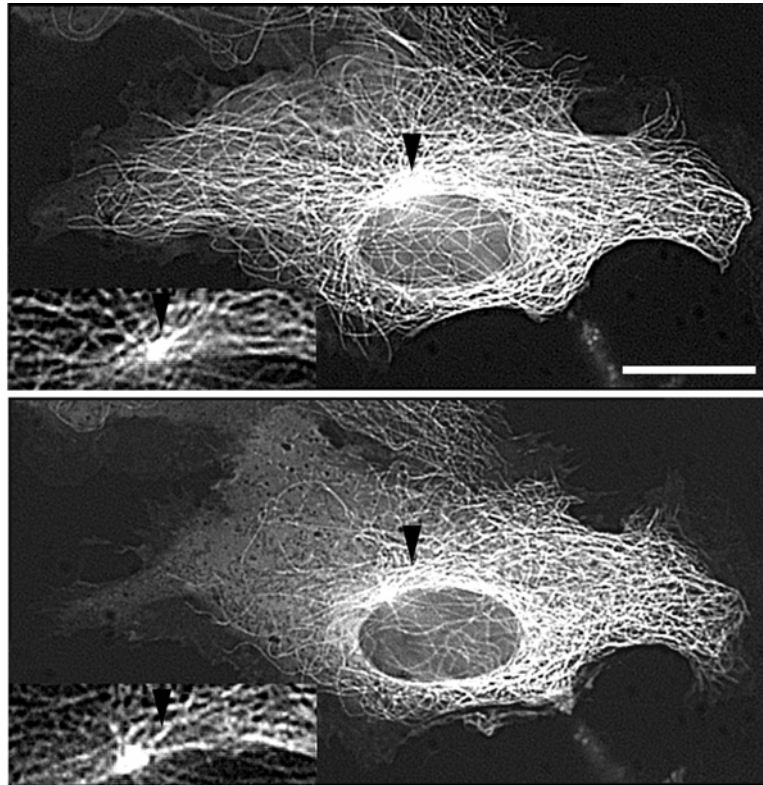


Рисунок 12. Перемещение centrosомы в клетке.

Пара флуоресцентных снимков, демонстрирующих положение centrosомы в клетке до (вверху) и после (внизу) локального поднесения нокодазола. Вставки показывают позицию centrosомы при большем увеличении. Начальное положение centrosомы показано чёрной стрелкой. Видно, что поднесение нокодазола индуцирует перемещение centrosомы по направлению к области разборки микротрубочек. Масштабная линейка – 20 мкм. Рисунок соответствует видеоролику 4.

Наблюдаемое нами перемещение centrosомы не зависело от клеточного ядра – действительно, в различных экспериментальных клетках ядро находилось как позади centrosомы относительно пятна нокодазола, так и перед ним или сбоку от него; и это не влияло на направление перемещения centrosомы. Если centrosома, находясь позади ядра, начинала двигаться по направлению к микрокапилляру, наблюдалось «вминание» её в ядро клетки. Кроме того, желая убедиться в независимом характере перемещения centrosомы, мы поставили аналогичный эксперимент с цитопластом – клеткой с экспериментально

удалённым ядром, но содержащей centrosому в месте схождения микротрубочек. Поведение centrosомы в цитопласте было аналогично поведению centrosомы в клетках, содержащих ядра, и смещение centrosомы составило 2,9 мкм за среднее время наблюдения (рис.13; таблица 3).

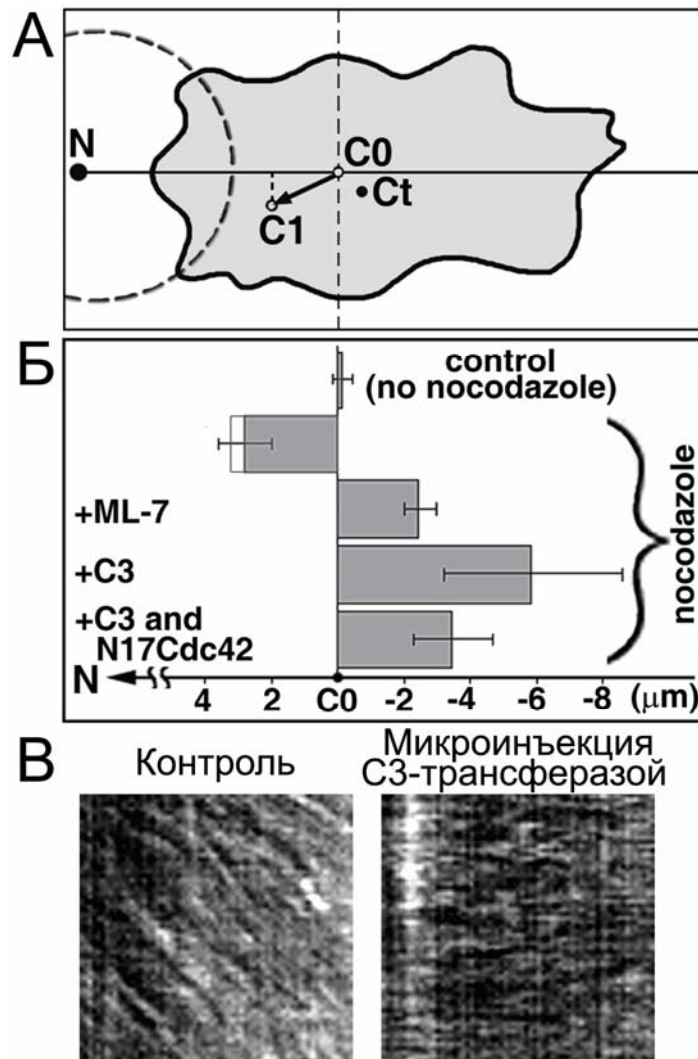


Рисунок 13. Сравнительная диаграмма перемещений centrosомы.

А – упрощённая схема измерений, проводимых при вычислении движения centrosомы.

Б – диаграмма, демонстрирующая статистику экспериментов по локальному поднесению нокодазола к клеткам: показано смещение centrosомы относительно центроида клетки по направлению к или от пятна нокодазола. Данные приведены для 10.5 минут наблюдения. Столбцы диаграммы соответствуют (сверху вниз) - контрольным клеткам (поднесение капилляра с культуральной средой); необработанным клеткам и цитопластам (прозрачный столбец); клеткам, обработанным ингибитором киназы лёгких цепей миозина ML-7; клеткам, предварительно инъецированным C3-трансферазой и клеткам, предварительно инъецированным C3-трансферазой и N17Cdc42. См. также таблицу 3.

В – представленные в виде кимографа результаты анализа центростремительного тока актина в контрольных и инъецированных C3-трансферазой клетках. Для проведения измерений клетки были предварительно инъецированы родамин-меченым F-актином. Видно, что после ингибирования RhoA центростремительный ток актина в клетках прекращается.

Для статистики наших экспериментов нами отбирались лишь строго неподвижные клетки – то есть те, в которых центроид практически не смещался относительно своего первоначального положения. Следует, однако, отметить, что и в случаях движения клеток (а все клетки стремились отползти от нокодазола) поведение центросомы оставалось прежним, то есть, она смещалась относительно центроида в сторону разборки микротрубочек. Так, например, в движущейся клетке центросома осталась практически на месте, в то время как сама клетка отползла далеко в сторону.

Таким образом, локальное разрушение микротрубочек приводило к перемещению центросомы по направлению к области воздействия нокодазолом.

ТАБЛИЦА 3. СМЕЩЕНИЕ ЦЕНТРОСОМЫ ОТНОСИТЕЛЬНО ЦЕНТРОИДА

Эксперимент	Величина смещения за 10,5 мин мкм ($\pm Se$)	Число клеток (N)
Контрольные клетки (капилляр с культуральной средой)	-0.2$\pm$0.3	10
Поднесение нокодазола, клетки ничем не обработаны	2.8$\pm$0.8	9
Поднесение нокодазола, цитопласт	2.9	1
Поднесение нокодазола, клетки обработаны ML-7	-2.5$\pm$0.5	9
Поднесение нокодазола, клетки инъецированы C3-трансферазой	-5.9$\pm$2.7	5
Поднесение нокодазола, клетки инъецированы N17Cdc42 и C3.	-3.5$\pm$1.2	6

§ 4. РОЛЬ АКТОМИОЗИНОВОЙ СОКРАТИМОСТИ В ПЕРЕМЕЩЕНИИ ЦЕНТРОСОМЫ

Описанному выше явлению смещения центросомы существовало два логичных объяснения. Во-первых, индуцированное нокодазолом смещение центросомы могло быть вызвано толкающими силами, продуцируемыми растущими на дистальном по отношению к нокодазолу микротрубочками. Действительно, растущая микротрубочка, упирающаяся в преграду, вполне в состоянии продуцировать механическое усилие, направленное в сторону её минус-конца.

В то же время, деполимеризация микротрубочек может также активировать RhoA-зависимый сигнальный каскад, который, как было показано ранее, воздействует на сократимость актомиозиновой системы (Wittmann and Waterman-Storer, 2001). Следовательно, альтернативным объяснением наблюдаемого нами явления являлось то, что деполимеризация микротрубочек с помощью нокодазола непосредственно индуцирует локальное повышение сократимости актинового цитоскелета. И, соответственно, облегчает движение актинового цитоскелета с прикреплённой к нему звездой микротрубочек по направлению к области локального воздействия нокодазолом.

Чтобы определить роль актомиозиновой сократимости в наблюдаемом перемещении centrosомы мы поставили две независимых серии экспериментов: либо ингибировали непосредственно RhoA путём внутриклеточных микроинъекций C3 трансферазы, либо подавляли активность миозина с помощью обработки клеток ингибитором киназы лёгких цепей миозина ML7. Для того, чтобы подтвердить неактивное состояние RhoA в клетках после инъекций C3 трансферазы, нами были поставлены контрольные эксперименты с восстановлением актиновых стресс-фибрилл клеток, содержащихся в бессывороточной среде, после добавления сыворотки. В клетках с активно работающей Rho стресс-фибриллы полностью восстанавливались спустя 10 минут после добавления сыворотки, чего не наблюдалось в клетках с подавленной активностью RhoA (рис. 14).

Мы решили исследовать также влияние ML7 и C3 трансферазы на центростремительный ток актина, который также зависит от работы актомиозиновой системы. Для этого клетки были микроинъектированы флуоресцентно меченым актином (см. раздел «Материалы и методы», и затем обработаны (или микроинъектированы) соответствующим ингибитором. После этого осуществлялась флуоресцентная центрифужная видеосъёмка так называемых спеклов актина.

Выявляемый с её помощью центростремительный ток актина, как и ожидалось, полностью подавлялся как C3 трансферазой, так и ML7. Поскольку ингибиторы актомиозиновой сократимости не влияли сколько-нибудь заметно на положение centrosом в интактных (не подвергавшихся нокодазолу) клеток, нами был сделан предварительный вывод, что сама по себе актомиозинзависимая сократимость не играет ключевой роли в поддержании положения centrosомы в центре клетки (рис.16Б). Убедившись в этом, мы подвергли клетки с заингибированной актомиозинзависимой сократимостью прежним экспериментальным процедурам – локальному воздействию нокодазола.

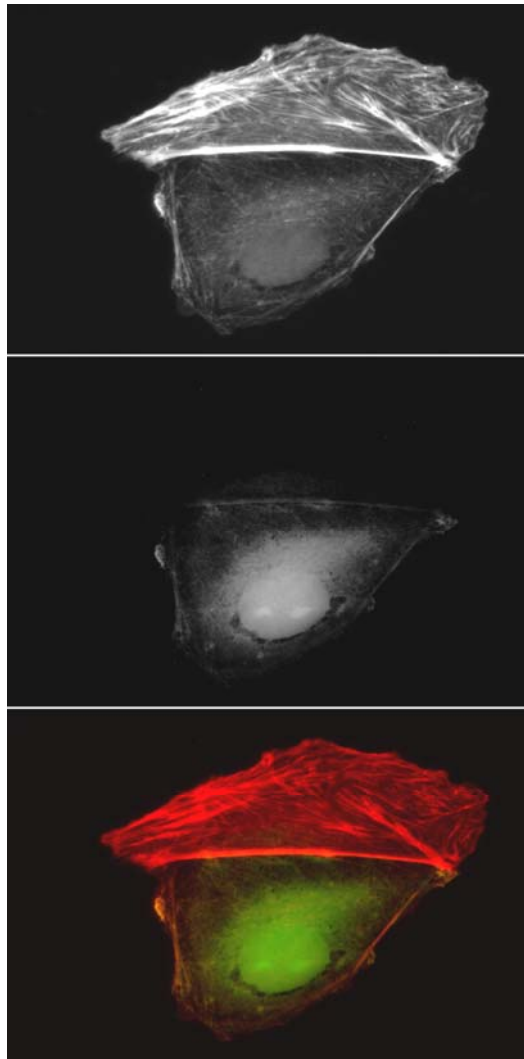


Рисунок 14. Динамика восстановления актинового цитоскелета в контрольной клетке и в клетке с подавленной активностью *RhoA*.

Клетки находились в культуральной среде, не содержащей сыворотки, вплоть до полной разборки находящихся в них стресс-фибрилл. Нижняя клетка была инъецирована раствором С3-трансферазы (для визуализации в раствор был добавлен флуоресцеин). Впоследствии в культуральную среду к клеткам была добавлена сыворотка и спустя 10 минут клетки были зафиксированы и окрашены родамин-фаллоидином. Видно, что в контрольной клетке (вверху) актиновый цитоскелет полностью восстановился, в то время как в клетке с ингибированной *RhoA* (внизу) восстановления актинового цитоскелета не произошло.

С помощью прижизненной флуоресцентной видеомикроскопии нами было показано, что локальное разрушение микротрубочек в клетках, предварительно инъецированных С3 трансферазой или предварительно обработанных ML7, индуцирует очень сильное перемещение центросомы в направлении от конца микрокапилляра (рис.15; таблица 3). В частности, среднее перемещение центросомы в экспериментах с ML-7 составило $-2,5 \pm 0,5$ мкм ($n=9$). В экспериментах же с использованием С3 трансферазы это смещение составило уже $-5,9 \pm 2,7$ мкм ($n=5$).

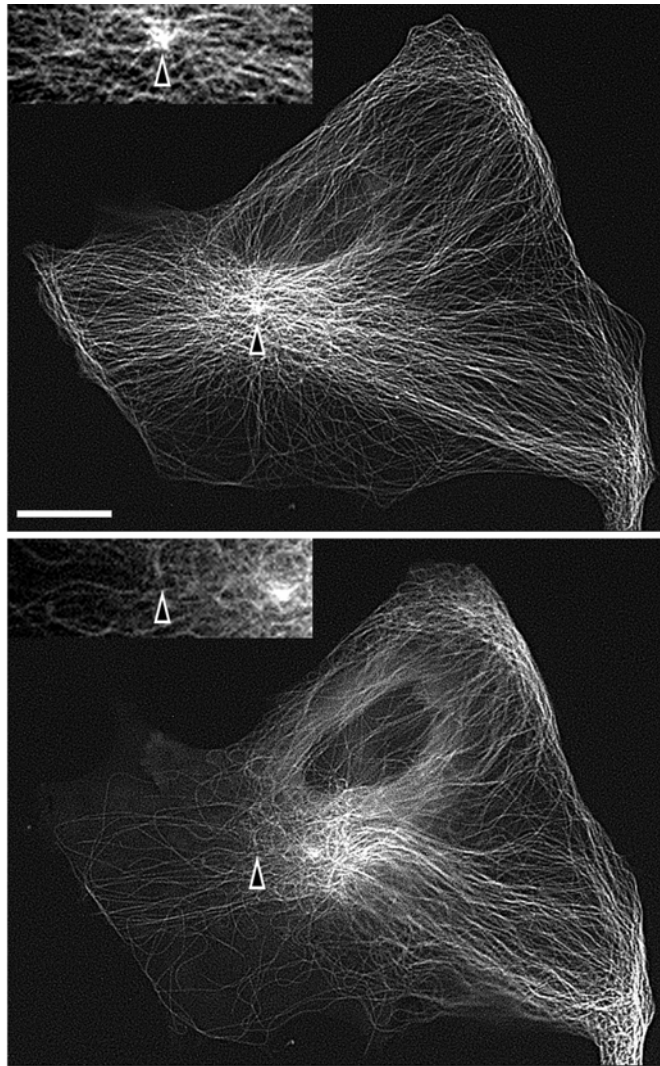


Рисунок 15. Перемещение центросомы в клетке с заингибированной RhoA.

Пара флуоресцентных снимков, демонстрирующих положение центросомы в клетке до (вверху) и после (внизу) локального поднесения нокадазола. Клетки были предварительно инъецированы ингибитором малой ГТФазы RhoA – C3-трансферазой. Ингибирование RhoA изменяет направление движения центросомы на противоположное. Вставки показывают позицию центросомы при большем увеличении. Начальное положение центросомы указано стрелкой. Масштабная линейка – 20 мкм. Рисунок соответствует видеоролику 5.

Следовательно, перемещение по направлению к микрокапилляру, наблюдаемое в предыдущих экспериментах, могло быть обусловлено локальным повышением актомиозиновой сократимости. Действительно, в её отсутствие, когда все силы, приложенные к центросоме, зависят исключительно от микротрубочек, локальная деполимеризация микротрубочек ведёт к тому, что центросома движется от области разборки микротрубочек, то есть подтягивается к дистальному краю клетки. Отсюда мы можем сделать вывод, что силы, влияющие на центросому со стороны микротрубочек, главным образом тянущие, а не толкающие.

§ 5. РОЛЬ ДИНЕИНА В ПЕРЕМЕЩЕНИИ ЦЕНТРОСОМЫ

Каково происхождение тянущих сил, приложенных к микротрубочкам? Ранее было показано, что такие тянущие силы могут продуцироваться посредством работы динеиновых моторов, связанных с элементами клеточного кортекса или заякоренных где-то в цитоплазме (Dujardin and Vallee, 2002; Gundersen, 2002). Следовательно, следующей задачей данного исследования было выяснить, зависит ли позиционирование центросомы от работы цитоплазматического динеина. Для этого мы изучали месторасположение центросом в клетках после микроинъекций в них моноклональных антител 74.1. Ранее было показано, что эти антитела успешно блокируют работу цитоплазматического динеина (Dillmann and Pfister, 1994).

Подавление активности динеина приводило к драматическому смещению центросомы со своего обычного местоположения в клеточном центре к ближайшему краю клетки (рис 16). Чтобы доказать, что такой эффект не является артефактным последствием инъекции данных конкретных антител, мы инъецировали в клетки рекомбинантный динамитин (p50), для которого ранее было показано, что он разрушает динактиновый комплекс и, изменяет нормальную локализацию динеина (Echeverri et al., 1996; Burkhardt et al., 1997). После инъекций в клетки p50 наблюдался эффект, полностью сходный с эффектом ингибирования динеина (рис 16Б).

Совместная инъекция клеток С3 трансферазой вместе с антителами 74.1 приводила к смещению центросомы, сходному с таковым в клетках, микроинъецированных одними только антителами 74.1. Подавление активности динеина не влияло на скорость центростремительного тока актина, подтверждая тот факт, что эффект подавления активности динеина является независимым от актомиозин-зависимых сил.

Данные результаты позволили нам сделать вывод, что основные механизмы, работа которых приводит к центрированию центросомы, требуют активной работы цитоплазматического динеина.

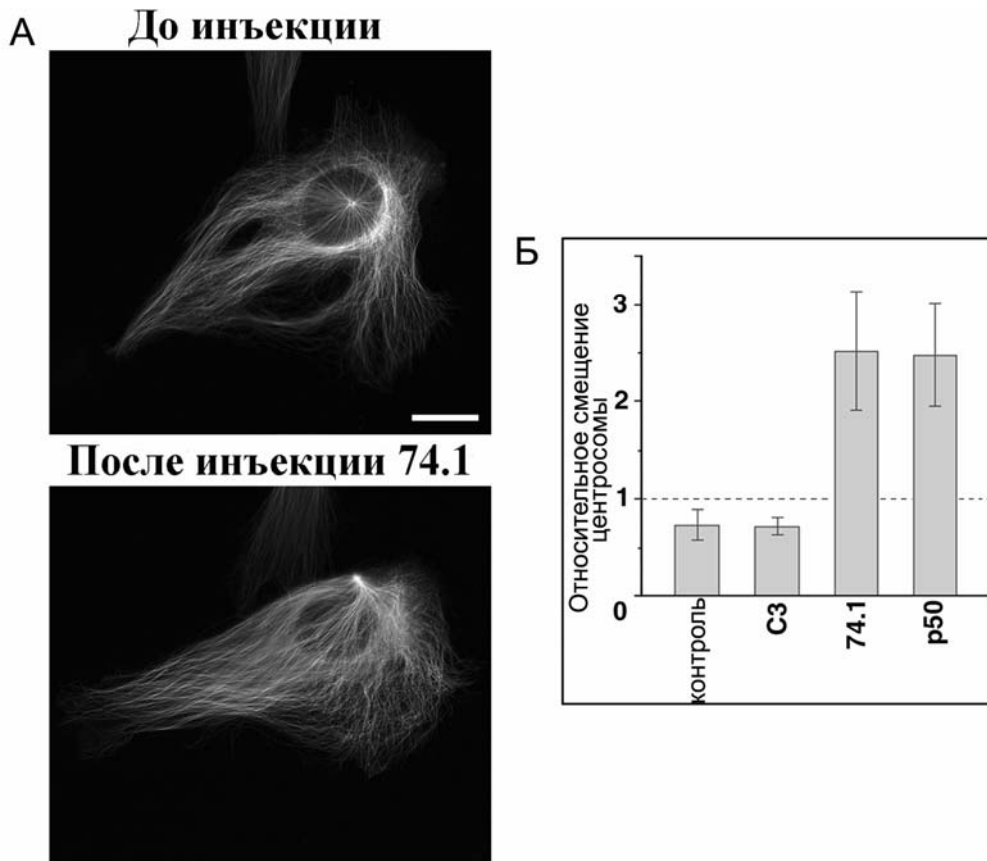


Рисунок 16. Для позиционирования центросомы в центре клетки требуется активный цитоплазматический динеин.

А – прижизненные флуоресцентные снимки микротрубочек в клетке до (вверху) и спустя 45 минут после (внизу) инъекции блокирующих динеин антител 74.1. Видно, что после подавления активности динеина центросома смещается из центра к краю клетки.

Б – Диаграмма, демонстрирующая относительное смещение центросомы в клетках после инъекций С3-трансферазой, антителами 74.1 или субъединицей p50 динактина. Относительное смещение высчитывалось как отношение начального (до инъекции) и конечного (после инъекции) положения центросомы, выраженного в процентах от радиуса клетки, проведённого от её центроида к центросоме. Контрольные клетки были инъектированы ничего не содержащим буфером для микроинъекций. Видно, что инъекции С3-трансферазой не влияют на положение центросомы, в то время как инъекции 74.1 или p50 приводят к значительному смещению центросомы.

Масштабная линейка – 20 мкм.

§ 6. РАБОТА ДИНЕИНА ПО ПЕРЕМЕЩЕНИЮ ЦЕНТРОСОМЫ РЕГУЛИРУЕТСЯ ГТФАЗОЙ CDC42

Ранее было показано, что при поляризации клетки для смещения центросомы, обусловленного работой динеина, необходима активность Cdc42 – члена семейства Rho малых ГТФаз (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Palazzo et al., 2001). Мы решили проверить, играет ли какую-то роль Cdc42 в создании микротрубочками тянущего усилия,

воздействующего на centrosому в нашей экспериментальной системе. Для этого мы повторили наши эксперименты с индуцированием смещения centrosомы путём локальной аппликации нокодазола, предварительно микроинъектировав экспериментальные клетки не только С3 трансферазой, но и доминантно негативным рекомбинантным белком N17Cdc42. Таким образом, нам удалось подавить активность как актомиозиновой системы, так и Cdc42 (рис.17).

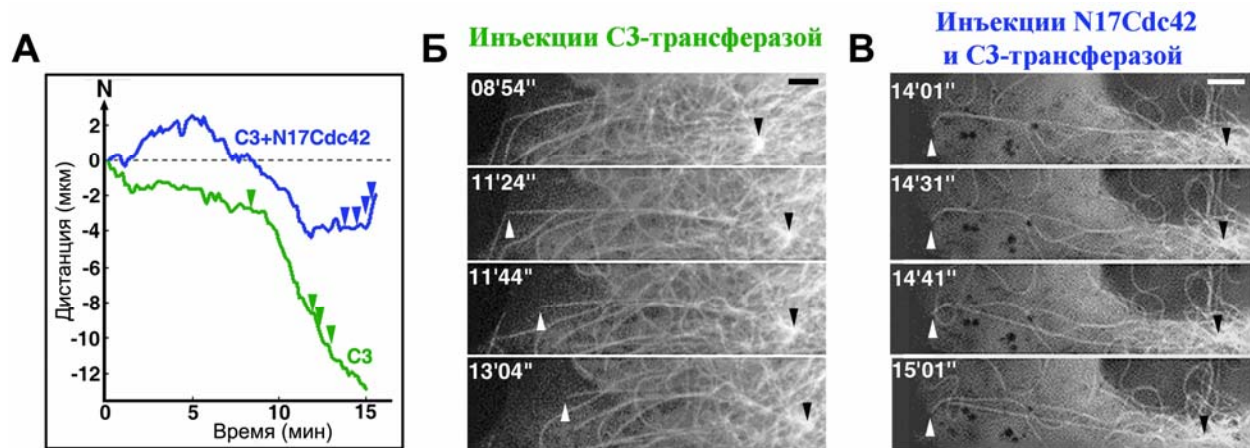


Рисунок 17. Позиционирование centrosомы регулируется посредством Cdc42-зависимого сигнального каскада.

А – Кинетика движения centrosомы при поднесении нокодазола в клетках, инъектированных С3-трансферазой (серая линия) или совместно С3-трансферазой и N17Cdc42 (чёрная линия). Стрелки соответствуют моментам времени, запечатлённым на кадрах, показанных в панелях В и С.

Б – в отсутствие центростремительного тока актина centrosома непрерывно движется от места локальной разборки микротрубочек. Сила натяжения, генерируемая на дистальном крае клетки, достаточно сильна для того, чтобы разорвать не успевшие деполимеризоваться микротрубочки на проксимальном крае клетки. Панель соответствует видеоролику 6. Масштабная линейка – 5 мкм.

В – в отсутствие как центростремительного тока актина, так и активности Cdc42, centrosома движется взад-вперёд в области центроида клетки. Тянущих сил недостаточно для того, чтобы разорвать микротрубочки. Одной микротрубочки, заякоренной проксимально, достаточно для того, чтобы удерживать centrosому и обратить вспять её движение (см. также панель А). Панель соответствует видеоролику 7. Масштабная линейка – 5 мкм.

В наших предыдущих экспериментах, в клетках после инъекций С3 трансферазой centrosома при местном разрушении микротрубочек непрерывно двигалась по направлению от микрокапилляра. Более детальное изучение процессов, происходящих с микротрубочками на проксимальном краю таких клеток, показало, что силы, подтягивающие centrosому к дистальному краю, настолько сильны, что часто рвут ещё не разобравшиеся микротрубочки, заякоренные в кортексе на проксимальном краю клетки. Часто результатом этого становится

увеличение скорости движения центросомы по направлению к дистальному краю (рис. 17 А,Б; видео 6).

По контрасту с этим, в клетках, совместно инъецированных СЗ трансферазой и ингибитором Cdc42, центросома совершала колебательные движения в центральной области клетки, несомненно удерживаемая на месте заякоренными в кортеске микротрубочками. Пристальное изучение позволило установить тот факт, что сил всего нескольких заякоренных проксимально микротрубочек (часто даже одной) было вполне достаточно для того, чтобы удерживать на месте центросому или даже обратить вспять направление её движения (рис. 17 А,Б; видео 7). Это говорит о том, что в клетке отсутствует значительная тянущая сила по направлению к дистальному краю, хотя активность непосредственно самих динеиновых моторов в данных экспериментах не была подавлена.

Таким образом, эта серия экспериментов продемонстрировала, что подавление активности Cdc42 без ингибирования цитоплазматического динеина приводит к уменьшению тянущего усилия микротрубочек, приложенного к центросоме. Следовательно, Cdc42 является регулятором активности динеина в данном процессе.

§ 7. УЧАСТИЕ ДИНАМИКИ ПЛЮС-КОНЦОВ МИКРОТРУБОЧЕК В ПРОЦЕССЕ ПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕНТРОСОМЫ

Известно, что динамика многочисленных плюс-концов микротрубочек способна генерировать вполне значительные по своей величине в масштабе клетки силы. Так как динамика микротрубочек потенциально вполне могла быть вовлечена в процесс позиционирования центросомы в качестве источника дополнительной силы, мы решили проверить параметры динамики микротрубочек во всех проводимых нами сериях экспериментов.

Оказалось, что динамика микротрубочек после наших экспериментальных воздействий, а также на дистальном краю экспериментальных клеток, не отличалась от динамики в контрольных клетках (таблица 2). Вследствие этого у нас возникло предположение, что смещение центросомы от центра клетки, наблюдавшееся нами после подавления активности динеина (рис.16) могло быть обусловлено силами, генерируемыми посредством динамики микротрубочек. То есть, в данном случае мы наблюдали действие «децентрирующих» сил, генерируемых динамичными плюс-концами микротрубочек. Для выяснения, так ли это на самом деле, мы «заморозили» динамику микротрубочек с помощью комбинированного воздействия низких доз таксола и нокодазола (120 и 600 наномоль соответственно). Это

воздействие практически полностью подавило рост и укорочение микротрубочек, как это было видно на прижизненной видеофлуоресцентной съёмке.

В ходе дальнейших экспериментов выяснилось, что такое замораживание динамики микротрубочек полностью блокирует смещение centrosомы, вызванное динеин-блокирующими антителами. Отсюда можно сделать однозначный вывод о том, что те несбалансированные децентрирующие силы, которые смещают centrosому в отсутствие активного динеина, генерируются именно динамикой микротрубочек.

§ 8. ЦИТОПЛАСТЫ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦЕНТРИРУЮЩИХ СИЛ ДИНЕИНА

Итак, проведённые серии экспериментов показали, что при позиционировании в клетке centrosомы к ней приложены три вида сил, воздействующих на радиальные микротрубочки: сила цитоплазматического динеина, актомиозиновой системы и толкающая сила динамичных плюс-концов самих микротрубочек. Однако для построения работающей модели позиционирования centrosомы необходимо изучить ещё один вопрос, ответа на который пока не было получено.

Остаётся невыясненным вопрос о том, где именно генерируются тянущие силы, продуцируемые динеином. Существует два варианта ответа. Во-первых, это может происходить лишь в клеточном кортексе, с которым взаимодействуют плюс-концы микротрубочек. Однако известно, что динеин обильно представлен в цитоплазме клетки, где он может быть заякорен на различных органеллах, и при этом способен взаимодействовать с микротрубочками, отходящими от centrosомы. В этом случае тянущие силы динеина могут прикладываться к микротрубочкам по всей их длине. Для изучения данного вопроса мы исследовали механизмы позиционирования centrosомы в цитопластах клеток Vero.

Цитопласты, то есть клетки с удалённым ядром, являются удобной экспериментальной моделью для изучения организации клеточных микротрубочек (Karsenti et al., 1984; Moskalewski and Thyberg, 1988; Gorgidze and Vorobjev, 1995; Rodionov et al., 1999). Маниотис и Шлива в своей работе 1991 года отделяли микроиглой содержащие ядро части клеток BS-C-1 (кариопласты) от частей, содержащих centrosому. Час спустя содержащие centrosому цитопласты образовывали радиальную систему микротрубочек, в которой микротрубочки росли от centrosомы, в то время как система микротрубочек в кариопластах была хаотичной. Однако 20 часов спустя ситуация менялась на противоположную – радиальную систему микротрубочек наблюдали уже в неcentросомных кариопластах, восстановившихся до нормальных клеточных размеров; а содержащие centrosому цитопласты демонстрировали

хаотичную систему микротрубочек. Объяснением авторов работы было то, что в стареющих цитопластах центросома утрачивала свою активность. Мы решили выяснить, действительно ли это так; и поддерживает ли такая неактивная центросома в стареющих цитопластах свою центральную позицию; другими словами, определяется ли центральная позиция центросомы в этой системе радиальностью микротрубочек. Попутно, мы решили выяснить причины хаотизации микротрубочек в этой экспериментальной системе: это инактивация центросомы, утрата динамики микротрубочек или же какие-то иные факторы?

Для получения цитопластов мы использовали общепринятый метод центрифугирования клеток после разрушения актиновых филаментов цитохалазином Б (Karsenti et al., 1984). Полученные таким способом цитопласты давали нам возможность изучить организацию микротрубочек и их динамику, а также активность центросомы и её местоположение.

§ 9. МИКРОТРУБОЧКИ УТРАЧИВАЮТ РАДИАЛЬНОСТЬ ПО МЕРЕ СТАРЕНИЯ ЦИТОПЛАСТОВ

Около 90% клеток Vero, подвергнутых обработке цитохалазином и последующему центрифугированию, как описано в разделе «Материалы и методы, теряют свои ядра и превращаются в цитопласты. Примерно 99% этих цитопластов содержат центросому, хорошо различимую после окрашивания антителами к γ -тубулину. Два часа спустя после окончания процедуры энуклеации большинство цитопластов содержат радиальную систему микротрубочек, сходную с системой микротрубочек в оставшихся клетках с ядрами (рис 18а,б). С увеличением времени инкубации после энуклеации увеличивается доля цитопластов с хаотической системой микротрубочек, хотя центросомы в них остаются, что видно путём окрашивания на γ -тубулин (рис 18в,г и 18п). 17 часов спустя после энуклеации в большинстве цитопластов наблюдаются хаотичные микротрубочки. Однако в околоцентросомном участке клетки часто можно различить некоторую радиальность микротрубочек, сходящихся к центросоме (рис 18в,г). В течение этого эксперимента система микротрубочек в соседних клетках с ядрами не претерпевает изменений (рис 18 в,г,п).

В данной части работы для оценки радиальности системы микротрубочек мы использовали метод оценки распределение интенсивности флуоресценции тубулина вдоль радиусов клеток и цитопластов, как это описано у Смуровой с соавторами (2002). Этот метод основан на том, что свободный неполимеризованный тубулин распределён по клетке равномерно, и график распределения неполимеризованного тубулина представляет собой горизонтальную линию. Если микротрубочки равномерно (т.е. неупорядоченно) распределены по цитоплазме, то график их флуоресценции также будет горизонтальным.

Если же микротрубочки сконцентрированы вокруг centrosомы, то график будет убывающим – линейно или экспоненциально. Экспоненциальная кривая характерна для строго радиальной системы, в которой большинство микротрубочек связаны с centrosомой – например, на ранних стадиях восстановления микротрубочек после их деполимеризации. Если наряду с centrosомными в цитоплазме присутствуют и свободные микротрубочки, график флуоресценции тубулина будет убывать линейно по направлению от центра клетки (Смурова с соавт, 2002).

Как в клетках Vero, так и в свежеприготовленных из них цитопластах флуоресценция тубулина убывала от центра к периферии практически линейно (рис 18 д,е). Подобный график соответствует радиальному расположению микротрубочек. В стареющих цитопластах (17 часов после центрифугирования) график распределения флуоресценции тубулина вдоль клеточного радиуса выглядел как горизонтальная линия (рис 18 ж), что соответствует хаотическому расположению микротрубочек в цитоплазме. В цитопластах с полностью разобранными микротрубочками график флуоресценции был горизонтальным, так что сигнал растворённого в цитоплазме тубулина был постоянным по площади клетки и не мог влиять на форму рассмотренных графиков флуоресценции.

Теоретически существует несколько возможных способов объяснения разрушения радиальной системы микротрубочек в стареющих цитопластах. Это может быть вызвано утратой centrosомой способности нуклеировать и/или заякоривать микротрубочки, или же нарушением динамики микротрубочек – поскольку стабилизация микротрубочек приводит к утрате их связи с centrosомой. Кроме того, это может быть вызвано нарушением взаимодействия микротрубочек с клеточным кортексом. Мы решили проверить по очереди все три вышеперечисленных предположения.

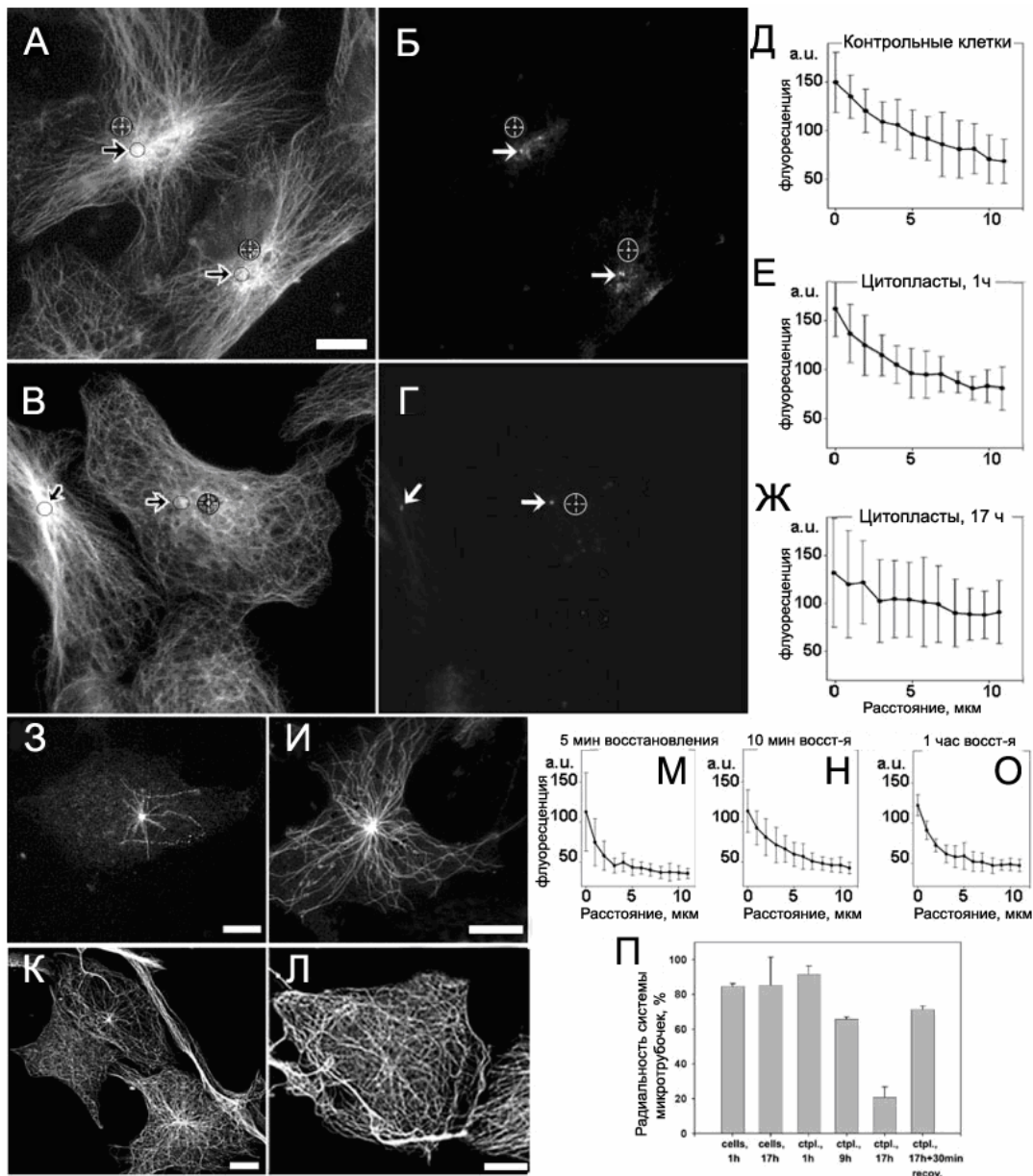


Рисунок 18. Система микротрубочек в клетках Vero и в цитопластах.

(А, В, 3-Л) – окрашивание антителами к α -тубулину, (Б,Г) – окрашивание антителами к γ -тубулину. А,Б – клетка и цитопласт 2 часа спустя после энуклеации; В,Г – клетка и цитопласт 17 часов спустя после энуклеации. Стрелки указывают на центросомы, перекрестья обозначают центроиды. Видно, что в 17-часовом цитопласте микротрубочки хаотизированы. (3-Л) – восстановление микротрубочек в 17-часовых цитопластах (после 1 часа на ледяной бане, согревание до 37°C): 3 – 5 минут восстановления, И – 10 минут, К – 60 минут, Л – 120 минут. Видно, что в 17-часовых цитопластах успешно образуются звёзды микротрубочек. Масштабная линейка – 10 мкм. (Д-Ж) и (М-О) – графики интенсивности флуоресценции вдоль радиусов клеток и цитопластов, окрашенных антителами к тубулину. (П) – соотношение клеток и цитопластов с радиальной системой микротрубочек, через различные промежутки времени после процедуры энуклеации. На всех графиках погрешность обозначает $\pm SD$.

§ 10. ХАОТИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В СТАРЕЮЩИХ ЦИТОПЛАСТАХ НЕ СВЯЗАНА С ДИСФУНКЦИЕЙ ЦЕНТРОСОМ

Чтобы изучить нуклеирующую активность centrosом в цитопластах, стареющие цитопласты охлаждали до 0°C в течение 1 часа, чтобы разобрать микротрубочки, и затем согревали их до +37°C, чтобы восстановить их. Спустя 5-10 минут после начала восстановления микротрубочек наблюдаются их отчётливые звёзды (рис 18 з,и), неотличимые от таковых в клетках с ядрами. Таким образом, centrosомы в стареющих цитопластах сохраняют свою нуклеирующую активность; следовательно, нарушение нуклеации на centrosоме не может служить объяснением хаотизации микротрубочек в цитопластах. При этом спустя 1-2 часа после начала восстановления система микротрубочек в стареющих цитопластах практически возвращалась к хаотичному состоянию, хотя вплотную к centrosоме были различимы оставшиеся звёздочки из микротрубочек (рис 18 к,л), что свидетельствует о её активности.

Флуоресценция тубулина спустя 5-10 минут после начала восстановления микротрубочек убывала экспоненциально по направлению от центра к периферии цитопластов (рис 18 м,н), что хорошо согласовывалось с предыдущими данными по восстановлению микротрубочек в клетках Vero (Smurova et al, 2002). После 60 минут восстановления график распределения тубулина становился не линейным, как это было описано для клеток с ядрами (Smurova et al, 2002), а содержал два участка: быстрого убывания в центральной части цитопласта и горизонтального плато на периферии (рис 18 о). Это означает, что в околоcentросомном регионе микротрубочки длительное время сохраняли свою радиальную организацию, но в периферических участках распределение микротрубочек становилось хаотическим. Этот факт может служить свидетельством того, что как нуклеирующая, так и заякоривающая активности centrosомы в стареющих цитопластах кардинальным образом не изменялись.

§ 11. ХАОТИЗАЦИЯ МИКРОТРУБОЧЕК В СТАРЕЮЩИХ ЦИТОПЛАСТАХ НЕ СВЯЗАНА СО СТАБИЛИЗАЦИЕЙ МИКРОТРУБОЧЕК

Вторым предположением, выдвинутым нами для объяснения постепенной хаотизации системы микротрубочек, было то, что в таких цитопластах микротрубочки могут быть стабилизированы. Обычно стабилизирование цитоплазматических микротрубочек сопровождается ацетилированием входящего в их состав тубулина (Piperno et al, 1987), происходящего по соседству с мембранами аппарата Гольджи (Chabin-Brion et al, 2001). Чтобы выяснить, не изменилась ли динамика микротрубочек в стареющих цитопластах, мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание их антителами к ацетилированному тубулину и к маннозидазе II (маркёру аппарата Гольджи). Как в свежеприготовленных, так и в стареющих цитопластах, количество ацетилированного тубулина микротрубочек было одинаковым, причём его было больше, чем в контрольных клетках ($P < 0.01$) (рис 19 б,д,л). Ацетилированные микротрубочки в стареющих цитопластах были равномерно распределены по всей цитоплазме, в то время как в клетках и в свежеприготовленных цитопластах они были сконцентрированы в центральной области. Аппарат Гольджи сохранял свою компактную структуру и центральное положение в обоих типах цитопластов (рис 19 в,е), в отличие от цитопластов с деполимеризованными микротрубочками, в которых аппарат Гольджи был диспергирован.

Чтобы подтвердить посредством другого экспериментального метода тот факт, что в стареющих цитопластах микротрубочки не стабилизированы, мы проанализировали уровень полимеризованного тубулина в свежеприготовленных и в стареющих цитопластах и обнаружили, что этот уровень был повышен в обоих типах цитопластов по сравнению с контрольными клетками ($P < 0.1$ для свежеприготовленных и $P < 0.05$ для стареющих цитопластов). Однако при этом этот уровень не менялся заметным образом по мере старения цитопласта (рис 19м). Под воздействием нокадазола микротрубочки постепенно разбирались, и количество оставшихся микротрубочек было приблизительно одинаковым у цитопластов обоих типов (рис 19ж-19к и 19м). Таким образом, можно считать установленным, что в процессе старения цитопластов в них не происходило какого-либо заметного увеличения количества стабильных микротрубочек. В свете того факта, что в цитопластах обоих типов число стабильных микротрубочек было выше, чем в исходных клетках, можно предположить, что некоторое изменение динамики микротрубочек происходило непосредственно после энуклеации; и при этом такое изменение никак не влияло на радиальность микротрубочек.

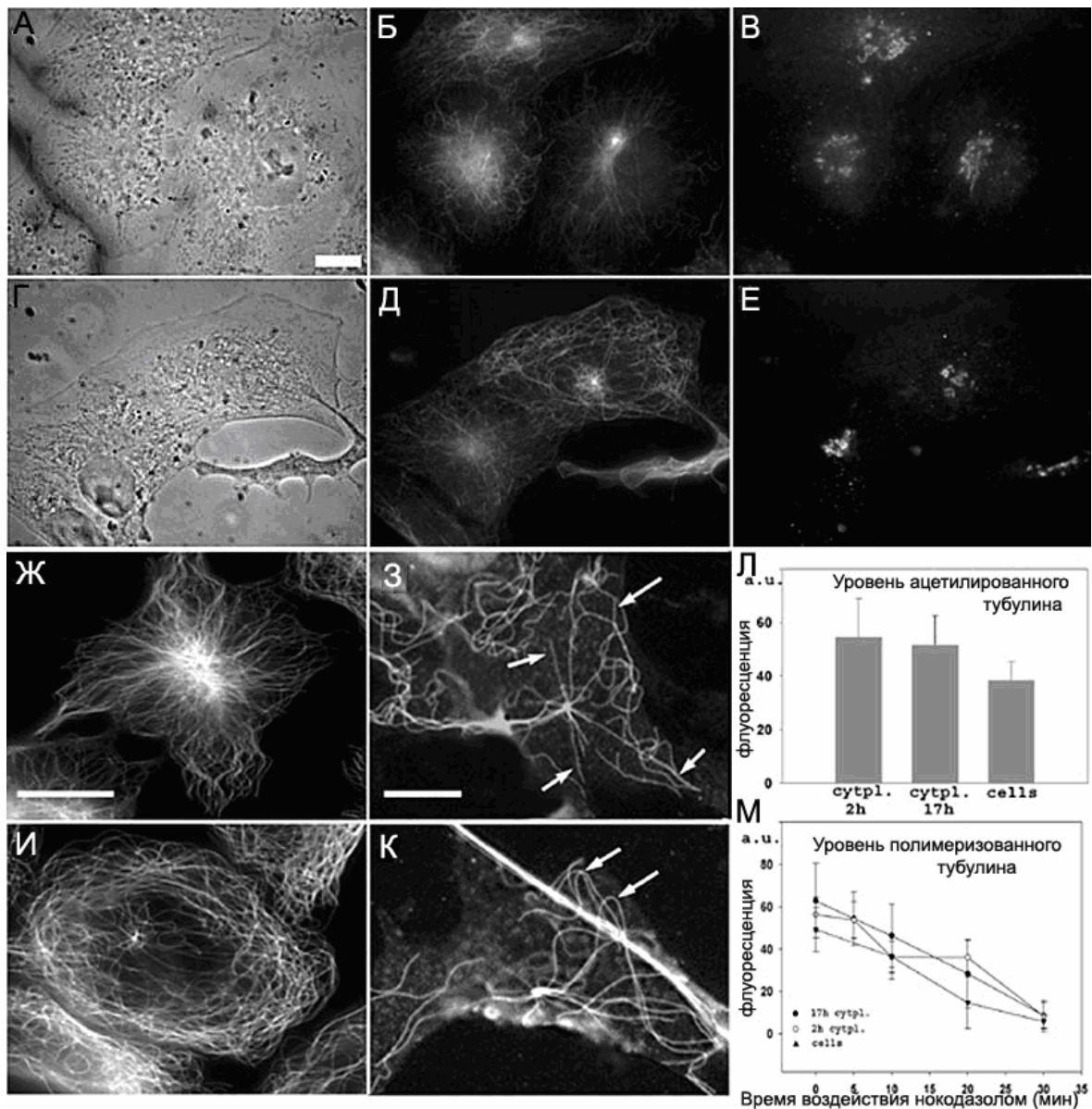


Рисунок 19. Стабилизированные микротрубочки и аппарат Гольджи в разновозрастных цитопластах Vero.

(А,Г) – фазовый контраст, (Б,Д) – окрашивание антителами к ацетилированному тубулину, (В,Е) – окрашивание антителами к маннозидазе II, (Ж-К) – окрашивание антителами к α -тубулину. А-В – клетка и цитопласт 1 час спустя после энуклеации; Г-Е – клетка и цитопласт 17 часов спустя после энуклеации. Ж-К – цитопласты спустя 2 часа (Ж,З) или 17 часов (И,К) после энуклеации, обработанные 1 мкг/мл нокодазола в течение 5 минут (Ж,И) или 30 минут (З,К). Л – диаграмма содержания ацетилированного тубулина. М – динамика деполимеризации тубулина под воздействием 1 мкг/мл нокодазола. Стрелки указывают на микротрубочки, ассоциированные с центросомой. Масштабная линейка 10 мкм.

§ 12. В СТАРЕЮЩИХ ЦИТОПЛАСТАХ МЕНЯЕТСЯ ПОВЕДЕНИЕ МИКРОТРУБОЧЕК НА КРАЮ КЛЕТКИ

Мы отметили тот факт, что некоторые прикреплённые к centrosome микротрубочки в стареющих цитопластах начинали изгибаться после достижения края клетки (рис 19 к, указано стрелками), в то время как в контрольных клетках и в свежеприготовленных цитопластах такое изгибание наблюдали исключительно у свободных цитоплазматических микротрубочек (рис 19 з). Это может являться косвенным свидетельством отсутствия силы, приложенной к таким микротрубочкам.

Мы предположили, что стареющие цитопласты содержат длинные микротрубочки, рост которых продолжается и после достижения ими края клетки; а в контрольных клетках и свежеприготовленных цитопластах микротрубочки после достижения края клетки свой рост прекращают. Мы провели прижизненную видеосъёмку микротрубочек в цитопластах клеток, экспрессировавших GFP-тубулин.

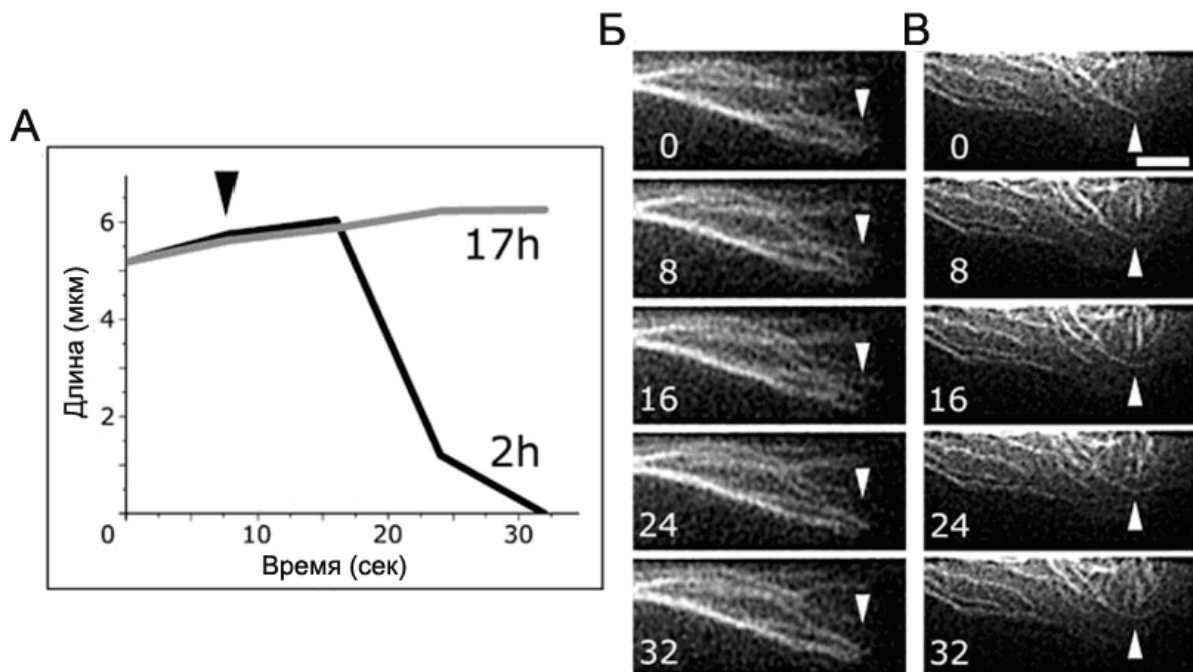


Рисунок 20. Различия в поведении плюс-концов микротрубочек вблизи клеточного края в разновозрастных цитопластах Vero.

(А) — Динамика плюс-концов микротрубочек, представленных на (Б,В). В свежеприготовленных цитопластах плюс-концы микротрубочек, достигших края клетки, претерпевают катастрофу, в отличие от стареющих цитопластов, в которых микротрубочки после этого продолжают расти. (Б) — концы микротрубочек на краю цитопласта 2 часа спустя после энуклеации. (В) — то же для 17-часового цитопласта. Числа обозначают время в секундах. Масштабная линейка — 1 мкм.

В клетках и в свежеприготовленных цитопластах микротрубочки прекращали расти, достигнув клеточного кортекса, и демонстрировали динамическую нестабильность (рис 20 а,б). В стареющих цитопластах микротрубочки вместо этого скользили вдоль плазматической мембраны или же загибались (рис 20 а,в). Иногда наблюдали отдельные эпизоды катастроф у микротрубочек, лежащих параллельно краю клетки (рис 20в).

Хорошо известно, что удлиняющиеся микротрубочки можно также визуализировать посредством белков, специфически связывающихся с растущими плюс-концами (плюс-концевые белки) – то есть, например, посредством CLIP170 или динактина. В свежеприготовленных цитопластах, окрашенных антителами к p150^{Glued} отчётливо различались динактиновые кометы на концах микротрубочек (рис 21а,б). В стареющих цитопластах таких комет не было, и были лишь маленькие точки динактина и, иногда, длинные треки p150^{Glued} (рис 21 г).

Чтобы исключить возможность того, что динактин в стареющих цитопластах деплецирован или функционально неисправен, мы разбирали в них микротрубочки на холоду и затем восстанавливали их при +37°C. Восстановленные микротрубочки имели на своих концах кометы динактина, неотличимые от таковых в контрольных клетках (рис 21 в), что говорит о достаточном количестве функционального динактина.

Другим способом визуализации плюс-концов микротрубочек была трансфекция клеток перед их энуклеацией конструктором, кодирующим флуоресцентный белок YFP-CLIP170 (Lansbergen et al., 2004). В свежеприготовленных цитопластах и в клетках кометы YFP-CLIP170 исчезали после того, как достигали края клетки (рис 22). В стареющих цитопластах кометы были значительно меньше и двигались медленно (или иногда были заметно длиннее и были стационарными). Эти кометы обычно отворачивали от клеточного кортекса и продолжали своё движение (рис 22Б).

Мы измерили углы между траекториями комет и радиусами клеток/цитопластов и обнаружили, что в клетках и свежеприготовленных цитопластах большинство микротрубочек росли от центра к периферии (углы от 0° до 40°), в то время как в стареющих цитопластах направление роста микротрубочек было хаотичным (рис 22в).

Таким образом, в результате этих экспериментов удалось установить, что поведение микротрубочек на краю стареющих цитопластов заметно меняется.

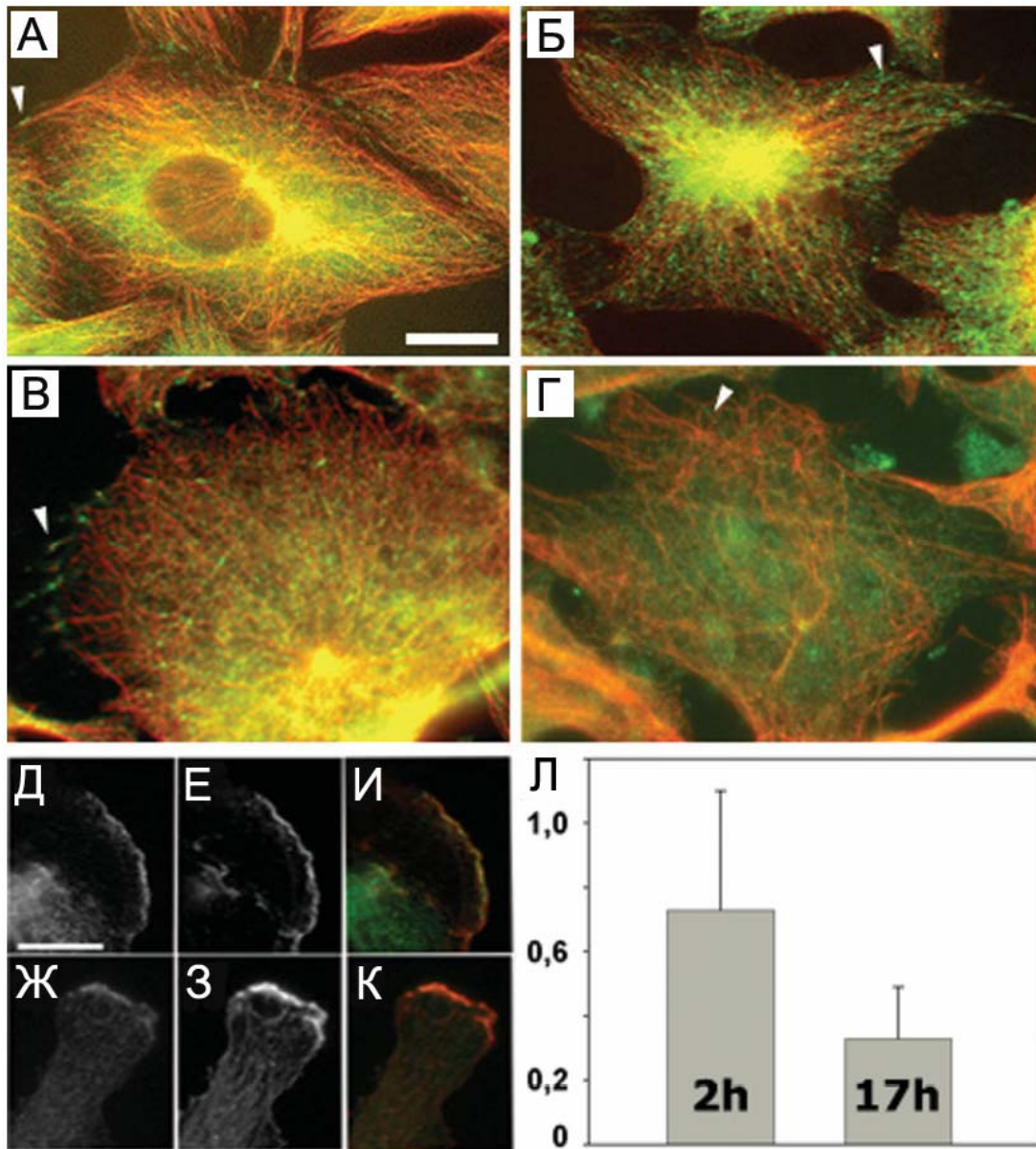


Рисунок 21. Динактин в клетках и в разновозрастных цитопластах Vero.

(А-Г) – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание крысиными антителами к α -тубулину (красный цвет) и мышиными антителами к p150^{Glued} (зелёный). А – клетка Vero, Б – двухчасовой цитопласт. Стрелки указывают на кометы динактина на концах микротрубочек. В, Г – 17-часовые цитопласты. На панели В цитопласты после охлаждения на водяной бане в течение 1 часа согревали до +37°C в течение 15 минут. Д-К – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: TRITC-фаллоидин (Е, З) и анти-динамитиновые антитела (Д, Ж). Д-И – свежеприготовленный цитопласт, Ж-К – стареющий цитопласт. Л – соотношение флуоресценции p50 и актина на краю ламеллы. Масштабная линейка – 10 мкм.

§ 13. КОРТЕКС СТАРЕЮЩИХ ЦИТОПЛАСТОВ СОДЕРЖИТ МЕНЬШЕ ДИНАКТИНА

Чем может объясняться изменение поведения плюс-концов микротрубочек вблизи клеточного края стареющих цитопластов? Известно, что моторный белок динеин вместе со своим кофактором динактином вовлечены во взаимодействие микротрубочек с клеточным кортексом (Dujardin et al., 2003), вместе с некоторыми другими белками, обсуждавшимися выше. Кроме того, наши экспериментальные данные продемонстрировали, что благодаря такому взаимодействию могут генерироваться мощные силы, достаточные для разрыва отдельных микротрубочек (рис.17). Как в контрольных клетках, так и в обоих типах цитопластов, компонент динактина белок p150^{Glued} был локализован на centrosоме, плюс-

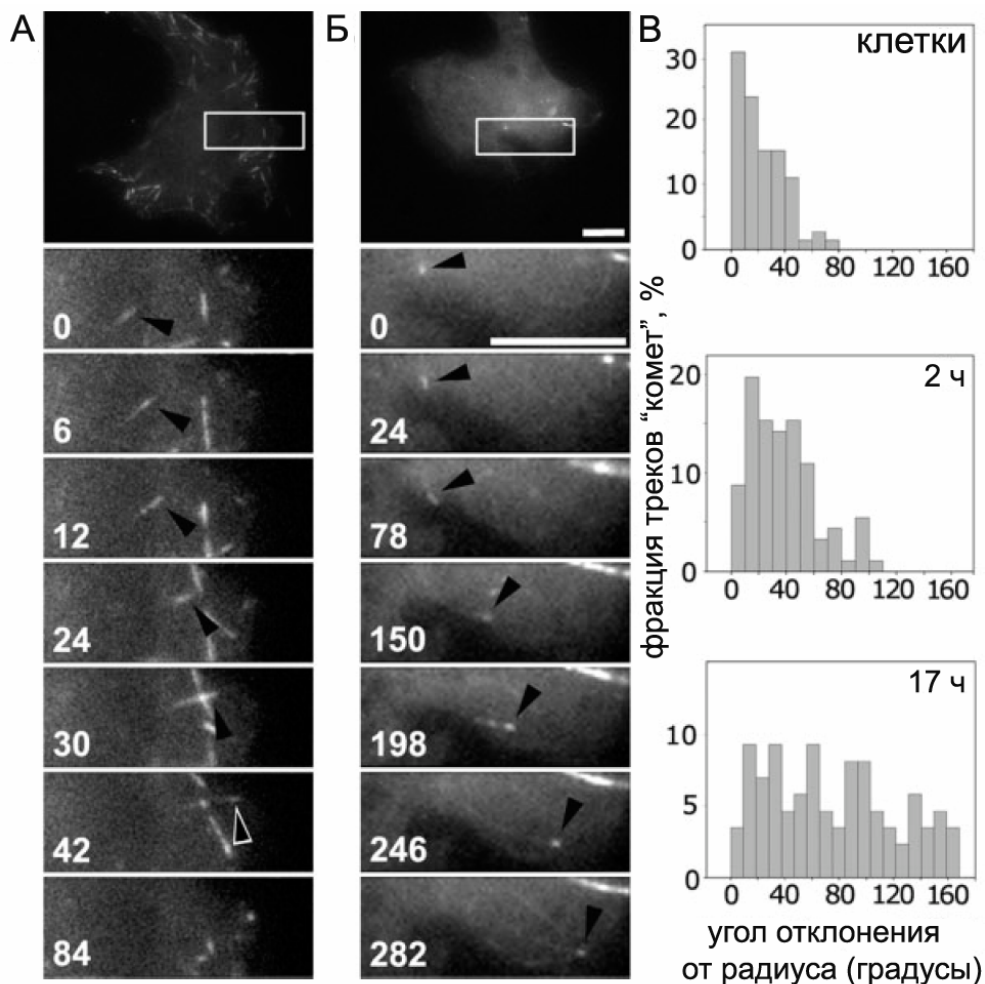


Рисунок 22. Направление движения комет YFP-CLIP170 различается у молодых и стареющих цитопластов.

(А) – В свежеприготовленных цитопластах кометы YFP-CLIP170 исчезают, когда достигают края клетки. (Б) – В стареющих цитопластах кометы продолжают расти после достижения клеточного кортекса. (В) – Распределение величин углов траекторий комет YFP-CLIP170 в клетках, свежеприготовленных и стареющих цитопластах. Масштабная линейка – 10 мкм.

концах микротрубочек, а также в некоторых участках края клетки (рис 21а-г). В стареющих цитопластах кортикальное анти-динактиновое окрашивание было значительно более слабым (рис 21ж). Чтобы подтвердить уменьшение количества кортикального динактина, мы провели двойное иммунофлуоресцентное окрашивание актина и динамитина и измерили отношение флуоресценции актина и динамитина, как это описано в материалах и методах. Мы обнаружили, что нормализованное по актину количество кортикального динамитина в стареющих цитопластах уменьшено по сравнению со свежеприготовленными ($P < 0.05$) (рис 21 л).

Хорошо известно, что активность цитоплазматического динеина/динактина необходима, в частности, для компактного расположения в клетках цистерн аппарата Гольджи. Как в свежеприготовленных, так и в стареющих цитопластах, Гольджи был расположен в центральной области цитоплазмы в виде компактной структуры (рис 21 в,е). Если в цитопласте разрушали микротрубочки нокадазолом, аппарат Гольджи при этом диспергировался. Эти данные служат подтверждением того, что в стареющих цитопластах цитоплазматический динеин сохранял свою активность, несмотря на то, что содержание его в кортексе уменьшалось.

§ 14. ПОЛОЖЕНИЕ ЦЕНТРОСОМ В ЦИТОПЛАСТАХ НЕ ЗАВИСИТ ОТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРОТРУБОЧЕК С КОРТЕКСОМ

Ранее в этой части данной работы было показано, что центральная позиция центросомы в клетках зависит от тянущих сил, приложенных к центросоме со стороны центросомных микротрубочек. Было показано также, что эти тянущие силы обеспечиваются работой динеин/динактинового комплекса. Оставался невыясненным вопрос о том, локализованы ли эти центрирующие центросому комплексы исключительно в клеточном кортексе, или же разбросаны по всей цитоплазме (Vallee and Stehman, 2005). Мы выяснили, что при старении цитопластов центросома не теряет своей связи с микротрубочками, они сохраняют свою динамичность, но при этом нарушается взаимодействие плюс-концов микротрубочек с клеточным кортексом. Также оказалось, что содержание динактина в кортексе стареющих цитопластов заметно снижено. Далее мы решили исследовать, как это может отразиться на позиции центросомы в таких цитопластах.

Мы оценивали позиции центросомы в свежеприготовленных и в стареющих цитопластах как расстояние между клеточным центроидом и точкой γ -тубулина (или ацетилированного тубулина) при иммунофлуоресцентном окрашивании. Мы нашли, что в

обоих случаях centrosома находилась вблизи центроида, обычно в пределах 4 мкм (рис 18 и 23). После полной разборки нокодазолом микротрубочек в цитопластах centrosома сдвигалась из центра по направлению к периферии, что было видно по окрашиванию на ацетилованный тубулин или γ -тубулин. В результате этого 15 часов спустя centrosома находилась на значительном расстоянии от центроида (рис 23).

Эти эксперименты являются подтверждением того факта, что позиция centrosомы в цитопластах по-прежнему зависит от centrosомных микротрубочек, несмотря на то, что взаимодействие их с клеточным кортексом нарушено. Единственным объяснением этому является то, что для работы центрирующего механизма необходимы отходящие от centrosомы микротрубочки и приложенные к ним тянущие силы динеина; и при этом силы, очевидно, приложены по всей длине микротрубочек, иначе centrosома в стареющих цитопластах была бы смещена из центра без воздействия нокодазола.

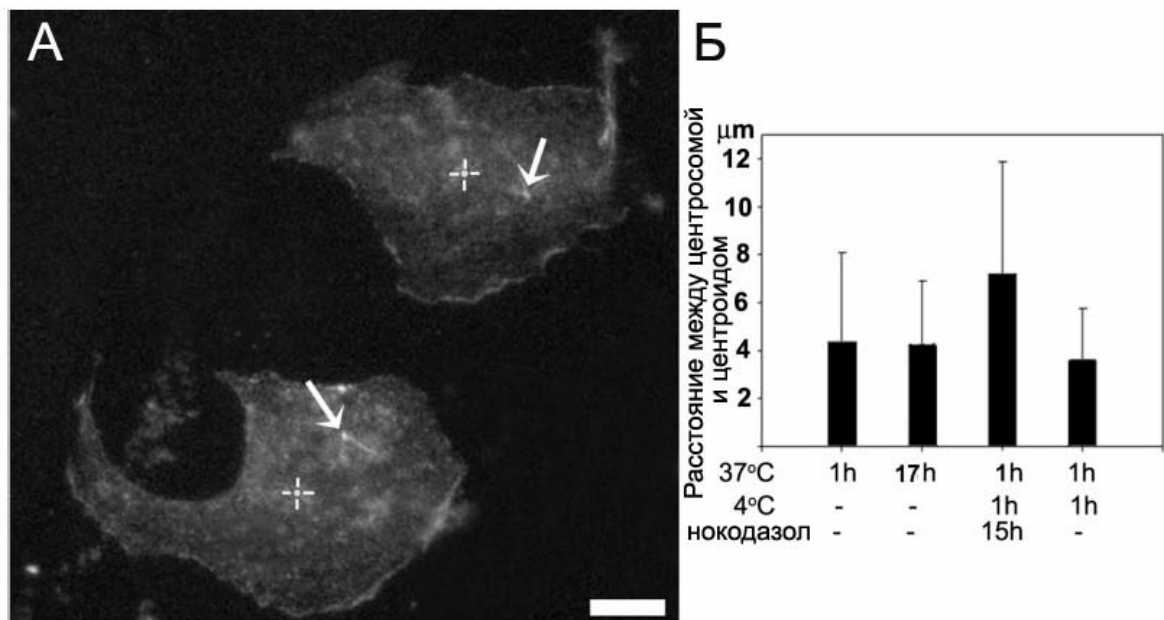


Рисунок 23. Centrosома смещается при деполимеризации микротрубочек, сохранив до этого своё центральное расположение в 17-часовых цитопластах (также рис 18).

(А) – 17-часовые цитопласты окрашены антителами к γ -тубулину после 1 часа деполимеризации микротрубочек на холоду и последующей инкубацией в течение 15 часов в 1 мкг/мл нокодазола при +37°C. Стрелками указаны centrosомы, крестиками обозначены центриоиды клеток и цитопластов. Масштабная линейка 10 мкм.

(Б) – Диаграмма среднего расстояния между centrosомой и центриоидом в цитопластах Vero. Экспериментальные условия см. в тексте. Показано $\pm$ SD.

Подведём итоги серии экспериментов с цитопластами. Итак, в стареющих цитопластах (17 часов спустя после энуклеации) клеток Vero радиальная система микротрубочек

становилась неупорядоченной. Ранее было показано, что в цитопластах BS-C-1 система микротрубочек также становится хаотичной за 24 часа (Maniotis and Schliwa, 1991), хотя в цитопластах, полученных из L-клеток система микротрубочек оставалась радиальной (Moskalewski and Thyberg, 1988; Gorgidze and Vorobjev, 1995). Выходит, процесс постепенной хаотизации микротрубочек зависит от типа клеток. Известно, что цитопласты сохраняют жизнеспособность в течение длительного времени, до 48 часов (Maniotis and Schliwa, 1991), и изменения в организации микротрубочек, вероятно, связаны с потерей ряда короткоживущих белков, кодируемых короткоживущими мРНК.

Далее было продемонстрировано, что, тем не менее, centrosомы в стареющих цитопластах сохраняют свою способность нуклеировать и заякоривать микротрубочки. По этой причине от centrosомы в таких цитопластах всегда радиально отходят в виде звезды несколько микротрубочек.

Мы обнаружили также, что микротрубочки в цитопластах динамичны, хотя их динамичность слегка снижена (т.е. они содержат большее количество ацетилированного тубулина) сразу после энуклеации; однако с течением времени стабильность микротрубочек не увеличивается. Повышение устойчивости к нокадазолу было описано ранее для цитопластов, полученных из L-клеток (Gorgidze and Vorobjev, 1995). Тем не менее, в свежеприготовленных цитопластах морфология системы микротрубочек неотличима от таковой в клетках. Поэтому можно сделать вывод, что некоторая стабилизация микротрубочек не влияет на их радиальную организацию.

Было выяснено, что микротрубочки в стареющих цитопластах, хотя и сохраняют свою динамичность, не взаимодействуют с клеточным кортексом. Другими авторами было показано, что в контрольных клетках, когда микротрубочки достигают клеточного края, они переключаются с фазы роста на паузу, и вскоре за этим следует катастрофа (Komarova et al., 2002). В центральных районах цитоплазмы катастрофы происходят гораздо реже, чем вблизи клеточного края (Komarova et al., 2002). В свежеприготовленных цитопластах динамика микротрубочек и была именно таковой. Однако в стареющих цитопластах динамика микротрубочек была очень специфичной: микротрубочки непрерывно и медленно росли, и начинали погибать, достигнув края. Когда в системе *in vitro* создавали экспериментальные барьеры на пути растущих микротрубочек, большинство из них изгибалось и продолжало расти (Dogterom and Yurke, 1997; Janson et al., 2003). Было показано, что вероятность катастрофы микротрубочки зависит от противодействия, оказанного этим экспериментальным барьером (Janson et al., 2003). По-видимому, в стареющих цитопластах край клетки может служить лишь в качестве пассивного механического препятствия для микротрубочек. Можно предположить, что контрольные клетки, также как и

свежеприготовленные цитопласты, содержат некую специфическую «деполимеризующую микротрубочки» активность на краю клетки. Ряд белков, обладающих дестабилизирующей микротрубочки активностью, были описаны ранее (Howard and Hуman, 2006), и среди них деполимеризующий кинезин МСАК, который связан с плюс-концами микротрубочек (Mooge et al., 2005). Однако ингибирование деполимеризующих микротрубочки белков не приводит к утрате радиальности микротрубочек. Деpletion MACF1/ACF7 изменяет поведение микротрубочек (Kodama et al., 2003) сходным образом со стареющими цитопластами, хотя и не так драматично. Возможно, в дальнейшем стареющие цитопласты могут использоваться в качестве модели для обнаружения специфичной дестабилизирующей микротрубочки активности на краю клетки. По-видимому, такое взаимодействие микротрубочек с клеточным кортексом играет критическую роль в строении всей системы микротрубочек.

Основной результат, полученный в ходе работы с цитопластами, касается механизмов позиционирования centrosомы в цитоплазме. В стареющих цитопластах микротрубочки, по-видимому, утрачивают свою способность взаимодействовать с клеточным кортексом, но centrosома сохраняет своё центральное положение в цитопласте. При этом процесс центрирования всё ещё зависит от centrosомных микротрубочек, поскольку их разборка приводит к смещению centrosомы из центральной области. По-видимому, ключевую роль в позиционировании centrosомы играют динеиновые комплексы, заякоренные повсеместно в цитоплазме на различных органеллах. Такие комплексы обеспечивают большее тянущее усилие микротрубочкам, обладающим большей длиной. Это подтверждает гипотезу о сервомеханической природе механизма центрирования, впервые выдвинутую при обсуждении наших первых экспериментов, описанных в начале этой главы (Vallee and Stehman, 2005).

§ 15. ПРЕДПОСЫЛКИ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛИ ЦЕНТРИРОВАНИЯ

Итак, изложенные выше результаты проведённых экспериментов убедительно доказывают, что позиция centrosомы в интерфазных клетках активно поддерживается в клеточном центре. Наши исследования показали, что centrosома сохраняет своё положение в центре благодаря силам, продуцируемым динеином и током актина, продуцируемом миозиновой сократимостью. Кроме того, существует некий фактор, зависящий от динамики микротрубочек, который также оказывает влияние на положение centrosомы в клетке. В завершение первой главы результатов данной работы будет приведено моделирование, симулирующее позиционирование centrosомы. Это моделирование основано на идее, что за смещение centrosомы отвечает баланс трёх сил – динеины, прилагающие тянущее усилие

вдоль длины микротрубочек, центроостремительный миозин-зависимый ток актина, и давление растущих микротрубочек на органеллы цитоплазмы. Сравнивая числовые предсказания с поведением centrosомы в контрольных и экспериментальных клетках, нам удалось исключить несколько гипотез о природе микротрубочковых сил, которые до этого казались вполне убедительными. Компьютерная симуляция продемонстрировала, что предлагаемый сбалансированный по силам механизм центрирования надёжен и универсален. Все предшествующие экспериментальные были использованы при построении модели для того, чтобы воспроизвести *in silico* типичные силы и перемещение centrosомы.

Как обсуждалось в обзоре литературы, во многих типах клеток centrosома в интерфазе находится в центроиде, или в геометрическом центре клетки (Dujardin and Vallee, 2002). Centrosома является точкой схождения звезды микротрубочек, и таким образом нет ничего удивительного в том, что именно микротрубочки играют ключевую роль в центрировании centrosомы, поскольку их длина примерно равна длине всей клетки. Кроме того, их динамика быстрого роста и укорочения позволяет им как бы исследовать всё клеточное пространство (Wühr et al., 2009). Ранее была описана способность микротрубочек, упирающихся в препятствие во время своего роста, генерировать давящую силу посредством так называемого храповикового механизма полимеризации (Dogterom and Yurke, 1997). Именно этим объясняли центрирование звёзд микротрубочек в стеклянных ячейках в системе *in vitro* (Holy et al., 1997): если, например, центр звезды ближе к левому краю экспериментальной ячейки (рис 24А), то более короткие микротрубочки с этой стороны упрутся в этот край и начинают изгибаться. С точки зрения механики, микротрубочки представляют собой эластичные стержни, и силы, возникающие при их изгибании, обратно пропорциональны квадрату их длин. Таким образом, с левой стороны короткие микротрубочки, изгибающиеся вследствие механических сил, толкают со значительной силой всю звезду направо. В то же время с правой стороны лишь немногочисленные микротрубочки достигают границы (вследствие своего периодического укорачивания при катастрофах) – и те, что всё же достигли границы, имеют гораздо большую длину. Поэтому при изгибании они продуцируют гораздо более слабые силы. Возникающий дисбаланс толкающих сил помещает звезду микротрубочек в центральную позицию в ячейке.

Этот элегантный механизм толкающих микротрубочек иногда работает также и *in vivo*: в маленьких по размеру клетках делящихся дрожжей ядро способно центрироваться благодаря толкающим силам, возникающим, когда растущие микротрубочки упрутся в края клетки (Tran et al., 2001; Tolic-Nørrelykke et al., 2004). Растущие микротрубочки могут также упираться в различные препятствия, разбросанные по цитоплазме клеток, такие как

желточные гранулы (Bjerknes, 1986; Wühr *et al.*, 2009), но соответствующий механический эффект этого никем не изучался.

Тем не менее, как правило, силы в клетке продуцируются не микротрубочками напрямую, а множеством молекулярных моторов, использующих микротрубочки в качестве рельсов (Civelekoglu-Scholey and Scholey, 2010). Описано много примеров того, как тянущие силы моторов позиционируют клеточные структуры (Grill *et al.*, 2001; Pearson and Bloom, 2004). Наиболее хорошо известны те, что имеют место в яйцах *Caenorhabditis elegans* когда динеины, связанные посредством динактина с клеточным краем и актиновым кортексом, пытаются двигаться по направлению к минус-концам микротрубочек, продуцируя таким образом тянущую силу вдоль микротрубочек, достигших клеточного кортекса (Grill and Hyman, 2005; рис 24 б). На первый взгляд, такой тянущий механизм является дестабилизирующим (рис 24 б): если центр звезды смещён влево, то здесь большее количество микротрубочек достигают кортекса, и сила, тянущая влево будет ещё сильнее уводить звезду из центра. Однако, количество тянущих молекул динеина ограничено, в то время как микротрубочки в избытке достигают кортекса со всех сторон клетки; и поэтому этот механизм, в котором моторы тянут микротрубочки за их плюс-концы, становится центрирующим (Grill and Hyman, 2005).

Существует и другая возможность: что динеиновые моторы распределены по всей цитоплазме, и прикреплены зачастую к структурам, которые сложно переместить с места на место – например, к мембранам эндоплазматического ретикулума, желтку, промежуточным филаментам или актину (Reinsch and Gönczy, 1998). В таком случае, чем длиннее микротрубочка, тем большее количество моторов способно работать вдоль неё, обуславливая тянущую силу, зависящую от длины микротрубочки. Такой сервомеханизм, предложенный Hamaguchi и Hiramoto в 1986 году (цит. по Dujardin and Vallee, 2002), должен стабилизировать центрирование: звезда микротрубочек ощущает вектор силы, направленный в направлении более длинных микротрубочек, и следовательно, в направлении центра клетки (рис 24в). Необходимые взаимодействия динеинов с латеральной поверхностью микротрубочек наблюдали в делящихся дрожжах (Vogel *et al.*, 2009), почкующихся дрожжах (Adames and Cooper, 2000), и в клетках *Dictyostelium* (Koonce and Khodjakov, 2002). Для работы этого механизма необходимо, чтобы генераторы силы были равномерно распределены по цитоплазме. Во многих клетках этого нет, так как моторные белки локализованы в плотном и достаточно тонком слое актина клеточного кортекса, подстилающего плазматическую мембрану; в то время как внутреннее пространство клетки занимают обширные территории достаточно жидкой фракции цитоплазмы, где моторам не на чем

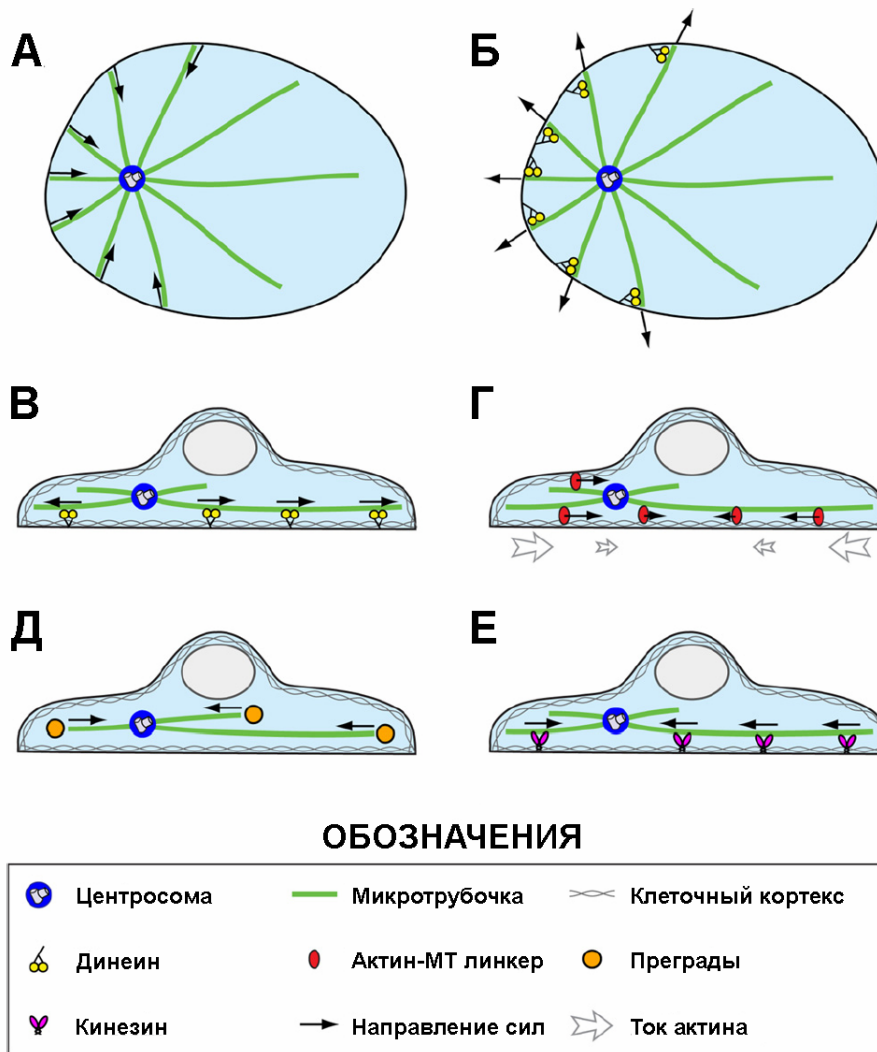


Рисунок 24. Гипотетические механизмы возникновения центрирующих сил.

А и Б – вид сверху, В-Е – вид клеток сбоку

(а) – Микротрубочки, упирающиеся в клеточную периферию, стабилизируют центрирование центросомы, поскольку, если центросома ближе к левому краю, большее число микротрубочек достигает этого края и толкают центросому вправо. **(б)** – Динеин, тянущий с клеточной периферии, дестабилизирует центрирование центросомы, если лимитирующим фактором является количество микротрубочек **(в)** – Динеин, тянущий за микротрубочки по всей их длине, стабилизирует центросому в центре, так как если центросома ближе к левому краю, большее количество моторов будет взаимодействовать с более длинными микротрубочками справа и тянуть таким образом центросому вправо **(г)** – Центростремительный ток актина стабилизирует центросому в центре, так как сеть микротрубочек большей плотности вокруг центросомы сдвинута влево, откуда она будет утаскиваться этим током по направлению к центру. **(д)** – Растущие плюс-концы микротрубочек, упирающиеся в некие препятствия в цитоплазме, дестабилизируют центрирование, так как по направлению к дистальному краю клетки ориентировано большее число плюс-концов микротрубочек **(е)** – Кинезин, толкающий микротрубочки по всей их длине, дестабилизирует центросому, поскольку, если центросома расположена ближе к левому краю, большее количество моторов будет взаимодействовать с более длинными микротрубочками справа, и таким образом, толкать центросому влево.

закрепиться. Однако в плоских распластанных клетках кортекс достаточно приближен к любой точке внутри клетки, и таким образом, микротрубочки могут выстраиваться вдоль кортекса и таким образом испытывать на себе кортикальные силы, зависящие при этом от их длины (O'Connell and Wang, 2000) – что позволяет говорить о наличии саморегуляции, т.е. сервомеханизма. Следует также отметить, что хотя динеин, заякоренный в клеточном кортексе посредством динактина, является наиболее очевидным кандидатом для приложения сил к микротрубочкам (Dujardin and Vallee, 2002), кинезины, запутавшиеся в богатом актином кортексе, также взаимодействуют с микротрубочками на их плюс-концах или поблизости, и также прилагают усилие к микротрубочкам (Brito et al., 2005).

Последний, но не менее важный аспект – микротрубочки взаимодействуют с актиновым гелем механическим способом посредством молекулярных комплексов, которые способны одновременно связываться и с актином, и с микротрубочками (Huang et al., 1999; Kodama et al., 2003; Weber et al., 2004). Миозин-зависимое сокращение вызывает всеобщий центростремительный ток F-актина в клетках (Yam et al., 2007; Alexandrova et al., 2008). Микротрубочки, связанные с этим током, увлекаются им и транспортируются таким образом к центру клетки (Mikhailov and Gundersen, 1995; Yvon and Wadsworth, 2000; Salmon et al., 2002; Rosenblatt et al., 2004; рис 24г). Вдобавок к этому, микротрубочки могут подтягиваться непосредственно миозиновым мотором по тяжам актина (Hwang et al., 2003).

В данной работе наше внимание сфокусировано на феномене центрирования centrosомы в распластанных культивируемых интерфазных клетках млекопитающих. Наши экспериментальные исследования показали, что динеиновые моторы, тянущие за микротрубочки, ответственны за силу, стабилизирующую centrosому в клеточном центре. Этой силе помогает миозин-зависимая центрирующая сила. Последняя не настолько сильна, чтобы стабилизировать симметричную позицию звезды микротрубочек сама по себе. Существует и третий фактор, дестабилизирующий положение звезды и смещающий centrosому к краю клетки. Этот третий фактор обусловлен динамикой микротрубочек, поскольку использование таксола для их стабилизации убирает соответствующую силу. Характеристики этой зависящей от динамики микротрубочек децентрирующей силы, однако, остаются неизвестными.

Математическое и компьютерное моделирование широко используется, чтобы дополнять традиционные цитологические и биофизические методы при выяснении механистических деталей центрирующих механизмов в разных системах (Holy et al., 1997; Grill et al., 2001; Vogel et al., 2009). Моделирование в этих случаях особенно полезно, поскольку индивидуальные микротрубочки и моторы практически невозможно различить

микроскопически во многих системах и поскольку измерить оцениваемые силы напрямую зачастую бывает слишком сложно. В данной работе был использован так называемый метод обратного инжинеринга, который до этого был с успехом применён для решения различных механических проблем, связанных с цитоскелетом (Wollman et al., 2008; Foethke et al., 2009). Этот метод в совокупности с проведёнными нами измерениями (приведёнными выше) был использован, чтобы ответить, в частности, на следующие вопросы: сколько моторов и микротрубочек вовлечены в центрирующий механизм и каковы его характеристичные силы? какова природа децентрирующей силы? – и ряд других.

§ 16. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ: ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ПЛЮС-КОНЦОВ МИКРОТРУБОЧЕК

Итак, наша модель основана на следующих экспериментальных данных, подробно описанных выше:

№1) Когда динеин ингибирован, центрирующие механизмы нарушены и центросома движется от центра (рис 25 а, красная стрелка).

№2) Ингибирование миозина останавливает центростремительный ток актина, но не влияет при этом на центрирование (рис 25 б, зелёные стрелки обозначают центрирование центросомы).

№3) Когда ингибированы совместно и динеин, и миозин – центросома сдвигается из центра.

№4) когда динеин ингибирован, и вдобавок клетки обработаны таксоллом, подавляющим динамику микротрубочек, центросома остаётся в центре (рис 25 в, зелёные стрелки обозначают центрирование центросомы).

№5) когда посредством локального воздействия нокодазолом на край клетки там разрушаются микротрубочки, центросома смещается из центра по направлению к нокодазолу (рис 25 г, зелёная стрелка).

№6) при локальном воздействии нокодазола на клетку, в которой вдобавок заингибирован миозин, центросома смещается по направлению от нокодазола (рис 25 д, красная стрелка).

№7) при локальном воздействии нокодазола на клетку, в которой не только заингибирован миозин, но и подавлена регуляция активности динеина, центросома осциллирует в районе клеточного центра.

Эти результаты говорят о том, что в позиционировании центросомы принимают участие одновременно три механизма: один механизм динеин-зависимый, другой зависит от миозина,

в основе третьего механизма лежит динамика микротрубочек, и в него вовлечены рост и укорочение их плюс-концов. Результат №1 демонстрирует нам, что работа динеина заключается в стабилизации центросомы в центре клетки, возможно, путём подтягивания астральных микротрубочек по всей их длине – поскольку подтягивание их лишь с края клетки будет дестабилизировать центрирование. Центрирующий эффект ограниченного числа динеинов, тянущих микротрубочки лишь на краю клетки, маловероятен. Объяснение этого достаточно просто: при локальной разборке микротрубочек, динеин на интактной части клеточного края в таком случае должен реориентировать тянущую силу столь эффективно, что центросома должна была бы сместиться от источника нокодазола, что противоречит экспериментальным данным результата №5. Результат №4, имеющий дело с ситуацией, при которой обе силы, зависящие от динеина и динамики микротрубочек подавлены, и действуют лишь силы, генерируемые миозином (рис 25), показывает нам, что миозин-зависимый механизм также стабилизирует центросому в центре клетки. Возможно, посредством кратковременных связей осуществляется взаимодействие между микротрубочками и центростремительным током актина, что вызывает эффективную подтаскивающую внутрь силу, приложенную к микротрубочкам. Результат №3 связывает дестабилизирующий механизм и динамику микротрубочек. Результаты №1 и №2 также свидетельствуют о том, что динеин-зависимое центрирование сильнее, чем дестабилизирующий механизм, в то время как миозин-зависимое центрирование слабее.

Вполне правдоподобные механизмы позиционирования, основанные на динамике микротрубочек, могут являться результатом взаимодействий плюс-концов микротрубочек и краёв клетки или иных преград; или же результатом работы кинезиновых моторов, заякоренных по всему кортексу. Латеральные взаимодействия по всей длине микротрубочек менее вероятны, так как подобные взаимодействия не требуют динамической нестабильности микротрубочек. Однако, поскольку теоретически толкание кинезинами вдоль всей микротрубочки может продуцировать децентрирующую силу, мы обязаны рассмотреть возможность того, что децентрирующая сила может возникать от толкания кинезинами микротрубочек по всей их длине (рис 24). Если какие-то моторы тянут плюс-концы микротрубочек по всей цитоплазме по направлению к центру клетки (или же укорачивающиеся микротрубочки подтягиваются за структуры кортекса, остающиеся прикрепленными к микротрубочкам (Grishchuk et al., 2005), то они будут таким образом стабилизировать положение звезды в центре, поскольку большее количество растущих плюс-концов микротрубочек будет расположено между центросомой и дистальным краем клетки.

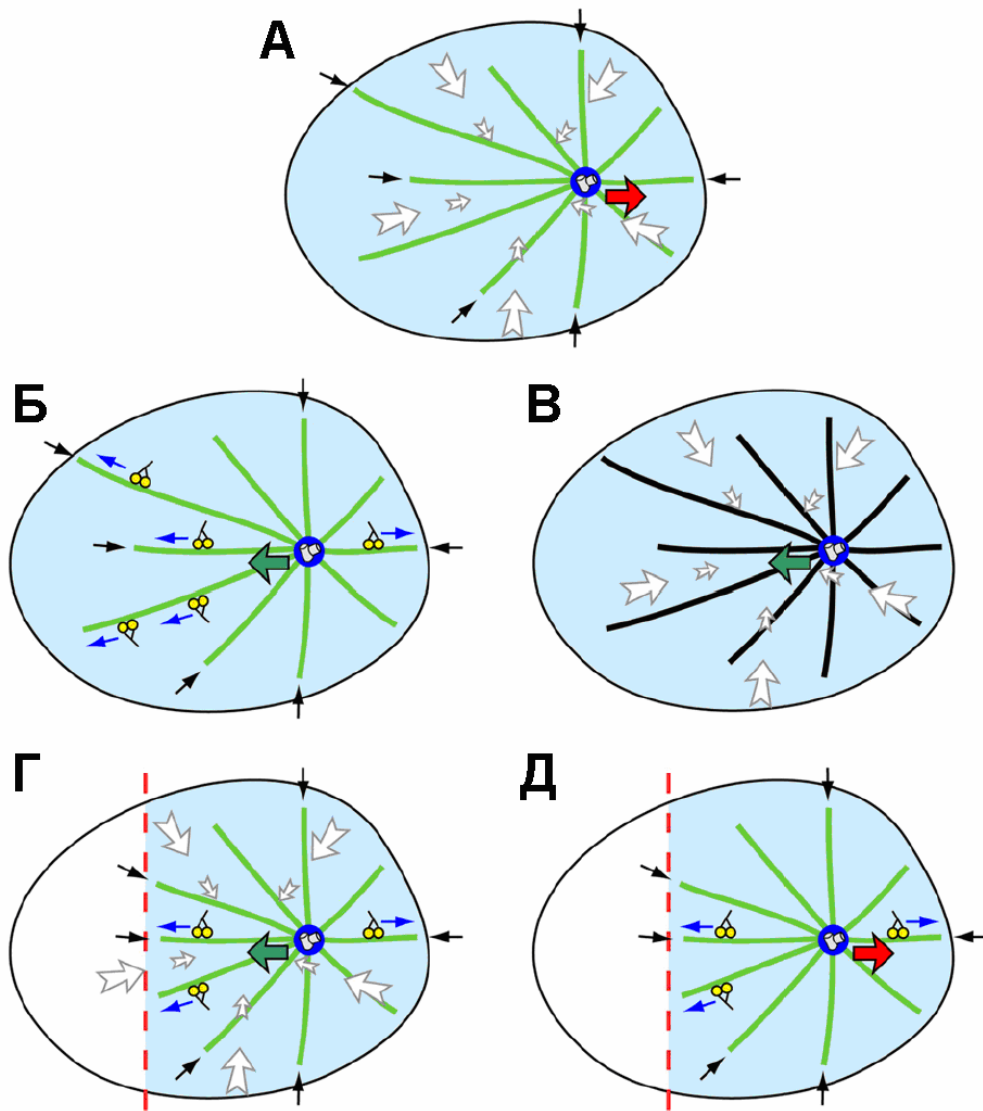


Рисунок 25. Геометрия возникновения сил, действующих на центросому (см. также рис.7)

- (а) Когда динеин ингибирован, и присутствуют только актиновый ток и сила динамичных микротрубочек, центрирование нарушено и центросома съезжает из центра
- (б) Когда миозин ингибирован, ток актина останавливается, и присутствуют только динеин и силы динамичных микротрубочек; центросома стабилизирована в центре.
- (в) Когда и динеин ингибирован, и микротрубочки стабилизированы таксолом, актиновый ток стабилизирует центросому в центроиде.
- (г) При локальном воздействии нокодазолом (моделируемого путём убирания микротрубочек из одной области клетки), центросома смещается в сторону этой области
- (д) При локальном воздействии нокодазолом и одновременном ингибировании миозина, центросома смещается прочь от этого участка клетки.

Зелёные стрелки – центросома стабилизирована и движется по направлению к центру; красные стрелки – центросома дестабилизирована и движется по направлению от центра; синие стрелки – тянущие силы динеина; белые стрелки – тащущие силы акто-миозина; чёрные стрелки – децентрирующие силы, связанные с динамичными микротрубочками. Динамичные микротрубочки показаны зелёным, а обработанные таксолом стабильные микротрубочки показаны чёрным.

Полимеризующиеся плюс-концы микротрубочек, упирающиеся в край клетки, также будут способствовать центрированию (рис 24А), как это обсуждалось выше. Ещё одно объяснение заключается в том, что когда centrosoma расположена ближе к одному из краёв клетки, микротрубочки перераспределяются таким образом, что толкают клеточный край лишь на дистальной стороне, вызывая дестабилизацию (рис 26). Однако, в таком случае, миозин-зависимая волокущая сила также являлась бы дестабилизирующей (рис 26), что приходит в противоречие с экспериментальным результатом №4. Если некие моторы тянут растущие плюс-концы микротрубочек от клеточного края, они будут дестабилизировать положение звезды (рис 24). Но это находится в противоречии с экспериментальным результатом №7: микротрубочки, остающиеся на противоположной стороне от места апплицирования нокодазола продолжают тянуть centrosому по направлению к этой стороне, поскольку активность миозина ингибирована. Всё вышеперечисленное оставляет нам лишь один непротиворечивый механизм: растущие плюс-концы микротрубочек упираются в структуры, связанные с кортексом, которые выстроены вдоль вентральной и дорсальной поверхностей клетки (рис 24). Последующее математическое моделирование и симуляция показали нам, что эта гипотеза полностью согласуется со всеми нашими экспериментальными наблюдениями.

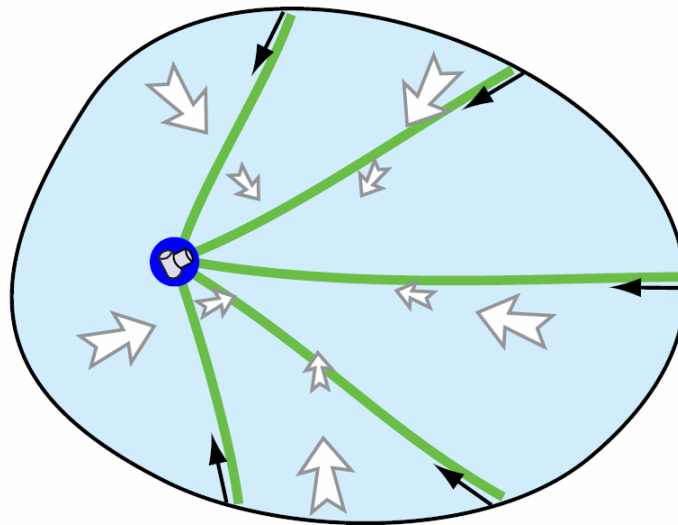


Рисунок 26. Если рост микротрубочек смещён к дистальному краю клетки, то в случае, когда centrosoma смещена из центра, обе силы – толкающие, возникающие на периферии при росте микротрубочек, и продуцируемые центростремительным током актина – будут дестабилизировать центрирование

§ 17. БАЛАНС СИЛ НА ЦЕНТРОСОМЕ ОБЛАДАЕТ ЦЕНТРИРУЮЩИМ ЭФФЕКТОМ В СЛУЧАЕ, КОГДА ТЯНУЩАЯ СИЛА ДИНЕИНА ДОСТАТОЧНО ВЕЛИКА

Мы представили три основные силы, воздействующие на центросому, как функции от расстояния до центра дисковидной клетки (рис 27А). Подтверждая результаты нашего качественного анализа, рис 27А (пунктир) показывает, что когда центросома смещается вправо от центра, то положительная общая сила от толкания микротрубочек будет смещать центросому ещё правее. В то же время отрицательная общая сила от тянущих динеинов и актинового тока (обозначенные, соответственно, сплошной линией и чёрточками) будет возвращать центросому назад в центр. Здесь для нас важен тот факт, что каждую индивидуальную микротрубочку динеин тянет наружу, в то время как миозин тянет её внутрь клетки. Таким образом, элементарные силы, приложенные к индивидуальным микротрубочкам, направлены в разные стороны и обладают разными знаками. Однако после объединения (интегрирования) элементарных сил для всех микротрубочек, обе общие (суммарные) силы (динеиновая и миозиновая) направлены внутрь, и таким образом, являются стабилизирующими. Численное значение всех трёх сил (динеиновой, миозиновой и толкающей) увеличивается приблизительно в линейной зависимости от смещения центросомы из центра. Это предсказание полностью согласуется с наблюдениями, согласно которым центросома ускоряется при удалении от центра, если динеин в клетке ингибирован (см. в предыдущих разделах этой главы). Такие вычисления приводят к выводу, что сумма всех трёх сил будет обладать центрирующим действием, если суммарная сила динеинов достаточно сильна (т.е. плотность динеиновых моторов превышает некую пороговую величину). Сходным образом, в отсутствие динеина, если общая (суммарная) сила миозинов меньше, чем от толкания микротрубочек, центросома будет дестабилизирована и станет смещаться к краю клетки.

Мы обнаружили, что балансирование центросомы в клетке можно определить тремя характеристическими силами: f_{push} – средней толкающей силой в расчёте на одну микротрубочку, aL – средней тянущей силой динеина в расчёте на одну микротрубочку, и bL^2 – средней миозин-зависимой силой в расчёте на одну микротрубочку. Здесь L – это показатель длины для динамической нестабильности микротрубочек, a – это сила динеина в расчёте на единицу длины микротрубочки, и b – это характеристика подтаскивающей силы актина на единицу площади клетки.

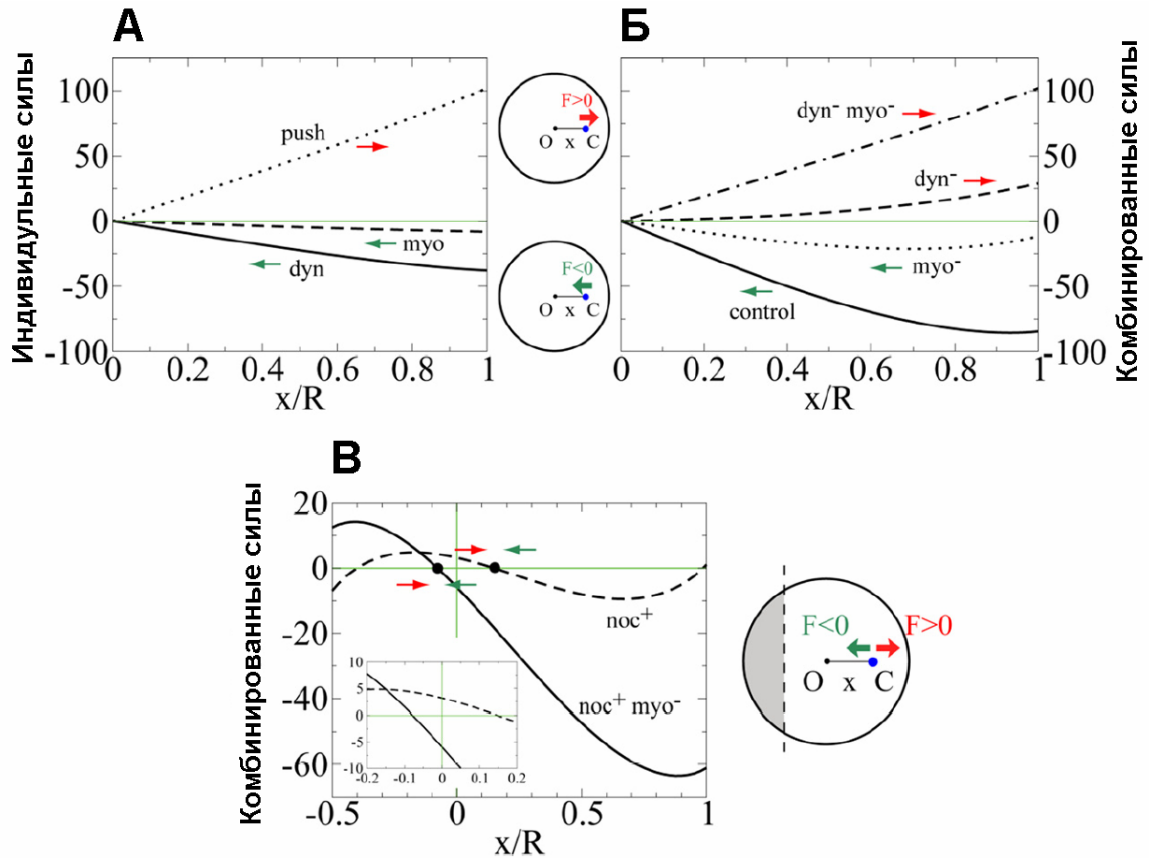


Рисунок 27. Вычисление зависимости сил, приложенных к центросоме, от расстояний. Все расстояния x нормализованы к клеточному радиусу R .

(А). Нормализованные суммарные силы, приложенные к центросоме, как функции нормализованных расстояний от центросомы до центра (центросома сдвигается направо от центра). Сплошная, пунктирная и точечная кривые соответствуют динеину, миозину и толкающим силам соответственно. Сила динеина выражена в единицах aL (средняя сила динеина на каждую микротрубочку; a – это сила динеина в расчёте на единицу длины, а L – длина динамической неустойчивости). Сила миозина выражена в единицах bL^2 (средняя тащущая сила актина в расчёте на микротрубочку; b – это тащущая сила на единицу площади). Толкающая сила выражена в единицах f_{push} – средняя толкающая сила в расчёте на микротрубочку.

(Б) Суммарная результирующая сила, приложенная к центросоме, выраженная в единицах f_{push} , в случае, когда $aL \approx 3f_{push}$ и $bL^2 = 8f_{push}$. Сплошная линия – контрольные клетки. Пунктирная линия – клетки с ингибированным динеином. Точечная линия – клетки, в которых ингибирован миозин. Точечно-пунктирная линия – клетки, в которых ингибированы как динеин, так и миозин.

(В) В случае, когда $aL \approx 3f_{push}$ и $bL^2 = 8f_{push}$, общая сила, действующая на центросому в клетках под воздействием нокадазола (участок воздействия простирается до полдороги к центру) показана для контрольных клеток (сплошная линия) и для клеток с подавленной активностью миозина (пунктирная линия). Увеличенная вкладка участка вблизи клеточного центра иллюстрирует распределение сил в этом месте. Чёрные точки показывают предсказанные сбалансированные (равновесные) местоположения центросомы. Зелёные стрелки – центрирование, направленные внутрь (отрицательные) силы. Красные стрелки – децентрирование, направленные наружу (позитивные) силы.

Интересно, что параметр L , предсказываемый моделью, составляет порядка 60 мкм, в то время как клеточный радиус – всего 20 мкм. Это означает, что большинство микротрубочек достигают края клетки (что и наблюдается нами в действительности), и что большинство индивидуальных микротрубочек в такой клетке имеют в длину 20 мкм (т.е. их длина равна клеточному радиусу). Когда соотношения $aL \approx 3f_{push}$ и $bL^2 \approx 8f_{push}$ находятся в пределах этих трёх основных силовых шкал, то суммарная сила, приложенная к центросоме, становится отрицательной в правой части клетки (рис 27Б, справа), и таким образом стабилизирует центросому в центре клетки, противодействуя механическим флуктуациям. В случае, когда миозин ингибирован, сумма результирующих сил динеина и плюс-концов микротрубочек остаётся отрицательной (рис 27Б, пунктир), и таким образом центрирование сохраняется. Однако в случае, если динеин в одиночку (рис 27Б, чёрточками), либо динеин вместе с миозином (рис 27Б, пунктир-тире) ингибированы, сила становится положительной и центральная позиция центросомы дестабилизируется. Стохастическое моделирование, проиллюстрированное видео 8 и 9, подтверждает эти предположения. Компьютерная симуляция также показывает, что в клетках с заингибированным динеином вдали от центра клетки дестабилизированная центросома движется со скоростью порядка 0,1 мкм/мин, в полном соответствии с экспериментальными данными (см. выше). Кадры из видео 8 и 9, имитирующие соответствующие кадры экспериментальных видеороликов, показаны на рисунке 28.

§ 18. ПРИ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК ЦЕНТРОСОМА ПРЕТЕРПЕВАЕТ СДВИГ ИЗ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ

Мы смоделировали локальное воздействие нокодазолом, описанное в данной работе ранее, путём вычисления изменений трёх основных сил после уничтожения микротрубочек в области на краю клетки (рис 25 г,д и рис 29), а также путём вычисления относительных изменений этих сил. Динамика изменения сил была следующей: при уменьшении плотности микротрубочек слева, динеин тянет центросому вправо; таким образом, сила динеина, тянущего центросому вправо, увеличивается. Однако две другие силы обладают противоположным эффектом: больше микротрубочек справа увлекается током актина в направлении справа налево. Толкание плюс-концов этих численно превосходящих микротрубочек также сдвигает центросому влево. Таким образом, несмотря на тот факт, что динеин сильнее, чем по отдельности миозин или толкающие силы микротрубочек, миозин-зависимый ток вместе с толкающими силами противостоят силе динеина; и суммарным эффектом является сдвиг центросомы влево – по направлению к источнику нокодазола. Это

подтверждается рис 27В, который показывает результирующую силу, действующую на центросому в присутствии капилляра с нокодазолом, обладающую следующими параметрами: $aL \approx 3f_{push}$ и $bL^2 \approx 8f_{push}$.

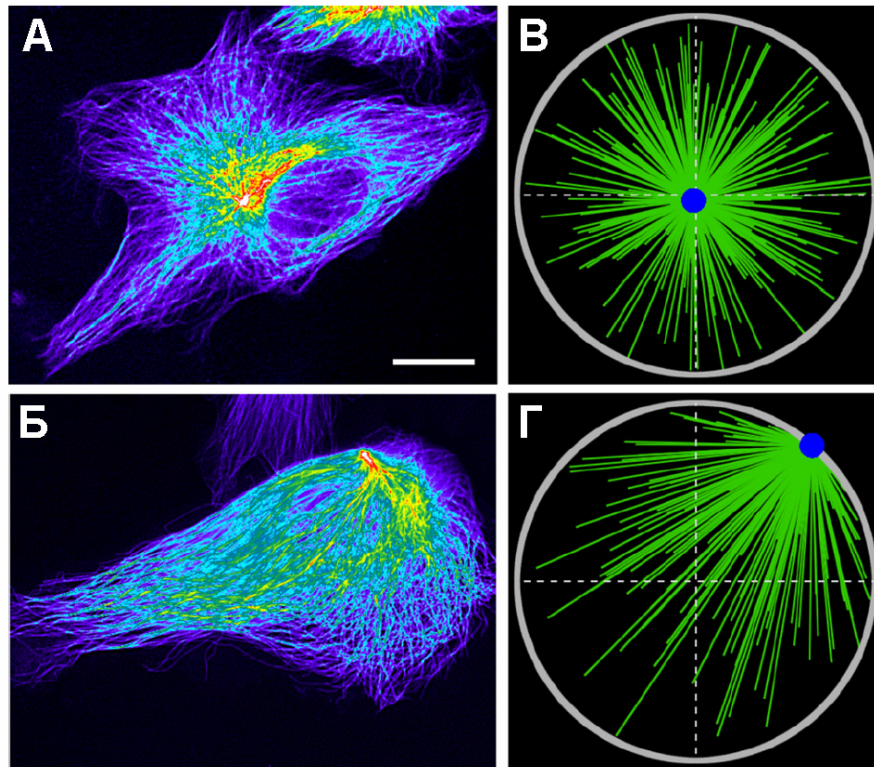


Рисунок 28. Центрирование в контрольной клетке и утрата стабильности положения центросомы при ингибировании динеина.

(А) Центрированная центросома в контрольной клетке. (Б) Центросома в клетке с ингибированным динеином сдвинута к краю клетки. Градиент псевдоцветов иллюстрирует соответственно градиент плотности микротрубочек. Обратите внимание, что в этом случае дестабилизированная центросома съехала к клеточному краю, ближайшему к центроиду клетки. Масштабная линейка 10 мкм. Панели А и Б соответствуют левой части рис.16 (В) Отдельный кадр из стохастического моделирования (видеоролик 8), соответствующий ситуации А.

(Г) Отдельный кадр из стохастического моделирования (видеоролик 9), соответствующий ситуации Б. Серая окружность – границы клетки, зелёные линии – микротрубочки, синяя точка – центросома.

Такое отношение силы и расстояния объясняет тот факт, что стабильная равновесная позиция центросомы находится слева от клеточного центра, ближе к источнику нокодазола (рис 27В, сплошная линия). Однако, поскольку в данной ситуации две слабые силы с трудом сообща перетягивают сильную, результирующая сила в итоге оказывается небольшой, и смещение центросомы из центра получается небольшим, в точном соответствии с экспериментальными наблюдениями (рис 29 а,б). В дальнейшем это предсказание также было подтверждено стохастическими симуляциями (рис 29в и видео 10). Когда нокодазол подносят к клетке с заингибированным миозином, наша модель предсказывает, что тянущая сила динеина справа будет пересиливать толкание микротрубочек справа же. Следовательно, если

$aL \approx 3f_{push}$ и $bL^2 \approx 8f_{push}$, то поднесение нокодазола к клетке с подавленной активностью миозина (рис 27в, тире) будет сдвигать центросому в сторону от источника нокодазола, то есть направо – в соответствии с полученными экспериментальными данными (рис 29, Г и Д). Стохастическая симуляция (рис 29е и видео 11) в дальнейшем подтвердили эти предположения.

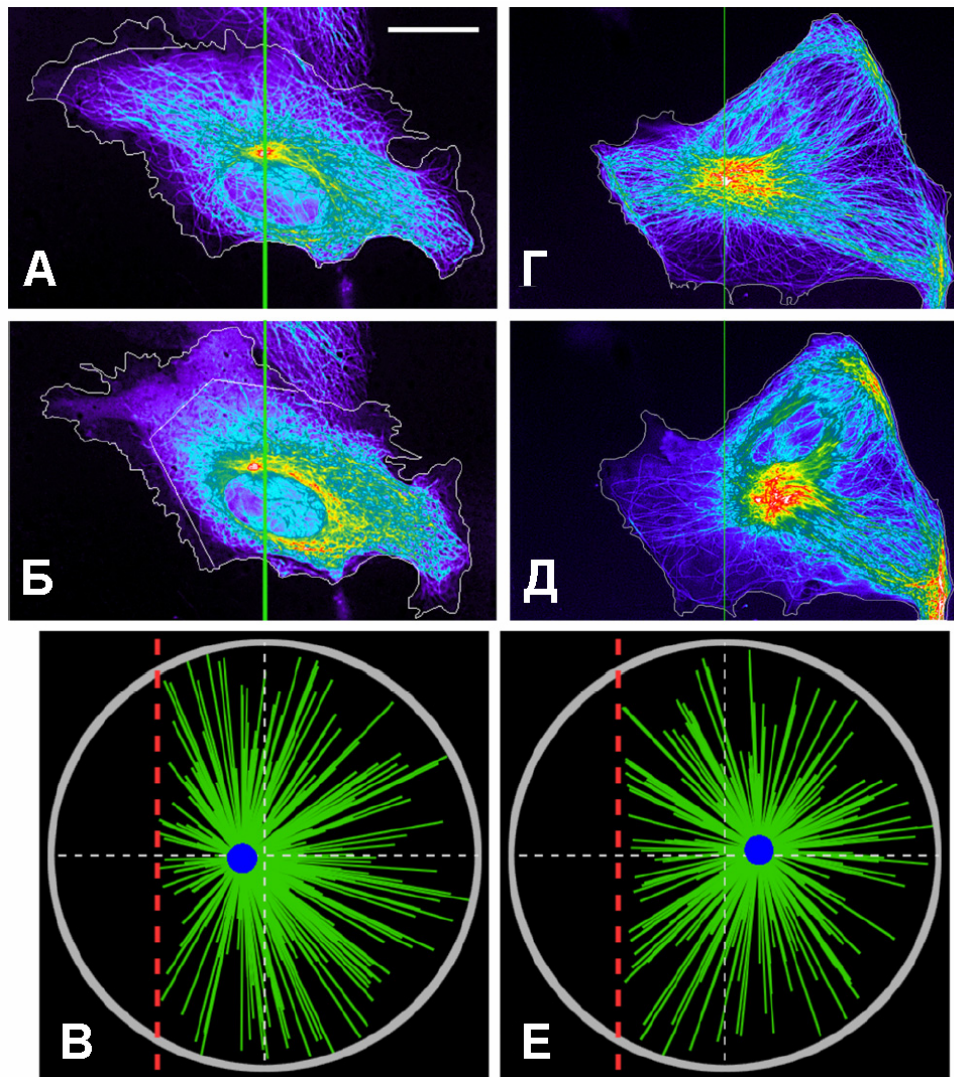


Рисунок 29. Влияние локального воздействия нокодазолом на местоположение центросомы.

Наблюдаемые позиции центросомы до (А) и после (Б) локального воздействия нокодазолом на левый край клетки. Ломаная линия показывает границу области воздействия нокодазола. Центросома слегка сдвигается по направлению к источнику нокодазола, что находится в соответствии с результатами моделирования (В) – отдельный кадр стохастического моделирования из видеоролика 10, соответствующего ситуациям А и Б.

(Г и Д). Наблюдаемые позиции центросомы до (Г) и после (Д) локального воздействия нокодазола на левый край клетки с заингибированным миозином. Центросома сдвигается в сторону от источника нокодазола, в соответствии с результатами моделирования (Е) – кадр стохастического моделирования из видеоролика 11, соответствующего ситуациям Г и Д. Масштабная линейка, 10 мкм (А,Б,Г и Д); цвета те же, что и на рис 28. Красные пунктирные линии представляют собой границу участка воздействия нокодазолом в компьютерной модели.

§ 19. ОЦЕНКА ПРИЛОЖЕННЫХ К ЦЕНТРОСОМЕ СИЛ И ЕЁ МОБИЛЬНОСТИ В ПРЕДЛОЖЕННОЙ МОДЕЛИ ЦЕНТРИРОВАНИЯ

Все разобранные ранее силы, приложенные к центросоме зависят от числа микротрубочек. Таким образом, непрерывная модель становится инвариантной, когда увеличивается число микротрубочек, автоматически увеличивая запас прочности модели (т.е. устойчивость к нарушениям исходных предпосылок). Однако стохастические эффекты случайных дисбалансов, возникающие из-за динамической нестабильности микротрубочек, будут увеличивать флуктуации позиции центросомы, когда число микротрубочек уменьшается. Чтобы оценить влияние этого эффекта, мы использовали стохастические симуляции (видео 8). Мы наблюдали, что когда среднее число микротрубочек колеблется от 30 до 300, центросома находится очень близко от геометрического центра моделируемой клетки. В то же время, например, в системе с тремя микротрубочками, центросома циркулирует достаточно далеко от центроида (рис 30А). Это позволяет нам оценить необходимое для успешной работы модели количество микротрубочек приблизительно в сто штук. Хотя точные экспериментальные подсчёты и невозможны, это число примерно соответствует наблюдаемому нами на снимках экспериментов.

Мы использовали пять из обсужденных выше серий экспериментов для того чтобы наложить строгие ограничения на параметры модели (две других серии наблюдений объяснимы без подобных ограничений). Пространственно модель проста и двумерна (рис 30Б). Поведение системы полностью определяется двумя безразмерными отношениями: характеристичной силой динеина aL к средней толкающей силе f_{push} , и характеристичной акто-миозиновой силе bL^2 к f_{push} . В пределах этих параметров существует относительно узкая треугольная область вокруг значений $aL \approx 3f_{push}$ и $bL^2 \approx 8f_{push}$ (рис 30Б, обозначено звёздочкой), в которой модель объясняет все экспериментальные наблюдения.

Достаточно строгие ограничения параметров модели дают нам возможность оценить порядок величины характеристичных сил, приложенных к микротрубочкам. Когда растущая микротрубочка упирается в препятствие, она может либо претерпеть катастрофу (Janson et al., 2003), либо же продолжить свой рост, обогнув препятствие. Мы принимаем, что вероятность происхождения двух этих событий сравнима, и что индуцированные столкновениями катастрофы являются неочевидной частью от общего числа катастроф. Далее, мы прикидываем, что микротрубочка будет упираться в препятствие примерно каждые 30 секунд, что примерно соответствует характерному наблюдаемому временному интервалу между двумя катастрофами (см таблицу 2). Мы принимаем, что сила генерируется в течение ~ 3 секунд до того момента, как микротрубочка начнёт укорачиваться; или же она огибает

препятствие и продолжает свой рост. Поскольку такая упёртая в преграду микротрубочка развивает силу порядка ~ 6 pN (Dogterom and Yurke, 1997), и этой микротрубочке требуется несколько секунд для того чтобы начать укорачиваться (Janson et al., 2003), средняя сила на конце микротрубочки должна быть

$$f_{push} \sim 6 \text{ pN} \times 3 \text{ s} / 30 \text{ s} = 0.6 \text{ pN}.$$

Подобный толкающий механизм лимитирован силой сгибания микротрубочки – максимальной силой сжатия, которую она может выдержать, не сломавшись. Поскольку сила сгибания обратно пропорциональна длине микротрубочки, для длинных микротрубочек она может быть очень малой. В самом деле, сила сгибания микротрубочки в водной среде может быть оценена как $\sim 10B/l^2$, где $B \sim 20 \text{ pN} \times \text{мкм}^2$ – это упругость сгибания микротрубочки и l – это её длина. Однако микротрубочки внутри клетки помещены не в воду, а в эластичный актиновый гель. Это существенно повышает силу сжатия, которую способна выдержать микротрубочка (Brangwynne et al., 2006): для длинной микротрубочки, погружённой в эластичный гель, длина изгиба равна $\lambda \sim 2\pi (B/Y)^{1/4}$, где Y – это коэффициент Янга (*Young modulus*) актиновой сети, который никак не зависит от толкающей силы и длины микротрубочки. При характерной эластичности клеточного кортекса $Y \sim 10^3 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$ эта длина составит $\lambda \sim 2.5 \mu\text{m}$. Учитывая даже, что эта величина для актинового геля, который расположен под узким слоем кортекса, отличается примерно на пару порядков, $Y \sim 10 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$, длина сгибания микротрубочки всё равно останется маленькой, $\lambda \sim 6 \text{ мкм}$. Соответствующая сила сгибания $\sim 10B/\lambda^2 \sim 6 \text{ pN}$ заметно превосходит характерные толкающие силы, которые, следовательно, будут приложены практически без ослабления к centrosome.

Принимая во внимание оценки $aL \approx 3f_{push}$ и $L \sim 60 \mu\text{m}$, мы делаем вывод, что

$a \sim 0,03 \text{ pN}/\mu\text{m}$. Поскольку, как известно, единичный динеиновый мотор способен развивать силу порядка $\sim 1 \text{ pN}$ (Mallik et al., 2004), в среднем должен приходиться примерно 1 тянущий динеин на каждые 30 мкм длины микротрубочки, или, округляя, по одному работающему динеину на микротрубочку. Как мы помним, с учётом наших предыдущих выкладок мы принимаем, что в клетке около 100 микротрубочек, и каждая в длину составляет около 20 мкм. Отсюда получается, что звезду микротрубочек тянут $\sim 100 \times 20 \mu\text{m} / 30 \mu\text{m} \approx 70$ динеиновых моторов. Мы дальше допускаем, что все динеиновые моторы в пределах 50 нм от любой из микротрубочек способны связаться с ней (Oiwa and Sakakibara, 2005), и что только половина всех существующих моторов одновременно работают и способны продуцировать тянущее усилие. Отсюда следует, что на площади $100 \times 20 \mu\text{m} \times 0,05 \mu\text{m} \approx 100 \mu\text{m}^2$ должно быть локализовано порядка ~ 140 моторов. Таким образом, необходимая

плотность динеина должна составлять $\sim 1,5/\mu\text{m}^2$. Поскольку площадь клетки составляет $\pi \times (20\ \mu\text{m})^2 \approx 1200\ \mu\text{m}^2$, то около 2000 молекул динеина в сумме должны присутствовать в клеточном кортексе. В более ранних работах нет информации о каких-либо непосредственных экспериментальных измерениях этого числа, однако Кобаяши и Мураяма в 2009 году сообщили о существовании сотен очагов, содержащих по несколько молекул динеина каждый – что согласуется с нашими теоретическими предсказаниями (Kobayashi and Murayama, 2009).

При помощи нашей модели. мы оценили мобильность звезды микротрубочек с центросомой в центре в $\mu \sim 0,03\ \mu\text{m} / (\text{pN} \times \text{min})$, что соответствует константе трения

$\zeta = 1/\mu \sim 30\ \text{pN} \times \text{min}/\mu\text{m}$. Принимая во внимание, что когда центросома значительно смещена из центра, к звезде прилагается сила порядка $50f_{\text{push}} \sim 30\text{pN}$, мы предсказываем, что центросома будет смещаться со скоростью $50\ \mu\text{f}_{\text{push}} \sim 1\ \mu\text{m}/\text{min}$. Это и является в действительности наблюдаемой скоростью движения центросомы (таблица 3). Стоит обратить внимание также на характерную наблюдаемую скорость центростремительного тока актина в плоских клетках (Alexandrova et al., 2008). Мы предположили, что подтаскивание с его помощью звезды микротрубочек обусловлено так называемым трением белков (Bormuth et al., 2009) – краткосрочными контактами микротрубочек и актиновых филаментов в кортексе. Эффективная константа трения для таких кратковременных прикреплений может быть оценена как $\kappa\tau$ (Bormuth et al., 2009), где $\kappa \sim 10\ \text{pN}/\mu\text{m}$ – это эффективный коэффициент эластичности деформированного актинового филамента (Mogilner and Oster, 1996), и $\tau \sim 1$ – это характерное время до того, как такой филамент открепится от микротрубочки (Howard, 2001). Таким образом, эффективная константа трения для каждого прикрепления составит порядка $\sim 10\text{pN} \times \text{s}/\mu\text{m}$. Чтобы добиться суммарной константы трения, составляющей $30\text{pN} \times \text{min}/\mu\text{m}$, мы должны предположить существование ~ 200 таких прикреплений, или примерно по два прикрепления на каждую микротрубочку, находящуюся в клетке. Это число также является теоретическим предсказанием нашей модели, поскольку подобных экспериментальных данных никем пока не получено.

§ 20. МЕХАНИЗМЫ ЦЕНТРИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ РАЗНОЙ ФОРМЫ И РАЗМЕРА

Поскольку большинство клеток не обладают идеально круглой формой, мы изучили вопрос, как предложенные нами механизмы центрирования работают в продолговатых клетках (рис 30Г). Данные проведённого математического моделирования подтвердили, что все предсказания модели, относящиеся к округлым клеткам, остаются в силе и в случае

клеток эллипсовидной формы. Мы обратили внимание на интересный результат моделирования: когда динеин ингибирован, дестабилизированная centrosoma неизменно движется к ближайшему краю клетки (рис 30Г и видео 9). Мы решили, что такое предсказание может являться хорошей проверкой работоспособности нашей модели. Поэтому мы снова внимательно изучили соответствующие снимки, полученные экспериментально (см выше) и убедились в том, что всё было именно так на самом деле (рис 28). Объяснение этому достаточно простое и исходит из того, что позиция centrosomy в данной ситуации определяется исключительно балансом между силами актомиозина и толкания концов микротрубочек. Известно, что величина миозин-зависимой силы очень чувствительна к расстояниям в клетке, поскольку скорость актинового центростремительного тока пропорциональна расстоянию от клеточного центра. Следовательно, в клетках эллиптической формы, акто-миозиновые силы слабее вдоль короткой оси, чем вдоль длинной оси клетки. С другой стороны, толкающая сила микротрубочек в меньшей степени подвержена влиянию клеточной геометрии, поскольку большинство плюс-концов микротрубочек распределено поблизости от centrosomy. Таким образом, нечувствительные к ориентации толкающие силы концов микротрубочек пересиливают подтаскивание внутрь током актина гораздо эффективнее вдоль короткой оси клетки. Следует обратить внимание, что сильно вытянутые клетки вплотную приближаются по свойствам к одномерной системе (1D-модель), для которой мы высчитали все силы аналитически; что ещё больше усиливает предсказательную силу нашей модели. Мы также наблюдали, что в продолговатых и 1D-клетках параметры модели в ещё большей степени могли объяснить все экспериментальные наблюдения (рис 30), в соответствии со всеми нюансами расстояний и величин углов относительно трёх важнейших сил. Для клеток больших размеров область параметров, которая объясняла все экспериментальные наблюдения, становилась меньше (рис 30). Очевидная причина этого явления заключается в том, что в большой клетки лишь немногие микротрубочки могут достигнуть её края, и таким образом, механизм зондирования динамическими микротрубочками работает с меньшей эффективностью.

Путём рассадки клеток на специальным образом микросфабрикованный субстрат, можно добиться того, чтобы они приняли определённую форму (The'ry et al., 2006). Чтобы изучить предсказанное нашей моделью поведение таких клеток, мы провели симуляцию стохастической модели сбалансированных сил на клетках, имеющих формы, описанные в (The'ry et al., 2006) – квадратной (рис 30Д) и веерообразной (рис 31). Поскольку экспериментально направление центростремительного тока актина в подобных клетках никто не изучал, для квадратных клеток мы использовали радиально-симметричный ток внутрь, в то

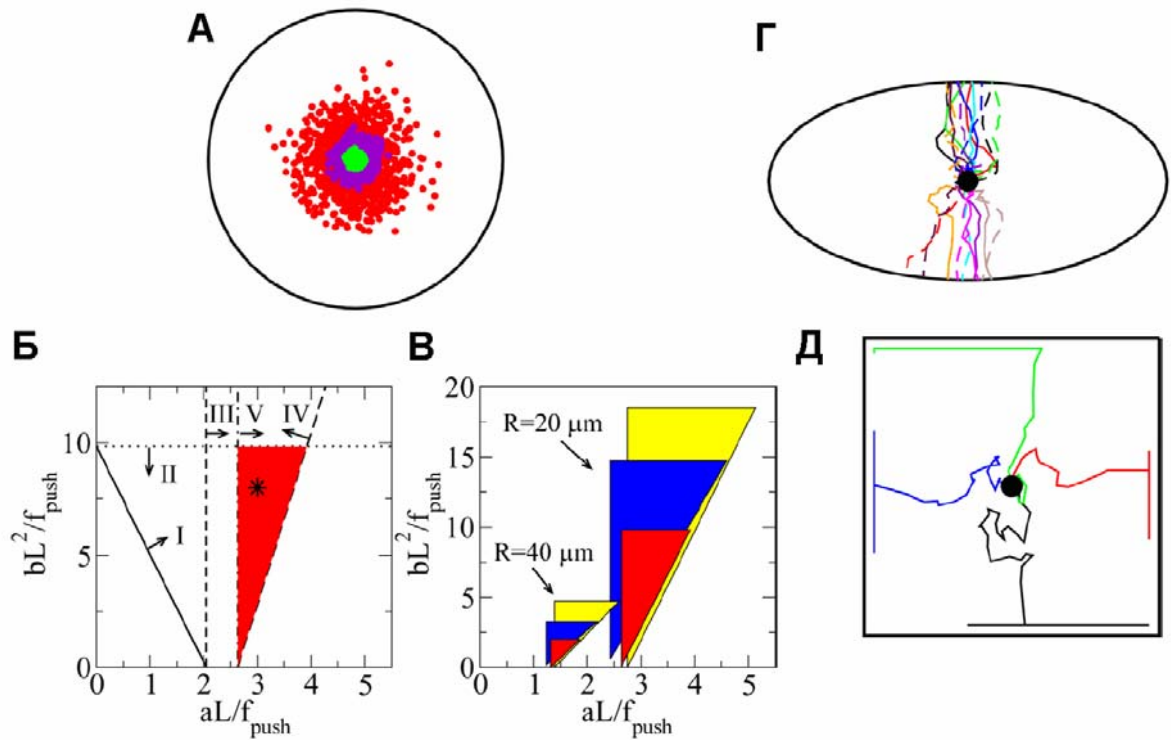


Рисунок 30. Калибровка модели и её теоретические предсказания.

(А) Стохастическое моделирование, иллюстрирующее флуктуации позиции центросомы в контрольной клетке с числом микротрубочек $N \sim 300$ (зелёные точки), $N \sim 30$ (лиловые точки) и $N \sim 3$ (красные точки). Границы клетки обозначены чёрным. Для каждого случая показаны по 1000 смоделированных позиций центросомы с 10-минутным временным интервалом.

(Б) Значения параметров для дисковидной клетки с радиусом $R=20 \mu m$. Линии и соответствующие стрелки показывают области значений параметров, соответствующие наблюдаемому поведению центросомы в контрольных клетках (I), с заингибированным динеином (II), с заингибированным миозином (III), в клетках с локальным воздействием нокадазола (IV), и в клетках с заингибированным миозином с локальным воздействием нокадазола (V). Пересечение этих областей, закрашенное красным цветом – это область значений параметров, для которых модель объясняет все наблюдаемые явления. Этот участок вокруг значений, определяемых соотношениями $aL \approx 3f_0$ и $bL^2 = 8f_0$, обозначен звёздочкой.

(В) Зависимость области значений параметров от формы и размеров клетки: красные области соответствуют круглой клетке радиуса R ; синие области – эллиптическим клеткам той же площади, что и дисковидные клетки; и в двойном геометрическом соотношении размеров; жёлтые участки – одномерные (1D) клетки с половиной длины, равной R .

(Г) Траектории центросомы в эллипсовидных клетках с заингибированным динеином; приведены 20 индивидуальных стохастических симуляций, помеченных линиями разных цветов и типов. Для каждой траектории центросома изначально позиционировалась в клеточном центре (чёрная точка).

(Д) Траектории центросомы в квадратных клетках с заингибированным динеином, результаты четырёх индивидуальных стохастических симуляций, помеченных разными цветами. Для каждой траектории центросома изначально позиционировалась в клеточном центре (чёрная точка). В двух случаях центросома закончила свой путь на краю клетки, и в двух других – в углах клетки.

время как для веероподобных клеток, напоминающих движущиеся клетки эпителия мы выбрали модель актинового тока, показанную на рис 31А – с точкой схождения, расположенной ближе к округлому краю (и почти в центроиде клетки) – то есть, характерную для движущихся клеток. Моделирование с использованием квадратных клеток предсказало, как и ожидалось, стабильное центрирование centrosомы (рис 30Д), в полном соответствии с экспериментальными наблюдениями (The'ry et al., 2006).

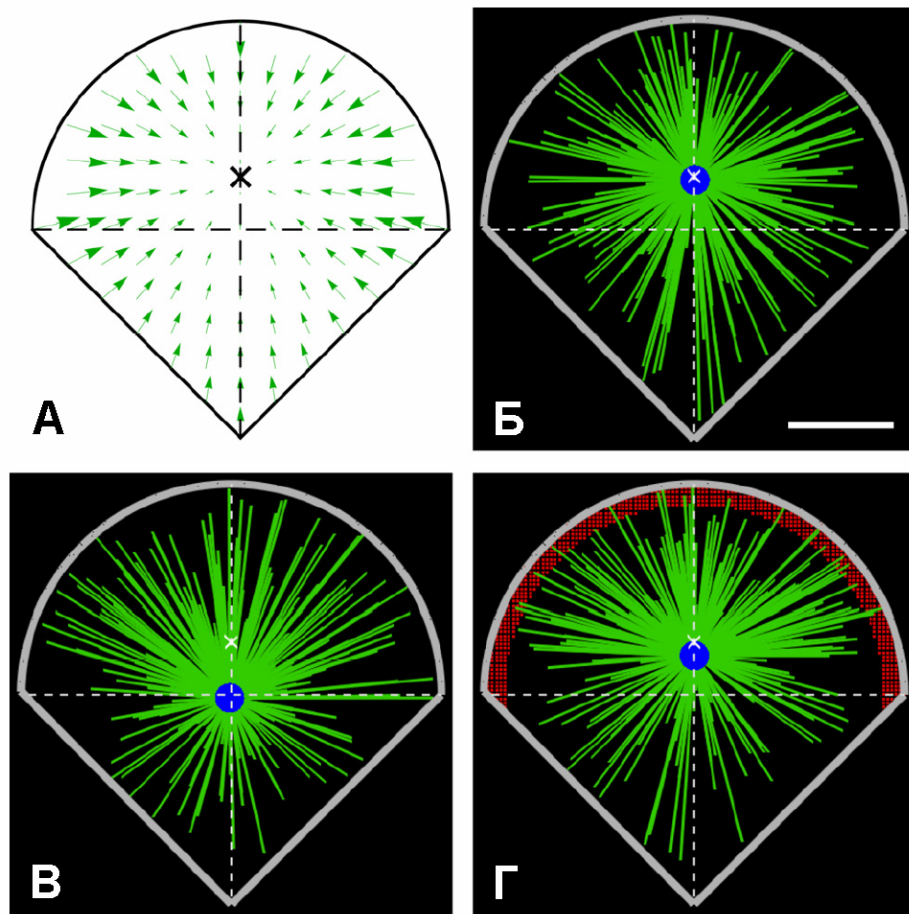


Рисунок 31. Предсказание модели для веероподобной клетки.

(А) Гипотетический центростремительный ток актина (зелёные стрелки) с центром схождения (крестик) рядом с центроидом.

(Б-Г) Отдельные кадры симуляций с изотропической нуклеацией микротрубочек (Б), анизотропической нуклеацией микротрубочек, при которой плотность микротрубочек, растущих по направлению к округлому краю вдвое превышает плотность микротрубочек, растущих в направлении угла (В); и с анизотропической нуклеацией микротрубочек, описанной в Б, но с дополнительными моторами на «ведущем крае» (обозначены красными точками) - Г. Зелёные линии – микротрубочки. Синий кружок – centrosома. Края клетки – толстые серые линии. Белый крестик – клеточный центр. Масштабная линейка – 10 мкм.

Нетривиальным результатом является то, что когда мы выключаем в нашей модели силу динеина, centrosoma смещалась к середине клеточного края и затем либо дрейфовала вдоль него, либо двигалась к одному из четырёх углов клетки и оставалась там (рис 30Д). В виртуальных веерообразных клетках centrosoma были стабилизированы в точке схождения тока актина (рис 31Б). Затем мы изучили, что произойдёт, если распределение микротрубочек в клетках станет ассиметричным. Для этого было удвоено количество микротрубочек, ориентированных по направлению к округлому краю клетки (что соответствует наблюдаемой в реальности ситуации в подвижных клетках, в которых наш округлый край соответствует лидирующему краю клетки). Centrosoma сместилась назад (рис 31В, что соответствует наблюдениям The'gu с соавторами), в соответствии с доминирующим эффектом ретроградного тока актина поблизости от закруглённого края. Моделирование продемонстрировало, что наличие дополнительных динеинов, аккумулированных на ведущем крае клетки (рис 31Г), centrosoma смещается к этому краю, как это наблюдалось в действительности в случае движущихся эпителиальных клеток (Dujardin et al., 2003).

§ 21. СПОСОБЕН ЛИ СВЯЗАННЫЙ С МИКРОТРУБОЧКАМИ КИНЕЗИН ГЕНЕРИРОВАТЬ ДЕЦЕНТРИРУЮЩУЮ СИЛУ?

Теоретически существует возможность иной природы возникновения сил децентрирования – это толкающее воздействие плюс-концевых кинезиновых моторов вдоль микротрубочек (рис 24Е). Сравнивая между собой рис 24В и 24Е, легко заметить, что толкание микротрубочек кинезином прямо противоположно подтягиванию их динеином; и кроме того, силы динеина и кинезина будут сходны по величине. Таким образом, толкание кинезином микротрубочек в принципе способно продуцировать децентрирующую силу. Поскольку суммарная сила всех кинезинов в контрольных клетках меньше, чем суммарная сила динеинов, кинезин-зависимый механизм не противоречит нашей модели и согласуется со всеми экспериментальными результатами. Однако, такой механизм должен отвечать двум обязательным условиям.

Во-первых, кинезиновые моторы должны быть заякорены на стационарных структурах в клетке, что вполне возможно: было описано привязывание кинезина к промежуточным филаментам (Helfand et al., 2004); и вдобавок, он взаимодействует с миозином V, который, в свою очередь, взаимодействует с актиновыми филаментами (Huang et al., 1999). Во-вторых, экспериментальные результаты №4 (см. выше) демонстрируют нам, что децентрирующая сила выключается в том случае, если микротрубочки стабилизированы таксолом. Однако, кинезин способен толкать стабилизированные микротрубочки. В соответствии с этим возражением, по-

видимому, верной является гипотеза, что в качестве децентрирующего фактора выступают динамичные концы микротрубочек, нежели воздействие на микротрубочки кинезина. Существует, однако, теоретическая возможность того, что обработанные таксолом микротрубочки обладают настолько большой механической жёсткостью, что кинезин просто не способен сдвинуть такую звезду микротрубочек из центра. Возможно, дальнейшие работы, связанные с ингибированием кинезина, внесут окончательную ясность в этот вопрос.

§ 22. РЕЗЮМЕ

В первой части работы, используя полученные экспериментальные данные и математическое моделирование, нам удалось ответить на вопрос о механизмах центрирования centrosом в интерфазных клетках животных. Одним из наиболее важных результатов наших исследований является установление того факта, что вдобавок к сильной тянущей силе динеина и более слабой миозин-зависимой силе актинового тока, существуют ещё децентрирующие толкающие силы, генерируемые по всей клетке растущими микротрубочками. Наиболее вероятным источником происхождения такой силы является сила полимеризации растущих плюс-концов микротрубочек, упирающихся в некие препятствия или органеллы, разбросанные по всей клетке и прикреплённые к цитоскелетному скеффолду (Bjerknes, 1986). Другая теоретическая возможность заключается в том, что микротрубочки взаимодействуют по всей длине с кинезиновыми моторами, заякоренными актиновой сетью (Brito et al., 2005), хотя это представляется менее вероятным, поскольку никак не подтверждается экспериментальными данными. Кроме того, наши экспериментальные данные и результаты нашего моделирования служат аргументом в пользу существования динеинового сервомеханизма (т.е. механизма, способного к саморегуляции). Этот механизм предполагает, что динеины заякорены по всей клетке и тянут за микротрубочки вдоль всей их длины – и не согласуются с предположением о том, что динеины в основном тянут только за плюс-концы микротрубочек на краю клетки.

Откалибровав модель при помощи множества проведённых нами экспериментально измерений, мы задали параметры модели таким образом, чтобы можно было предсказывать порядок величин характеристичных сил. А именно, мы предсказали, что примерно 100 динамичных микротрубочек ответственны за среднюю толкающую силу в ~ 1 пиконьютон в расчёте на микротрубочку. Эта децентрирующая сила успешно преодолевается генерируемой динеином тянущей силой. Тянущая сила составляет порядка одного пиконьютона на каждые 30 мкм длины микротрубочки, и она суммируется к тому же с центростремительной силой, вызванной одной-двумя молекулярными связями между каждой микротрубочкой и

движущимися потоком частиц актина. Мы также смогли рассчитать необходимую плотность динеина в 1-2 мотора на каждый квадратный микрон. Затем мы пришли к оценке, что величина мобильности centrosомы и звезды микротрубочек должна составлять несколько сотен мкм/(мин×пиконьютонов). Мы рассчитали, что для того, чтобы толкнуть звезду микротрубочек с характерной скоростью нескольких микрон в минуту, необходима сила порядка 100 пиконьютонов, что полностью соответствует данным Reinsh and Goñczy (1998).

Полученные данные говорят о том, что центрирующий механизм вполне надёжен: для того, чтобы centrosома оставалась в клеточном центре, необходимо лишь, чтобы суммарная сила динеина превышала скромный порог в ~ 1 тянущий мотор на микротрубочку. Эксперименты и последующее моделирование локального воздействия нокодазолом показывают нам, что значительные изменения динамики микротрубочек приводят к относительно небольшим смещениям centrosомы. Причина этого кроется в противоположном действии, оказываемом динеином и миозин-зависимым током на каждую индивидуальную микротрубочку: в то время как динеин тянет микротрубочку из центра, актиновый ток тащит её в центр, и поэтому изменение распределения микротрубочек ведёт к изменениям обеих противоположных сил, частично уничтожающих одна другую. Ещё одним свидетельством надёжности такого центрирующего механизма является то, что он предсказывает расположение centrosомы вблизи центра клетки в квадратных и вероподобных клетках (рис 30 и 31) независимо от анизотропии микротрубочек и изменений всей системы. Изучение параметров модели показывает, что механизм становится даже более надёжным в случае с продолговатыми клетками (рис 30) – и на практике мы обычно видим, что все клетки имеют слегка вытянутую форму. Наконец, увеличение размеров клетки делает механизм центрирования менее устойчивым (рис 30), поскольку меньшее количество микротрубочек достигает клеточных краёв, в соответствии с выводами Wuhr et al. (2009). Однако пропорциональное увеличение длины микротрубочек будет способствовать восстановлению эффективности центрирования.

Механизм центрирования не только надёжен, но и универсален: динеин, тянущий в одиночку, способен преодолеть дестабилизирующее толкание концов микротрубочек и стабилизировать положение centrosомы в центре клетки. Таким образом, на первый взгляд, присутствие миозин-зависимой силы тока актина выглядит даже излишним для процесса центрирования. Однако устойчивая точка равновесия centrosомы расположена между точками схождения центростремительного тока актина и тянущих сил динеина. Следовательно, обеспечение симметрии и гетерогенности системы благодаря наличию двух центрирующих сил (посредством изменения распределения динеина и миозина) может сдвигать centrosому в необходимую позицию (рис 31). В частности, концентрированный на

ведущем крае движущейся клетки динеин может смещать centrosому вперёд (рис 31Г; Dujardin et al., 2003), противодействуя ретроградным усилиям миозина (Grabham et al., 2007).

В этой части нашей работы не обсуждается рассмотренное выше взаимодействие между centrosомой и ядром, к которому она, как правило, тесно прилегает (Robinson et al., 1999), или её взаимодействие с другими элементами цитоскелета (Starr, 2007). Мы экспериментально показали (см. выше), что механизм центрирования не зависит от ядра, поскольку эксперименты, проведённые на цитопластах, продемонстрировали сходное поведение centrosомы. Более того, уже после наших экспериментов было показано, что позиции ядра и centrosомы определяются различными регуляторными путями (Gomes et al., 2005). Вопрос о том, какие именно силы – толкающие или тянущие – позиционируют ядро и каково происхождение этих сил, был успешно разрешён за последнее десятилетие путём комбинирования экспериментальных исследований и моделирования (Kimura and Onami, 2005). Тем не менее, механический эффект от взаимодействия centrosомы с ядром является важным предметом дальнейших исследований в данной области.

Предлагаемая нами модель является минимальной и не учитывает такие факторы как силы, зависящие от их ориентации (Tsou et al., 2003), регуляцию длины микротрубочек (Tolic'-Nørrelykke, 2010), соотношения силы-скорости и принудительного отрывания динеина (Vogel et al., 2009), а также изгибания микротрубочек (Bicek et al., 2009). Существуют и другие процессы позиционирования, успешно работающие в клетке – механизмы, не зависящие от сил (Malikov et al., 2005), а также клеточные контакты, определяющие стабилизацию centrosомы (The'ry et al., 2006). Потенциально все эти факторы могут оказаться не такими уж незначительными; дальнейшие работы в данной области покажут, насколько верными являются все предсказания нашей модели. При создании приведённой здесь модели в 2010 году нами были порекомендованы следующие эксперименты для дальнейшей проверки нашей модели сбалансированных сил:

1) используя нанотехнологии, построить локальные барьеры в цитоплазме, влияющие на толкающую силу микротрубочек, и таким образом сдвинуть centrosому в предсказанном направлении; 2) используя ультрафиолет для того, чтобы локально отменить общее воздействие нокодазола (Hamaguchi and Hiramoto, 1986), разобщить и проанализировать по отдельности на отдельном участке три исследуемые силы;

3) используя лазер для разрезания микротрубочек, разобщить таким образом тянущую и толкающую силы и протестировать на практике зависимость тянущей силы динеина от длины микротрубочки (Vogel et al., 2009).

Последние экспериментальные данные, полученные другими авторами спустя некоторое время после опубликования нашей модели, полностью подтвердили справедливость наших

логических построений. Таким образом, правильность приведённых выше механизмов центрирования можно считать доказанной.

Ниже приводится выносимое на защиту положение, сформулированное на основе результатов, полученных в этой части работы:

Позиционирование centrosомы осуществляется благодаря 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.

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

Основная транспортная система интерфазной клетки животных представлена радиальной «звездой» из микротрубочек, расходящихся из района центросомы (Gould and Borisy, 1990), по которым перемещаются плюс- и минус-концевые моторные белки. Механизмы позиционирования центросомы были подробно рассмотрены в предыдущей части работы. Эта органелла определяет архитектуру всей тубулиновой транспортной сети, поскольку является центром микротрубочковой организации. Интерфазная центросома содержит порядка трёхсот различных белков, и при этом функции многих из них до сих пор не выяснены. Очевидно, что для процессов внутриклеточного транспорта имеют значение те из них, работа которых связана с процессами нуклеации и заякоривания, поскольку это определяет в конечном счёте расположение микротрубочек.

Основными белковыми комплексами, нуклеирующими микротрубочки, считаются кольцевые комплексы γ -тубулина (γ -TuRC), состоящие из нескольких белков и прикрепляющиеся к центросоме (Moritz et al, 1995; Dictenberg and Zimmerman, 1998). Нельзя исключить, что наряду с γ -TuRC в нуклеации микротрубочек могут участвовать и другие белковые комплексы. В функции удержания микротрубочек участвуют, по меньшей мере, несколько белков – PCM-1 (Dammermann and Merdes, 2002), Cep135 (Uetake et al, 2004), найнеин (Dammermann and Merdes, 2002; Delgehyr et al, 2005), CAP350 и FOP (Yan et al, 2006). Как происходит «переход» микротрубочек от нуклеирующих к удерживающим комплексам, до сих пор неизвестно.

Процессы нуклеации и заякоривания могут регулироваться или на уровне экспрессии каждого участвующего в них белка, или же путём изменения его активности. Последнее может осуществляться посредством обратимого фосфорилирования. С центросомой связано определённое количество протеинкиназ и фосфатаз, однако большинство из них регулирует центросомный цикл, и лишь для нескольких было показано, что они вовлечены в процесс организации микротрубочек. В последних работах было продемонстрировано, что протеинкиназы могут регулировать как нуклеацию микротрубочек, так и их заякоривание на центросоме. Например, связывание фосфо-бета-катенина с центросомой усиливает её нуклеирующую активность (Huang et al, 2007). Протеинкиназа Nek7 регулирует способность нуклеирующих микротрубочки гамма-тубулиновых кольцевых комплексов (γ -TURC) связываться с центросомой (Kim et al, 2007). Это связывание контролируется путём фосфорилирования белка GCP-WD (Luders et al, 2006). Протеинкиназы требуются также для накопления γ -TURC в центросоме в начале митоза (Abe et al, 2006). Протеинкиназа GSK-3 β

контролирует заякоривание и кэппирование микротрубочек посредством активирования динеин-зависимой доставки заякоривающего микротрубочки белка найнеина в центросому (Fumoto et al., 2006). Киназа Aurora A регулирует DTACC-Msps-опосредованное заякоривание минус-концов микротрубочек на митотических центросомах (Barros et al., 2005). Поэтому можно ожидать, что в организацию системы микротрубочек вовлечены и другие киназы.

Ранее в нашей лаборатории была идентифицирована киназа LOSK (от Long Ste20-like Kinase), член группы киназ герминального центра – как белок, связанный с микротрубочками и центросомой (Zinovkina et al., 1997, 1998; Nadezhdina et al., 2001). Исходя из этого, мы предположили, что она может принимать участие в регулировании функций центросомы и/или в организации микротрубочек. LOSK была также описана другими авторами под именем SLK, от Ste20-Like Kinas (Itoh et al., 1997; Sabourin and Rudnicki, 1999; Yamada et al., 2000). LOSK/SLK (далее везде LOSK) повсеместно экспрессируется в клетках млекопитающих (Itoh et al., 1997; Zinovkina et al., 1998; Sabourin and Rudnicki, 1999; Storbeck et al., 2004), и её активность сохраняется на постоянном уровне на протяжении всего клеточного цикла, слегка увеличиваясь во время митоза (Ellinger-Ziegelbauer et al., 2000; O'Reilly et al., 2005). Как down-, так и up- регуляция этого минорного белка приводит к апоптозу клетки (Sabourin et al., 2000; O'Reilly et al., 2005). Это свидетельствует о важности клеточных функций, регулируемых LOSK. Нам удалось исследовать часть из них.

§ 1. ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КИНАЗЫ LOSK *IN VITRO*

Как полноразмерная эндогенная LOSK, так и её рекомбинантный каталитический домен, экспрессированный в *E. coli*, демонстрируют *in vitro* ярко выраженную каталитическую активность (Sabourin et al., 2000; Wagner et al., 2002; Potekhina et al., 2003). Чтобы изучать функции LOSK, мы создали доминантно-негативный конструктор K63R-ΔT путём внесения мутации K63R в конструктор ΔT. Эта мутация инвариантного лизина в каталитическом киназном домене обычно превращает белок в доминантно-негативный, поскольку он начинает конкурировать с белком дикого типа за связывание с субстратом (Li et al., 1995). K63R-ΔT, слитый с GST, был экспрессирован в *E. coli* и очищен. Такой белок не демонстрировал никакой активности – ни автофосфорилирования, ни фосфорилирования MBP (рис 32Б, колонки 2 и 2'). Более того, добавление уменьшающихся количеств GST-K63R-ΔT градиентно ингибировало фосфорилирование MBP каталитически активным конструктором GST-ΔT (рис 32Б, колонки 3-6 и 3'-6'). Пятикратный избыток мутантной киназы полностью ингибировал её нормальную киназную активность (рис 32Б, колонки 6 и 6').

Кроме того, другой фрагмент LOSK, GST- Δ N Δ T, также утрачивает свою собственную каталитическую активность и частично ингибирует GST- Δ T (рис 32B).

Предполагалось, что С-концевой структурный домен LOSK ингибирует её киназную активность (Sabourin et al., 1999, 2000). Чтобы проверить это предположение, мы исследовали влияние двух центральных фрагментов молекулы (M1f и M2f) и С-концевую часть Ct на активность Δ T в киназной реакции *in vitro*. На активность Δ T не влияли даже большие избытки ни Ct, ни M1f, ни M2f; и эти фрагменты не обладали сайтами фосфорилирования LOSK (рис 32B). Эти данные свидетельствуют о том, что, к сожалению, экспрессия С-концевой части LOSK в клетках не может быть использована в качестве ингибитора её активности.

Тубулин, выделенный из мозга свиней, также не фосфорилировался киназой LOSK *in vitro*.

§ 2. ПОЛНОРАЗМЕРНАЯ LOSK ЧАСТИЧНО СОЛОКАЛИЗУЕТСЯ С МИКРОТРУБОЧКАМИ, А N-КОНЦЕВОЙ ФРАГМЕНТ LOSK ДИФФУЗНО РАСПРЕДЕЛЁН ПО ЦИТОПЛАЗМЕ

В предыдущих работах нашей лаборатории было показано, что протеинкиназа LOSK ассоциирована с микротрубочками и центросомой в культивируемых клетках CHO-K1 и в спермиях рыб (Zinovkina et al., 1997, 1998; Nadezhdina et al., 2001). Это подтверждалось иммунофлуоресцентным окрашиванием, иммуноэлектронной микроскопией и соосаждением с микротрубочками. В данной работе приводится дополнительное свидетельство того, что LOSK связана с микротрубочками – путём экспрессии полноразмерной LOSK, слитой с EGFP, в клетках линий Vero и HeLa. Полноразмерная EGFP-слитая LOSK была распределена по цитоплазме и частично солокализовалась с микротрубочками (рис 33А, белые стрелки). Некоторые микротрубочки, особенно на периферии клетки, утрачивали связь с полноразмерной LOSK (чёрные стрелки на рис 33А).

В трансфицированных клетках фрагменты киназы – активный Δ T, транкированный Δ N Δ T или мутантный K63R- Δ T – были диффузно распределены по цитоплазме (рис 33Б и 34). Мы не наблюдали в трансфицированных клетках каких-либо флуоресцентных фибрилл или похожих на центросому точек. Если клетки обрабатывали даже низкими

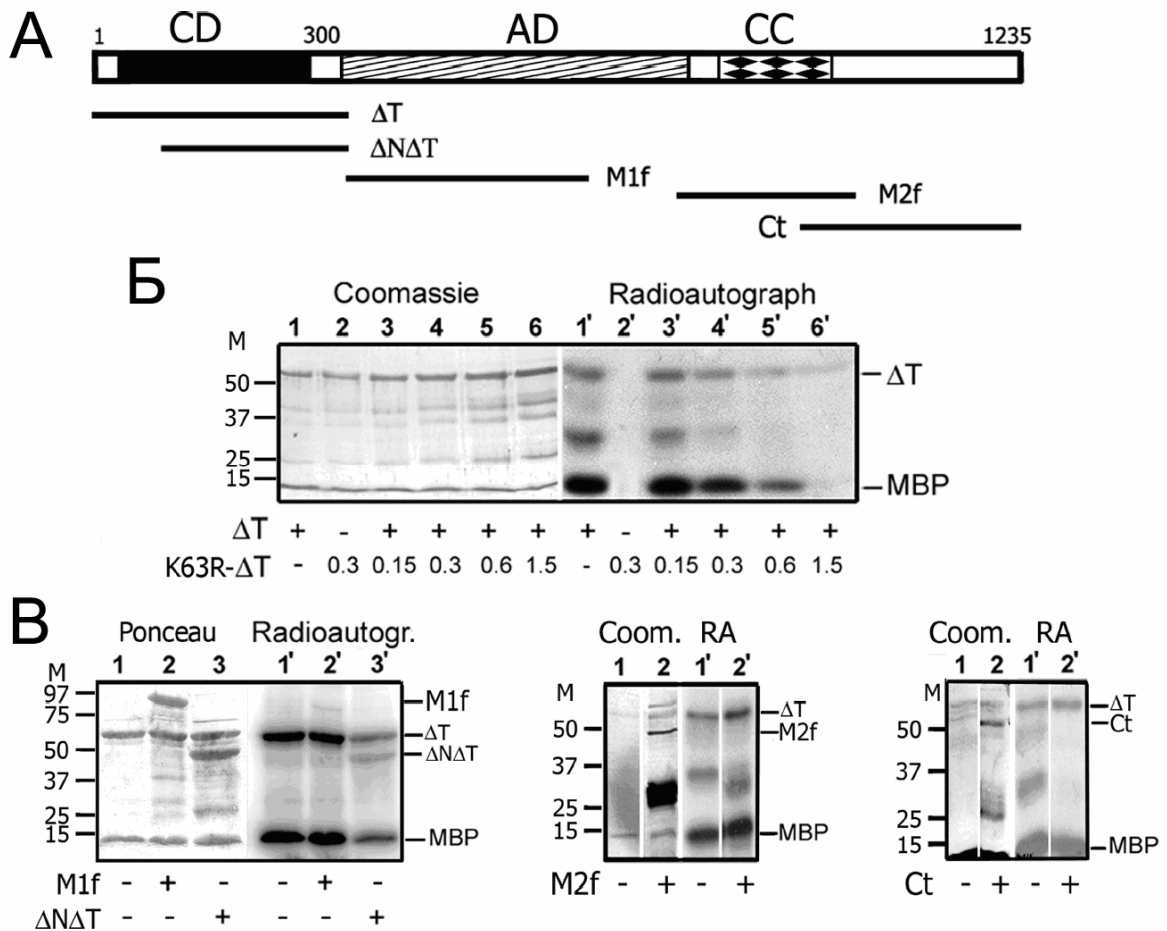


Рисунок 32. Фрагмент ΔT протеинкиназы LOSK обладает *in vitro* каталитической активностью, которая может быть подавлена избытком K63R-ΔT, но не другими фрагментами LOSK.

(А) Структура молекулы LOSK и её фрагментов, использованных в данной работе. Числами обозначены аминокислоты. CD – каталитический домен, AD – кислый центральный домен с неопределённой вторичной структурой, CC – coiled-coil домен.

(Б) Ингибирующее воздействие K63R-ΔT на активность ΔT *in vitro*. Дорожки 1-6 – гель, окрашенный Кумасси, дорожки 1'-6' – радиоавтограф этого же геля. Каждая реакционная смесь содержала 0,5 мкг MBP и 0,3 мкг ΔT, за исключением дорожек 2 и 2', на которых один K63R-ΔT. Дорожки 3-6 и 3'-6', обозначено количество добавленного K63R-ΔT (мкг).

(В) Влияние фрагментов LOSK на активность ΔT *in vitro*. ΔNΔT частично подавляет активность ΔT. M1f, M2f и Ct не оказывают влияния. Обратите внимание на аномальную электрофоретическую подвижность M1f (расчётная молекулярная масса M1f, слитого с GST, составляет 63 кДа). Числами обозначены молекулярные массы маркёров (кДа).

дозами детергента, продукты экспрессии обычно полностью вымывались из клеток. Таким образом, N-концевой домен LOSK не имеет сродства ни к микротрубочкам, ни к центросоме; однако N-концевые фрагменты LOSK, находящиеся в цитоплазме, способны конкурировать с эндогенной LOSK за любые цитоплазматические субстраты.

Содержание ацетилированного тубулина, характерного для стабилизированных микротрубочек, не изменялось существенным образом в клетках Vero, экспрессирующих ΔT

или K63R-ΔT: в клетках, экспрессирующих ΔT, оно увеличивалось на $10 \pm 5\%$ (N=127), а в клетках, экспрессирующих K63R-ΔT – на $10 \pm 7\%$ (N=106) (рис 33). Исходя из этого, можно заключить, что эти фрагменты LOSK не влияют на стабильность микротрубочек. Будучи экспрессированными в клетках, M1f и M2f также диффузно распределяются по цитоплазме, не влияя на микротрубочки, не связываясь с ними и не стабилизируя их. В противоположность этому, в клетках, экспрессирующих C-концевой фрагмент LOSK – Ct – наблюдается увеличение уровня ацетилированного тубулина на $28 \pm 9\%$ (N=57). Микротрубочки, содержащие ацетилированный тубулин, организованы радиально (рис 33). При низких уровнях экспрессии, Ct главным образом локализуется в ядрах, тогда как при увеличении экспрессии он накапливается в цитоплазме и частично связывается с микротрубочками, как и полноразмерная LOSK (рис 33). Мы предположили, что у киназы LOSK сайт связывания с микротрубочками расположен в Ct фрагменте, в пределах аминокислот 944-1235, и что Ct фрагмент способен слегка стабилизировать микротрубочки подобно некоторым «классическим» белкам, связанным с микротрубочками. Интересно, что такая стабилизация не влияет на образование радиальной системы микротрубочек.

§ 3. ОВЕРЭКСПРЕССИЯ ДОМИНАНТНО-НЕГАТИВНОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА LOSK ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ РАДИАЛЬНОСТИ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКАХ ЛИНИИ VERO.

Поскольку было показано, что эндогенная киназа LOSK связывается с микротрубочками, мы предположили, что посредством своей киназной активности она может как-то влиять на организацию микротрубочек. Мы сравнили строение системы микротрубочек в клетках Vero, экспрессирующих доминантно-негативный K63R-ΔT (который ингибирует активность LOSK) и в клетках, экспрессирующих активный ΔT (повышенная активность LOSK) или неактивный ΔNΔT (частично ингибирует активность LOSK).

Можем ли мы быть уверены, что путём экспрессии K63R-ΔT в культивируемых клетках достигается ингибирующий эффект в отношении активности киназы LOSK? Количество рекомбинантных фрагментов LOSK в клеточных лизатах было как минимум втрое выше, чем уровень эндогенной 210-кДа LOSK (рис 34A). Поскольку в наших экспериментах экспрессировали белок менее 20% от общего числа клеток, большинство трансфицированных клеток содержало примерно 15-кратный избыток ингибирующего фрагмента. Значит, действительно можно ожидать, что в клетках, экспрессирующих K63R-ΔT, активность клеточной LOSK будет полностью подавлена.

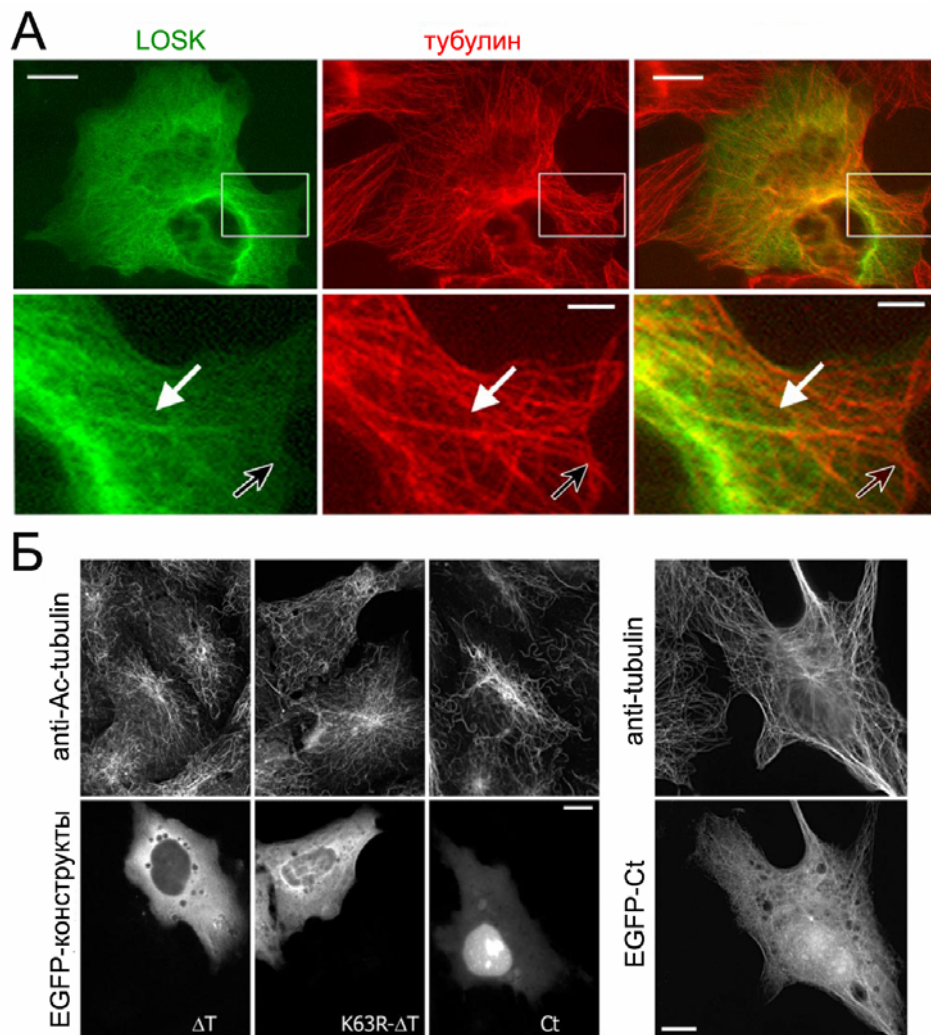


Рисунок 33. Протеинкиназа LOSK взаимодействует с клеточными микротрубочками.

(А) EGFP-слитая полноразмерная LOSK, экспрессирующаяся в клетках HeLa, частично распределяется по микротрубочкам. Верхние панели, общий вид клеток; нижние панели – более сильное увеличение выделенных областей. Белыми стрелками обозначены микротрубочки, с которыми ассоциирована LOSK. Чёрными стрелками обозначены свободные от LOSK микротрубочки.

(Б) Ацетилированный тубулин, являющийся маркёром стабилизированных микротрубочек, не накапливается в клетках, экспрессирующих K63R-ΔT или ΔT. Его содержание слегка возрастает в клетках, экспрессирующих Ct. При высоких уровнях экспрессии, фрагмент Ct частично солокализуется с микротрубочками. Масштабная линейка, 10 мкм (2 мкм в нижних панелях А).

Количественный анализ полученных данных продемонстрировал, что ~80% нетрансфицированных клеток Vero обладают радиальной системой микротрубочек с чётко выраженными центрами организации (рис 34В). Экспрессия ΔT вызывает небольшое снижение числа клеток с радиальными микротрубочками; ΔNΔT имеет более выраженный

эффект, в то время как в большинстве клеток, экспрессирующих K63R-ΔT, микротрубочки располагались хаотично (рис 34 Б и В). Этот эффект не зависел от плотности монослоя. Аналогичные результаты были получены также с использованием конструкта DsRed-K63RΔT. Мы измерили интенсивность флуоресценции тубулина вдоль линейных отрезков поперёк клеток (показаны на рисунках). Эти отрезки проведены через наиболее яркие участки цитоплазмы. Если система микротрубочек радиальна, график должен иметь характерную форму колокольчика. В клетках с хаотичным расположением микротрубочек график становился более плоским, с многочисленными нерегулярными пиками (рис 34 Б, внизу), что говорит о случайном распределении интенсивности флуоресценции, то есть микротрубочек.

Клетки, экспрессирующие K63RΔT, становятся неровными по краям и приобретают протрузии, не характерные для интактных клеток Vero. Однако экспрессия как активного киназного домена, так и неактивного мутанта, не оказывает заметного влияния на актиновые стресс-фибриллы. Процентное содержание клеток с хорошо развитыми стресс-фибриллами и с утратившими их, не менялось при экспрессии как ΔT, так и K63RΔT. Это согласуется с полученными ранее данными (Sabourin et al, 2000) о том, что С-концевой домен LOSK влияет на актиновый цитоскелет, а N-концевой – нет. Сходным образом, экспрессия K63RΔT не влияет на морфологию фокальных контактов, которые мы визуализировали путём иммунофлуоресцентного окрашивания на паксиллин. Всё это говорит о специфическом влиянии активности киназы LOSK на систему микротрубочек.

В трансфицированных клетках теоретически может оставаться остаточная активность LOSK. Чтобы проверить такую возможность, мы воздействовали на клетки ооадаевой кислотой. Это не повлияло на радиальные микротрубочки в контрольных клетках, а в клетках с экспрессией K63RΔT стала видна крошечная звезда из нескольких микротрубочек посреди хаотичных периферических микротрубочек (рис 34 Г). Возможно, это частичное спасение радиальности системы микротрубочек отражает остаточную активность LOSK или каких-то минорных киназ, которые фосфорилируют тот же субстрат по тому же сайту.

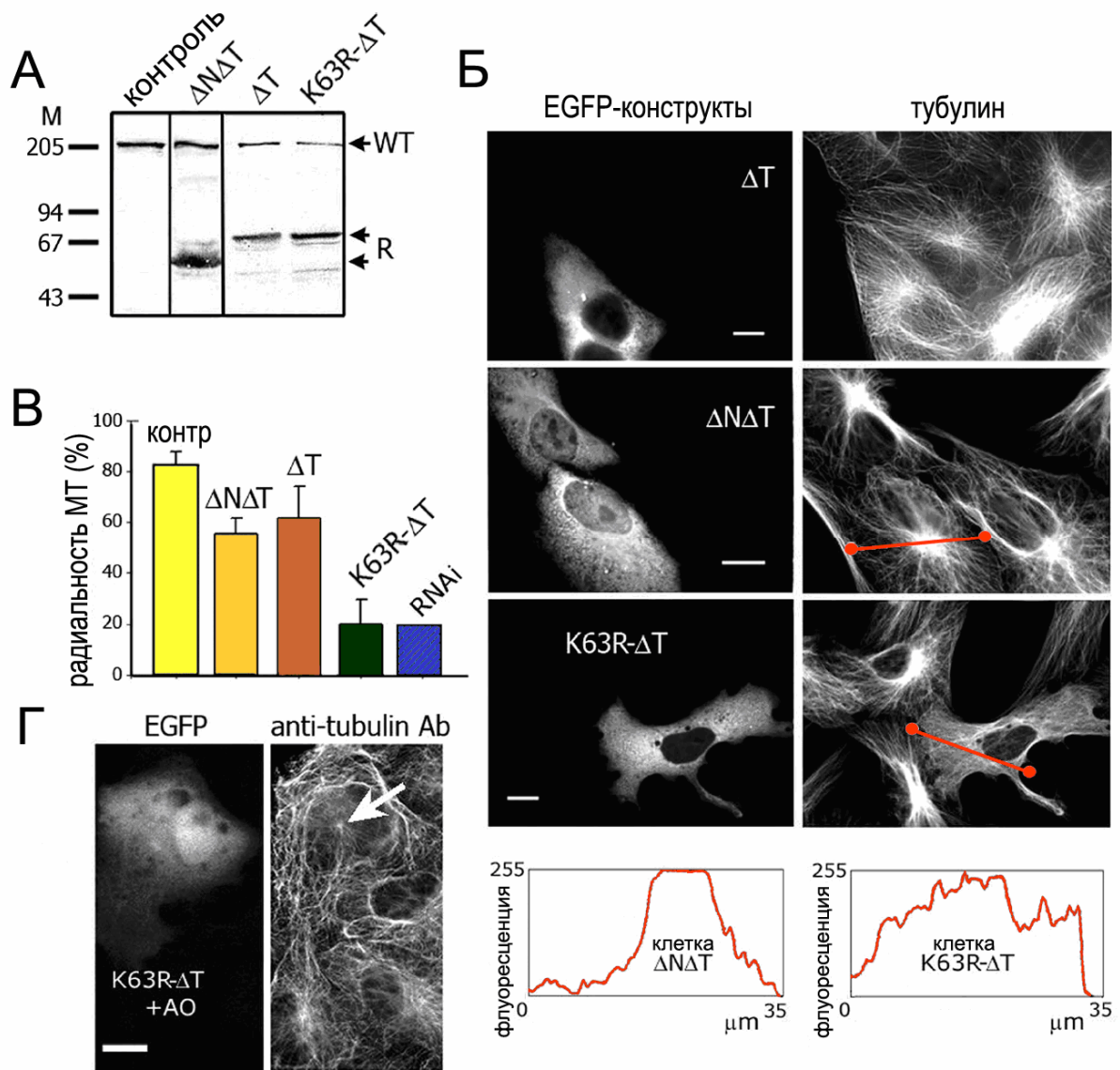


Рисунок 34. Экспрессия доминантно-негативного конструкта K63R- ΔT в клетках Vero влияет на радиальность системы микротрубочек.

(А) Иммуноблоттинг клеточных гомогенатов с антителами к LOSK polK1A. Дорожка 1 – нетрансфицированные клетки; дорожки 2-4 – клетки, трансфицированные ΔT (2), K63R- ΔT (3) и $\Delta N\Delta T$ (4). Числами обозначены маркёры молекулярных масс (кДа). WT – клеточная LOSK дикого типа; R – рекомбинантные фрагменты LOSK.

(Б) Клетки линии Vero, экспрессирующие активную ΔT и неактивную $\Delta N\Delta T$, демонстрируют нативную систему микротрубочек, в то время как клетки, экспрессирующие K63R- ΔT обладают дезорганизованной системой микротрубочек. Внизу приведены сканы интенсивности флуоресценции, проведённые вдоль линий, обозначенных на снимках клеток.

(В) Частоты встречаемости клеток, обладающих выраженной радиальностью системы микротрубочек. Для каждого столбца было подсчитано по 50 клеток в каждом из трёх независимых экспериментов. Ошибка представляет собой SD.

(Г) Видна звезда микротрубочек (стрелка) в экспрессирующих K63R- ΔT клетках после обработки их оадаевой кислотой. Масштабная линейка, 10 мкм.

§ 4. ДЕПЛЕЦИЯ LOSK ПОСРЕДСТВОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ТАКЖЕ НАРУШАЕТ РАДИАЛЬНОСТЬ МИКРОТРУБОЧЕК

Чтобы подтвердить, что ингибирующее влияние доминантно-негативной LOSK на радиальность системы микротрубочек является специфическим, мы удалили LOSK из клеток посредством РНК-интерференции. Трансфицированные клетки, экспрессирующие shRNA, определяли по флуоресценции EGFP; количество LOSK в клетках мы оценивали путём иммунофлуоресцентного окрашивания, а также путём иммуноблоттинга после отсортировки клеток с экспрессией EGFP посредством проточной цитофлуориметрии. Мы обнаружили, что в случае конструкта pG-Shin2-4.1, на 7й-8й день после трансфекции как клеток Vero, так и клеток HeLa, интенсивность окрашивания на LOSK радикальным образом снижается, что является индикатором нокдауна LOSK (рис 35А). На 9-10й день после трансфекции все трансфицированные клетки погибают. Последний результат подтверждает наблюдения О'Рейли с соавторами (O'Reilly et al, 2005) о том, что LOSK необходима для выживания клеток. Ни пустой вектор, ни альтернативный конструкт pG-Shin2-6.1 не влияли ни на жизнеспособность клеток, ни на уровень содержания LOSK. Данные иммуноблоттинга (рис 35Б) говорят о том, что содержание LOSK падает примерно до 5% от исходного уровня.

Мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание микротрубочек в клетках Vero на 8й день после трансфекции pG-Shin2-4.1 и обнаружили, что радиальная система микротрубочек в этих клетках нарушена, как и в клетках, экспрессировавших K63R-ΔT (рис 34В и 35А). Микротрубочки в них располагались хаотично, без видимых центров организации, и кривая интенсивности флуоресценции тубулина, снятая с пересекающей клетку линии, была практически горизонтальной (рис 35А).

Экспрессия полноразмерной LOSK, K63R-ΔT или ΔT, равно как деплеция LOSK посредством RNAi является фатальной для клеток в течение 1-2 суток. Это делает затруднительным постановку эксперимента по спасению клеток с нокдауном LOSK. Кривые, отражающие временную динамику гибели клеток с экспрессией ΔT или K63R-ΔT, демонстрируют ~40% смертность спустя сутки после трансфекции. Интересно, что хотя экспрессирующие ΔT клетки погибают, строение системы их микротрубочек до конца остаётся нормальным. Таким образом, нарушение системы микротрубочек не является следствием клеточной гибели, вызванной ингибированием LOSK. Для адекватности наших подсчётов мы не учитывали в них перестройки системы микротрубочек в клетках с различными признаками гибели – конденсированными или фрагментированными ядрами.

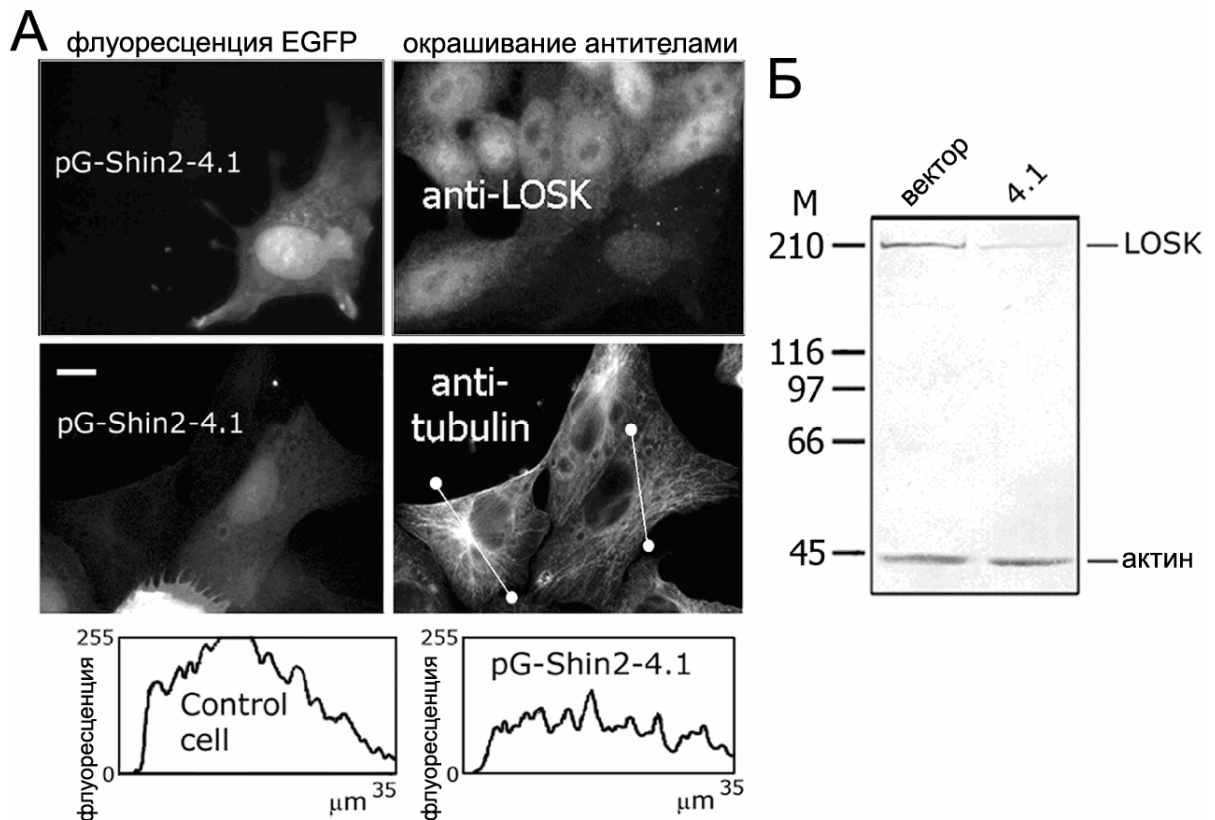


Рисунок 35. Деплеция *LOSK* в клетках посредством *RNAi* влияет на радиальность системы микротрубочек.

(А) Иммунофлуоресцентное окрашивание *LOSK* (вверху справа) и микротрубочек (справа в середине) в клетках на восьмой день после трансфекции *pG-Shin2-4.1*. Внизу справа приведены сканы интенсивности флуоресценции, проведённые вдоль указанных на снимках линий. Масштабная линейка, 10 мкм.

(Б) Иммуноблоттинг *LOSK* и актина в клетках, трансфицированных либо пустым вектором, либо *pG-Shin2-4.1* и отобранных посредством *FACS* на восьмой день после трансфекции. Обозначены молекулярные массы маркёров (кДа).

§ 5. ДОМИНАНТНО-НЕГАТИВНЫЙ КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ДОМЕН *LOSK* НАРУШАЕТ РАДИАЛЬНОСТЬ МИКРОТРУБОЧЕК В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ КЛЕТОК

Киназа *LOSK* является высококонсервативным белком, особенно в области своего каталитического домена (Potekhina et al., 2003). Она была обнаружена во всех исследованных клетках и тканях. В нашей работе мы использовали фибробластоподобные или эпителиоподобные клетки различных линий, выделенных исходно из органов человека или других млекопитающих. Наиболее подходящими клетками в итоге оказались Vero благодаря своей отчётливо выраженной радиальной системе микротрубочек и высокому уровню экспрессии K63R-ΔT. Клетки CHO-K1 (фибробластоподобные клетки из яичника китайского

хомячка) также имели отчётливо радиальную систему микротрубочек. Экспрессия K63R-ΔT приводила к хаотизации микротрубочек и в клетках CHO-K1 (рис 36). 95% контрольных клеток CHO-K1 содержали звезду микротрубочек, отходящих от centrosомы. То же самое наблюдали в 94% клеток, экспрессирующих ΔT, в то время как лишь у 57% клеток, трансфицированных K63R-ΔT система микротрубочек оставалась радиальной.

Микротрубочки в контрольных интерфазных клетках HeLa (карцинома шейки матки человека) изначально расположены нерадиально, и экспрессия как ΔT, так и K63R-ΔT не вызывает каких-либо изменений в строении микротрубочек (Рис 36). Более того, интерфазные centrosомы клеток HeLa даже в экспериментах по восстановлению микротрубочек после разборки не формировали вокруг себя звёзд микротрубочек, из чего следует, что они изначально были неактивными (рис 36).

В большинстве трансфицированных клеток CV-1 (ещё одна клеточная линия, выделенная из почки зелёной мартышки) экспрессия фрагментов LOSK находилась на очень низком уровне. Однако в клетках, где экспрессия K63R-ΔT была на высоком уровне, также наблюдали хаотизацию микротрубочек (рис 36). Таким образом, протеинкиназа LOSK регулирует радиальность организации системы микротрубочек в различных типах культивируемых клеток млекопитающих.

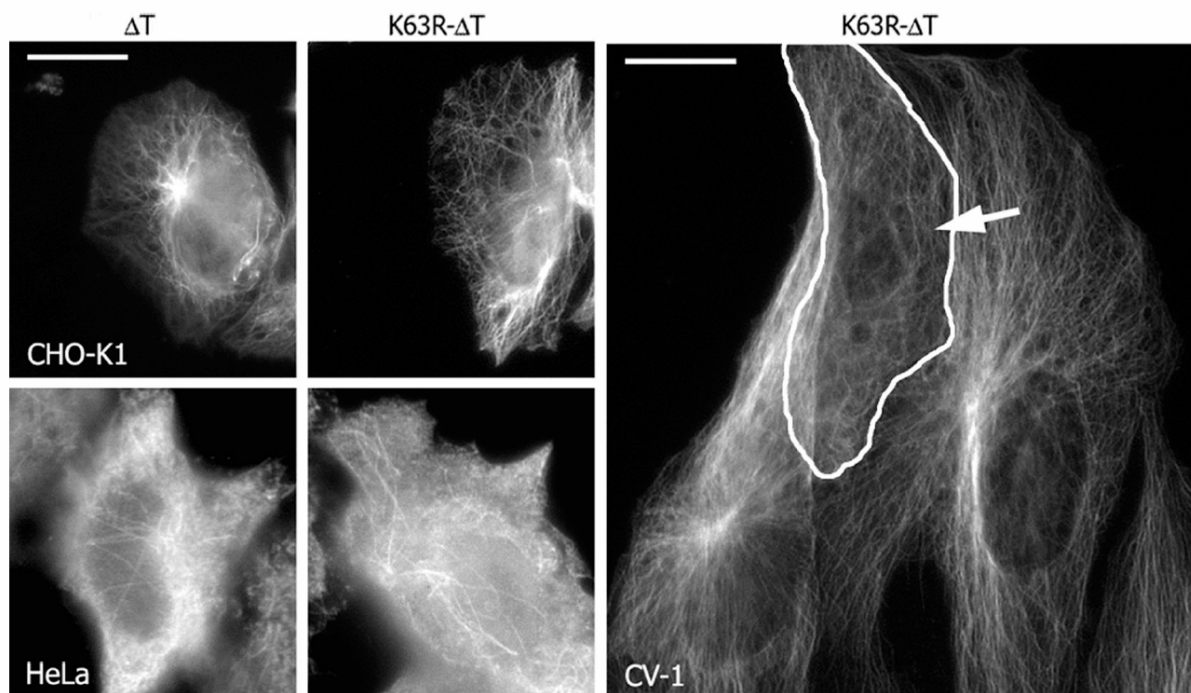


Рисунок 36. Экспрессия K63R-ΔT нарушает радиальное расположение микротрубочек в клетках CHO-K1 и CV-1, но не влияет на систему микротрубочек в клетках HeLa.

Трансфицированная клетка CV-1 обведена и обозначена стрелкой. Клетки CHO-K1 и HeLa были охлаждены на льду и затем согреты в течение 15 минут. Клетки CV-1 всё время находились при +37°C. Масштабная линейка, 10 мкм.

§ 6. ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ LOSK НЕ ВЛИЯЕТ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ ЦЕНТРОСОМЫ И НУКЛЕАЦИЮ НА НЕЙ МИКРОТРУБОЧЕК, НО НАРУШАЕТ ПРОЦЕСС ЗАЯКОРИВАНИЯ

Как упоминалось выше, образование радиальной звезды микротрубочек зависит главным образом от активности centrosомы. Мы проверили влияние K63R-ΔT на способность centrosом нуклеировать и заякоривать микротрубочки как *in vivo*, так и *in vitro*. Эксперименты по восстановлению микротрубочек были поставлены, как это описано в разделе «Материалы и методы». Как в контрольных, так и в экспрессирующих K63R-ΔT клетках Vero спустя две минуты после начала отмывки нокодазола формировались одиночные звёздочки из коротких микротрубочек (рис 37А). Эти звёздочки росли в размерах и микротрубочки достигали края клеток к 4-5й минуте как в контрольных, так и в трансфицированных клетках (рис 37А). Однако уже 6 минут спустя после отмывки нокодазола микротрубочки в трансфицированных клетках становились хаотичными, в то время как в контрольных клетках они продолжали сохранять радиальную организацию (рис 37А). Сходные результаты были получены на клетках с деплецией LOSK. Из этих результатов следует, что в клетках с подавленной активностью LOSK centrosомы не способны заякоривать микротрубочки, хотя их нуклеирующая микротрубочки активность остаётся интактной.

Кроме этого, мы исследовали активность centrosом в трансфицированных клетках в системе *in vitro*. В наших предварительных экспериментах мы показали, что LOSK-ΔT и её мутантный вариант полностью вымывались из клеток после обработки детергентом Triton-X100, и таким образом трансфицированные клетки после этого невозможно было отличить от контрольных. Поэтому мы одновременно экспрессировали в клетках фрагменты LOSK и EGFP-слитого ламина В, белка ядерной оболочки, устойчивого к воздействию Triton-X100 на клетки. Мы микроинъектировали в клетки смесь ДНК pEGFP-LamB с ΔT либо с K63R-ΔT. Экспрессия pEGFP-LamB никак не влияла при этом на воздействие фрагментов LOSK на систему микротрубочек. Centrosомы клеток, экспрессировавших pEGFP-LamB и K63R-ΔT, после обработки нокодазолом и последующей пермеабилзации Triton-X100, успешно индуцировали полимеризацию очищенного тубулина в системе *in vitro* и также организовывали вновь образованные микротрубочки в форме звезды (рис 37Б). При этом размер этих звёздочек был таким же, как и у контрольных клеток (рис 37Б). Эти данные подтверждают наши предыдущие результаты о том, что способность centrosомы нуклеировать микротрубочки не нарушается при ингибировании LOSK.

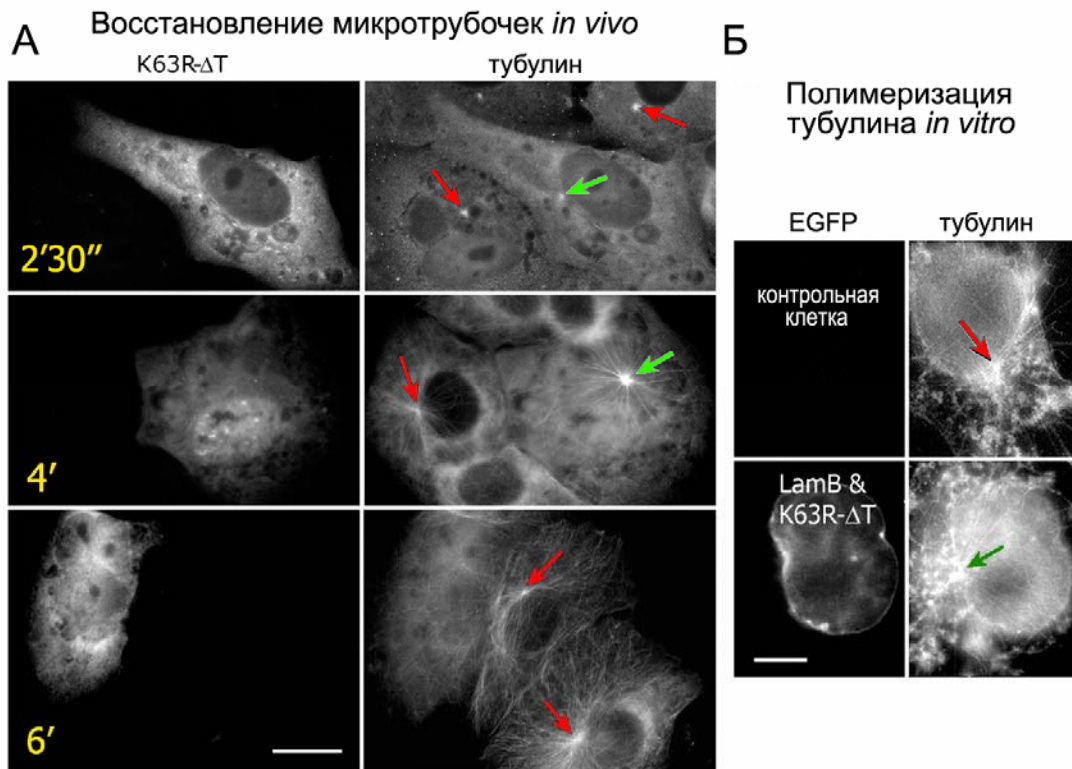


Рисунок 37. Экспрессия K63R-ΔT в клетках линии Vero подавляет заякоривание микротрубочек на центросоме, но не подавляет их нуклеацию.

(А) Клетки Vero обрабатывали нокадазолом в течение 2 часов и затем отмывали в течение времени, обозначенного на снимках. Белыми стрелками указаны звёздочки микротрубочек в контрольных клетках, чёрными стрелками – в клетках, экспрессирующих K63R-ΔT.

(Б) Клетки линии Vero, экспрессирующие EGFP-lamin B и K63R-ΔT, были обработаны нокадазолом, пермеабелизованы Triton-X100 и затем инкубированы при 37°C с очищенным тубулином. Видно, что микротрубочки образуют звезду вокруг центросомы как в клетках с экспрессией, так и в контрольных. Масштабная линейка 10 мкм.

Чтобы установить причину столь резкого снижения способности центросом заякоривать микротрубочки, мы изучили содержание в центросомах трансфицированных клеток основных белков, отвечающих за поддержание их структурной целостности и за организацию микротрубочек: γ -тубулина, перичентрина, найнеина и субъединиц динактина – p150^{Glued} и динамитина. Клетки, экспрессирующие K63R-ΔT, имели на центросомах то же количество найнеина, что и контрольные клетки; а количество γ -тубулина и перичентрина уменьшалось на 20% как в клетках, экспрессирующих ΔT, так и в клетках, экспрессирующих K63R-ΔT (рис 38, А-В). Таким образом, неспособность центросом заякоривать и кэппировать микротрубочки в клетках с экспрессией K63R-ΔT не зависит от количества данных центросомных белков. Мы, однако, обнаружили, что в клетках с экспрессией K63R-ΔT на центросомах было меньше динактина – как p150^{Glued}, так и динамитина (рис 38, А-В). Экспрессия активной киназы ΔT вызывало увеличение содержания на центросоме p150^{Glued}

(рис 38в). Тем не менее, иммунофлуоресцентное окрашивание выявило, что в клетках, экспрессирующих K63R-ΔT, «кометы» p150^{Glued} на плюс-концах микротрубочек не изменялись (рис 38в). Чтобы оценить суммарное содержание динактина в клетках с экспрессией K63R-ΔT, мы провели иммуноблоттинг клеток HeLa, эффективность трансфекции которых приближалась к 100%. Ни количество p150^{Glued}, ни количество динамитина не уменьшались после ингибирования LOSK (рис 38г). Наконец, мы одновременно экспрессировали в клетках Vero EGFP-p150^{Glued} и DsRed-K63R-ΔT и наблюдали характерные «кометы», которые ничем не отличались в контрольных и экспрессирующих DsRed-K63R-ΔT клетках (рис 38д).

В принципе, доминантно-негативная форма киназы способна вызывать при сверхэкспрессии некие неспецифические эффекты в клетках. Чтобы подтвердить специфичность её влияния на centrosomal динактин, мы изучили содержание динактина в трансфицированных pG-Shin2-4.1 клетках с деплецией LOSK. Мы обнаружили, что деплеция LOSK коррелирует с заметным снижением содержания обеих субъединиц динактина (как p150^{Glued}, так и динамитина) на centrosome (рис 38 е,ж). Чтобы удостовериться, что наблюдаемый объект действительно является centrosomой, мы проводили двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к γ-тубулину и к субъединицам динактинового комплекса. После деплеции LOSK отношение уровня флуоресценции γ-тубулина к уровню флуоресценции динамитина значительно возросло (рис 38 ж). При этом «кометы» динактина в цитоплазме клеток оставались неизменными.

Таким образом, киназа LOSK способна регулировать внутриклеточное распределение динактина, дестабилизируя его связывание с centrosomой. Поскольку динактин обеспечивает также структурную целостность аппарата Гольджи и его внутриклеточные перемещения, мы решили исследовать влияние ингибирования LOSK на аппарат Гольджи.

§ 7. ИНГИБИРОВАНИЕ LOSK НАРУШАЕТ ПОЛЯРИЗАЦИЮ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ НА КРАЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАНЫ МОНОСЛОЯ

Мы провели окрашивание клеток Vero антителами к маркерному белку аппарата Гольджи маннозидазе II и обнаружили, что степень компактизации аппарата Гольджи никак не менялась в клетках, экспрессирующих как ΔT, так и K63RΔT (рис 39). В то же время в клетках Vero, экспрессирующих ингибирующий динеин/динактин фрагмент белка p150^{Glued} – CC1, аппарат Гольджи был диспергирован (см. §3 этой главы). Эти данные свидетельствуют о том, что изменения активности LOSK не оказывают существенного влияния на связанный с

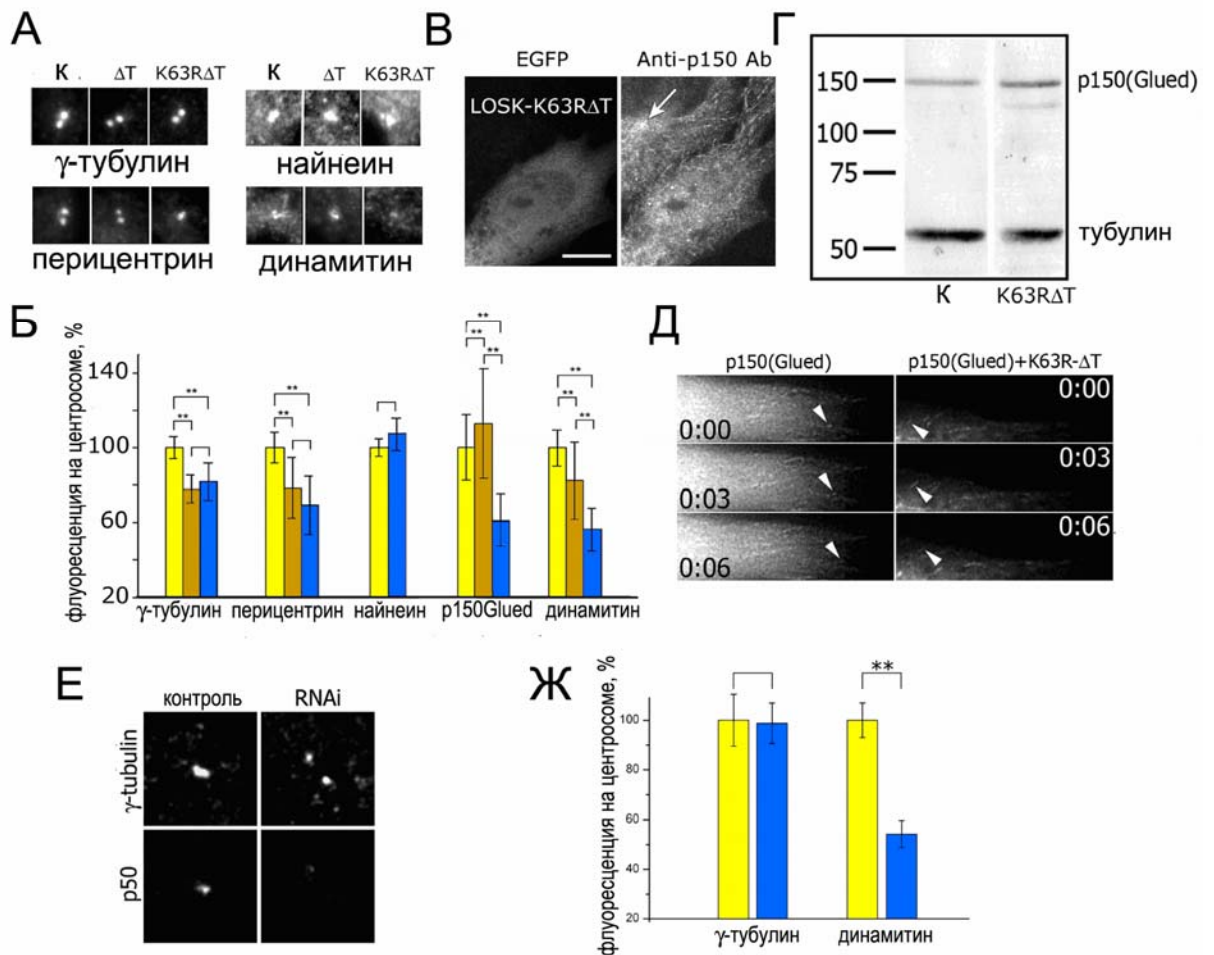


Рисунок 38. Влияние LOSK на содержание основных белков центросомы: уменьшение уровня динактина как при ингибировании, так и при деплеции LOSK.

(А) Снимки типичных центросом (сравнение средних числовых значений приведено на части В этой иллюстрации), окрашенных антителами к белкам, указанным внизу панелей. Соп – контрольные клетки.

(Б) Гистограмма интенсивности флуоресценции окрашенных антителами центросом. Для каждой точки было измерено от 30 до 50 центросом. Различия обозначены как * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$. Белым обозначены контрольные клетки, светло-серым ΔT, и темно-серым K63R-ΔT.

(В) Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, экспрессирующих K63R-ΔT, антителами к p150^{Glued}. Стрелка указывает на центросому в контрольной (нетрансфицированной) клетке. Обратите внимание на «кометы» p150^{Glued} на концах микротрубочек. Масштабная линейка 10 мкм.

(Г) Иммуноблоттинг контрольных клеток (Соп) и клеток, экспрессирующих K63R-ΔT, обработанный антителами к p150^{Glued} и тубулину. Маркеры молекулярных масс приведены в кДа.

(Д) Кадры видеосъемки живых клеток, экспрессирующих либо один EGFP-p150^{Glued}, либо смесь DsRed-Mопотер-K63R-ΔT и EGFP-p150^{Glued}. Стрелки указывают на «кометы», числа обозначают секунды.

(Е) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание динамитина (p50) и γ-тубулина в контрольных и деплецированных по LOSK при помощи RNAi клетках.

(Ж) Гистограмма интенсивности флуоресценции окрашенных антителами центросом. Для каждой точки была измерена флуоресценция у 28-43 центросом. Белые столбцы – контрольные клетки, серые – RNAi. Масштабная линейка 10 мкм.

аппаратом Гольджи динеин/динактин. Мы также изучили перемещения аппарата Гольджи во время поляризации клеток на краю экспериментальной раны монослоя при помощи метода, описанного Ватсоном и Штефенсом (Watson and Stephens, 2006). Мы обнаружили, что два часа спустя после нанесения раны монослоя, у большинства клеток аппарат Гольджи ориентирован по направлению к ране (рис 39). Экспрессия каталитически активного ΔT не влияет на реориентацию Гольджи. Однако, несмотря на то, что экспрессирующие K63R ΔT клетки выдвигают свои ламеллы в рану, аппарат Гольджи не переориентируется по направлению к ней, и лишь небольшая часть таких клеток обладает поляризованным по отношению к ране аппаратом Гольджи (рис 39). Таким образом, можно сделать вывод о том, что активность протеинкиназы LOSK необходима для образования радиальной звезды микротрубочек и для поляризации аппарата Гольджи на краю экспериментальной раны.

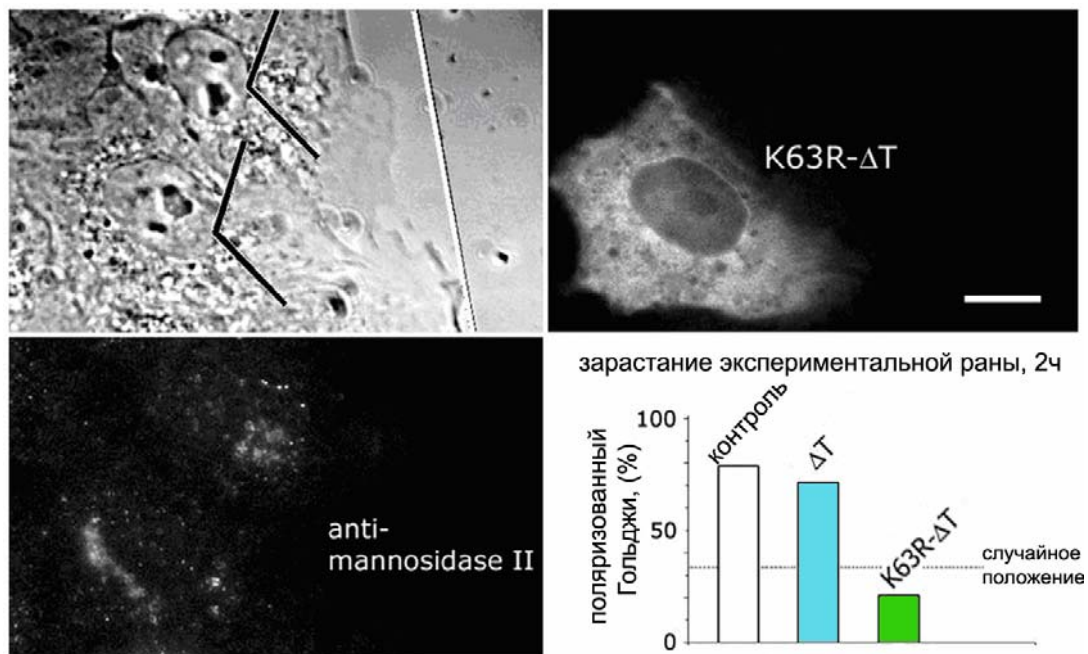


Рисунок 39. Экспрессия K63R- ΔT препятствует поляризации аппарата Гольджи в клетках на краю экспериментальной раны монослоя.

Клетки Vero на краю раны спустя 2 часа после процарапывания монослоя. На фазовоконтрастном снимке направление вдоль края раны обозначено белой линией. Уголками обозначены обращённые к ведущему краю сектора клеток (треть периметра). На гистограмме приведён один из трёх независимых экспериментов, $n = 75, 42$ и 38 соответственно. Масштабная линейка 10 мкм.

§ 8. ИЗМЕНЕНИЕ СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК К ЛОКОМОЦИИ МОЖЕТ СЛУЖИТЬ ИНДИКАТОРОМ НАРУШЕНИЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА

Итак, при подавлении каталитической активности киназы LOSK происходит не только нарушение радиальности микротрубочек, но нарушается также поляризация аппарата Гольджи на краю экспериментальной раны. Это наводит на мысль о возможных нарушениях процесса поляризации и локомоции самих клеток, в которых подавлена активность LOSK.

Основная роль в клеточной локомоции принадлежит актомиозиновому компоненту цитоскелета. Однако ещё в ранних работах, посвящённых изучению клеточной подвижности, было отмечено участие в данном процессе микротрубочек (Vasiliev et al., 1970; Vasiliev and Gelfand, 1977; Vasiliev, 1982). Некоторые небольшие по размеру клетки, такие как кератоциты рыб или лейкоциты, способны к локомоции за счёт одной своей актомиозиновой системы даже после экспериментального разрушения микротрубочек (Zigmond et al., 1981; Euteneuer and Schliwa, 1984). Однако более крупные по размеру фибробласты после разрушения микротрубочек способны лишь к хаотической псевдоподиальной активности, но не к направленному перемещению (Vasiliev et al., 1970; Vasiliev and Gelfand, 1977; Vasiliev, 1982).

Роль микротрубочек в клеточной локомоции до конца неясна. Полагают, что микротрубочки служат «рельсами» для транспорта необходимых для движения клеточных компонентов на передний край клетки. В таком случае, нарушение радиальности микротрубочек должно снижать эффективность такого транспорта, и как следствие, негативно влиять на процесс локомоции. В пользу такого предположения говорят данные о том, что при постепенной разборке микротрубочек наномолярными дозами нокадазола происходит падение скорости перемещения фибробласта пропорционально уменьшению количества в нём микротрубочек (Liao et al., 1995; Григорьев и др., 1999). Кроме того, стабилизация микротрубочек также приводит к уменьшению подвижности клеток. Было также продемонстрировано, что микротрубочки в движущейся клетке поляризованы вдоль оси клеточного движения таким образом, что их динамичные плюс-концы обращены по направлению к ведущему краю клетки, а centrosoma расположена, как правило, между ядром и ведущим краем (Kupfer et al., 1982; Euteneuer and Schliwa, 1992). По-видимому, это направляет мембранный транспорт к лидирующему краю фибробласта, что способствует образованию в этом месте новой мембраны и определяет направление последующего движения клетки.

Мы решили изучить процессы направленного клеточного движения клеток линии Vero с подавленной активностью протеинкиназы LOSK. Поскольку хаотизация микротрубочек снижает эффективность внутриклеточного транспорта, который необходим для

направленного движения фибробластов, ингибирование LOSK может приводить не только к нарушениям архитектуры цитоскелета, но и к изменениям клеточной подвижности.

§ 9. ИНГИБИРОВАНИЕ LOSK ЗАМЕДЛЯЕТ ДВИЖЕНИЕ КЛЕТОК И СНИЖАЕТ ЕГО НАПРАВЛЕННОСТЬ, А ТАКЖЕ СТАБИЛИЗИРУЕТ ФОКАЛЬНЫЕ КОНТАКТЫ

Спустя два часа после нанесения экспериментальной раны, при помощи флуоресцентной микроскопии мы находили на краю монослоя клетку с экспрессией того или иного конструкта, слитого с GFP, и начинали фазовоконтрастную цейтраферную видеосъёмку этого участка. На рис. 40А представлены прорисовки движения клеток в рану монослоя на протяжении трёх часов, представляющие собой проекции первых и последних кадров полученного видеоролика на одну плоскость. Видно, что клетка, экспрессирующая каталитически активную LOSK, выползает в рану монослоя со скоростью, неотличимой от таковой у контрольной нетрансфицированной клетки. В то же время экспрессия доминантно-негативного конструкта приводит к резкому замедлению движения. Кроме того, оказалось, что клетки с экспрессией LOSK-K63RΔT хуже выдерживают первоначальное направление движения и могут выдвигать ламеллу в направлении, не перпендикулярном краю экспериментальной раны. На рис. 40Б представлены векторы движения клеток в рану монослоя, отложенные на абрис края экспериментальной раны в момент начала наблюдения. Видно, что клетка с подавленной каталитической активностью LOSK движется не только медленнее соседних клеток, но и в другом направлении. Следствием такого замедленного и неправильно ориентированного перемещения экспериментальных клеток в просвет раны становится их постепенное отставание от соседних с ними клеток. Обычно через два-три часа после начала движения клетки с подавленной каталитической активностью LOSK находятся уже не на краю экспериментальной раны, а во втором ряду клеток (рис. 40В).

Замедление движения клеток может возникать по двум причинам: либо клетки медленнее выдвигают ламеллу ведущего края, либо изменена адгезия клеток к субстрату. Поэтому мы исследовали псевдоподиальную активность и скорость расплывания по субстрату контрольных клеток и клеток, экспрессирующих обе наших конструкции. Сначала мы изучили скорость выдвигания ламеллы на участках движения клеток, где они не меняли направление движения. Оказалось, что контрольные клетки и клетки с повышенной и пониженной активностью LOSK выдвигают ламеллу с одинаковой средней скоростью, хотя в случае ингибирования LOSK это процесс идёт неравномерно, рывками (рис 42А).

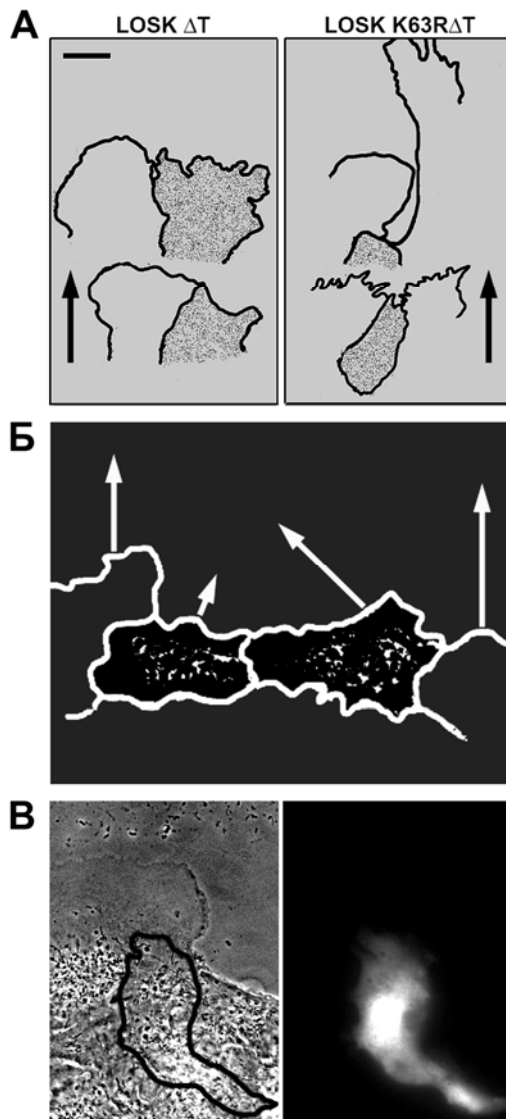


Рисунок 40. Влияние киназы LOSK на выдвигание клеток в экспериментальную рану монослоя.

А. Прорисовки выдвигения в рану монослоя клеток линии Vero, экспрессирующих LOSK ΔT и LOSK K63RΔT. Первый и последний кадры видеороликов продолжительностью 3 часа были проецированы на одну плоскость. Клетки с флуоресценцией показаны более тёмными, чем соседние контрольные клетки на краю раны. Стрелками указано направление движения в рану. Видно, что LOSK ΔT не влияет на скорость локомоции, в то время как клетка с экспрессией LOSK K63RΔT в конечном итоге отстаёт от соседних клеток. Масштабная линейка 20 мкм.

Б. Векторы движения в экспериментальную рану монослоя клеток с ингибированной активностью LOSK в течение 2 часов. Направление векторов соответствует направлению движения, длина векторов соответствует величине пройденного пути за время наблюдения. Видно, что направление движения клеток с экспрессией LOSK K63RΔT отличается от направления движения соседних контрольных клеток.

В. Клетка с экспрессией LOSK K63RΔT, находившаяся на краю экспериментальной раны в момент её нанесения, спустя два часа после нанесения раны. На левой панели фазовоконтрастный снимок монослоя клеток на краю раны; на ней приведён контур клетки, экспрессирующей LOSK K63RΔT (правая панель).

После этого мы проверили, с какой скоростью одиночные клетки распластываются по субстрату. На рис. 41А представлены графики увеличения площади клеток со временем при распластывании их по субстрату. Видно, что скорость распластывания практически одинакова во всех трёх случаях. Затем мы провели иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к маркерному белку фокальных контактов – паксиллину, чтобы оценить возможные изменения количества и морфологии фокальных контактов у клеток с подавленной активностью LOSK. На рис. 41Б видно, что количество фокальных контактов на единицу площади контрольных и трансфицированных различными конструкциями клеток практически одинаково. Далее мы решили изучить динамику фокальных контактов.

Для этой цели сначала мы провели двойную трансфекцию клеток ДНК-конструкциями, кодирующими слитые с GFP фрагменты киназы LOSK и слитый с m-Cherry паксиллин. Затем

наносили экспериментальную рану монослоя и находили на краю раны клетку с высоким уровнем экспрессии LOSK K63RΔT или LOSK ΔT, и при этом относительно низким уровнем экспрессии m-Cherry–паксиллина, позволяющим отчётливо визуализировать фокальные контакты. Затем осуществляли флуоресцентную цейтраферную видеосъёмку, позволяющую проследить динамику контактов на ведущем крае выползающих в просвет экспериментальной раны клеток. На рис. 42Б представлены кимографы, отражающие такую динамику. Видно, что время существования фокального контакта в клетке с подавленной каталитической активностью LOSK как минимум втрое больше, чем у клеток, экспрессирующих контрольный конструкт. Таким образом, фокальные контакты в клетках с экспрессией доминантно-негативной протеинкиназой LOSK стабилизированы.

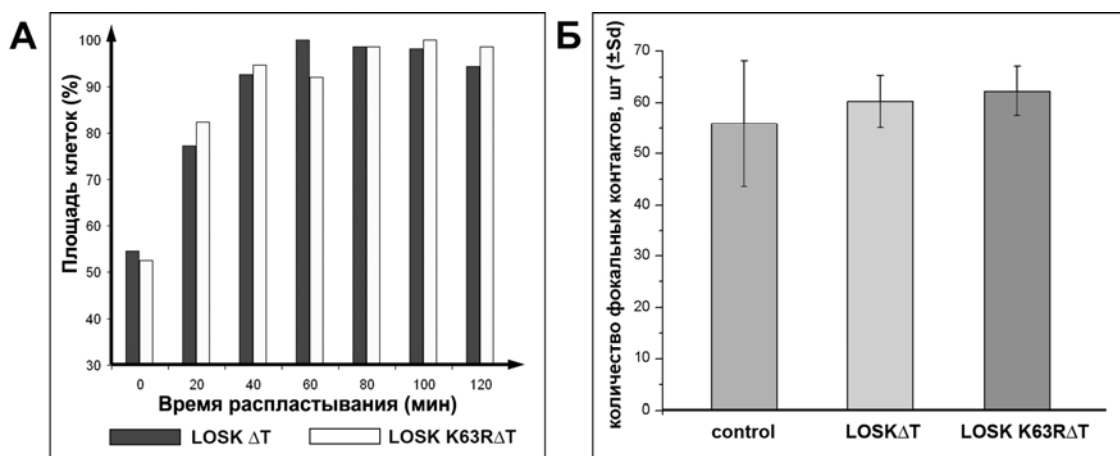


Рисунок 41.

Распрямление и прикрепление к субстрату клеток зависит от активности LOSK.

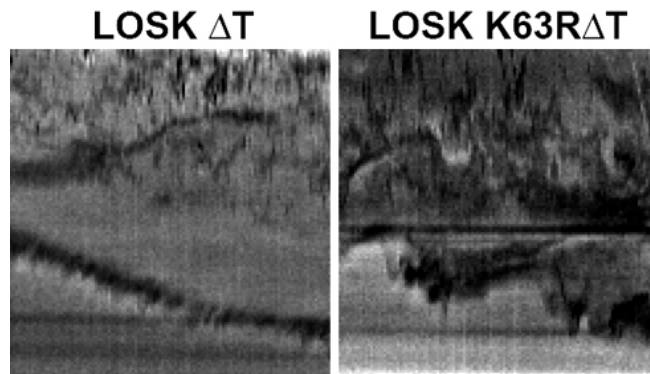
А. Динамика распрямления одиночных клеток с экспрессией LOSK ΔT или LOSK K63RΔT по субстрату. На диаграмме показано увеличение площади распрямляемых клеток в течение двух часов. Ввиду разницы в размерах индивидуальных клеток значения площадей усреднены и приведены в процентах, при этом за 100% принят окончательный размер клетки после завершения процесса распрямления.

Б. Количество фокальных контактов в клетках с активной и неактивной киназой LOSK. Для подсчёта фокальных контактов проводили иммунофлуоресцентное окрашивание трансфицированных клеток антителами к паксиллину, затем отбирали по 10 клеток равной площади среди контрольных клеток и клеток с экспрессией LOSK ΔT или LOSK K63RΔT. На диаграмме приведено среднее количество фокальных контактов на одну клетку с указанием среднеквадратичного отклонения.

Причин стабилизации фокальных контактов может быть несколько, в том числе и нарушение фосфорилирования каких-либо белков, входящих в их состав. Однако логичнее предположить, что фокальные контакты стабилизируются при ингибировании LOSK из-за нарушения их взаимодействия с микротрубочками. Ранее было показано, что микротрубочки подходят к фокальным контактам на нанометровое расстояние (Krylyshkina et al., 2003), и что

именно микротрубочки способствуют динамике фокальных контактов. Возможно, что по микротрубочкам идет доставка факторов, необходимых для разборки контактов, например, белка динамина (Ezratty et al., 2005), или же, например, активатора ГТФазы Rac белка STEF (Rooney et al., 2010). Подавление активности LOSK приводит к хаотизации системы микротрубочек, и нарушение динамики фокальных контактов из-за отсутствия плюс-концов микротрубочек на периферии клетки приводит к нарушениям клеточной локомоции.

А



Б

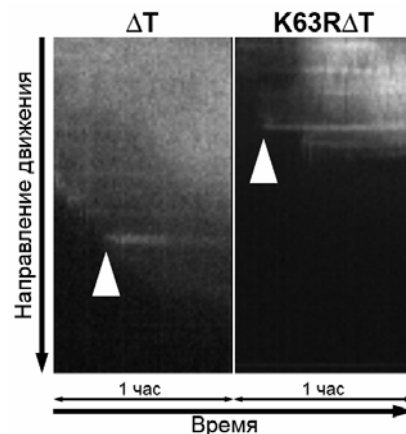


Рисунок 42. При ингибировании LOSK меняется динамика фокальных контактов

А. Кимограмма, демонстрирующая процесс выдвигения ламеллы контрольной клетки и клетки с экспрессией LOSK K63RΔT. Направление выдвигения ламеллы в рану монослоя сверху вниз, продолжительность выдвигения – 2 часа. Для наблюдения были выбраны клетки, не меняющие направление движения на протяжении периода наблюдения. Видно, изменения в динамике выдвигения ламеллы, хотя средняя скорость её выдвигения остаётся той же.

Б. Кимограмма, демонстрирующая динамику фокальных контактов у клеток с экспрессией LOSK ΔT или LOSK K63RΔT. Проводили флуоресцентную двухканальную цейтраферную видеосъёмку клеток с экспрессией LOSK ΔT или LOSK K63RΔT и *ptCherry-Rac*. Продолжительность наблюдения – 1 час. Выдвижение ламеллы в рану монослоя – сверху вниз. Белой стрелкой отмечено возникновение новообразованного фокального контакта, чёрной – его исчезновение. Видно, что время жизни фокального контакта в клетке с подавленной активностью LOSK намного выше, что свидетельствует о стабилизации в ней фокальных контактов.

Однако не стоит забывать, что LOSK, как и любая другая протеинкиназа, является лишь регулятором процесса заякоривания, своего рода «переключателем» - и молекула киназы не принимает непосредственного участия в этом процессе. Мы решили подробнее изучить этот вопрос. Как было показано выше, киназа LOSK способна регулировать внутриклеточное распределение динактина, дестабилизируя его связывание с центросомой. Динактин чаще всего упоминается как кофактор цитоплазматического динеина, функционируя в составе динеин/динактинового комплекса. Моторный белок динеин доставляет различные грузы к минус-концам микротрубочек. Мы решили изучить работу динеина непосредственно на центросоме.

§ 10. ВЫБОР ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ДИНЕИНА, НАХОДЯЩЕГОСЯ НА ЦЕНТРОСОМЕ

Центросомы содержат цитоплазматический динеин, минус-концевой микротрубочковый транслокатор, функции которого в этих органеллах до последнего времени оставались непонятными. Ранее была показана способность цитоплазматического динеина нуклеировать и стабилизировать микротрубочки в опытах *in vitro* (Malikov et al, 2004). Известно, что динеин участвует в независимой от центросомы самоорганизации системы микротрубочек в меланофорах рыб (Rodionov and Borisy, 1997; Vorobjev et al, 2001), а также доставляет в центросому γ -TuRC (Young et al, 2000) и найнеин (Delgehyr et al, 2005; Casenghi et al, 2005). Отсюда можно было предположить участие динеина как в нуклеации, так и в удержании микротрубочек на центросоме; или в координации работы нуклеирующих и удерживающих комплексов центросомы.

Чтобы исследовать функции динеина в центросоме, необходимо каким-то образом экспериментально подавить его активность. Фармакологические агенты, эффективно и специфически влияющие на активность динеина, до сих пор не найдены. Активность динеина ингибируют моноклональные антитела 74.1 к его промежуточной цепи (dynein intermediate chain, DIC) (Dillman and Pfister, 1994). Динеин также можно ингибировать, разобзив его с кофактором динактином. Известно, что центросомы клеток животных обогащены динактином. В состав динактинового комплекса входит крупный (150 кДа) белок p150Glued (Schroer, 2004), который содержит участок связывания с микротрубочками на своем N-конце (18 – 157 а.о.). Взаимодействие p150Glued с динеином осуществляется на довольно протяженном участке в области 200 – 811 а.о., но основная часть взаимодействий приходится на район CC1 (coiled coil-1) (217 – 548 а.о.). С фрагментом p150Glued-CC1

взаимодействует N-концевой участок DIC с 1 по 123 а.о. (Karki and Holzbaur, 1995). Избыток p150Glued-CC1, DIC или его N-концевого фрагмента приводит к разобщению динеина и динактина и ингибированию активности динеина (Karki and Holzbaur, 1995; King et al, 2003). Моноклональные антитела к DIC 74.1 (Dillman and Pfister, 1994) оказывают аналогичное действие.

Было показано, что экспрессия полноразмерной DIC и ее фрагмента (1 – 237 а.о.) вызывала диспергирование аппарата Гольджи в клетках *Dictyostelium* (Ma et al, 1999), свидетельствуя об ингибировании динеин-зависимого транспорта. При экспрессии p150Glued-CC1, фрагментов DIC и некоторых других разрушающих динактиновый комплекс конструкторов в интерфазных фибробластах млекопитающих отмечали дисперсию аппарата Гольджи, а также резкое нарушение радиального расположения микротрубочек (Quintyne et al, 1999). Кроме того, в клетках снижалась активность centrosомы (число отрастающих от нее микротрубочек при их восстановлении после предварительной разборки). Это позволило предположить, что в интерфазных фибробластах динеин и динактин являются одними из основных организаторов системы микротрубочек (Quintyne et al, 1999; Quintyne and Schroer, 2002). Оставалось неясным, влияют ли динеин и динактин на нуклеацию или на удерживание микротрубочек в centrosоме.

В первой части наших экспериментов по изучению роли centrosомного динеина/динактина мы нарушали их взаимодействие при экспрессии в клетках фрагмента p150Glued-CC1, и наблюдали при этом за системой микротрубочек, чтобы проверить данные, приведенные в работах (Quintyne et al, 1999; Quintyne and Schroer, 2002). Нам интересовало, изменится ли активность centrosомы и степень радиальности микротрубочек (возможно, не зависящая от centrosомы) при ингибировании динеина. Опыты проводили на клеточных линиях HeLa и Vero, изначально имеющих различный уровень активности centrosомы и различную выраженность радиальной организации сети микротрубочек. Главной же целью работы было исследование влияния рекомбинантного фрагмента p150Glued-CC1, слитого с глутатион-S-трансферазой (GST), и антител 74.1 на индуцируемую centrosомой сборку микротрубочек *in vitro*, т.е. непосредственно на нуклеирующую активность centrosомы. Ранее подобные эксперименты никем не проводились, и они позволили определить, участвует ли динеин в нуклеации микротрубочек на centrosоме.

Исследование специфической роли цитоплазматического динеина в процессе организации микротрубочек затруднено тем, что этот моторный белок необходим для осуществления множества процессов в клетке (в частности, в центрировании centrosомы – см. в предыдущей главе), и, похоже, участвует в организации и поддержании сфокусированной звезды микротрубочек несколькими различными способами. Чтобы

преодолеть это затруднение, во второй части наших экспериментов мы исследовали функции динеина на centrosомах интерфазных фибробластов млекопитающих путём микроинъекций в клетки ингибиторов динеина и наблюдений незамедлительно последовавших за этим изменений в организации микротрубочек в инъекцированных клетках. Этот экспериментальный подход позволил определить первоочередные последствия ингибирования активности динеина на организацию микротрубочек.

§ 11. ПРОВЕРКА ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ p150Glued-CC1

Прежде чем начать эксперименты по разобщению динеина и динактина на centrosомах, мы проверили, как влияет выбранный нами фрагмент p150Glued-CC1 на зависимый от динеина внутриклеточный транспорт. Для этого GST-p150Glued-CC1 синтезировали в *E. coli* и очищали методом аффинной хроматографии. Электрофоретическое исследование показало, что молекулярная масса синтезированного в *E. coli* фрагмента GST-p150Glued-CC1 соответствовала расчетной (65 кДа), и очищенный препарат содержал преимущественно целевой белок (рис.43 а).

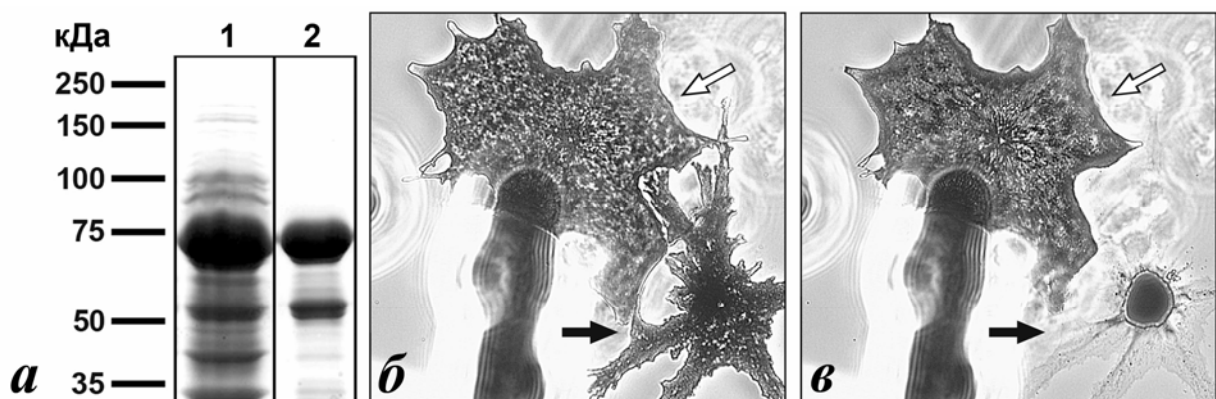


Рисунок 43. Микроинъекция белка GST-p150Glued-CC1 нарушает работу динеина в меланофорах тернеции.

А – Гель, окрашенный кумасси. На дорожку 1 нанесён лизат *E. coli*, экспрессирующих фрагмент GST-p150Glued-CC1, на дорожку 2 – очищенный путём аффинной хроматографии препарат белка.

Б, В – Агрегация пигментных гранул меланофоров тернеции в ответ на добавление в среду адреналина спустя 30 мин после микроинъекции. Белыми стрелками показана инъекцированная GST-p150Glued-CC1 клетка, чёрными – соседняя контрольная клетка. б) – 10 с и в) – 10 мин после добавления адреналина. В контрольной клетке гранулы полностью агрегировали, в инъекцированной клетке агрегации не наблюдается.

Раствор очищенного GST-p150Glued-CC1 инъектировали в меланоциты тернеции, пигментные гранулы в которых находились в диспергированном состоянии. Инъекция белка

никак не влияла на жизнеспособность меланоцитов – они оставались прикрепленными к субстрату, и гранулы в них были подвижны. После обработки адреналином, в контрольных клетках (черные стрелки на рис. 43 б, в) происходила агрегация пигментных гранул, в то время как в инъектированных клетках такой агрегации не наблюдалось (белые стрелки на рис. 43 б, в), хотя они сохраняли жизнеспособность. В качестве контрольного эксперимента были проведены микроинъекции свободного GST, которые никак не повлияли на меланоциты и на их гранулы пигментные гранулы. Поскольку пигментные гранулы агрегируют с помощью динеинового транспорта по микротрубочкам, можно заключить, что p150Glued-CC1 вызывает ингибирование динеина в меланоцитах.

§ 12. ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ p150Gglued-CC1 ПРИВОДИТ К ХАОТИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК И К ДИСПЕРГИРОВАНИЮ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ

Первым делом была проведена оценка радиальности микротрубочек в контрольных клетках используемых в дальнейших экспериментах линий. В интерфазных клетках Vero и HeLa микротрубочки могут располагаться радиально или хаотично, с разной степенью выраженности радиальности их системы. В данном случае мы оценивали степень радиальности системы микротрубочек визуально, привлекая 2–3 коллег, которые не были информированы о том, какие фотографии (контрольных или экспериментальных клеток) они анализируют. В большинстве клеток Vero наблюдали строгую радиальную систему микротрубочек (рис. 44, б, г). В культуре HeLa имеющая размытый центр радиальная система микротрубочек наблюдалась лишь в 60% клеток, а в остальных клетках микротрубочки располагались совершенно хаотично (рис. 44, б, в).

Затем клетки HeLa и Vero трансфицировали плазмидной ДНК pEGFP-p150Glued-CC1. Через 24 часа после трансфекции клетки фиксировали и проводили иммуофлуоресцентное окрашивание антителами к тубулину, или из клеток изготавливали гомогенат и проводили иммуноблоттинг. На иммуноблотах антитела к GFP выявляли пептид расчетной для рекомбинантного GFP-p150-CC1 молекулярной массы 64 кДа (рис. 44, а). В большинстве синтезирующих GFP-p150-CC1 клеток Vero происходило выраженное разрушение радиальной системы микротрубочек – микротрубочки становились хаотичными, были равномерно распределены по цитоплазме, без увеличения плотности в центре (рис. 44, з, е). В трансфицированных клетках HeLa система микротрубочек также распадалась: в большинстве клеток не было даже намека на упорядоченное расположение микротрубочек в виде звезды (рис. 44, в, д). При этом по визуальной оценке общее число микротрубочек в клетках существенно не изменялось. При подсчетах количества клеток с радиальной

системой микротрубочек, в качестве контроля служили соседние клетки, растущие вместе с экспрессирующими на одном стекле. На рис. 44Б показан один представительный эксперимент из трех повторов, в котором подсчитано 83 клетки Vero и 118 клеток HeLa. Видно, что GFP-p150-CC1 вызывает уменьшение в несколько раз доли клеток с радиальным расположением микротрубочек. В клетках, синтезировавших GFP-p150Glued-ID, система микротрубочек не изменялась по сравнению с нетрансфицированными клетками.

В клетках Vero аппарат Гольджи выявлялся антителами к маннозидазе II как совокупность цистерн и везикул, компактно располагающихся в околоядерной области (рис. 44ж). При экспрессии в клетках GFP-p150-CC1 аппарат Гольджи распадался на отдельные мелкие везикулы, равномерно распределенные по цитоплазме (рис. 44ж, з), что свидетельствует об ингибировании динеина.

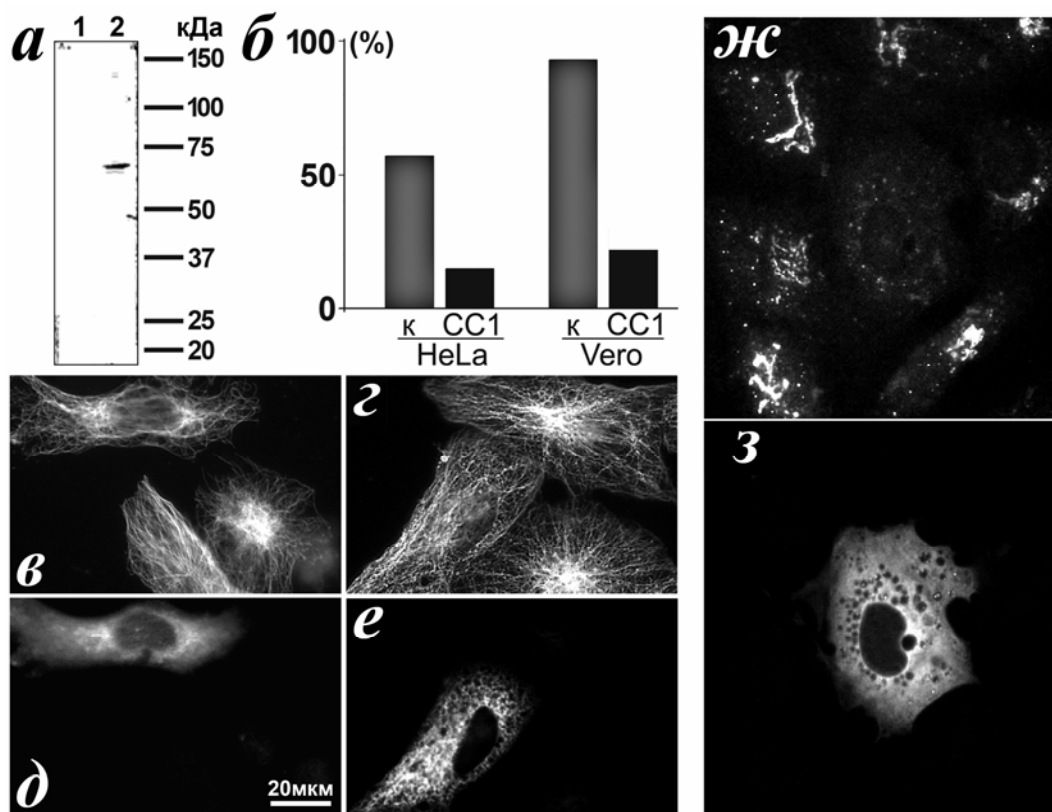


Рисунок 44. Экспрессия GFP-p150-CC1 в клетках млекопитающих приводит к дисперсии аппарата Гольджи и хаотизации системы микротрубочек.

А – Иммуноблот лизата клеток HeLa, окрашенный антителами к GFP. 1 – контрольные клетки, 2 – клетки, трансфицированные pEGFP-p150Glued-CC1. Б – Доля клеток с радиальным расположением микротрубочек: контрольные (к) и экспрессирующие GFP-p150-CC1 (CC1) клетки HeLa и Vero. В-Е – Экспрессия в клетках GFP-p150-CC1 приводит к хаотизации клеточных микротрубочек: В,Д – клетки HeLa, Г,Е – клетки Vero. В,Г – Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами к α -тубулину, Д,Е – свечение GFP в трансфицированных клетках, в том же поле зрения. Ж,З – Экспрессия в клетках Vero GFP-p150-CC1 приводит к дисперсии аппарата Гольджи: Ж – иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маннозидазе II, З – свечение GFP в том же поле зрения.

§ 13. ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ p150Gglued-CC1 НАРУШАЕТ РАДИАЛЬНОСТЬ ВОССТАНОВЛЕННЫХ ПОСЛЕ РАЗБОРКИ МИКРОТРУБОЧЕК

Чтобы выяснить, какую активность centrosомы – нуклеирующую или заякоривающую – нарушает GFP-p150-CC1, мы провели эксперимент по восстановлению микротрубочек после их разрушения нокадазолом. Для этого клетки Vero, трансфицированные вектором pEGFP-p150-CC1 или pEGFP-p150-ID, обрабатывали нокадазолом (3 мкг/мл, 3 часа), а затем отмывали чистой средой при 37°. Через 3 минуты после начала отмывки во всех клетках, контрольных и экспрессирующих GFP-p150-CC1 или GFP-p150-ID, образовывались звезды из сравнительно коротких микротрубочек, расходящихся от centrosомы (рис. 45 а, з). Через 10 минут эти звезды сохранялись, но микротрубочки в них удлинялись и достигали края клеток (рис. 3, б, д). Через 60 мин отмывки проявлялась специфика клеток, экспрессирующих GFP-p150-CC1 – в них система микротрубочек теряла радиальность и становилась хаотичной, тогда как в остальных клетках, контрольных или экспрессирующих GFP-p150-ID, микротрубочки оставались практически строго радиальными (рис. 45 в, е). Таким образом, мы обнаружили, что при экспрессии в клетках p150-CC1 centrosома сохраняет способность нуклеировать микротрубочки, но не может удерживать их в виде звезды длительное время.

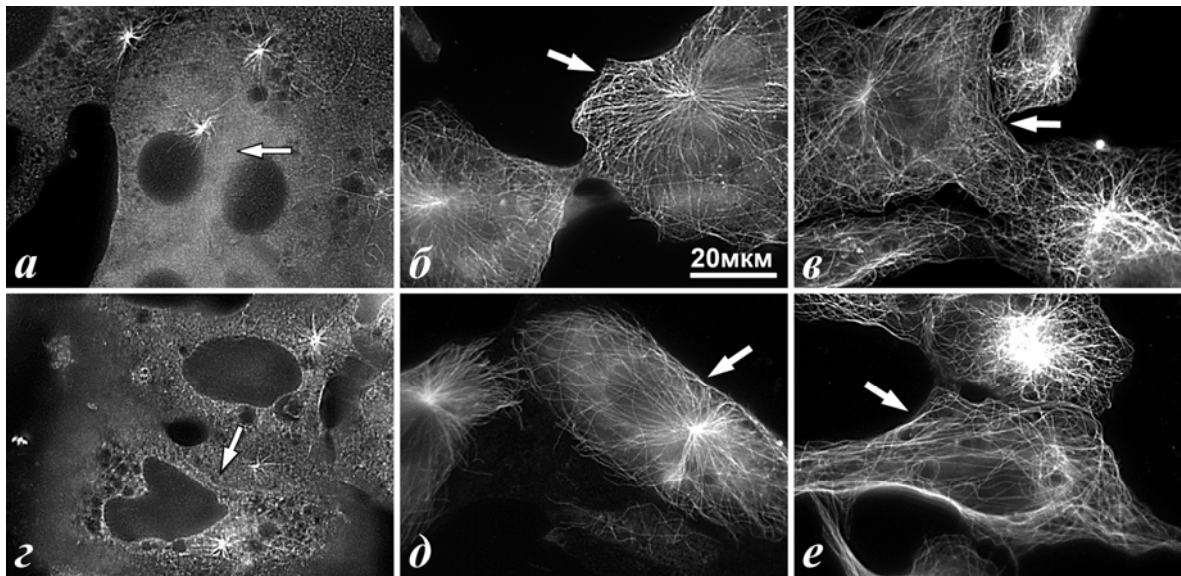


Рисунок 45. Экспрессия GFP-p150-CC1 в клетке нарушает работу centrosомы, не затрагивая её способность нуклеировать микротрубочки.

А-В – Экспрессия GFP-p150-ID, Г-Е – экспрессия GFP-p150-CC1 (клетки с экспрессией соответствующих конструкторов обозначены стрелками). А,Г – 3 минуты отмывки нокадазола, Б,Д – 10 минут, В,Е – 1 час.

§ 14. ИНГИБИРОВАНИЕ ДИНЕИНА НЕЗНАЧИТЕЛЬНО ВЛИЯЕТ НА СБОРКУ МИКРОТРУБОЧЕК ИЗ ЭКЗОГЕННОГО ТУБУЛИНА В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Для дальнейшей проверки влияния динеина на способность centrosомы нуклеировать микротрубочки, мы полимеризовали на centrosомах очищенный тубулин в системе *in vitro* и исследовали влияние на эту полимеризацию антител к динеину 74.1 или рекомбинантного белкового фрагмента GST-p150Glued-CC1. Клетки с разрушенными нокодазолом микротрубочками пермеабелизовывали детергентом, и такие клеточные «тени» инкубировали в контрольном буфере, с антителами 74.1 или с GST-p150Glued-CC1. Затем клеточные «тени» инкубировали в растворе тубулина при 37°, фиксировали и окрашивали антителами микротрубочки (Рис.4, см. раздел «Материалы и методы исследования»). В данных экспериментах важно было подобрать концентрацию тубулина таким образом, чтобы в растворе не образовывались свободные микротрубочки и сборка шла только на centrosомах. Выделенный нами препарат тубулина был достаточно чистым, в нем выявлялось очень небольшое содержание примесей даже при большой перегрузке геля (рис. 46А). Оптимальной для сборки на centrosомах оказалась концентрация ~1,2 мкг/мл тубулина, что совпадает с результатами других авторов (Kuriyama, 1984). При превышении данной концентрации в препаратах образовывались многочисленные свободные микротрубочки, на фоне которых было трудно рассмотреть centrosому. При концентрации ~1,2 мкг/мл тубулина от centrosом отрастали микротрубочки в виде звезды, и в препарате были видны лишь единичные свободные микротрубочки (рис. 46В). В центре звезды из микротрубочек находилась именно centrosома, что было подтверждено с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания на γ -тубулин (рис. 46 Е,Ж). Если клеточные «тени» инкубировали с чистым буфером, не содержащим тубулина, то в цитоплазме были видны единичные остаточные эндогенные микротрубочки, а звезды из микротрубочек никогда не образовывались (рис. 46Б).

В экспериментах с применением антител 74.1 использовали тубулин, выделенный из мозга свиньи, хранившийся в жидком азоте. После инкубации с этим тубулином в среднем 93% клеточных «теней» имели centrosому с развившейся вокруг нее звездой из микротрубочек. В среднем в состав звезды входило $14,7 \pm 4,3$ микротрубочки (минимально 7, максимально 27). После предварительной инкубации с антителами 74.1 и в присутствии этих антител происходило некоторое уменьшение количества нуклеированных на centrosомах микротрубочек: только 68% клеток содержали звезду, и в среднем в состав звезды входило $11,7 \pm 5,1$ микротрубочки (минимально 4, максимально 26), т.е. размер звезды составлял 80%

контрольного (рис. 46 Г). Таким образом, антитела 74.1 несколько ингибировали способность centrosомы к нуклеации микротрубочек ($p = 0,0004$), хотя и незначительно.

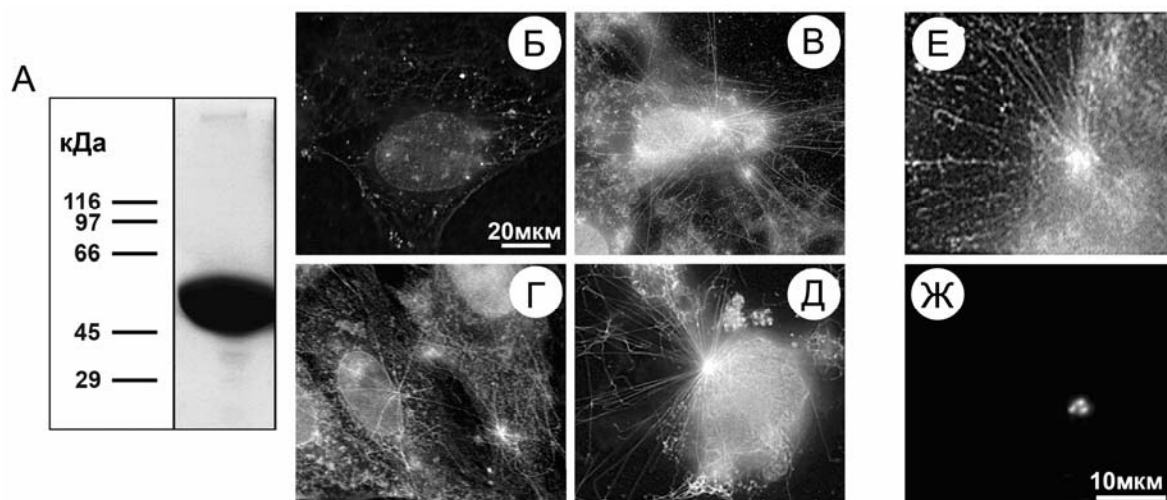


Рисунок 46. Центросома *in vitro* сохраняет способность нуклеировать микротрубочки после ингибирования динеина различными способами.

А – Препарат тубулина, очищенного из мозга свиней, гель окрашен кумасси. Б-Д – сборка микротрубочек на клеточных «теньях»: Б – «тени», инкубированные с буфером, не содержащим тубулина, В-Д – инкубированные с раствором тубулина, видны звезды микротрубочек, отходящих от centrosомы; Г – преинкубированные с антителами 74.1, Д – преинкубированные с белком GST-p150-CC1. Е, Ж – centrosома клеточной «тени» с отходящими от неё микротрубочками содержит γ -тубулин: двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Б-Е – иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к α -тубулину, Ж – антителами к γ -тубулину.

В экспериментах с фрагментом GST-p150-CC1 использовали свежеполученный тубулин из мозга крыс. После инкубации с этим тубулином в среднем 79% клеточных «теней» имели звезду из микротрубочек. В среднем в состав звезды входило $39,4 \pm 15,3$ микротрубочек (минимально 15, максимально 64), т.е. значительно больше, чем при использовании тубулина мозга свиней, хранившегося в жидком азоте. После предварительной инкубации с GST-p150-CC1 и в присутствии этого белка доля «теней», развивавших звезду из микротрубочек, не уменьшалась, и в среднем в звезде насчитывалось $31,3 \pm 8,9$ микротрубочки (минимально 21, максимально 48), т.е. 79,5% от контрольного значения (рис. 45 е). Таким образом, GST-p150-CC1 также несколько ингибировал нуклеирующую активность centrosомы ($p = 0,03$), но так же слабо, как и антитела 74.1.

Были поставлены контрольные эксперименты для проверки того, сохраняются ли в клеточных «теньях» динеин и динактин на centrosомах. Для этого фиксировали «тени» до их инкубации с тубулином и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание антителами 74.1,

антителами к тяжёлой цепи динеина DHC и к белку p150Glued. Чтобы идентифицировать centrosому, использовали антитела к γ -тубулину. Оказалось, что и динактин, и динеин сохранялись в centrosоме после обработки клеток нокодазолом и Triton X-100 (рис. 47). Некоторое количество этих белков также выявлялось в ядре, что делало невозможным подтвердить их присутствие в centrosоме клеточных «теней» посредством методом иммуноблоттинга. Таким образом, мы убедились в том, что и динеин, и динактин потенциально могли повлиять на сборку микротрубочек на centrosоме *in vitro* в наших экспериментах.

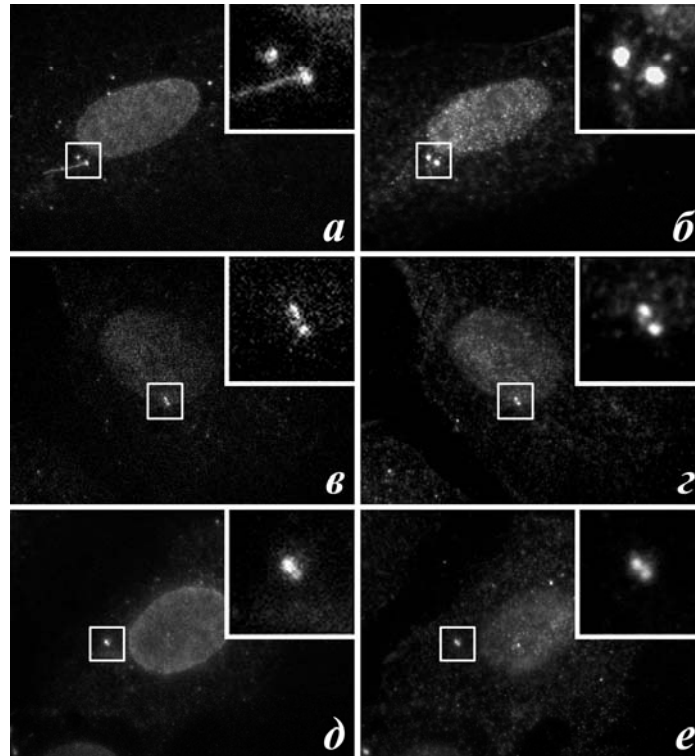


Рисунок 47. Centrosомы клеточных «теней» содержат динеин и динактин.

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание «теней» антителами к γ -тубулину (б, г, е) и к компонентам динактинового комплекса: антителами 74.1 (а), антителами к DHC (в) и к p150Glued (д). Районы клеток, выделенные квадратами, показаны крупно на врезках.

Итак, мы продемонстрировали, что при действии агентов, нарушающих динеин-динактиновые взаимодействия, способность centrosомы нуклеировать микротрубочки как в системе *in vivo*, так и *in vitro*, нарушается незначительно. Centrosома *in vivo* сохраняет способность образовывать звезду из микротрубочек на короткие сроки. Вероятно, существенную основную роль в нуклеации микротрубочек на centrosоме динеин-динактиновый комплекс не играет, несмотря на способность динеина к нуклеации микротрубочек *in vitro* (Malikov et al, 2004). Хаотизация микротрубочек в клетках при подавлении динеин-динактиновых взаимодействий, скорее всего, связана с нарушением процесса заякоривания микротрубочек на centrosоме. Возможно, это происходит из-за

нарушения зависящей от динеина доставки в центросому заякоривающих белков (Young et al, 2000; Karki and Holzbaur, 1995; Quintyne et al, 1999; Quintyne and Schroer, 2002; Fumoto et al, 2006). Она также может быть связана и с диспергированием аппарата Гольджи, который по данным последних исследований, может принимать участие в организации микротрубочек в клетках. Возможно также, что динеин участвует в «передаче» микротрубочек с нуклеирующих на заякоривающие белковые комплексы.

Работа динеин-динактинового комплекса на центросоме, вероятно, может регулироваться иными способами, чем при регуляции его в цитоплазме. В пользу этого говорит то, что, как мы недавно выяснили, существуют две различных изоформы белка p150Glued, различающихся длиной участка связывания с микротрубочками. Нами было показано, что изоформа, которую мы назвали 1А, имеет повышенную афинность к микротрубочкам по сравнению со второй изоформой, 1В (которая короче первой всего на 20 аминокислотных остатков). Если первая связывается с микротрубочкой по всей её длине, то вторая декорирует лишь плюс-конец микротрубочки. Открытие двух различных изоформ динактина, вполне возможно, означает существование различных способов регуляции его работы в районе центросомы и в периферийных областях цитоплазмы.

§ 15. ИНГИБИРОВАНИЕ ДИНЕИНА ПРИВОДИТ К БЫСТРОМУ НАРУШЕНИЮ РАДИАЛЬНОСТИ МИКРОТРУБОЧЕК В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

Ингибирование активности динеина, нарушавшее заякоривание микротрубочек на центросомах (см. §12-13), могло быть следствием нарушения доставки необходимых для этого белков к центросоме. В самом деле, при трансфекции клеток соответствующими генетическими конструкциями эффект от экспрессии наблюдают обычно на следующий день – срок, вполне достаточный для истощения пула какого-нибудь доставляемого динеином компонента центросомы. Таким образом, морфологически эффект ингибирования минус-концевого транспорта будет схож с эффектом ингибирования заякоривания на центросоме при непосредственном участии динеина. Чтобы подробнее разобраться в вопросе, какие функции на центросоме выполняет динеин, мы решили быстро подавить активность динеина в живых клетках и сразу после этого прижизненно наблюдать возможные изменения системы микротрубочек и нуклеирующей/заякоривающей активности центросомы.

Для дальнейшего изучения роли цитоплазматического динеина в радиальной организации микротрубочек, мы метили микротрубочки в фибробластах Vero или CV-1 путём инъекций конъюгированного с Су-3 тубулина. Затем повторно микроинъектировали клетки контрольным или анти-динеиновым реагентом. Сразу после второй микроинъекции начинали

видеосъёмку микротрубочек. Чтобы нарушить функции динеина, были использованы два ингибитора – моноклональные антитела к промежуточной цепи динеина 74.1 (Dillman and Pfister, 1994) и фрагмент субъединицы динактинового комплекса p150Glued, соответствующий coiled-coil домену 1 – CC1 (Quintyne et al, 1999). Как упоминалось выше, оба ингибитора препятствуют связыванию промежуточной цепи динеина с субъединицей динактина p150Glued, и таким образом разрушают динеин-динактиновый комплекс, не влияя при этом на структуру динактина (Quintyne et al, 1999; Steffen et al, 1997). Анти-динеиновые антитела вызывали дисперсию аппарата Гольджи, чья структурная организация зависит от активности динеина. Негативный контроль эксперимента заключался в микроинъекциях клеток мышиными не-иммунными иммуноглобулинами G (IgG). В качестве позитивного контроля использовали микроинъекции в клетки рекомбинантной субъединицы динактинового комплекса p50 (Echeverri et al, 1996). Поскольку мы считаем, что динактиновый комплекс участвует в заякоривании микротрубочек на centrosome, его диссоциация в присутствии избытка p50 ожидаемо приводит к дезорганизации centrosomal radial star of microtubules в интерфазных клетках (Quintyne et al, 1999; Quintyne and Schroer, 2002).

Чтобы проверить гипотезу о том, что непрерывная активность цитоплазматического динеина необходима для поддержания radial star of microtubules в интерфазных клетках, мы изучали результаты time-lapse видеосъёмки микротрубочек, проводившейся в течение первых 60 минут после инъекций ингибиторов динеина. Мы обнаружили, что вдобавок к ожидаемому смещению centrosome из клеточного центра (см. часть 1 данного раздела), антитела 74.1 (5 мг/мл) или CC1 (10 мг/мл) вызывают драматические нарушения radial organization of microtubules, что проявляется в их беспорядочном расположении в цитоплазме клетки (рис 48А, видео 12 и 13) и в утрате пика флуоресценции tubulin на centrosome, что согласуется с разрушением sфокусированной звезды микротрубочек (рис. 48Б). Инъекции рекомбинантного p50 (20 мг/мл) имеют сходный эффект (рис 48А,Б). Численная оценка разрушающего эффекта ингибиторов динеина во всей выборке инъектированных клеток продемонстрировала, что CC1 и антитела 74.1 вызывают существенное (соответственно, двукратное и трёхкратное – см. рис 49А) уменьшение фракции клеток с radial microtubules; по сравнению с клетками, инъектированными неиммунными IgG, которые не влияли на организацию микротрубочек (рис 48А). Затем нами был проведён количественный анализ кинетики процесса утраты radialности микротрубочек путём измерения флуоресценции микротрубочек на участке вокруг centrosome через разные временные интервалы после микроинъекций ингибиторов динеина.

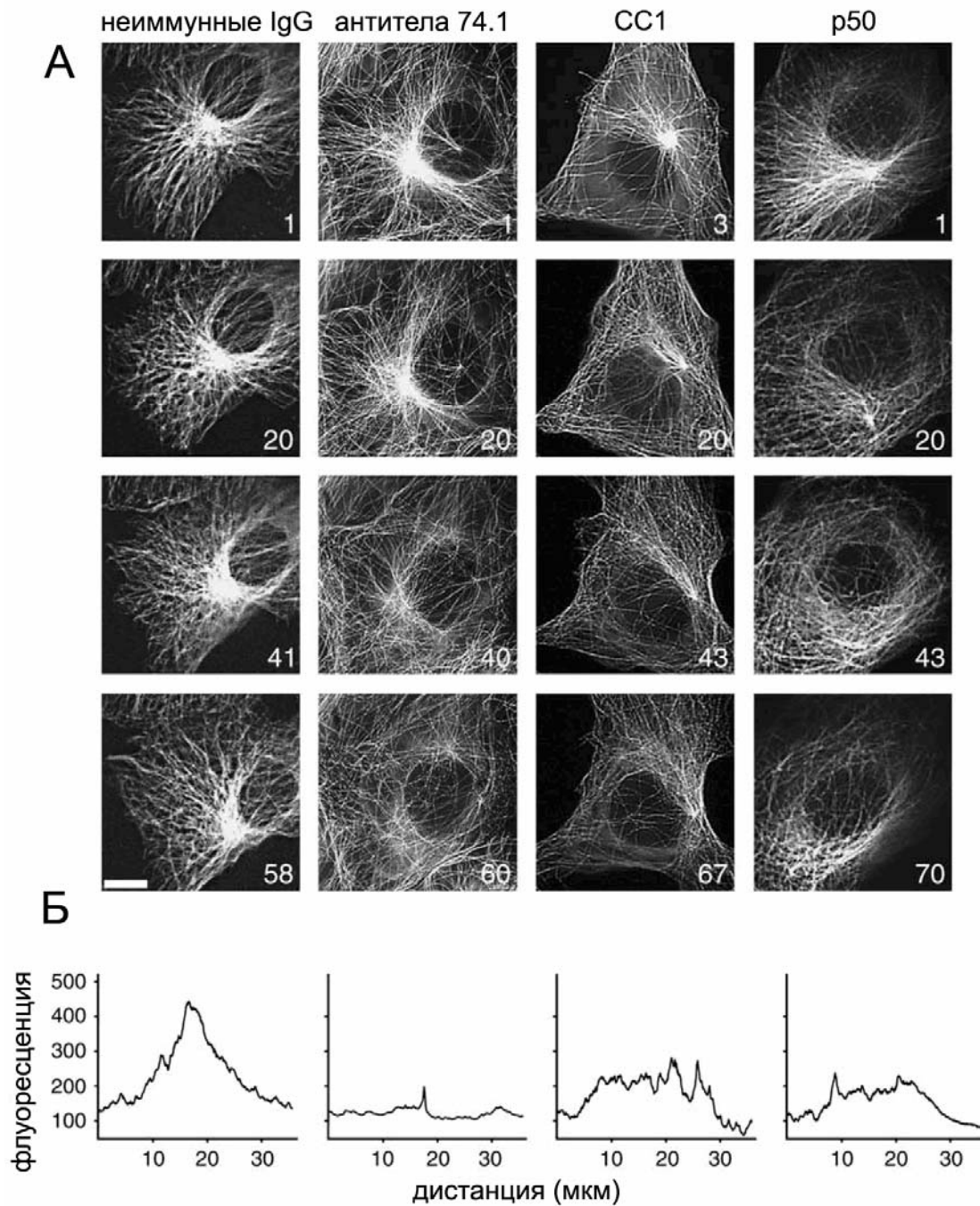


Рисунок 48. Микроинъекции ингибиторов динеина нарушают радиальную организацию микротрубочек в фибробластах Vero.

А) Серии кадров, на которых представлены микротрубочки, помеченные тубулином, конъюгированным с СуЗ. Клетки микроинъекцированы (слева направо) неиммунными мышиными IgG (5 мг/мл), антителами 74.1 к промежуточной цепи динеина (5 мг/мл), рекомбинантным фрагментом p150^{Glued} – CC1 (10 мг/мл) или рекомбинантной субъединицей динактина p50 (20 мг/мл). Масштабная линейка 10 мкм. Видно, что инъекции антител 74.1 или рекомбинантных CC1 или p50 – не неиммунных IgG – приводят к нарушению радиальной организации микротрубочек.

Б) Лайнсканы интенсивности флуоресценции, проведённые поперёк клеток через область центросомы на нижних кадрах панели А. Флуоресценция микротрубочек в центросомной области значительно снижается в клетках, инъекцированных 74.1, CC1 или p50 – но не неиммунными IgG.

Проведённый анализ подтвердил, что разрушение радиальной системы микротрубочек происходило быстро и половинное время (half-time) этого процесса составляло ~ 20 минут (рис 49Б). Из всего этого мы сделали вывод, что для поддержания радиальности системы микротрубочек в интерфазных фибробластах необходима постоянная активность динеина.

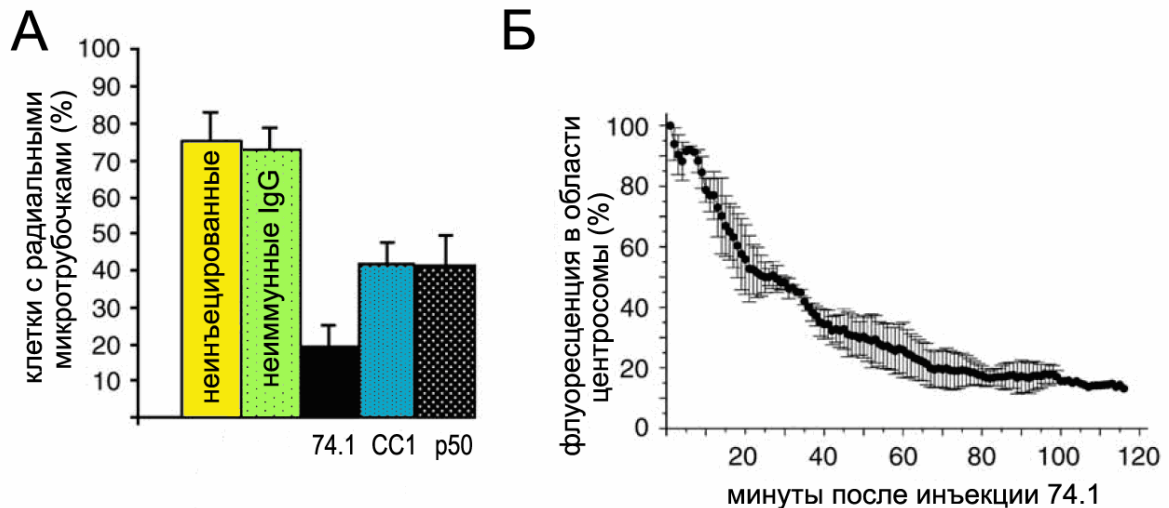


Рисунок 49. Микроинъекции ингибиторов динеина нарушают радиальную организацию микротрубочек в фибробластах Vero.

А) Количественная оценка процентного содержания клеток с радиальной системой микротрубочек среди неинъецированных клеток и клеток, инъецированных неиммунными IgG, антителами 74.1, фрагментом CC1 белка p150^{Glued} или рекомбинантной субъединицей динактина p50. Видно, что инъекции 74.1, CC1 и p50 существенно снижают долю клеток с радиальным расположением микротрубочек.

Б) Кинетика уменьшения флуоресценции микротрубочек в области centrosомы в клетках, инъецированных 74.1. Аппроксимирование экспериментальных данных угасания флуоресценции к экспоненциальной кривой даёт время полужизни для снижения уровня флуоресценции равное ~20 минутам.

§ 16. АКТИВНОСТЬ ДИНЕИНА ПРИСУТСТВУЕТ НА ЦЕНТРОСОМЕ НА ПРОТЯЖЕНИИ ВСЕЙ ИНТЕРФАЗЫ

На следующем этапе наших исследований мы решили определить, действительно ли активность динеина, фокусирующая микротрубочки на centrosоме, постоянно требуется в течение всей интерфазы. Для этого мы сравнили влияние ингибиторов динеина на радиальную организацию микротрубочек в клетках, находящихся в ранней (G₁) или поздней (S-G₂) интерфазе. Чтобы определить, какие клетки находятся в G₁ или в S-G₂ фазах клеточного цикла, мы экспрессировали в них слитый с зелёным флуоресцентным белком GFP белок центрин-2, связанный с центриолями, что позволило подсчитывать число пар

центриолей в трансфицированных клетках. Поскольку центриоли удваиваются в ранней S – фазе клеточного цикла, наличие одной пары центриолей мы рассматривали как индикацию G₁-фазы, а двух пар центриолей – как S-G₂ фаз (рис 50А). Клетки, находящиеся как в G₁, так и в S-G₂ фазах микроинъекцировали антителами 74.1, и фракцию клеток с радиальным расположением микротрубочек определяли после иммуофлуоресцентного окрашивания клеток антителами к α -тубулину. Статистический анализ полученных данных показал, что несмотря на то что процент клеток с нарушенной системой микротрубочек был слегка повышен в фазах S-G₂ по сравнению с G₁, разрушающее воздействие ингибиторов динеина в G₁ фазе было всё ещё значительным (рис 50Б). Из этого мы сделали вывод, что активность динеина необходима для организации микротрубочек в сфокусированную звезду непрерывно на протяжении всей интерфазы.

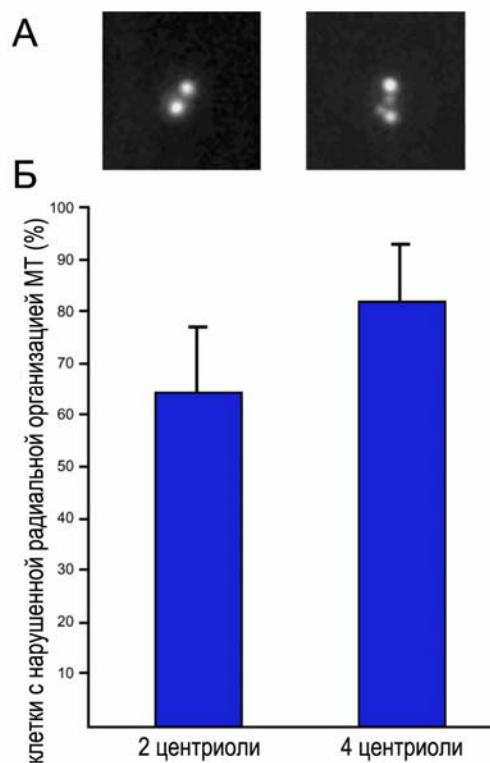


Рисунок 50. Нарушение радиальной организации микротрубочек после инъекций антител 74.1 не зависит от стадии интерфазы.

А) Результатом экспрессии в клетках Vero GFP-слитого центрина 2 является мечение либо двух (левая панель) либо четырёх центриолей (правая панель). Поскольку центриоли реплицируются в S-фазе клеточного цикла, мечение их GFP-слитым центрином 2 позволяет нам определить, находится ли клетка на G₁ или же на S-G₂ стадиях интерфазы.

Б) Сравнение дезорганизующего воздействия антител 74.1, инъектированных в клетки с двумя или четырьмя центриолями. Поскольку доля клеток, утративших радиальную организацию микротрубочек, одинакова в клетках с двумя и четырьмя центриолями, то, следовательно, дезорганизующее воздействие антител 74.1 не зависит от стадии интерфазы.

§ 17. РОЛЬ ДИНЕИНА НА ЦЕНТРОСОМЕ НЕ СВОДИТСЯ К ДОСТАВКЕ ДРУГИХ ЦЕНТРОСОМНЫХ БЕЛКОВ

Нарушение радиальной организации микротрубочек в клетках, инъецированных ингибиторами динеина, может быть объяснено подавлением минус-концевого транспорта по микротрубочкам, что в свою очередь приводит к уменьшению содержания centrosomных белков, необходимых для нуклеации и заякоривания микротрубочек (Young et al, 2000; Zimmerman and Doxsey, 2000). Чтобы изучить возможность того, что ингибиторы динеина влияют на структурную целостность centrosомы, мы провели оценку количества на ней белков, которые выполняют либо структурную роль (перицентрин), либо вовлечены в процесс нуклеации микротрубочек (γ -тубулин) или их заякоривания (наинеин и p150^{Glued}) – в клетках с подавленной активностью динеина. Для проведения такого анализа мы инъецировали клетки антителами к динеину 74.1, которые нарушают радиальное расположение микротрубочек (рис 48А,Б) и затем проводили иммунофлуоресцентное окрашивание инъецированных клеток антителами к основным centrosomным белкам; после чего оценивали интенсивность флуоресценции в области centrosомы на сделанных снимках окрашенных клеток. Мы обнаружили, что инъекции клеток антителами к динеину заметно не меняют уровни основных centrosomных белков, ответственных за нуклеацию микротрубочек (γ -тубулин), заякоривание (наинеин и p150^{Glued}) или за структурную организацию centrosомы (перицентрин) по сравнению с неинъецированными клетками или с клетками, инъецированными контрольным буфером (рис 51А,Б). Следовательно, дезорганизация радиальной системы микротрубочек в клетках с подавленной активностью динеина никак не связана с утратой целостности centrosомы. Эти результаты дополняют полученные ранее в системе *in vitro* на клеточных «тенях» (см. рис. 47) и полностью с ними согласуются. Отсюда мы сделали вывод, что динеин играет иную роль в радиальной организации микротрубочек в интерфазных клетках, нежели простая помощь при сборке centrosомы.

§ 18. ДИНЕИН ОТВЕЧАЕТ НЕ ЗА НУКЛЕАЦИЮ, А ЗА УДЕРЖАНИЕ МИКРОТРУБОЧЕК НА ЦЕНТРОСОМЕ

Как известно, радиальная организация микротрубочек в интерфазных клетках посредством centrosомы зависит от соотношения скоростей нуклеации микротрубочек на centrosоме и их открепления от неё (Keating et al, 1997). Значит, нарушение радиальной организации микротрубочек, наблюдаемое в клетках, инъецированных ингибиторами динеина, может быть объяснено либо нарушением нуклеации микротрубочек на centrosоме,

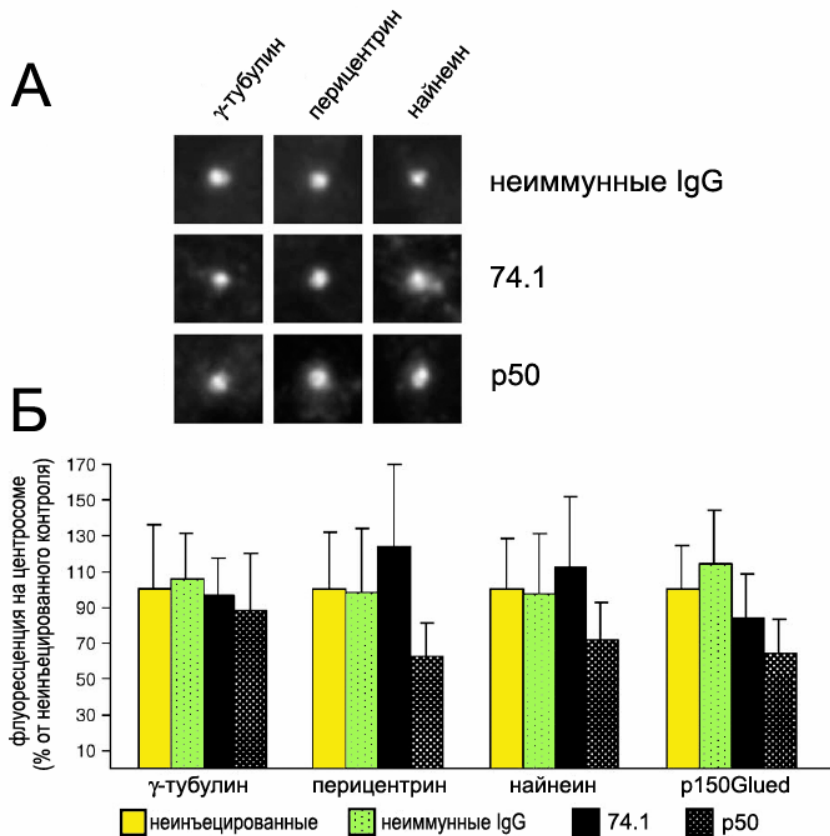


Рисунок 51. Инъекции ингибиторов динеина существенно не изменяют содержание белков центросомы.

А) Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к основным белкам центросомы – γ-тубулину (левая колонка), перицентрину (средняя колонка) или найнеину (правая колонка) в контрольных клетках, инъецированных неиммунными мышиными IgG (верхний ряд), в клетках, инъецированных 74.1 (средний ряд) или рекомбинантным p50 (нижний ряд). Во всех инъецированных клетках γ-тубулин, перицентрин и найнеин связаны с центросомой.

Б) Сравнение количества связанных с центросомой белков (слева направо: γ-тубулин, перицентрин, найнеин и p150Glued) в неинъецированных клетках и клетках, микроинъецированных контрольными IgG, антителами 74.1 или субъединицей динактина p50. Инъекции p50 приводят к небольшому снижению на центросоме уровня перицентрина, найнеина и p150^{Glued}; в то время как инъекции антител 74.1 не влияют заметным образом на уровень содержания центросомных белков.

либо утратой центросомой способности удерживать микротрубочки в виде радиальной звезды – либо же обоими этими процессами. Как следует из §5 этой главы, до сих пор мы не могли исключать влияния ингибирования динеина на процессы нуклеации на центросоме. Чтобы проверить гипотезу о том, что динеин вовлечён в нуклеацию микротрубочек, мы трансфицировали клетки кДНК, кодирующей связывающийся с микротрубочками GFP-слитый белок EB1. Особенностью EB1 является то, что этот связывающийся с микротрубочками белок специфически метит растущие плюс-концы цитоплазматических

микротрубочек в клетках. Частота зарождений флуоресцентных точек на центросоме, таким образом, обеспечивает возможность напрямую оценить её нуклеирующую активность (Piehl et al, 2004).

Мы обнаружили, что, как и в случае с контрольными клетками, в клетках, инъецированных ингибиторами динеина, кометы EB1 появлялись из одиночной точки, соответствующей центросоме (рис 52А). Статистический анализ показал, что среднее число таких случаев зарождения было одинаковым в контрольных клетках и инъецированных ингибиторами динеина (рис 52Б). Отсюда мы сделали вывод, что для нуклеации микротрубочек на центросоме активность цитоплазматического динеина не требуется.

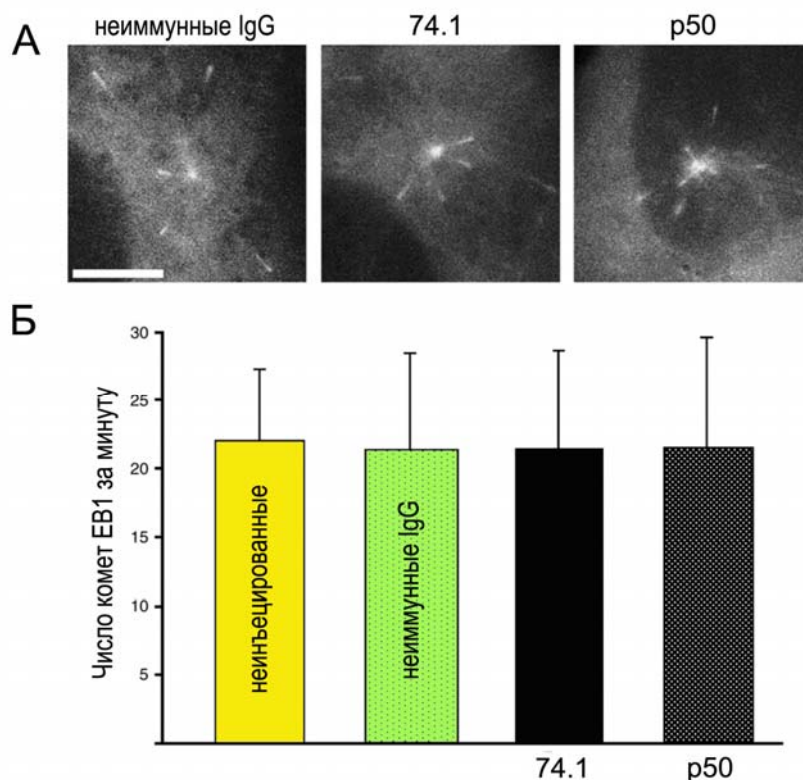


Рисунок 52. Инъекции ингибиторов динеина не влияют на нуклеирующую активность центросомы.

А) Отдельные кадры, на которых представлены GFP-EB1 кометы у центросом, полученные 60 минут спустя после инъекций в клетки неиммунных IgG (левая панель), антител 74.1 (средняя панель) или рекомбинантной субъединицы динактина p50 (правая панель). Кометы GFP-EB1 вылетают из области центросом в клетках, инъецированных ингибиторами динеина, свидетельствуя о том, что центросомы не утратили своей способности нуклеировать микротрубочки.

Б) Подсчёт количества комет GFP-EB1, вылетающих из центросомы в контрольных неинъецированных клетках или в клетках, инъецированных неиммунными IgG (5 мг/мл), антителами 74.1 (5 мг/мл) или рекомбинантной субъединицей динактина p50 (20 мг/мл). Приблизительно равные количества комет GFP-EB1 вылетают из центросом в контрольных и инъецированных ингибиторами динеина клетках.

Отсутствие влияния ингибиторов динеина на темпы нуклеации микротрубочек наводят на мысль, что подавление активности динеина ускоряет процессы открепления микротрубочек из состава радиальной звезды. Для проверки этой гипотезы мы инъецировали клетки антителами 74.1 и проводили видеосъёмку микротрубочек в centrosomal области с высоким временным разрешением. Мы обнаружили, что в клетках, инъецированных антителами к динеину, дезорганизация радиальной системы микротрубочек часто сопровождается откреплением от centrosомы целых пучков микротрубочек (рис 53, слева). Такие пучки микротрубочек никогда не высвобождались из centrosомы в контрольных клетках, инъецированных неиммунными IgG (рис 53 справа). Это свидетельствует о том, что рост скорости открепления микротрубочек от радиальной звезды, которое наблюдается в клетках с ингибированным динеином, является специфичным эффектом. Отсюда, в свою очередь, следует однозначный вывод о том, что активность динеина требуется именно для удержания микротрубочек на centrosоме в интерфазных клетках.

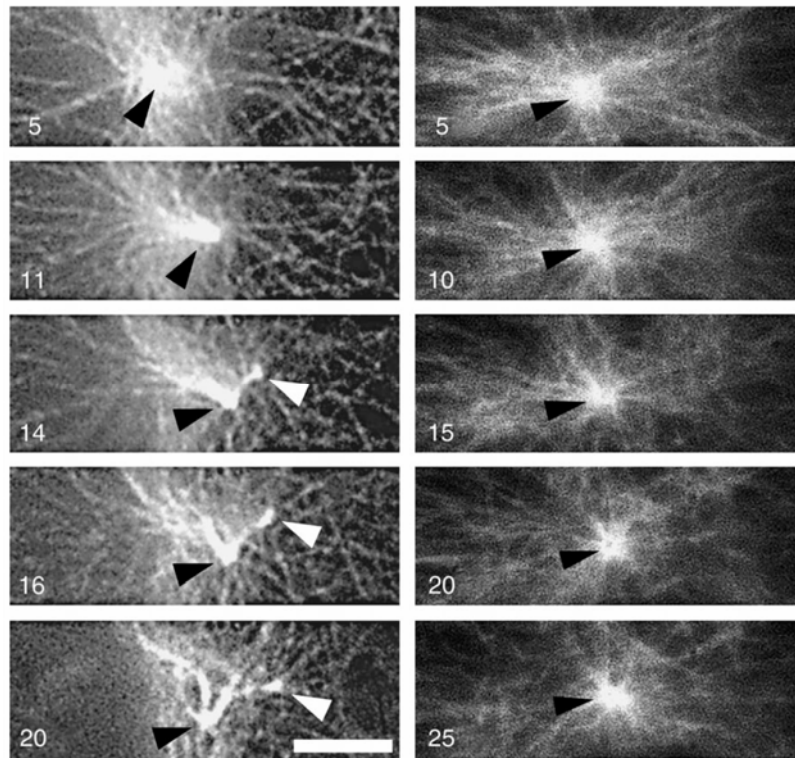


Рисунок 53. Инъекции антител 74.1 приводят к откреплению микротрубочек от centrosомы.

На панелях представлены последовательные снимки микротрубочек на centrosомах клеток, инъецированных антителами к динеину 74.1 (слева) или контрольными IgG (справа). Чёрными стрелками обозначено положение centrosом, белая стрелка указывает на пучок микротрубочек, открепляющийся от centrosомы. Числа обозначают время в минутах, прошедшее с момента микроинъекций. В клетке, инъецированной антителами к динеину, между 11-й и 14-й минутами после инъекции происходит отхождение пучка микротрубочек от centrosомы, что вызывает существенное снижение уровня флуоресценции на ней. Масштабная линейка 10 мкм.

§ 19. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ РАБОТЫ ЦЕНТРОСОМНОГО ДИНЕИНА

Мы продемонстрировали, что инъекции интерфазных фибробластов ингибиторами динеина приводят к быстрому нарушению радиальной организации микротрубочек в инъецированных клетках. При этом такое нарушение никак не коррелирует с уменьшением скорости нуклеации микротрубочек на центросоме или с утратой основных компонентов центросомы. Однако скорость высвобождения микротрубочек из состава радиальной звезды в клетках с подавленной активностью динеина заметно увеличена. Наши результаты, таким образом, показывают, что динеин стабилизирует радиальную организацию микротрубочек в интерфазе посредством удержания их в виде радиальной звезды.

В наших экспериментах не было показано корреляции между разрушением радиальной системы микротрубочек посредством ингибиторов динеина и уровнем содержания основных белков центросомы, ответственных за нуклеацию и заякоривание микротрубочек – ввиду незначительности временного промежутка после ингибирования динеина. В то же время предыдущие исследования показывали, что активность динеина может быть вовлечена и в круговорот белковых компонентов центросомы (см., например, Zimmerman and Doxsey, 2000). Однако наш экспериментальный подход кардинально отличается от тех, что использовались во всех предыдущих исследованиях. Вместо длительного воздействия на клетки ингибиторами динеина (Young et al, 2000; Dammermann and Merdes, 2002; Quintyne et al, 1999), мы осуществляли видеомикроскопическую съёмку организации микротрубочек сразу после микроинъекций ингибиторов в клетки. Если круговорот центросомных белков в интерфазе – относительно медленный процесс, то короткий временной интервал между моментом микроинъекции и началом видеозаписи в наших экспериментах может быть явно недостаточным для сколько-нибудь различного снижения уровня белков на центросоме. Таким образом, наши данные в принципе не исключают возможности того, что активность динеина вносит вклад в круговорот белков центросомы. Вместо этого, результаты наших экспериментов приводят к выводу, что динеин как минимум играет ещё и дополнительную роль в поддержании сфокусированной организации микротрубочек в интерфазных клетках.

Наши данные свидетельствуют против версии о том, что динеин принимает участие в нуклеации микротрубочек на центросомах интерфазных клеток. Это вывод следует из не только из экспериментов по восстановлению разобранных микротрубочек и экспериментов по сборке звёзд микротрубочек *in vitro*. Это напрямую следует из экспериментов, в которых при помощи EB1-GFP непосредственно оценивали темпы нуклеации микротрубочек на центросомах контрольных клеток и клеток с подавленной активностью динеина. С другой стороны, недавние исследования показали, что очищенный динеин сам по себе обладает

способностью нуклеировать микротрубочки в системе *in vitro* (Malikov et al, 2004). Это видимое несоответствие может объясняться вовлечением в процесс нуклеации микротрубочек множества факторов. А именно, в данном исследовании мы подавляли активность динеина в живых клетках, где сборка микротрубочек определяется нуклеирующей активностью связанных с центросомой γ -тубулиновых кольцевых комплексов (Zheng et al, 1995; Oakley and Oakley, 1989; Stearns and Kirschner, 1994). Присутствие этих сильных центров нуклеации сохраняет концентрацию свободных молекул тубулина в цитоплазме на устойчиво низком уровне (Kirschner and Mitchison, 1986), и следовательно, подавляет таким образом нуклеацию микротрубочек другими молекулами со слабой нуклеирующей активностью, таких как цитоплазматический динеин. Таким образом, в течение интерфазы, активность динеина не усиливает видимым образом нуклеацию новых микротрубочек на центросоме, а вместо этого препятствует отсоединению микротрубочек, уже находящихся в составе радиальной звезды, чем предохраняет их от разборки с минус-конца.

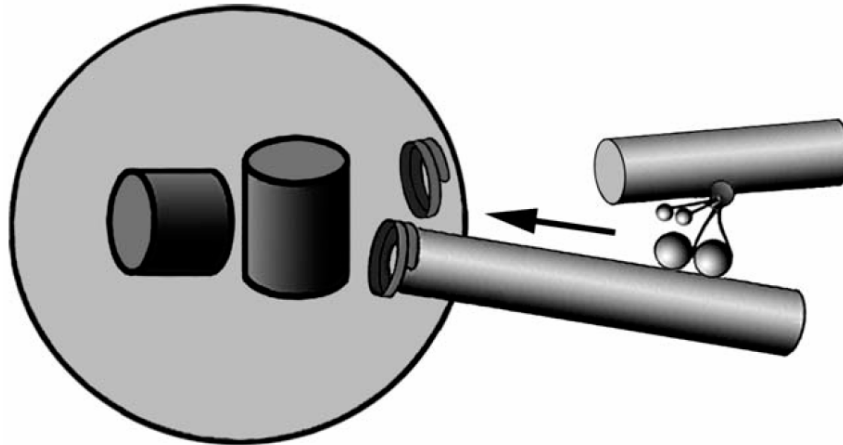


Рисунок 54. Гипотеза об удержании микротрубочек на центросоме интерфазной клетки с помощью динеина.

Динеин способен удерживать высвобождающиеся микротрубочки, связываясь с ними и транспортируя их обратно на центросому. Сходный механизм отвечает за организацию посредством динеина полюсов веретена деления во время митоза. Таким образом, механизм организации радиальной системы микротрубочек посредством динеина, по-видимому, консервативен у интерфазных и митотических клеток.

Таким образом, полученные данные наглядно демонстрируют, что в интерфазных клетках динеин удерживает микротрубочки на центросоме, и этот механизм не связан с поддержанием на определённом уровне центросомных белков, заякоривающих микротрубочки. Мы выдвинули гипотезу, что основной функцией этого механизма является возвращение микротрубочек, высвободившихся из центросомных сайтов нуклеации или заякоривания. Чтобы вернуть на место высвободившуюся микротрубочку, динеин может связаться с ней посредством динактина или других, в настоящий момент ещё не

идентифицированных микротрубочки-связывающих белков, и подтянуть назад минус-концом вперёд вдоль микротрубочек, остающихся заякоренными на центросоме (рис 54). Подобный механизм мы видим в митотических клетках, где динеин-зависимый транспорт микротрубочек по микротрубочкам поддерживает существование полюсов митотического веретена деления. Таким образом, наша работа демонстрирует ещё и тот факт, что механизмы организации цитоплазматических микротрубочек в радиальные системы консервативны у митотических и интерфазных клеток.

§ 20. К ВОПРОСУ ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА

Перед тем как перейти к заключительной части работы, посвящённой транспорту органелл по сети актиновых филаментов, необходимо обсудить понятие эффективности внутриклеточного транспорта. Первые две части работы были посвящены изучению различных механизмов, формирующих в итоге радиально-симметричную транспортную систему, состоящую из микротрубочек. Основной логической предпосылкой, объединяющей все эти исследования, является мысль о том, что звезда динамичных микротрубочек, связанных с моторными белками разной направленности, является наиболее эффективным способом доставки грузов в любой участок цитоплазмы. Под эффективностью в данном случае понимается перемещение органелл с наименьшими затратами энергии и с наибольшей скоростью, при этом требуется минимизировать объём участков цитоплазмы, «не охваченных» транспортом. Если сравнивать, например, актиновую и тубулиновую транспортные системы, то очевидно, что транспорт по актину заметно уступает по эффективности, во многом благодаря однонаправленности транспорта и относительно коротким расстояниям, преодолеваемым за единичное перемещение груза. Микрофиламенты расположены хаотично, и поэтому перемещение на значительные расстояния не прямолинейны, как в случае направленного транспорта по микротрубочкам, что удлиняет путь перевозимого груза. Кроме того, хотя транспорт в обратном направлении в исходную точку по ряду хаотичных микрофиламентов, случайно выстроившихся соответствующим образом, с математической точки зрения не невозможен, вероятность этого близка к нулю. Градиентное падение плотности радиальных микротрубочек по направлению от центра к краям клетки не приводит к уменьшению эффективности транспорта в периферийных областях цитоплазмы, поскольку компенсируется динамикой плюс-концов микротрубочек. В этих областях концы микротрубочек постоянно «исследуют» цитоплазму в поисках объекта транспорта, а в центральном районе клетки, где микротрубочки гораздо стабильнее, их плотность и без этого достаточна для обеспечения транспорта.

Таким образом, вполне правомерно использование термина «эффективность внутриклеточного транспорта», который помогает оценить научную значимость полученных данных о формировании симметричной звезды микротрубочек. Когда мы говорим об эффективности транспорта, далеко не всегда это напрямую связано, например, с жизнеспособностью клеток. В самом деле, необходима ли такая звезда для жизнедеятельности всех без исключения клеток животных? Очевидно, что нет. Хорошо известно, что радиальность обычно исследуют фактически в системе 2D – на адгезивных линиях распластанных клеток – и в клетках, взятых из тканей организма, чаще всего звезды микротрубочек не наблюдается. Кроме того, многие клеточные культуры, вроде классической HeLa, также не могут похвастаться в интерфазе красивым радиальным расположением микротрубочек, что не снижает их жизнеспособность и не мешает им активно делиться. Мы проводили отдельные серии экспериментов, связанные с проверкой жизнеспособности клеток, в которых эффективный транспорт был нарушен вследствие нарушения радиальности микротрубочек.

Известно достаточное количество способов нарушить упорядоченность системы клеточных микротрубочек – от добавления в культуральную среду таксола, стабилизирующего микротрубочки (Schiff and Horwitz, 1980) до ингибирования динеин-динактинового комплекса, рассмотренного выше. Однако все они имеют ярко выраженные побочные эффекты, нарушающие нормальную жизнедеятельность клетки. Недавно было показано, что к хаотизации микротрубочек в клетке ведёт ингибирование GSK-3 β киназы путём РНК-интерференции (Fumoto et al., 2006). Известно, что GSK-3 киназу в клетках можно заингибировать добавлением в культуральную среду инсулина (Welsh et al., 1993) или хлорида лития (Ryves et al., 2001). Кроме того, недавно были получены данные, что добавление в среду эпидермального фактора роста также ведёт к дезорганизации системы микротрубочек в клетках HeLa (Kharchenko et al., 2007).

Мы решили подобрать условия культивирования клеток Vero таким образом, чтобы получить жизнеспособную популяцию, в которой у большинства клеток микротрубочки не радиальны. Для этого мы добавляли инсулин (20 мкг/мл) или хлорид лития (5 мМ) к клеткам культуры Vero и оценивали радиальность микротрубочек в клетках спустя месяц после начала эксперимента, пересекая клетки всякий раз при достижении конfluence монослоя или сменяя среду на свежую каждые 3-4 дня. Мы наблюдали снижение степени радиальности микротрубочек у клеток, культивировавшихся в присутствии хлорида лития (микротрубочки сохраняли радиальность у 38% клеток). В присутствии инсулина эффект нарушения радиальности был ниже – количество клеток с радиальными микротрубочками падало всего лишь до 60%. Однако присутствие в культуральной среде инсулина сильно замедляло рост

клеток, а присутствие хлорида лития приводило к практической остановке роста, что было подтверждено МТТ-тестом. Также были проведены эксперименты по культивированию клеток Vero при различном содержании сыворотки в культуральной среде. Известно, что весь комплекс необходимых клеткам ростовых факторов содержится именно в сыворотке, которая поэтому является необходимым компонентом культуральных сред. При низком содержании в среде сыворотки (1%) происходило замедление роста клеток. Избыток в среде сыворотки новорожденных телят (20%) не приводил к статистически достоверным изменениям в строении системы микротрубочек. Однако при избытке в среде эмбриональной телячьей сыворотки (18,5% вместо обычных 7%) наблюдалось нарушение радиальности микротрубочек в клетках (оно падало с 75% до 56% по визуальной оценке и с 94% до 68% при оценке с помощью программы Метаморф) (Рис. 55). При этом скорость роста клеток не изменялась, что также было подтверждено МТТ-тестом. Клетки с нарушенной радиальностью микротрубочек культивировали в избытке сыворотки в общей сложности в течение 7 месяцев. При этом замедления скорости роста по сравнению с клетками контрольной группы не было зафиксировано, что свидетельствует о том, что никакие жизненно важные процессы клеток затронуты не были. В клетках с неупорядоченными микротрубочками не была ингибирована нуклеация микротрубочек на центросомах (Рис. 55), и содержание γ -тубулина и найнеина в них оставалось прежним, однако заякоривание микротрубочек несколько нарушалось. Аппарат Гольджи в таких клетках был слегка диспергирован, но при этом сохранял способность к поляризации на краю экспериментальной раны монослоя. Подводя итоги этих экспериментов, можно сделать вывод о том, что клетки млекопитающих с нарушенной архитектурой системы клеточных микротрубочек вполне способны жить и размножаться в культуре.

Помимо этого, мы провели ряд экспериментов, чтобы выяснить, не является ли хаотичность микротрубочек непреодолимым препятствием для процесса клеточной локомоции. Для этого мы получали цитопласты клеток CV-1 с центросомой и без неё, и наблюдали выдвижение в рану монослоя цитопластов, соответственно, с радиальной и хаотичной системой микротрубочек. Оказалось, что цитопласты без центросомы способны вползать в рану, и средние значения скоростей цитопластов с центросомой и без неё составили $5,6 \pm 3,8$ и $5,1 \pm 3,1$ мкм/час соответственно. При сравнении полученных данных между собой посредством критерия Стьюдента оказалось, что различие незначимо ($P > 0,05$), хотя скорости движения обоих типов цитопластов были достоверно ниже скорости движения целых клеток ($P < 0,05$).

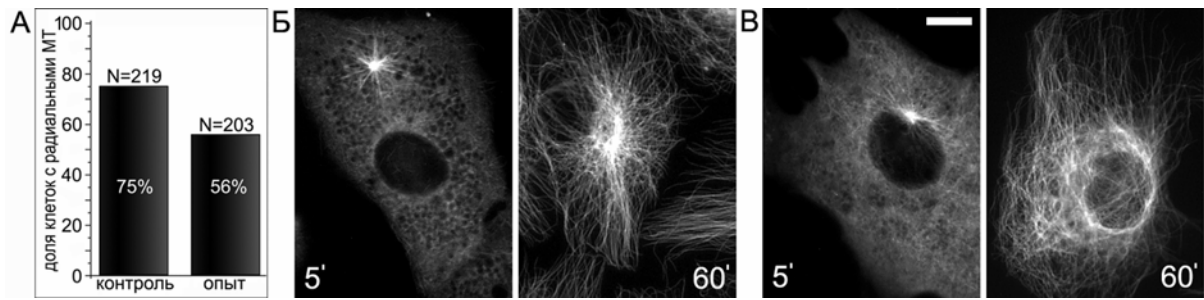


Рисунок 55. Избыток эмбриональной сыворотки в культуральной среде приводит к нарушению радиального расположения микротрубочек в клетках.

(А) Гистограмма количества клеток с радиальными микротрубочками в популяции. Приведены данные визуальной оценки, программа *Metamorph* даёт сходную картину с числовыми данными 94% и 68% для клеток контроля и опыта соответственно. (Б) – восстановление микротрубочек после предварительной разборки нокодазолом в клетках контроля, приведена морфология микротрубочек на 5 и 60 минут после начала восстановления. Видно постепенное увеличение размеров звезды микротрубочек, растущих от centrosомы. (В) – восстановление микротрубочек в клетках, растущих при избытке эмбриональной сыворотки. Видно, что спустя час после начала восстановления микротрубочки в клетках неупорядочены, хотя на начальном этапе хорошо видны маленькие звёзды микротрубочек, заправляемых на centrosоме. Масштабная линейка 10 мкм.

Означает ли всё это, что радиальность микротрубочек не играет вовсе никакой роли и понятие эффективности внутриклеточного транспорта носит лишь умозрительный характер? Очевидно, что ответ «нет» должен подтверждаться демонстрацией наглядного примера того, как чёткая радиальность микротрубочек, отходящих из центра клетки от centrosомы, обуславливает максимально возможную скорость и направленность клеточного транспорта. Такой пример хорошо известен – это пигментные клетки некоторых рыб, земноводных и моллюсков. Быстрота и слаженность, с которой происходит процесс агрегации и начальный этап дисперсии пигментных гранул, сделали меланофоры модельным объектом для исследования процессов транспорта по микротрубочкам. Система микротрубочек в этих клетках строго радиальна, centrosома находится в самом центре клетки, и более того – клетка представляет собой симметричный диск, благодаря чему архитектура тубулиновой транспортной сети становится геометрически безупречной. И именно в таких клетках транспорт по микротрубочкам максимально эффективен – ведь от его скорости зависит порой выживание целого организма, например, детёныша каракатицы, мгновенно изменяющего цвет в случае опасности.

Таким образом, хотя жизнеспособность клеток напрямую не связана со строением тубулиновой транспортной сети, архитектура системы микротрубочек является одним из главных факторов, определяющих эффективность внутриклеточного транспорта.

§ 21. РЕЗЮМЕ

Обобщая результаты, изложенные во второй части работы, можно заключить, что нами впервые продемонстрировано участие двух белков centrosомы в заякоривании микротрубочек – процессе, во многом определяющим архитектуру тубулинового цитоскелета. Одним из них является динеин/динактиновый комплекс, выполняющий на centrosоме не описанную никем ранее структурно-образующую функцию. В системах *in vitro* и путём прижизненных наблюдений *in vivo* было продемонстрировано, что подавление его активности приводит к дезорганизации системы микротрубочек. Кроме того, было показано, что работа динеина на centrosоме связана не с нуклеацией, а с удержанием микротрубочек на centrosоме. Второй белок – это серин-треониновая протеинкиназа LOSK. Посредством опытов *in vivo* и *in vitro* было продемонстрировано, что данная киназа участвует в заякоривании микротрубочек, и что ингибирование её активности приводит к истощению пула centrosомного динактина и нарушению радиальной организации микротрубочек.

Ниже приводится выносимое на защиту положение, сформулированное на основе результатов, полученных в этой части работы:

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.

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

Как уже упоминалось выше, помимо основной транспортной системы клетки – тубулиновой, представленной микротрубочками – цитоскелет клеток животных образует ещё одну. Вторая транспортная система представляет собой сеть актиновых микрофиламентов, по которым органеллы перемещаются при помощи миозиновых моторов.

Актиновая транспортная сеть отличается от тубулиновой не только отсутствием геометрически правильной организации элементов цитоскелета, входящих в её состав. Другим фундаментальным отличием является однонаправленность транспорта по актину, в отличие от двунаправленного транспорта по микротрубочкам. Вопрос одно- или двунаправленности перемещения органелл по элементам цитоскелета при помощи моторных белков является ключевым при определении эффективности внутриклеточного транспорта. Традиционно считалось, что двунаправленность или однонаправленность транспорта зависят от наличия в клетке соответствующих моторных белков. Однако некоторое время назад был описан миозин VI, который в системе *in vitro* перемещается к минус-концам актиновых микрофиламентов. Было также показано, что в клетке он присутствует на поверхности мембранных органелл наряду с другими моторами. Однако в отличие от миозина V, миозин VI, судя по всему, не выполняет в клетках транспортных функций.

Таким образом, неизбежно возникает противоречие – ведь если направление транспорта по элементам цитоскелета зависит лишь от наличия в цитоплазме соответствующих моторных белков, то в клетках должен присутствовать двунаправленный транспорт по актину, чего не наблюдается в действительности. При этом плюс-концевой транспорт по сети коротких микрофиламентов посредством миозина V, «перешагивающего» с одного микрофиламента на другой, играет важную роль во многих клеточных процессах; и логично было бы наблюдать двунаправленный транспорт по актиновым филаментам. Отсюда следует, что исходное предположение является неверным и возможность двунаправленного транспорта вдоль микрофиламента определяется какими-то иными, ещё неизвестными, факторами. В заключительной части данной работы приведены результаты исследования, демонстрирующего, что же на самом деле определяет одно- или двунаправленность внутриклеточного транспорта по актиновым микрофиламентам.

§ 1. СТАБИЛИЗАЦИЯ АКТИНА ВЛИЯЕТ НА ДИСПЕРГИРОВАНИЕ ПИГМЕНТНЫХ ГРАНУЛ, НЕ ВЛИЯЯ НА ИХ АГРЕГАЦИЮ

В многочисленных работах, посвящённых миозин-зависимому транспорту мембранных органелл, актиновым филаментам отводится роль «рельсов», по которым перемещаются молекулярные моторы (Berg et al, 2001; Krendel and Mooseker, 2005; Mooseker and Cheney, 1995; Tuxworth and Titus, 2000). Было показано, что эти филаменты высокодинамичны, и что мономеры актина в их составе постоянно обмениваются с мономерами, находящимися вокруг в цитоплазме, путём конкурентного роста и укорочения микрофиламентов на противоположных концах (Pollard and Borisy, 2003). Хотя к настоящему времени уже было хорошо известно, что динамика актиновых филаментов играет важную роль для многих функций, выполняемых элементами актинового цитоскелета, роль такой динамики в миозин-зависимом транспорте органелл никогда до этого не изучалась. Итак, задачей нашего исследования стало изучение роли динамики микрофиламентов в процессах миозин-зависимого транспорта мембранных органелл.

В качестве экспериментальной системы для изучения этого мы использовали меланофоры ксенопуса (Nascimento et al, 2003). Главная функция меланофоров заключается в быстром перераспределении пигментных гранул, которые агрегируют в клеточном центре или же равномерно распределяются по цитоплазме (Nascimento et al, 2003). Процессы агрегации и дисперсии к настоящему времени изучены достаточно подробно. В то время как агрегация пигментных гранул зависит исключительно от микротрубочек, дисперсия включает в себя кинезин-зависимый транспорт гранул вдоль радиальных микротрубочек, и последующий миозин-зависимый транспорт вдоль хаотично расположенных актиновых филаментов. Воздействие на меланофоры веществ, разрушающих микротрубочки, с последующим воздействием стимулов к дисперсии обеспечивает хорошую экспериментальную систему для изучения актинового компонента транспорта органелл (Rodionov et al, 1998).

На начальном этапе наших исследований мы решили проверить гипотезу о том, что динамика актиновых филаментов действительно важна для транспорта органелл по актину. Для этого мы изучили агрегацию и дисперсию пигмента в меланофорах, обработанных актин-стабилизирующим веществом джасплакинолидом (Bubb et al, 1994). Для уменьшения вероятности возникновения неспецифических эффектов воздействия этим веществом, мы брали джасплакинолид в низкой концентрации (1мкМ) (Cramer, 1999), и кроме того, воздействовали им на клетки в течение короткого промежутка времени (5 минут). Мы обнаружили, что в то время как кинетика агрегации пигментных гранул (то есть процесса,

зависящего исключительно от микротрубочек) была абсолютно нормальной, скорость диспергирования пигмента (то есть процесса, комбинирующего как актин-зависимый, так и зависимый от микротрубочек виды транспорта) была существенно снижена в обработанных джасплакинолидом клетках (рис 56 и видео 14-17). Эти данные свидетельствуют о том, что стабилизация актиновых филаментов джасплакинолидом специфически влияет на зависящий от них компонент транспорта пигментных гранул.

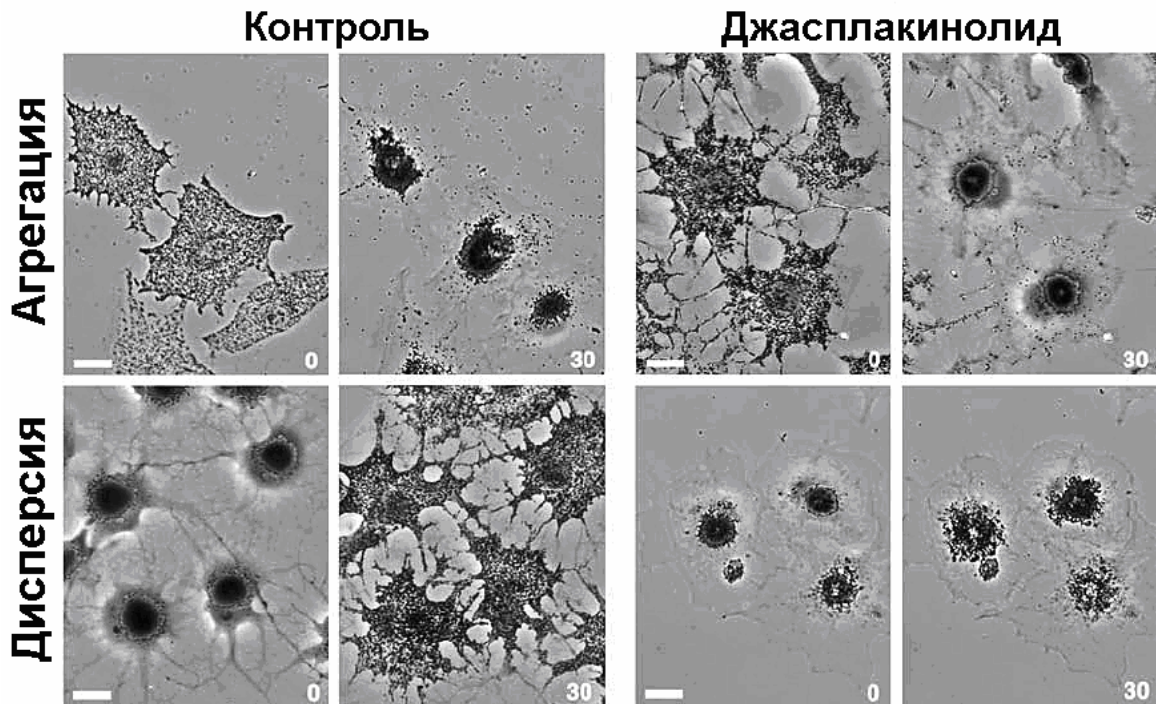


Рисунок 56. Обработка меланофоров джасплакинолидом подавляет дисперсию меланосом, не влияя на их агрегацию

Фазовоконтрастные снимки меланофоров: обработанных мелатонином, индуцирующим агрегацию пигмента (верхний ряд), или меланоцит-стимулирующим гормоном, индуцирующим дисперсию пигмента (нижний ряд). Левая панель – без джасплакинолида, правая панель – в присутствии джасплакинолида (1 мкМ). Пары снимков в каждой панели демонстрируют одни и те же клетки до и 10 минут после добавления гормонов. Видно, что агрегация пигмента проходила с нормальной кинетикой в обоих случаях, а скорость дисперсии пигмента существенно снижалась при обработке клеток джасплакинолидом. Числа показывают время в минутах, масштабная линейка равна 20 мкм.

§ 2. ДИНАМИКА АКТИНА НЕОБХОДИМА ДЛЯ МИОЗИН-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА ОРГАНЕЛЛ

В следующих экспериментах мы изучили, как воздействует джасплакинолид непосредственно на актин-зависимый транспорт в отсутствие такого компонента как микротрубочки. Для этого мы исследовали воздействие различных веществ,

стабилизирующих актиновые микрофиламенты, на движение пигментных гранул в меланофорах, обработанных предварительно разрушающим микротрубочки веществом нокодазолом (Rodionov et al, 1998). В соответствии с предыдущими наблюдениями (Rodionov et al, 1998), пигментные гранулы в обработанных нокодазолом клетках непрерывно двигались в присутствие стимула к дисперсии пигмента, что было хорошо видно в световой микроскоп при использовании метода фазового контраста. Вскоре после воздействия джасплакинолида на такие клетки (5 минут инкубации), видимое движение гранул драматическим образом уменьшилось (видео 18 и 19). Это свидетельствует о том, что обработка джасплакинолидом ингибирует движение гранул вдоль актиновых филаментов. Чтобы количественно оценить этот эффект, мы отложили на графике средние квадраты расстояний, пройденных индивидуальными пигментными гранулами за отрезок времени (рис 57А) и использовали двумерную модель диффузии, чтобы количественно охарактеризовать движение пигментных гранул. Это было сделано путём вычисления коэффициентов диффузии (определяемых как наклон кривой среднего квадратичного смещения с течением времени, аппроксимированной к прямой линии) (Slepchenko et al, 2007) для движения гранул при разных условиях. Обработка джасплакинолидом приводила к уменьшению величины коэффициента диффузии примерно в восемь раз по сравнению с необработанными контрольными клетками (до 0.48×10^{-3} мкм²/с по сравнению с 4.03×10^{-3} мкм²/с в контрольных клетках). Значительное ингибирование наблюдали также в случае, если вместо обработки джасплакинолидом клетки инъецировали фаллоидином – другим актин-стабилизирующим веществом, отличающимся по химическому строению от джасплакинолида (Dancker et al, 1975). Результатом инъекций фаллоидина было падение коэффициента диффузии до 0.91×10^{-3} мкм²/с по сравнению с 3.79×10^{-3} мкм²/с, которые мы наблюдали в случае контрольных клеток, инъецированных буфером (рис 57А). Из этих экспериментов следует, что влияние стабилизирующих актин веществ на транспорт пигментных гранул и в самом деле связано с ингибированием динамики актина, а не является специфическим химическим свойством, в частности, джасплакинолида.

Ранее было показано, что ингибирование внутриклеточного миозина Va путём сверх-экспрессии доминантно-негативной транскрипированной конструкции миозина Va приводит к полному подавлению актин-зависимого транспорта пигментных гранул (Rogers et al, 1999). Чтобы сравнить степень такого ингибирования с тем, что мы наблюдаем при использовании джасплакинолида, мы оценивали актин-зависимое движение пигментных гранул в клетках, трансфицированных доминантно-негативным конструктором миозина и обработанных нокодазолом для того, чтобы разобрать микротрубочки. Мы обнаружили, что в таких клетках актин-зависимый транспорт был подавлен до уровня, сходного с таковым при обработке

джасплакинолидом (рис 57А, MST-GFP; $0,39 \times 10^{-3}$ мкм²/с). Это ещё раз подтверждает тот факт, что стабилизирование актина в клетках посредством джасплакинолида приводит к очень существенному подавлению транспорта пигментных гранул вдоль актиновых филаментов. И это подтверждает наш предварительный вывод о том, что динамика актиновых филаментов необходима для этого транспорта.

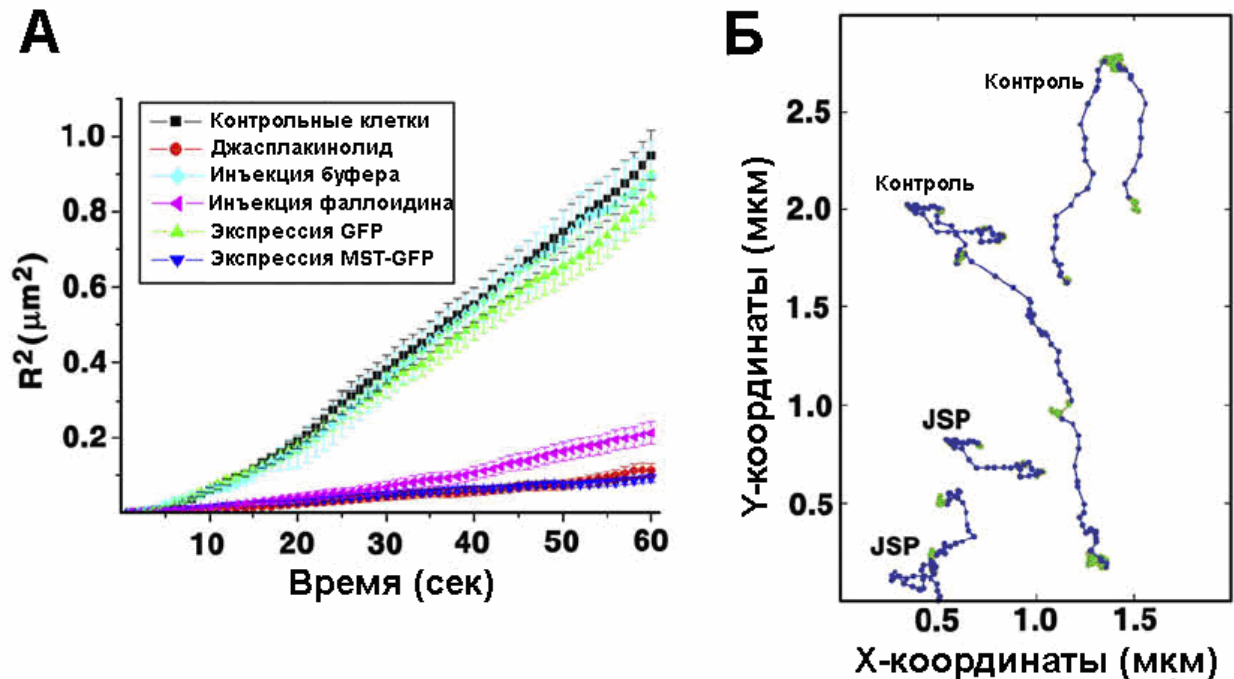


Рисунок 57. Стабилизация актиновых филаментов подавляет транспорт меланосом.

(А). Динамика актин-зависимого движения пигментных гранул, подсчитанного в клетках с разобранными цитоплазматическими микротрубочками. На графиках представлено изменение с течением времени средних квадратов расстояния, пройденного пигментными гранулами из стартовой точки. Представлены данные в контрольных клетках (чёрные квадраты); клетках, обработанных джасплакинолидом (1 мкМ) в течение 5 минут (красные кружки); клетках, инъецированных раствором фаллоидина (100 мкМ) (пурпурные треугольники); инъецированных буфером клетках (голубые ромбы); клетках, сверхэкспрессирующих GFP (зелёные треугольники) или доминантно-негативный конструктор миозина Va (MST-GFP) – синие треугольники. Видно, что обработка клеток джасплакинолидом или микроинъекция их раствором фаллоидина снижает подвижность пигментных гранул до уровня, наблюдаемого у меланофоров, сверхэкспрессирующих доминантно-негативный миозин Va. Погрешность соответствует $\pm SD$.

(Б). Разложение траекторий движения пигментных гранул в клетках с разрушенными микротрубочками на линейную составляющую (синее) и на случайные смещения, обусловленные диффузией (зелёные) посредством multiscale trend analysis в контрольных клетках (две верхних траектории) и в обработанных джасплакинолидом (две нижних). Видно, что длина линейных сегментов траекторий, которые соответствуют актин-зависимым пробежкам, существенно короче в клетках, обработанных джасплакинолидом.

§ 3. АНАЛИЗ ДВИЖЕНИЯ МЕЛАНОСОМ И ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ АКТИНА МЕТОДОМ FRAP

Хотя величина коэффициента диффузии является общепринятым параметром для описания абсолютного смещения пигментных гранул за единицу времени (Gross et al, 2002), она не даёт возможности оценить длину одиночных линейных смещений частиц и их скоростей на этих отрезках, которые соответствуют индивидуальным событиям транспорта вдоль актиновых филаментов. Скорее, она описывает сразу все типы поведения пигментной гранулы, включая паузы между пробежками и случайные смещения пигментных гранул, не зависящие от моторных белков. Подобные ограничения сильно затрудняют оценку влияния стабилизации актиновых филаментов именно на опосредованный миозином актин-зависимый компонент транспорта – в отличие от оценки суммарного смещения пигмента в клетке. Для того чтобы оценить это воздействие обособленно от других, мы провели детальный анализ траекторий пигментных гранул путём разложения их на составные части: на линейные пробежки вдоль актиновых филаментов, и на случайные перемещения, похожие на диффузию – используя в качестве математического инструмента так называемый *multiscale trend analysis* (МТА) (Zaliapin et al, 2005) (рис 57Б). Мы обнаружили, что в соответствии с результатами наших визуальных наблюдений и в соответствии с вычислениями коэффициента диффузии, обработка джасплакинолидом существенно (примерно в три раза) уменьшала длину линейных пробежек по актину и количество времени, которое пигментные гранулы проводили, перемещаясь вдоль актиновых филаментов (таблица 4). Скорость актин-зависимого движения также заметно снижалась. Таким образом, актин-зависимое движение пигментных гранул и в самом деле было подавлено в клетках со стабилизированными актиновыми филаментами.

ТАБЛИЦА 4. Параметры актин-зависимого движения пигментных гранул и лизосом.

	Пигментные гранулы		Лизосомы	
	Контроль	Джасплакинолид	Контроль	Джасплакинолид
Число проанализированных пробежек	767	504	559	532
Длительность пробежек (мин)	0.21 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Длина пробежек (мкм)	0.41 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Скорость пробежек (мкм/мин)	2.05 ± 0.04	1.40 ± 0.04	2.60 ± 0.05	2.40 ± 0.05
Время, проведённое на актине (%)	66 ± 0.5	24 ± 0.5	68 ± 0.8	42 ± 0.7

Для того чтобы ещё раз подтвердить данные результаты, было проведено несколько дополнительных серий контрольных экспериментов. В первую очередь было необходимо подтвердить, что наша обработка джасплакинолидом и в самом деле стабилизирует актиновые филаменты в меланофорах. Для этого мы изучали динамику актина в отсутствие и в присутствие джасплакинолида в клетках, микроинъектированных родамин-меченым актином, используя метод FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*, восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания). Восстановление флуоресценции актина после обесцвечивания небольшого участка цитоплазмы проходило гораздо медленнее в клетках, обработанных джасплакинолидом, чем в контрольных – что становится очевидным из графика интенсивности флуоресценции актина в зоне обесцвечивания (рис 58, видео 20 и 21). Отсюда можно сделать вывод, что, как и ожидалось, обработка джасплакинолидом и в самом деле приводит к подавлению динамики актина.

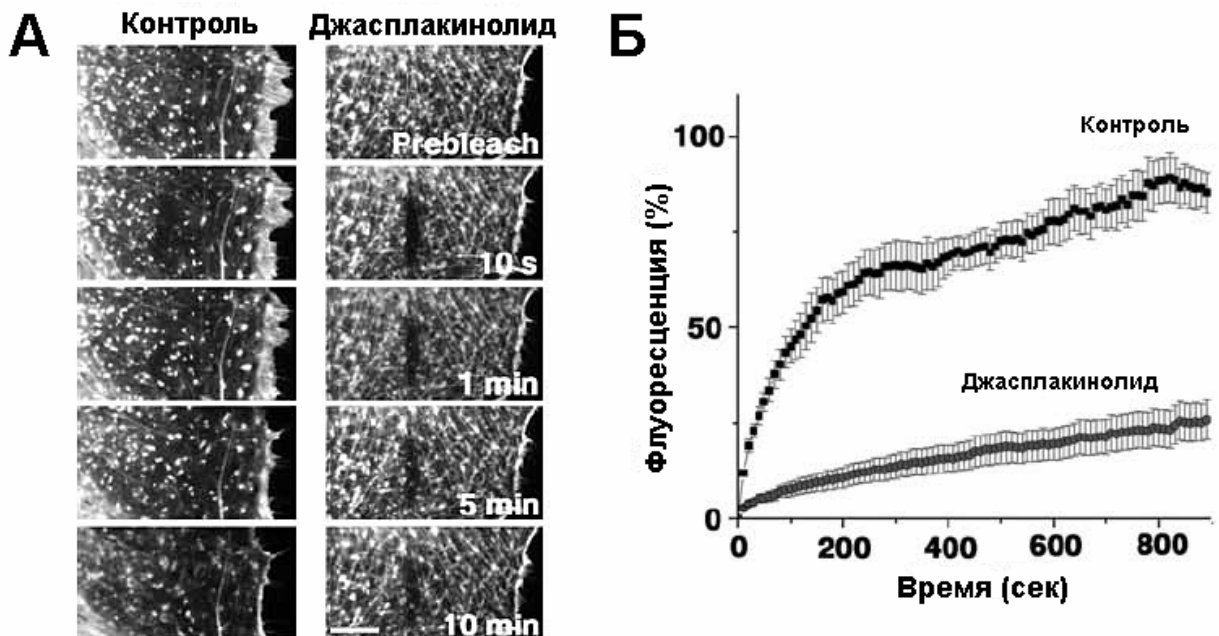


Рисунок 58. Обработка джасплакинолидом стабилизирует актиновые филаменты. FRAP-анализ скоростей обмена актиновых филаментов в контрольных и обработанных джасплакинолидом клетках

(А) Последовательность кадров, демонстрирующих зону обесцвечивания в контрольных необработанных (слева) или обработанных джасплакинолидом (справа) клетках. Числа обозначают время, прошедшее после выжигания. Масштабная линейка 10 мкм.

(Б) График восстановления флуоресценции в зонах обесцвечивания, расположенных на равном расстоянии как от края, так и от центра клеток в участках цитоплазмы, способных обеспечивать актин-зависимый транспорт. Чёрные квадраты соответствуют контрольным клеткам, серые кружки – клеткам, обработанным джасплакинолидом. Погрешность соответствует SEM, подсчитанной для 10 различных клеток. Видно, что восстановление флуоресценции актина происходит значительно быстрее в контрольных клетках, чем в обработанных джасплакинолидом.

§ 4. СТАБИЛИЗАЦИЯ АКТИНА НЕ СВЯЗАНА СО СТРУКТУРНОЙ ПЕРЕСТРОЙКОЙ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА

Итак, методом FRAP мы выяснили, что динамика актина в клетках, как и ожидалось, существенно подавляется сразу после добавления джасплакинолида. Далее мы исследовали теоретическую возможность того, что подавление транспорта пигментных гранул путём обработки джасплакинолидом может быть обусловлено перестройкой (или какой-либо реорганизацией) актинового цитоскелета, вызванной этим веществом. Для этого мы в деталях изучили организацию актиновых филаментов до и после воздействия джасплакинолида – как посредством прижизненной световой микроскопии клеток, микроинъектированных родамин-меченым актином, так и посредством электронной микроскопии платиновых реплик отдельных участков зафиксированных клеток, обработанных субъединицами миозина 1 для того чтобы декорировать актиновые филаменты.

Прижизненные снимки одних и тех же клеток до и спустя 5 минут после начала воздействия показали, что обработка джасплакинолидом не приводит к заметным перераспределениям флуоресценции актина (рис 59А). Электронная микроскопия платиновых реплик продемонстрировала, что общее распределение актиновых филаментов (рис 59Б), так же как и их локальная плотность (рис 59В) были сходными в обработанных джасплакинолидом и в контрольных необработанных меланофорах. При этом локальная плотность определялась как общая длина актиновых филаментов в расчёте на единицу площади в десяти различных полях зрения. Отсюда следует, что кратковременное воздействие на меланофоры низких концентраций джасплакинолида, используемых в наших экспериментах, не приводит к заметным изменениям в организации актиновых филаментов в клетках, подвергшихся обработке. Следовательно, ингибирование актин-зависимого транспорта пигментных гранул, наблюдаемое в обработанных джасплакинолидом клетках, никак не может быть объяснено изменениями в пространственной организации актиновых филаментов.

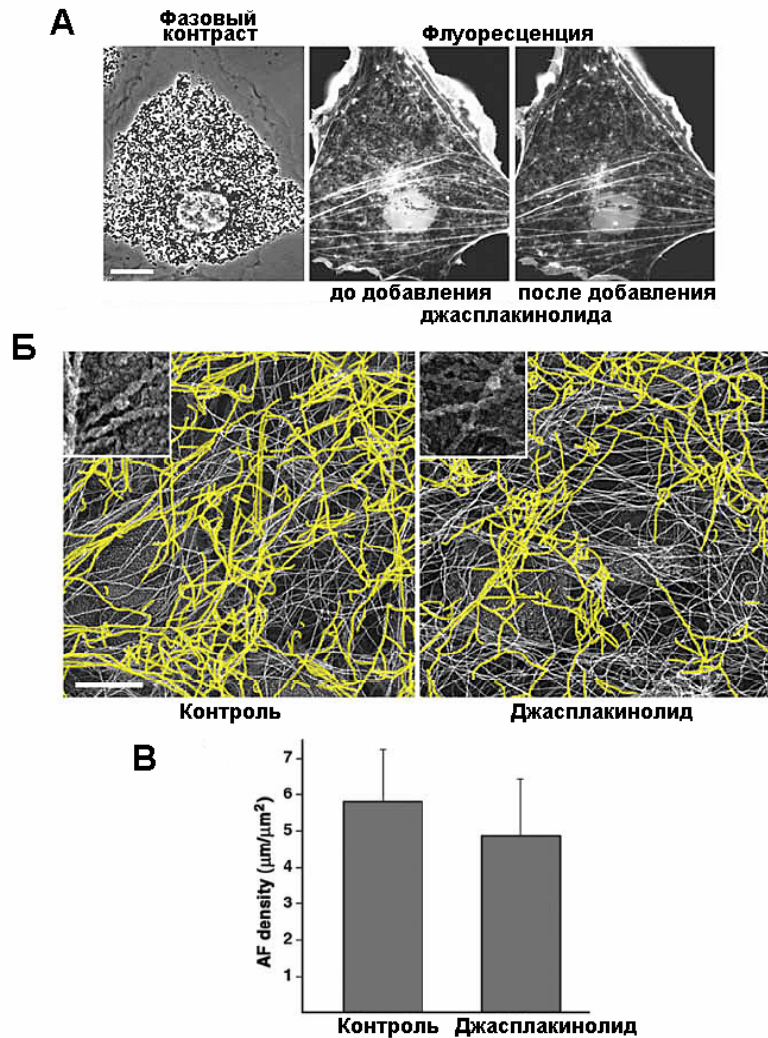


Рисунок 59. Обработка джасплакинолидом не приводит к заметному изменению пространственной организации микрофиламентов или к изменению уровня полимеризованного актина в цитоплазме.

(А) Распределение флуоресценции актина в одной и той же клетке до (в середине) или 5 минут спустя (справа) воздействия джасплакинолида. Для того чтобы пометить актиновые филаменты, клетки были инъецированы родамин-меченым актином за два часа до того, как были сделаны снимки. Слева приведён фазовоконтрастный снимок, который показывает распределение пигментных гранул в этой клетке. Видно, что обработка джасплакинолидом не оказывает заметного влияния на распределение флуоресценции актина. Масштабная линейка 20 мкм.

(Б). Электронные микрофотографии платиновых реплик участков цитоплазмы, расположенных на равных расстояниях от клеточного центра и края клетки в контрольных необработанных (слева) и обработанных джасплакинолидом меланофорах (справа). Характерная канатовидная внешность актиновых филаментов (на вставке), дающая возможность идентифицировать их на электронных микрофотографиях, объясняется декорированием их S1 субфрагментами миозина во время подготовки препарата для электронной микроскопии (Rodionov et al, 1998). Декорированные S1 актиновые филаменты выделены жёлтым цветом. Видно, что обработка джасплакинолидом не изменяет распределения актиновых филаментов. Масштабная линейка 0,5 мкм.

(В). Определение плотности актиновых филаментов путём подсчёта длин актиновых филаментов на электронных микрофотографиях контрольных необработанных и обработанных джасплакинолидом клеток. Погрешность (SEM) приведена для десяти разных клеток. Видно, что джасплакинолид не влияет на плотность актиновых филаментов.

§ 5. ДЖАСПЛАКИНОЛИД НЕ ИНГИБИРУЕТ АКТИВНОСТЬ МИОЗИНА Va

Задачей следующей серии экспериментов была экспериментальная проверка теоретической возможности того, что джасплакинолид подавляет транспорт пигментных гранул вдоль актиновых филаментов путём ингибирования активности связанных с пигментными гранулами молекул моторного белка миозина. Чтобы это сделать, мы выделили пигментные гранулы из меланофоров и сравнили их движение вдоль актиновых филаментов, флуоресцентно меченых родамин-фаллоидином, в присутствии или в отсутствие джасплакинолида, в экспериментальной системе *in vitro motility assay*. В обоих препаратах, контрольном и обработанном джасплакинолидом, пигментные гранулы часто прикреплялись к актиновым филаментам и двигались вдоль них (рис 60А). В обоих препаратах эти случаи транспорта происходили со сходной частотой и со сходными скоростями ($3,47 \pm 0,17$ и $3,93 \pm 0,12$ мкм/мин в контрольных и обработанных джасплакинолидом препаратах соответственно, рис 60Б). Чтобы исключить возможность того, что в нашей системе *motility assay* актиновые филаменты связываются с джасплакинолидом и таким образом оттитровывают его из раствора, мы также изучили движение пигментных гранул вдоль стабилизированных джасплакинолидом актиновых филаментов, собранных из родамин-меченого актина. Оказалось, что в этих экспериментальных условиях пигментные гранулы двигались со скоростью $3,69 \pm 0,17$ мкм/мин, что очень сходно с контрольными образцами. Следовательно, подавление транспорта пигментных гранул в обработанных джасплакинолидом клетках не может быть объяснено ингибированием активности миозина Va или его способности осуществлять транспорт органелл вдоль актиновых филаментов.

§ 6. ДИНАМИКА АКТИНА СОДЕЙСТВУЕТ МИОЗИН-ЗАВИСИМОМУ ТРАНСПОРТУ

Приведённые выше эксперименты демонстрируют нам, что подавление динамики актиновых филаментов подавляет транспорт органелл вдоль них, не затрагивая при этом ни расположение или плотность самих актиновых филаментов, ни свойства миозина. Одно из возможных объяснений данного эффекта заключается в том, что непрерывный рост и укорочение актиновых филаментов создаёт временные переходы между соседними микрофиламентами и таким образом устраняет препятствия на пути следования гранул, предотвращая их запутывание в сети актиновых филаментов. Если это так, стабилизация

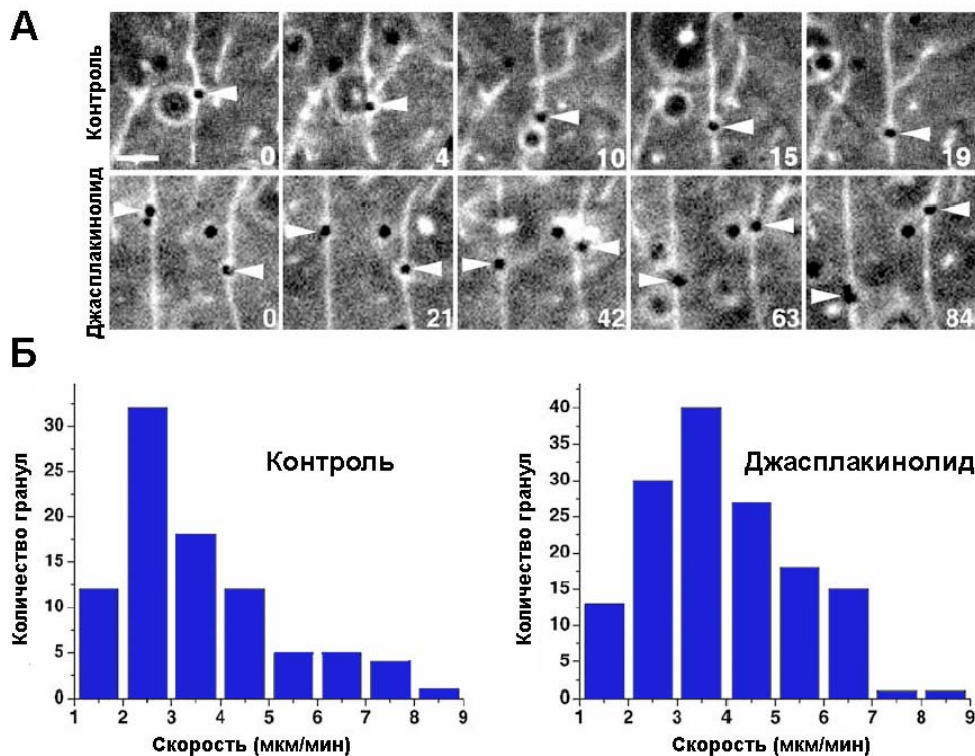


Рисунок 60. Джасплакинолид не влияет на миозин-зависимое движение выделенных пигментных гранул вдоль актиновых филаментов в системе *in vitro*.

(А). Последовательные кадры флуоресцентно меченых актиновых филаментов и пигментных гранул, снятые в отсутствие (верхняя панель) или в присутствии (нижняя панель) джасплакинолида (1 мкМ). Как в контрольном, так и в содержащем джасплакинолид препаратах, пигментные гранулы часто прикрепляются к актиновым филаментам и движутся по ним, показывая таким образом, что джасплакинолид не оказывает заметного влияния на миозин-зависимый транспорт пигментных гранул. Числа обозначают время в секундах. Масштабная линейка 0,5 мкм.

(Б). Частотные гистограммы распределения скоростей движения пигментных гранул по актиновым филаментам *in vitro* в отсутствие (слева) или в присутствии (справа) джасплакинолида. Как в присутствии, так и в отсутствие джасплакинолида, скорости движения достигают максимума на уровне ~3 мкм/мин, показывая таким образом, что вещество не оказывает сколько-нибудь заметного воздействия на активность миозина Va.

актиновых филаментов должна воздействовать на общую способность гранул перемещаться по цитоплазме, включая также и их транспорт по микротрубочкам. Наши исходные эксперименты в принципе продемонстрировали, что обработка джасплакинолидом не влияет на общее перераспределение пигмента во время его агрегации (рис 56) и, следовательно, выступают в качестве аргумента против такой возможности. Тем не менее всё ещё остаётся вероятность того, что в обработанных джасплакинолидом клетках происходят некие локальные местные изменения транспорта по микротрубочкам. Для того чтобы проверить это, мы изучили влияние стабилизации актиновых филаментов джасплакинолидом на параметры двунаправленного транспорта индивидуальных пигментных гранул вдоль

микротрубочек во время процесса агрегации пигмента. Оценка и анализ смещений индивидуальных гранул продемонстрировал, что подавление динамики актиновых филаментов джасплакинолидом не влияет на скорость или на продолжительность непрерывных пробежек пигментных гранул вдоль микротрубочек, равно как и на продолжительность пауз (рис 61). Следовательно, стабилизация актиновых филаментов во время обработки джасплакинолидом не индуцирует появление каких-то актиновых «ловушек» для пигментных гранул в цитоплазме.

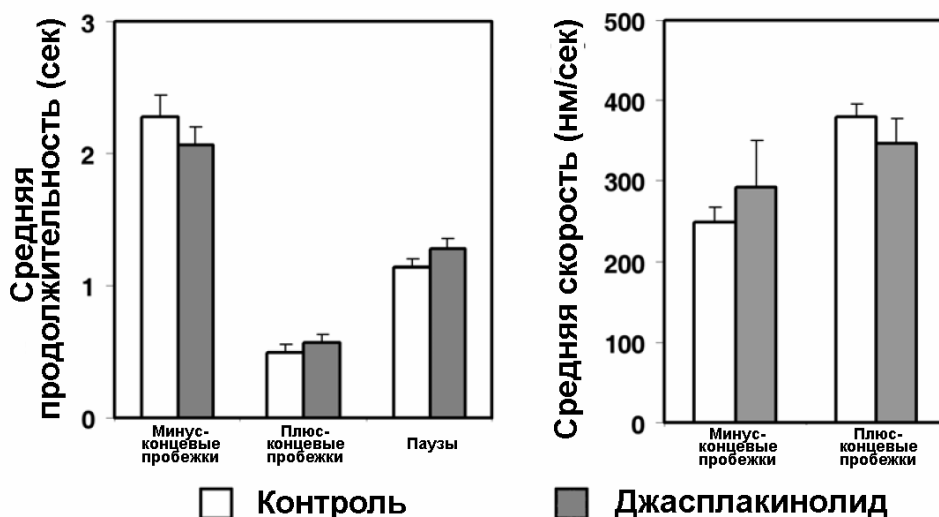


Рисунок 61. Обработка джасплакинолидом меланофоров не влияет на параметры движения пигментных гранул по микротрубочкам.

Средняя продолжительность минус-концевых пробежек, плюс-концевых пробежек или пауз (левая панель), и средние скорости минус-концевых и плюс-концевых пробежек, измеренные 5 минут спустя после стимуляции агрегации пигмента в контрольных клетках (белые столбики) и обработанных джасплакинолидом (серые столбики). Видно, что обработка джасплакинолидом не влияет на параметры двунаправленного транспорта пигментных гранул вдоль микротрубочек. Ошибка представляет собой $\pm SD$.

Изучение такой «ловушечной» способности стабилизированных актиновых филаментов было продолжено. Для этого мы проверили, действительно ли обработка джасплакинолидом влияет на диффузию растворимых цитоплазматических частиц, которые не являются грузами для миозин-зависимого транспорта. А именно, мы обсчитали перемещение флуоресцентных латексных зёрен, микроинъектированных в меланофоры в присутствии и в отсутствие этого вещества. Было обнаружено, что коэффициенты диффузии латексных частиц в присутствии и в отсутствие джасплакинолида очень близки ($0,41 \times 10^{-3}$ и $0,39 \times 10^{-3}$ мкм²/с, соответственно). Следовательно, стабилизация актиновых филаментов никак не ограничивала движение цитоплазматических частиц безотносительно к природе этой подвижности. Результаты этих

экспериментов говорят о том, что динамика актиновых филаментов содействует именно миозин-зависимому транспорту пигментных гранул посредством некоего специфического механизма, который влияет на способность актиновых «рельсов» самим обеспечивать движение органелл.

§ 7. МЕХАНИЗМ ТРАНСПОРТА ПО АКТИНУ

Чтобы проверить, применимы ли механизмы зависимо от динамики актина транспорта к транспорту иных органелл, нежели пигментные гранулы, мы проверили влияние стабилизации актиновых филаментов на транспорт лизосом, помеченных флуоресцентным маркером LysoTracker. Как и пигментные гранулы, лизосомы движутся вдоль актиновых «рельсов» посредством миозиновых моторов (Cordonnier et al, 2001). Декомпозиция (то есть разложение) траекторий лизосом посредством МТА продемонстрировала, что линейные актиновые пробежки были заметно короче в клетках, обработанных джасплакинолидом, и что время, проведённое ими на актине, уменьшалось. Хотя движение лизосом было затронуто в меньшей степени, чем движение пигментных гранул, (по всей видимости потому, что актин-зависимое движение вносит меньший вклад в транспорт лизосом), тем не менее, подавление подвижности лизосом было существенным (таблица 4). Следовательно, необходимость динамики актина не является специфическим свойством транспорта именно пигментных гранул. Динамика актина – универсальное свойство актин-зависимого движения мембранных органелл при помощи миозина.

Полученные результаты неизбежно приводят к выводу, что внутриклеточный транспорт органелл по актину обусловлен популяцией динамичных актиновых филаментов, которые теряют субъединицы актина на своих минус-концах и добавляют их к своим плюс-концам. Анализ данных, полученных посредством FRAP (см. раздел «Материалы и методы») показывает, что средняя скорость роста актиновых филаментов в цитоплазме составляет ~4,3 мкм/мин, что превышает скорость движения пигментных гранул или лизосом вдоль актиновых филаментов (таблица 4). Такой более быстрый рост филамента по сравнению со скоростью миозин-зависимого движения говорит о том, что миозиновые моторы, которые перемещают органеллы по направлению к растущим плюс-концам актиновых филаментов, никогда не достигнут концов транспортных «рельсов». Таким образом, рост актиновых филаментов должен существенно увеличивать дистанции, пробегаемые органеллами, путём увеличения длины «рельсов» как длины путей эффективного транспорта (рис 62). Ингибирование динамики актина подавляет добавление субъединиц к плюс-концам

актиновых филаментов, блокируя удлинение актиновых «рельсов» перед движущимися органеллами.



Рисунок 62. Роль динамики актина в миозин-зависимом транспорте пигментных гранул.

На схеме показано, что миозин *Va* транспортирует пигментные гранулы по направлению к растущим плюс-концам актиновых филаментов. Таким образом, рост актинового филамента увеличивает дистанцию пробега пигментной гранулы вдоль него.

Органеллы, достигающие конца такого нединамичного «рельса», будут вынуждены остановиться или же переключиться (то есть перепрыгнуть) на прилегающий соседний актиновый «рельс». Но для того, чтобы такое переключение произошло, плотность актиновых филаментов в цитоплазме должна быть достаточной для этого, так чтобы каждая органелла в каждый момент времени имела поблизости множество соприкасающихся актиновых филаментов. Однако, детальное изучение электронномикроскопических стереопар меланофоров (рис 63) показало, что несмотря на свою несомненно высокую плотность (рис 59), большинство актиновых филаментов не соприкасаются с поверхностью пигментных гранул. Это приводит к выводу, что перескакивание органелл на соседний прилегающий актиновый «рельс» – гораздо менее частое событие, чем непрерывный транспорт вдоль одного и того же филамента. Следовательно, органеллы, достигшие концов стабильных актиновых «рельсов», скорее всего вынуждены будут отвалиться в цитоплазму и прекратить своё перемещение. В масштабе всей клетки, такое ингибирование должно замедлять общее актин-зависимое движение по цитоплазме, как мы и наблюдаем в наших экспериментах.

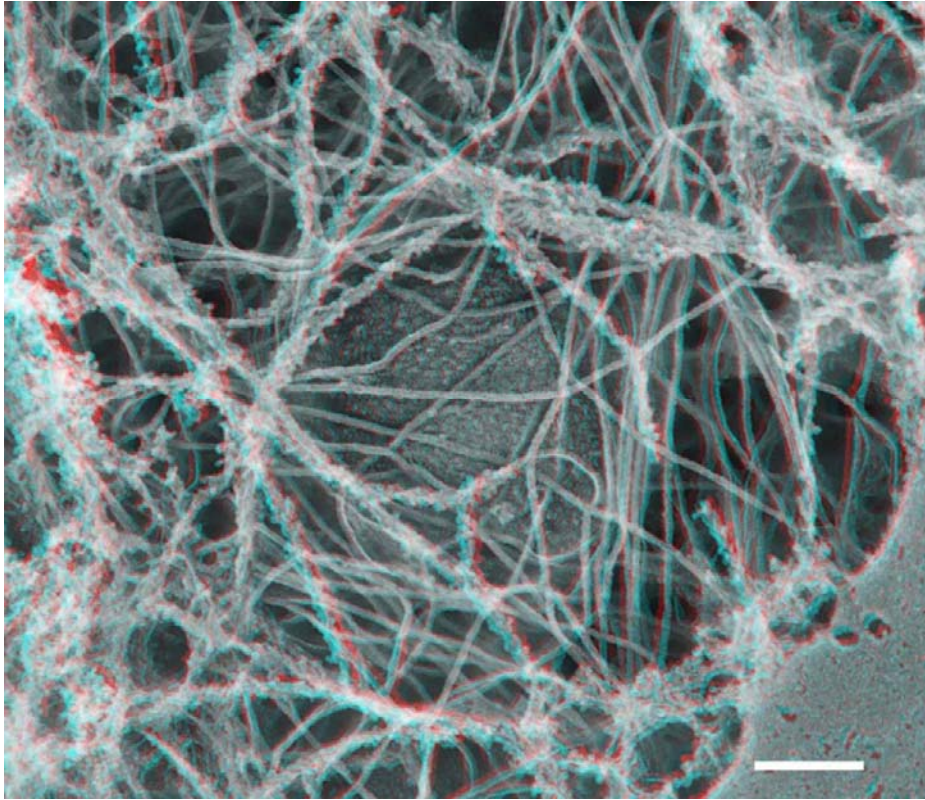


Рисунок 63. Электронномикроскопическая стереофотография цитоскелета меланофора ксенопуса.

Гладкие филаменты на фото – это промежуточные виментиновые филаменты, а филаменты с грубым неровным рельефом – это актиновые микрофиламенты, декорированные тяжёлым меромиозином. Актиновые филаменты, находящиеся вблизи пигментных гранул, на самом деле, не касаются их поверхности. Для появления 3D-эффекта этот снимок надо рассматривать через стандартные красно-синие очки.

Наши данные о роли динамики актина во внутриклеточном транспорте проливают свет на основные механизмы транспорта всех типов мембранных органелл, которые используют моторный белок миозин для движения вдоль актиновых филаментов. Актиновые филаменты высокодинамичны во всех типах эукариотических клеток, изученных до сих пор. Опубликованное время полупериода обмена для актиновых филаментов в клетках млекопитающих варьирует от нескольких секунд до нескольких минут (Theriot and Mitchison, 1991; Theriot and Mitchison, 1992; McGrath et al, 1998; Murthy and Wadsworth, 2005), и следовательно, находится примерно в том же диапазоне у меланофоров (~2 мин, рис 58Б). Из этого следует, что мембранные органеллы, такие как митохондрии (Hollenbeck and Saxton, 2005), синаптические пузырьки (Bridgman, 2004) и секреторные гранулы (Eichler et al, 2006), всегда движутся вдоль динамичных актиновых филаментов. Большинство миозинов транспортируют свои грузы к плюс- концам актиновых филаментов со скоростями, сопоставимыми со скоростями роста актиновых филаментов при физиологической

концентрации актина (Krendel and Mooseker, 2005; Pollard and Borisy, 2003). Следовательно, рост филамента должен являться существенным фактором, определяющим расстояния, на которые перемещаются мембранные органеллы в цитоплазме. Анализ роли динамики актиновых филаментов в транспорте других специфических типов мембранных органелл является интересным продолжением этой работы и полем для дальнейших экспериментов.

Общеизвестно, что актин-зависимое движение мембранных органелл и цитоплазматических частиц осуществляется по одному из двух независимых механизмов. Хотя некоторые органеллы, такие как пигментные гранулы, транспортируются вдоль актиновых филаментов моторным белком миозином (Krendel and Mooseker, 2005), другие могут проталкиваться сквозь цитоплазму актиновыми филаментами, собирающимися на их поверхности и часто образующими характерные «хвосты комет» (Boldogh and Pon, 2007; Frischknecht and Way, 2001; Hamon et al, 2006; Cameron et al, 2000; Taunton, 2001). Второй механизм, зависящий от процесса сборки актиновых филаментов, отвечает за транспорт внутриклеточных патогенов (Frischknecht and Way, 2001; Cameron et al, 2000; Stevens et al, 2006) и таких органелл, как эндосомы (Taunton, 2001) или митохондрии (Boldogh and Pon, 2007). В этом механизме сборка актиновых филаментов играет центральную роль, поскольку она обеспечивает движущую силу для транспорта. Полученные нами данные впервые продемонстрировали, что динамика актиновых филаментов необходима также и для транспорта при помощи моторного белка миозина. Таким образом, динамичность является фундаментальным свойством актиновых филаментов, которые играют существенную роль во всех типах актин-зависимого внутриклеточного транспорта.

Из этого неизбежно вытекает вывод о том, что двунаправленность транспорта по актину в клетке в принципе невозможна даже при наличии соответствующих минус-концевых моторных белков. В самом деле, стремительно разбирающийся минус-конец микрофиламента не даст возможности минус-концевому моторному белку переместиться на сколько-нибудь значимое расстояние, а замедление разборки путём стабилизации микрофиламента, в свою очередь, остановит и плюс-концевой транспорт. Таким образом, в заключительной части данной работы впервые показано, что однонаправленность цитоплазматического транспорта по актину определяется именно тредмиллингом микрофиламентов, образующих транспортную сеть, а не отсутствием в клетке соответствующих моторных белков. Это в корне меняет существовавшие до этого представления о роли элементов цитоскелета в процессах внутриклеточного транспорта; и теперь микрофиламенты больше не могут рассматриваться в качестве пассивного участника этих процессов.

Ниже приводится выносимое на защиту положение, сформулированное на основе результатов, полученных в этой части работы:

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 самих филаментов, образующих транспортную сеть, а не наличием или отсутствием в клетке соответствующих моторных белков.

6. ВЫВОДЫ

1. Позиция интерфазной centrosомы 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 centrosомы, 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 centrosоме, не влияя заметным образом на их нуклеацию.
4. Динеин удерживает микротрубочки на centrosоме, причём этот процесс не связан с транспортом основных функциональных centrosомных белков.
5. Активность протеинкиназы LOSK необходима для поддержания уровня centrosомного 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.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа посвящена изучению цитоскелета клеток животных как системы путей внутриклеточного транспорта. В ней были исследованы основные механизмы, определяющие архитектуру главной транспортной системы клетки – радиальной сети микротрубочек. В частности, был впервые описан механизм позиционирования centrosомы, определяющий центральную симметрию этой транспортной сети. Кроме того, впервые было продемонстрировано, что моторный белок динеин и киназа LOSK участвуют в процессах заякоривания микротрубочек, что обеспечивает геометрическую правильность тубулиновой транспортной системы. Помимо этого, впервые наглядно показана истинная причина однонаправленности внутриклеточного транспорта по второй транспортной системе клетки – сети актиновых микрофиламентов. Остановимся на этих результатах чуть более подробно.

В первой части работы описан саморегулирующийся механизм позиционирования centrosомы в интерфазных клетках животных. Сочетание методов прижизненной флуоресцентной видеомикроскопии с микроинъекциями различных ингибиторов и с локальным разрушением участка тубулиновой транспортной сети позволило получить новые оригинальные данные, которые легли в основу компьютерного моделирования. В результате проведённых исследований все аспекты процесса центрирования к настоящему времени полностью изучены. Нами были определены все силы, непосредственно воздействующие на микротрубочки (продуцируемые динеином, актомиозиновой системой и динамичными плюс-концами микротрубочек), и два регулятора данного процесса – белки RhoA и Cdc42. Также определён относительный вклад каждого из участников этого механизма и сведены вместе в рамках одной модели геометрические параметры системы (направление векторов сил, жёсткость отдельных микротрубочек, форма клетки) и размер физических величин (тянущие силы отдельных молекул моторных белков, количество контактов микротрубочек с актином).

Известно, что локализация centrosомы играет существенную роль при дифференцировке нейронов и эпителия, при поляризации клетки, а также контролирует процессы клеточной подвижности (Manneville and Etienne-Manneville, 2006). В контексте обсуждения внутриклеточного транспорта система микротрубочек рассматривается как наиболее эффективная транспортная система клетки именно благодаря центральной симметрии своей архитектуры. Наличие открытого нами механизма позиционирования обуславливает выполнение первого из двух обязательных условий, определяющих классическую архитектуру системы микротрубочек. Это условие заключается в центральном расположении центра организации транспортных путей, поскольку его ассиметричное

расположение неизбежно внесёт анизотропию в процессы транспорта, эффективность которого станет разной в различных областях клетки.

Второе условие радиальной симметричности тубулиновой транспортной системы – выполнение центросомой функции заякоривания, то есть удержания минус-концов микротрубочек. Эта функция остаётся до конца неизученной до сих пор, хотя к настоящему времени уже показано участие целого ряда белков в данном процессе. В представленной работе впервые было продемонстрировано участие в процессе удержания микротрубочек на центросоме двух абсолютно разных белков – динеина и протеинкиназы LOSK. Моторный белок динеин до этого был детально описан в качестве минус-концевого транслокатора, перемещающего грузы по микротрубочкам. Его роль в качестве структурно-образующего элемента цитоскелета показана здесь впервые. Серин-треониновая протеинкиназа LOSK была ранее открыта в нашей лаборатории, и функции этого белка как участника процесса заякоривания также впервые продемонстрированы в данной работе. Для обоих новых участников процесса заякоривания результаты прижизненных экспериментов *in vivo* полностью подтверждались впоследствии результатами экспериментов *in vitro*. Открытие двух новых участников процесса заякоривания микротрубочек на центросоме и описание механизма её позиционирования существенно углубляют имеющиеся представления об архитектуре тубулиновой транспортной сети.

В заключительной третьей части работы были изучены молекулярные механизмы транспорта по актиновым филаментам, позволившие выяснить один из важных аспектов внутриклеточного транспорта, остававшийся неясным в течение длительного времени. Ранее проведённые исследования демонстрировали присутствие в цитоплазме различных клеток животных моторного белка миозина VI и его способность к минус-концевому транспорту в системе *in vitro*. На клеточном же уровне двунаправленный транспорт по актину никогда никем не наблюдался. При описании миозин-зависимого транспорта по актину общепринятая аналогия с бегущим по рельсам поездом не объясняла данного факта, хотя она с успехом применяется при описании транспорта по микротрубочкам. Нашей заслугой стало то, что мы подвергли сомнению эту общепринятую аналогию и экспериментально доказали, что в случае транспорта по актину миозин можно сравнить разве что с поездом-путеукладчиком, перед которым постоянно укладываются новые рельсы, которые при этом разбираются позади него. В таком случае становится совершенно очевидным, что даже если прицепить к такому составу сзади второй тепловоз, готовый тянуть его в обратном направлении, это не приведёт к желаемым результатам. Другими словами, оказалось, что столь фундаментальное свойство внутриклеточного транспорта, как его одно- или двунаправленность, может зависеть не от наличия соответствующих моторных белков, а от

динамики самих филаментов, составляющих транспортную сеть. Таким образом, наши данные впервые позволили построить непротиворечивую схему внутриклеточного транспорта по актиновым микрофиламентам.

Понимание пространственных механизмов организации внутриклеточного транспорта даёт возможность подробнее исследовать многие его аспекты, исключительно важные с биомедицинской точки зрения. В частности, способы перемещения по цитоплазме клеток животных различного рода патогенов могут определять инфекционность того или иного возбудителя заболеваний. Исходя из этого, можно надеяться, что новые данные, изложенные в этой работе, будут иметь не только теоретическое, но и научно-практическое значение, и послужат основой для дальнейших исследований как фундаментальной, так прикладной направленности.

8. СПИСОК ВИДЕО

В приведённом ниже перечне содержится описание содержимого видеороликов, упоминание которых встречается в тексте диссертации. Соответствующее видео размещено в сети Интернет в качестве сопроводительного материала к статьям, опубликованным по теме диссертации (перечень статей находится на страницах 202-203).

1. Динамика микротрубочек на ближнем к микрокапилляру крае клетки
2. Динамика микротрубочек на дальнем от микрокапилляра крае клетки
3. Компьютерное моделирование диффузии нокодазола и димеров тубулина
4. Перемещение центросомы к области разборки микротрубочек
5. Перемещение центросомы от области разборки микротрубочек
6. Движение центросомы при разборке микротрубочек в присутствии C3-трансферазы
7. Движение центросомы при разборке микротрубочек в присутствии C3 и N17Cdc42
8. Компьютерное моделирование: контрольная клетка
9. Компьютерное моделирование: ингибирование динеина
10. Компьютерное моделирование: поднесение нокодазола
11. Компьютерное моделирование: поднесение нокодазола и ингибирование миозина
12. Система микротрубочек после микроинъекции 74,1
13. Система микротрубочек после микроинъекции CC-1
14. Контрольная клетка: агрегация меланосом
15. Контрольная клетка: дисперсия меланосом
16. Обработка джасплакинолидом: агрегация меланосом
17. Обработка джасплакинолидом: дисперсия меланосом
18. Движение меланосом при разобранных микротрубочках – контроль
19. Движение меланосом при разобранных микротрубочках – джасплакинолид
20. FRAP актиновых микрофиламентов - контроль
21. FRAP актиновых микрофиламентов - джасплакинолид

9. СПИСОК СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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.**, Nadezhkina 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 centrosоме 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.**, Nadezhkina 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 centrosоме // *Биохимия*. – 2007. – т.72. № 11. – с.1515-1524
7. **Burakov A.**, Kovalenko O, Semenova I, Zhapparova O, Nadezhkina E, Rodionov V. Cytoplasmic dynein is involved in the retention of microtubules at the centrosome in interphase cells // *Traffic*. – 2008 –Vol.9.№ 4. – p. 472-480.
8. **Burakov AV**, Zhapparova ON, Kovalenko OV, Zinovkina LA, Potekhina ES, Shanina NA, Weiss DG, Kuznetsov SA, Nadezhkina ES. Ste20-related Protein Kinase LOSK (SLK) Controls Microtubule Radial Array in Interphase // *Molecular Biology of the Cell*. – 2008. – Vol.19.№5. – 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.1635-1646.

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.4418-4427.

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

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. – с.116–128



10. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Воробьев И.А., Надеждина Е.С. Итоги науки и техники. Общие проблемы физ.-хим. биологии. // Москва:ВИНИТИ – 1987. – 160с

Григорьев И.С., Чернобельская А.А., Воробьев И.А. Нокодазол, винбластин и таксол в низких концентрациях нарушают локомоцию фибробластов и сальтаторные движения органелл. // Биол. мембраны. – 1999. –13 (1). – с.23-48.

Зиновкина Л.А., Надеждина Е.С. Центросомные белки: обзор // Биохимия. –1996. – №61. – с.1347-1365

Зиновкина Л.А., Полтараус А.Б., Соловьянова О.Б., Надеждина Е.С. Предполагаемая новая протеинкиназа клеток млекопитающих, ассоциированная с микротрубочками // Молекулярная биология. – 1998 – т.32.№2. – с.341-348

Минин А.А., Кулик А.В. Внутриклеточный транспорт. Принципы регуляции // Успехи биологической химии. – 2004. – т. 44. – с. 225-262

Надеждина ЕС, Зиновкина ЛА, Файс Д, Ченцов ЮС. Сперматозоиды выюна *Misgurnus fossilis* как объект для идентификации новых белков центросом. // Онтогенез. – 2001. – т.32 – с.45-50.

Смурова К.М., Алиева И.Б., Воробьев И.А. Динамика восстановления цитоплазматических микротрубочек после их разрушения нокодазолом в клетках культуры Vero. // Биологические мембраны. – 2002. – т.19(6) – с.472-482

Потехина ЕС, Зиновкина ЛА, Надеждина ЕС. Ферментативная активность протеинкиназы LOSK: возможная роль регулятора структурного домена. // Биохимия. – 2003. – т.68 –с.188-95.

Шанина Н.А., Иванов П.А., Чудинова Е.М., Северин Ф.Ф., Надеждина Е.С. Фактор инициации трансляции eIF3 может связываться с микротрубочками в клетках млекопитающих // Молекулярная биология. – 2001. – т.35. – с.638–646.

Abe, Y., Ohsugi, M., Haraguchi, K., Fujimoto, J., and Yamamoto, T. LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. // FEBS Lett. – 2006. – v.580. – p.782–788.

Adames, N. R., and Cooper, J. A. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. // J. Cell Biol. – 2000. – v.149. – p.863–874.

Adams, R.J., Pollard, T.D. Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin filaments by myosin-I. // Nature. – 1986. – v.322. – p.754–756.

Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M., Hirokawa, N. Kinesin family in murine central nervous system // J. Cell Biol. – 1992. – v.119. – p.1287–1296.

Akhmanova A., Hoogenraad C.C. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions.// Curr. Opin. Cell Biol. – 2005. – V.17. – P. 47-54.

- Alexandrova, A. Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J. M., Meister, J.-J., Bershadsky, A. D., and Verkhovsky, A. B. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. // PLoS ONE – 2008. – 3e3234.
- Allen W.E., Zicha D., Ridley A.J., Jones G.E. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis // J. Cell Biol. – 1998. – Vol.141. №5. – p.1147-1157
- Archambault V, Zhao X, White-Cooper H, Carpenter AT, Glover DM. Mutations in *Drosophila* Greatwall/Scant Reveal Its Roles in Mitosis and Meiosis and Interdependence with Polo Kinase.// PLoS Genet. – 2007. – v.3 – p.200.
- Archambault V, D'Avino PP, Deery MJ, Lilley KS, Glover DM. Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphoprime-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis. // Genes Dev – 2008. – v.22. – p.2707-20.
- Archambault V, Pinson X. Free centrosomes. Where do they all come from? // Fly. – 2010. – 4. – 172-177.
- Aronson JF. Demonstration of a colcemid-sensitive attractive force acting between the nucleus and a center. // J Cell Biol – 1971. – v.51(21) – 579-83.
- Askham, J. M., Vaughan, K. T., Goodson, H. V., and Morrison, E. E. Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. // Mol. Biol. Cell – 2002. – 13. – p.3627–3645.
- Balczon R, Varden CE, Schroer TA. Role for microtubules in centrosome doubling in Chinese hamster ovary cells. // Cell Motil Cytoskeleton – 1999 – v.42 – p.60–72.
- Barros, T. P., Kinoshita, K., Hyman, A. A., and Raff, J. W. Aurora A activates D-TACC-Msps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. // J. Cell Biol. – 2005. – v.170. – p.1039–1046.
- Bennett D, Alphey L. Cloning and expression of mars, a novel member of the guanylate kinase associated protein family in *Drosophila*. // Gene Expr Patterns. – 2004. – 4. – 529-35.
- Berg, J.S., Powell, B.C., and Cheney, R.E. A millennial myosin census. // Mol. Biol. Cell – 2001. – 12. – 780–794.
- Bicek, A. D., Tu"zel, E., Demtchouk, A., Uppalapati, M., Hancock, W. O., Kroll, D. M., and Odde, D. J. Anterograde microtubule transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. // Mol. Biol. Cell – 2009. – 20. – 2943–2953.
- Bjerknes, M. Physical theory of the orientation of astral mitotic spindles. // Science – 1986. – 234 – 1413–1416.
- Blangy A., Arnaud L., Nigg E.A. Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150. // J. Biol. Chem. – 1997. – V.272. – P. 19418-19424.
- Blocker A., Griffiths G., Olivo J.C., Hyman A.A., Severin F.F. A role for microtubule dynamics in phagosome movement // J. Cell Sci. – 1998. – Vol.111(Pt3) – p.303-12.

- Bloom G. S., Wagner M. C., Pfister K. K., Brady S. T., Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. // *Biochemistry* – 1988. – 27. – 3409
- Bobinnec Y., Khodjakov A., Mir L.M., Rieder C.L., Edde B., Bornens M. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol.143. – p.1575-1589
- Boldogh, I.R., and Pon, L.A. Mitochondria on the move. // *Trends Cell Biol.* – 2007. – 17. – p. 502–510.
- Bolhy S, Bouhrel I, Dultz E, Nayak T, Zuccolo M, Gatti X, et al. A Nup133-dependent NPC-anchored network tethers centrosomes to the nuclear envelope in prophase. // *J Cell Biol* – 2011 – 192 – p.855-71.
- Bormuth, V., Varga, V., Howard, J., and Schaäffer, E. Protein friction limits diffusive and directed movements of kinesin motors on microtubules. // *Science* – 2009. – 325 – p.870–873.
- Bornens M. Is the centriole bound to the nuclear membrane? // *Nature.* –1977. – 270 – p.80-82.
- Boveri, Theodor. Zellen-Studien II: Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megalocephala*. // Jena: Gustav Fischer Verlag. –1888. – Режим доступа:
<http://www.biodiversitylibrary.org/item/29952#page/7/mode/1up>
- Brady S. T., A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. // *Nature* – 1985. – 317. – p.73
- Brady S. T., Lasek R. J., Allen R. D., Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axon. // *Science* – 1982. – 216. – p.1129
- Brady S. T., Pfister K. K., Bloom G. S., A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. // *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* – 1990. –87. – p.1061
- Bridgman, P.S. Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. // *J. Cell. Biol.* – 1999 – 146 – p.1045–1060.
- Bridgman, P.C. Myosin-dependent transport in neurons. // *J. Neurobiol.* – 2004 – 58. – p.164–174.
- Brito, D. A., Strauss, J., Magidson, V., Tikhonenko, I., Khodjakov, A., and Koonce, M. P. Pushing forces drive the comet-like motility of microtubule arrays in *Dictyostelium*. // *Mol. Biol. Cell* – 2005. –16. – p.3334–3340.
- Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C., Kumar, S., Geisse, N. A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K. K., Ingber, D. E., and Weitz, D. A. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. // *J. Cell Biol.* – 2006. – 173. – p.733–741.
- Brown, S.S. Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1999. –15. – p.63–80.

Brown C.R., Doxsey S.J., Hong-Brown L.Q., Martin R.L., Welch W.J. Molecular chaperones and the centrosome. A role for TCP-1 in microtubule nucleation // *J. Biol. Chem.* –1996. – Vol.271 №2. – p.824-32.

Bryantseva SA, Zhapparova ON. Bidirectional transport of organelles: unity and struggle of opposing motors // *Cell Biol Int.* – 2012. –36(1). – p.1-6.

Bubb,M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L., and Korn, E.D. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – 269. – p.14869–14871.

Burke, B., and Roux, K. J. Nuclei take a position: managing nuclear location. // *Dev. Cell* – 2009. – 17. – p.587–597.

Burkhardt J.K., Echeverri C.J., Nilsson T. and Vallee R.B. Overexpression of dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution // *J. Cell Biol.* – 1997. –Vol.139. – p.469-484

Buss, F., Kendrick"Jones, J., Lionne, C., Knight, A.E., Cote, G.P., Paul Luzio, J. The localization of myosin VI at the golgi complex and leading edge of fibroblasts and its phosphorylation and recruitment into membrane ruffles of A431 cells after growth factor stimulation// *J. Cell Biol.*, –. 1998. –143. – p.1535–1545.

Cameron, L.A., Giardini, P.A., Soo, F.S., and Theriot, J.A. Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2000. – 1. – p.110–119.

Cantalupo G., Alifano P., Roberti V. et al. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. // *EMBO J.* – 2001. –V.20. –P.683–693.

Casenghi, M., Barr, F.A., and Nigg, E.A. Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome. // *J. Cell Sci.* – 2005. – 118. – p.5101–5108.

Castoldi, M., and Popov, A.V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. // *Protein Expr Purif.* – 2003. –32. – p.83–88.

Catlett, N.L., Weisman, L.S. The terminal tail region of a yeast myosin-V mediates its attachment to vacuole membranes and sites of polarized growth. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* –1998. – 95(25). – p.14799-804.

Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Pou's C. The Golgi is a microtubule-organizing organelle. // *Mol Biol Cell* –2001. –12. – p.2047–2060.

Cheney, R.E., Riley, M.A., Mooseker, M.S. Phylogenetic analysis of the myosin superfamily.// *Cell Motil. Cytoskeleton*, – 1993. –24. – p.215–223.

Cheney, R.E., O_Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E., Mooseker, M.S. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. // *Cell.* – 1993. – 75. – p.13–23.

Civelekoglu-Scholey, G., and Scholey, J. M. Mitotic force generators and chromosome segregation. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – 67, – p.2231–2250.

- Clark S.W., Meyer D.I. Centractin is an actin homologue associated with the centrosome. // *Nature*. – 1992. – V.359. – P. 246–250.
- Coluccio, L.M. Myosin I // *Am J Physiol.* – 1997. –273. – p.347–359.
- Compton DA. Focusing on spindle poles.// *J Cell Sci* –1998. –111. – p.1477–1481.
- Coquelle F.M., Caspi M., Cordelieres F.P. et al. LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. // *Mol. Cell. Biol.* –2002. – V.22. – P. 3089-3102.
- Cordonnier, M.N., Dauzonne, D., Louvard, D., and Coudrier, E. Actin filaments and myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes. // *Mol. Biol. Cell* – 2001. – 12. – p.4013–4029.
- Cramer L. Organelle transport: dynamic actin tracks for myosin motors. // *Curr Biol.* –2008. – 18(22): – p1066-8
- Cramer L.P. Molecular mechanism of actin-dependent retrograde flow in lamellipodia of motile cells // *Front. Biosci.* – 1997. –Vol.2. – p.260-270
- Cramer, L.P. Role of actin-filament disassembly in lamellipodium protrusion in motile cells revealed using the drug jasplakinolide. // *Curr. Biol.* – 1999. – 9, – p.1095–1105.
- Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. // *J. Cell Biol* – 2006; – 172: – p.41-53.
- Culver-Hanlon TL, Lex SA, Stephens AD, Quintyne NJ, King SJ. A microtubule-binding domain in dynactin increases dynein processivity by skating along microtubules.// *Nat Cell Biol* –2006. – 8. – p.264–270.
- Dammermann A, Merdes A. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1.// *J Cell Biol* –2002; –159: – p.255–266.
- Dancker, P., Low, I., Hasselbach, W., and Wieland, T. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. // *Biochim. Biophys. Acta* – 1975. – 400, – p.407–414.
- Davis A., Sage C.R., Dougherty C.A., Farrell K.W. Microtubule dynamics modulated by guanosine triphosphate hydrolysis activity of beta-tubulin // *Science*. –1994. – Vol.264(5160) – p.839-42.
- Deacon S.W., Serpinskaya A.S., Vaughan P.S. et al. Dynactin is required for bidirectional organelle transport. // *J. Cell Biol.* –2003. –V. 160. –P.297–301.
- Delgehyr, N., Sillibourne, J., and Bornens, M. Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. // *J. Cell Sci.* – 2005. – 118, – p.1565–1575.
- Dictenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, Young A, Vidair C, Zheng Y, Carrington W, Fay FS, Doxsey SJ. Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome.// *J.Cell Biol.*, – 1998 –141, – p.163–174.
- Dillmann J.F. 3rd and Pfister K. Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles // *J. Cell Biol.* –1994. – Vol.127. – p.1671-1681

- Dionne MA, Howard L, Compton DA. NuMA is a component of an insoluble matrix at mitotic spindle poles. // *Cell Motil Cytoskeleton* – 1999; – 42: – p.189–203.
- do Carmo Avides M. and Glover D.M. Abnormal spindle protein, ASP, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing centers // *Science*. –1999. – Vol.283. – p.1733-1735
- do Carmo Avides M., Tavares A. and Glover D.M. Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes // *Nat. Cell Biol.* –2001. – Vol.4. – p.421-424.
- Dogterom, M., and Leibler, S. Physical aspects of the growth and regulation of microtubule structures. // *Phys. Rev. Lett.* – 1993. –70, – p.1347–1350.
- Dogterom M, Yurke B. Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. // *Science* –1997. –278: – p.856–860.
- Dohner K., Wolfstein A., Prank U. et al. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. –V.13. –P.2795-2809.
- Donaldson M.M., Tavares A.A., Ohkura H., Deak P. and Glover D.M. Metaphase arrest with centromere separation in polo mutants of *Drosophila* // *J. Cell Biol.* –2001. –Vol.153. –p.663-676
- Downing K.H., Nogales E. Tubulin and microtubule structure // *Curr. Opin. Cell Biol.* –1998. – Vol.10. №1. – p.16-22. .
- Dujardin D, Barnhart L, Stehman S, Gomes E, Gundersen G, Richard V.. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement.// *J Cell Biol* –2003. –163. – p.1205–1211.
- Dujardin D.L. and Vallee R.B. Dynein at the cortex // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2002. –Vol.14. – p.44-49
- Eastwood SL, Walker M, Hyde TM, Kleinman JE, Harrison PJ. The DISC1 Ser704Cys substitution affects centrosomal localization of its binding partner PCM1 in glia in human brain. // *Hum Mol Genet* –2010 –19: – p.2487-96.
- Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. // *J Cell Biol.* –1998. – 143(3): – p.777-94.
- Echeverri C., Paschal B.M., Vaughan K.T. and Vallee R.B. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis // *J. Cell Biol.* –1996. –Vol.132. – p.617-633
- Eichler, T.W., Kogel, T., Bukoreshtliev, N.V., and Gerdes, H.H. The role of myosin Va in secretory granule trafficking and exocytosis. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – 34, – p.671–674.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Karasuyama, H., Yamada, E., Tsujikawa, K., Todokoro, K., and Nishida, E. Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells. // *Genes Cells* – 2000. – 5, – p.491–498.
- Endow, S.A., Henikoff, S., Soler, Niedziela L. Mediation of meiotic and early mitotic chromosome segregation in *Drosophila* by a protein related to kinesin. // *Nature*, – 1990 – 345, – p.81–83.

- Endow S. A. and Hatsumi M., A multimember kinesin gene family in *Drosophila*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1991 – 88, – p.4424
- Eshel D., Urrestarazu L.A., Vissers S., Jauniaux J.-C., van Vliet-Reedijk J.C., Planta R.J. and Gibbons I.R. Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol.90. – p.11172-11176
- Etienne-Manneville U. and Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ // *Cell.* – 2001. – Vol.106. – p.489-498
- Euteneuer U., Schliwa M. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. // *Nature.* – 1984. – 310 (5972), – p.58-61.
- Euteneuer U. and Schliwa M. Mechanism of centrosome repositioning during the wound response in BSC-1 cells // *J. Cell Biol.* – 1992. – Vol.116. – p.1157-1166
- Evans, L.L., Lee, A.J., Bridgman, P.C., Mooseker, M.S. Vesicle-associated brain myosin-V can be activated to catalyze actin-based transport. // *J. Cell Sci.*, – 1998 – 111, – p.2055–2066.
- Ezratty E.J., Partridge M.A., Gundersen G.G. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. // *Nat. Cell. Biol.* – 2005. – 7(6), – p.581-590.
- Fais D, Nadezhdina ES, Chentsov YuS. Evidence for the nucleus-centriole association in living cells obtained by ultracentrifugation. // *Eur J Cell Biol* – 1984; – 33: – p.190-6.
- Faivre-Moskalenko C. and Dogterom M. Dynamics of microtubule asters in microfabricated chambers: The role of catastrophes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol.99. – p.16788-16793
- Fath, K.R., Trimbur, G.M., Burgess, D.R. Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells. // *J. Cell Biol.*, – 1994 – 126, – p.661–675.
- Faulkner N.E., Dujardin D.L., Tai C.Y. et al. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – V. 2. – P.784 –791.
- Feng Y., Hodge D.R., Palmieri G., Chase D.L., Longo D.L., Ferris D.K. Association of polo-like kinase with α -, β - and γ -tubulins in a stable complex // *Biochem. J.* – 1999 – Vol.339. – p.435-442
- Foethke, D., Makushok, T., Brunner, D., and Ne'de'lec, F. Force- and length-dependent catastrophe activities explain interphase microtubule organization in fission yeasts. // *Mol. Syst. Biol.* – 2009. – 5, – p.1–6.
- Fridolfsson HN, Ly N, Meyerzon M, Starr DA. UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration. // *Dev Biol* – 2010; – 338: – p.237-50.
- Frischknecht, F., and Way, M. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. // *Trends Cell Biol.* – 2001. – 11, – p.30–38.

- Fumoto, K., Hoogenraad, C. C., and Kikuchi, A. GSK-3 β -regulated interaction of BICD with dynein is involved in microtubule anchorage at centrosome. // *EMBO J* – 2006. – 25, – p.5670–5682.
- Gaglio T, Dionne MA, Compton DA. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. // *J Cell Biol* – 1997; – 138: – p.1055–1066.
- Gaglio T, Saredi A, Bingham JB, Hasbani MJ, Gill SR, Schroer TA, Compton DA. Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. // *J Cell Biol* – 1996; – 135: – p.399–414.
- Ge X, Frank CL, Calderon de Anda F, Tsai LH. Hook3 interacts with PCM1 to regulate pericentriolar material assembly and the timing of neurogenesis. // *Neuron* – 2010; – 65: – p.191–203.
- Gerashchenko MV, Chernov Ivanenko IS, Moldaver MV, Minin AA. Dynein is a motor for nuclear rotation while vimentin IFs is a "brake". // *Cell Biol Int* – 2009; – 33: – p.1057–64.
- Gho, M., McDonald, K., Ganetzky, B., Saxton, W.M. Effects of kinesin mutations on neuronal functions. // *Science*, – 1992 – 258, – p.313–316.
- Gibbons BH, Asai DJ, Tang WJ, Hays TS, Gibbons IR. Phylogeny and expression of axonemal and cytoplasmic dynein genes in sea urchins. // *Mol Biol Cell*. – 1994 – 5(1): – p.57–70.
- Gill SR, Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. // *J Cell Biol* – 1991; – 115 – p.1639–1650.
- Gomes, E. R., Jani, S., and Gundersen, G. G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. // *Cell* – 2005. – 121, – p.451–463.
- Gonçalves J, Nolasco S, Nascimento R, Lopez Fanarraga M, Zabala JC, Soares H. TBCCD1, a new centrosomal protein, is required for centrosome and Golgi apparatus positioning. // *EMBO Rep* – 2010; – 11: – p.194–200.
- Gonzalez C, Saunders RD, Casal J, Molina I, Carmena M, Ripoll P, et al. Mutations at the asp locus of *Drosophila* lead to multiple free centrosomes in syncytial embryos, but restrict centrosome duplication in larval neuroblasts. // *J Cell Sci* – 1990; – 96: – p.605–16.
- Gonczy P., Pichler S., Kirkham M. and Hyman A.A. Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryos // *J. Cell Biol.* – 1999. – Vol.147. – p.135–150
- Goshima G, Nedelec F, Vale RD. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. // *J Cell Biol* – 2005; – 171: – p.229–240.
- Gould R.R., Borisy G.G. The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation // *J. Cell Biol.* – 1990. – Vol.73. – p.601–615
- Gorgidze L, Vorobjev I. Centrosome and microtubules behavior in the cytoplasts. // *J Submicrosc Cytol Pathol* – 1995. – 27: – p.381–389.

Grabham, P. W., Seale, G. E., Bennecib, M., Goldberg, D. J., and Vallee, R. B. Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. // *J. Neurosci.* – 2007. – 27, – p.5823–5834.

Grafstein B. and Forman D. S., Intracellular transport in neurons. // *Physiol. Rev.* – 1980. – 60, – p.1167

Grill, S. W., Goñczy, P., Stelzer, E.H.K., and Hyman, A. A. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. // *Nature* – 2001. – 409, – p.630–633.

Grill, S. W., and Hyman, A. A. Spindle positioning by cortical pulling forces. // *Dev. Cell* – 2005. – 8, – p.461–465.

Grishchuk, E. L., Molodtsov, M. I., Ataullakhanov, F. I., and McIntosh, J. R. Force production by disassembling microtubules. // *Nature* – 2005. – 438, – p.384–388.

Gross SP, Guo Y, Martinez JE, Welte MA. A determinant for directionality of organelle transport in *Drosophila* embryos. // *Curr Biol.* – 2003 –13(19): – p.1660-8.

Gross, S.P., Tuma, M.C., Deacon, S.W., Serpinskaya, A.S., Reilein, A.R., and Gelfand, V.I. Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus melanophores*. // *J. Cell Biol.* – 2002. – 156, – p.855–865.

Gross SP, Welte MA, Block SM, Wieschaus EF. Coordination of opposite-polarity microtubule motors. // *J Cell Biol.* – 2002, – 156(4): – p.715-24.

Gunawardane R.N., Lizarraga S.B., Wiese C., Wilde A. and Zheng Y. γ -tubulin complexes and their role in microtubule nucleation // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2000. – Vol.49. – p.55-73

Gundersen G.G. Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol.3. – p.296-304

Gyoeva, F.K., Leonova, E.V., Rodionov, V.I., and Gelfand, V.I. Vimentin intermediate filaments in fish melanophores. // *J. Cell Sci.*, – 1987 – 88, – p.649–655.

Habermann A., Schroer T.A., Griffiths G. et al. Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles.// *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114. – P. 229–240.

Hall D. H. and Hedgecock E. M., Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. // *Cell* – 1991; – 65, – p.837

Hamaguchi, M. S., and Hiramoto, Y. Analysis of the role of astral rays in pronuclear migration in sand dollar eggs by the colcemid-UV method. *Dev. // Growth Differ.* – 1986 –.28, – p.143–156.

Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: A multifaceted model. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2006. – 4, – p.423–434.

Hannak E, Kirkham M, Hyman AA, Oegema K. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* – 2001; – 155: – p.1109–1116.

- Harada A., Takei Y., Kanai Y. et al. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. // *J Cell Biol.* – 1998. – V.141. – P.51–59.
- Hasson, T., Mooseker, M.S. Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. // *Curr. Opin. Cell Biol.*, – 1994 – 7, – p.587–594.
- He Y., Francis F., Myers K.A. et al. Role of cytoplasmic dynein in the axonal transport of microtubules and neurofilaments. // *J. Cell Biol.* – 2005. – V.168. – P. 697-703.
- Heald R, Tournebize R, Blank T, Sandaltzopoulos R, Becker P, Hyman A, Karsenti E. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts.// *Nature* – 1996; – 382: – p.420–425.
- Helfand, B. T., Chang, L., and Goldman, R. D. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. // *J. Cell Sci.* – 2004. – 15, – p.133–141.
- Helfand B.T., Mikami A., Vallee R.B. et al. A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. // *J. Cell Biol.* – 2002. – V.157. – P. 795–806.
- Hendricks AG, Perlson E, Ross JL, Schroeder HW 3rd, Tokito M, Holzbaur EL. Motor Coordination via a Tug-of-War Mechanism Drives Bidirectional Vesicle Transport. // *Curr Biol.* – 2010 – 20(8): – p.697-702.
- Herman, I.M., Crisona, N.J., Pollard, T.D. Relation between cell activity and the distribution of cytoplasmic actin and myosin. // *J. Cell Biol.*, – 1981 – 90, – p.84–91.
- Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. // *Science.* – 1998. – V. 279. – P. 519-527.
- Hirokawa N., Axonal transport and the cytoskeleton. // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1993. – 3, – p.724
- Hirokawa N., Organelle transport along microtubules - the role of KIFs. // *Trends Cell Biol.* – 1996. – 6, – p.135
- Hirokawa N., Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. // *J. Cell Biol.* – 1982. – 94, – p.129
- Hirokawa N, Pfister KK, Yorifuji H, Wagner MC, Brady ST, Bloom GS. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. // *Cell* – 1989 – 56 – p.867
- Hirokawa, N., Sato Yoshitake, R., Kobayashi, N., Pfister, K.K., Bloom, G.S., Brady, S.T. Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. // *J. Cell Biol.*, – 1991 – 114, – p.295–302.
- Hollenbeck, P.J., Swanson, J.A. Radial extension of macrophage tubular lysosomes supported by kinesin. // *Nature*, – 1990 – 346, – p.864–866.

- Holleran E.A., Ligon L.A., Tokito M. et al. beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276. – P. 36598–36605.
- Hoogenraad C.C., Akhmanova A., Howell S.A. et al. Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 4041–4054.
- Hoogenraad C.C., Wulf P., Schiefermeier N. et al. Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. // EMBO J. – 2003. – V.22. – P.6004–6015.
- Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. The axonal transport of mitochondria. // J. Cell Sci. – 2005. – 118, – p.5411–5419.
- Holy, T. E., Dogterom, M., Yurke, B., and Leibler, S. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1997. – 94, – p.6228–6231.
- Hotani H., Horio T. Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability // Cell Motil. Cytoskeleton. – 1988. – Vol.10.№1-2. – p.229-36.
- Howard, J. Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. // Nature, – 1997 – 389, – p.561–567.
- Howard, J. Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton, Sunderland, MA: Sinauer Associates. – 2001.
- Howard J, Hyman AA Microtubule polymerases and depolymerases. // Curr Opin Cell Biol. – 2007 – 19(1) – p.31-35.
- Huang, J. D., Brady, S. T., Richards, B. W., Stenoien, D., Resau, J. H., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. Direct interaction of microtubule- and actinbased transport motors. // Nature – 1999. – 397 – p.267–270.
- Huang, P., Senga, T., and Hamaguchi, M. A novel role of phosphobeta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. // Oncogene – 2007. – 26 – p.4357–4371.
- Hubert T, Vandekerckhove J, Gettemans J. Actin and Arp2/3 localize at the centrosome of interphase cells. // Biochem Biophys Res Commun – 2011. – 404 – p.153-158.
- Hwang, E., Kusch, J., Barral, Y., and Huffaker, T. C.. Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables.// J. Cell Biol. – 2003 – 161 – p.483–488.
- Hyman AA, Karsenti E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly.// Cell – 1996; – 84: – p.401–410.
- Inoue S. and Salmon E.D. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements // Mol. Biol. Cell. – 1995. – Vol.6 –. p.1619-1640
- Itoh, S., Kameda, Y., Yamada, E., Tsujikawa, K., Mimura, T., and Kohama, Y.. Molecular cloning and characterization of a novel putative STE20-like kinase in guinea pigs. // Arch. Biochem. Biophys. – 1997 – 340 – p.201–207.

- Janson M, de Dood ME, Dogterom M. Dynamic instability of microtubules is regulated by force. // J Cell Biol – 2003. – 161: – p.1029–1034.
- Januschke J, Gervais L, Dass S, Kaltschmidt JA, Lopez-Schier H, St Johnston D, Brand AH, Roth S, Guichet A. Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. // Curr Biol. – 2002. – 12(23): – p.1971–81.
- Jordens I, Fernandez-Borja M., Marsman M. et al. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. // Curr. Biol. – 2001. – V.11. – P.1680–1695.
- Kahana J.A., Schlenstedt G., Evanchuk D.M. et al. The yeast dynactin complex is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells during anaphase B. // Mol. Biol. Cell. – 1998. – V.9. – P.1741–1756.
- Karki, S., and Holzbaur, E.L. Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. // J. Biol. Chem., – 1995. – 270. – p.28806–28811.
- Karsenti E, Vernos I. The mitotic spindle: a self-made machine. // Science – 2001. – 294. – p.543–547.
- Karsenti E, Kobayashi S, Mitchison T, Kirschner M. Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: Properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. // J Cell Biol – 1984. – 98: – p.1763–1776
- Kashina, A.S., Semenova, I.V., Ivanov, P.A., Potekhina, E.S., Zaliapin, I., and Rodionov, V.I. Protein kinase A, which regulates intracellular transport, forms complexes with molecular motors on organelles. // Curr Biol – 2004. – 14. – p.1877–1881.
- Keating T.J. and Borisy G.G. Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation // Nature Cell Biol. – 2000. – Vol.2. – p.352–357
- Keating TJ, Peloquin JG, Rodionov VI, Momcilovic D, Borisy GG. Microtubule release from the centrosome. // Proc Natl Acad Sci U S A – 1997; – 94: – p.5078–5083.
- Kelkar S.A., Pfister K.K., Crystal R.G. et al. Cytoplasmic dynein mediates adenovirus binding to microtubules. // J. Virol. – 2004. – V.78. – P.10122–10132.
- Khodjakov A, Rieder CL. The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. // J Cell Biol – 1999; – 146: – p.585–596.
- Kharchenko M.V., Aksyonov A.A., Melikova M.M., Kornilova E.S. Epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis is accompanied by reorganization of microtubule system in HeLa cells. // Cell Biol Int. – 2007. – 31(4), – p.349–359.
- Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Venner K, Ansley SJ, Ross AJ, Leroux MR, Katsanis N, Beales PL. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. // Nat Genet – 2004; – 36. – p.462–470.

- Kim, S., Lee, K., and Rhee, K.. NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007 – 360, – p.56–62.
- Kimura, A., and Onami, S. Computer simulations and image processing reveal length-dependent pulling force as the primary mechanism for *C. elegans* male pronuclear migration. // *Dev. Cell* – 2005. – 8, – p.765–775.
- King, S., Brown, C., Maier, K.C., Quintyne, N., and Schroer, T. Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. // *Mol. Biol. Cell.*, – 2003 – 14. – p.5089–5097.
- King SJ, Schroer TA. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. // *Nat Cell Biol* – 2000. – 2: – p.20–24.
- Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis.// *Cell* – 1986; – 45: – p.329–342.
- Kobayashi, T., and Murayama, T. Cell cycle-dependent microtubulebased dynamic transport of cytoplasmic dynein in mammalian cells. // *PLoS One* – 2009. – 4, – e7827.
- Kodama A, Karakesisoglou I, Wong E, Vaezi A, Fuchs E. ACF7: An essential integrator of microtubule dynamics. // *Cell* – 2003. – 115: – p.343–354.
- Kojima, S., Vignjevic, D., and Borisy, G. G.. Improved silencing vector co-expressing GFP and small hairpin RNA. // *Biotechniques* – 2004 – 36. – p.74–79.
- Kondo, S., Sato_Yoshitake, R., Noda,Y., Aizawa, H., Nakata, T., Matsuura,Y., Hirokawa, N. KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. // *J. Cell Biol.*, – 1994 – 125, – p.1095–1107.
- Komarova Y, Vorobjev I, Borisy G. Life cycle of MTs: Persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. // *J Cell Sci* – 2002. – 115: – p.3527–3539.
- Koonce, M. P., and Khodjakov, A. Dynamic microtubules in *Dictyostelium*.// *J. Muscle Res. Cell M.* – 2002. – 23, – p.613–619.
- Koonce M.P., Kohler R., Neujahr J.M., Schwartz I., Tikhonenko I. and Gerish G. Dynein motor stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position // *EMBO J.* – 1999. – Vol.18. – p.6786-6792
- Koonce MP, Samso M. Overexpression of cytoplasmic dynein's globular head causes a collapse of the interphase microtubule network in *Dictyostelium*.// *Mol Biol Cell* – 1996; – 7: – p.935–948.
- Kracklauer MP, Banks SM, Xie X, Wu Y, Fischer JA. *Drosophila* klaroid Encodes a SUN Domain Protein Required for Klarsicht Localization to the Nuclear Envelope and Nuclear Migration in the Eye. // *Fly (Austin)* – 2007; – 1: – p.75-85.
- Kracklauer MP, Wiora HM, Deery WJ, Chen X, Bolival B Jr, Romanowicz D, et al. The *Drosophila* SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. // *J Cell Sci* – 2010; – 123: – p.2763-72.

- Krendel, M., and Mooseker, M.S. Myosins: Tails (and heads) of functional diversity. // *Physiology (Bethesda)* – 2005. – 20, – p.239–251.
- Krendel, M., Sgourdas, G., Bonder, E.M. Disassembly of actin filaments leads to increased rate and frequency of mitochondrial movement along microtubules. // *Cell Motil. Cytoskel.*, – 1998 – 40, p.368–378.
- Krylyshkina O., Anderson K.I., Kaverina I., Upmann I., Manstein D.J., Small J.V., Toomre D.K. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. // *J Cell Biol.* – 2003. – 161(5) – p.853-859.
- Kumar S., Lee I.H., Plamann M. Cytoplasmic dynein ATPase activity is regulated by dynactin-dependent phosphorylation. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 31798-31804.
- Kupfer A., Louvard D., Singer S.J. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1982. – 79(8), – p.2603-2607.
- Kural C, Kim H, Syed S, Goshima G, Gelfand VI, Selvin PR. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? // *Science.* – 2005; – 308(5727): – p.1469-72.
- Kuriyama, R. Activity and stability of centrosomes in Chinese hamster ovary cells in nucleation of microtubules in vitro. // *J. Cell Sci.*, – 1984 – 66, – p.277–295.
- Kuriyama R, Borisy GG. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. // *J Cell Biol* – 1981; – 91: – p.814-21.
- Kuznetsov, S.A., Langford, G.M., Weiss, D.G. Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. // *Nature*, – 1992 – 356, – p.722–725.
- Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 1984. – Vol.10. – p.203-9
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol.227. – p.680-5
- Lange B.M. Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002. V. 14. P. 35–43.
- Lansbergen G, Komarova Y, Modesti M, Wyman C, Hoogenraad CC, Goodson HV, Lemaitre RP, Drechsel DN, Van Munster E, Gadella TW, Jr., Grosveld F, Galjart N, Borisy GG, Akhmanova A. Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. // *J Cell Biol* – 2004. – 166: – p.1003–1014.
- Lee G. Non-motor microtubule-associated proteins // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1993. – Vol.5. №1. p.88-94.
- Lee W.L. Oberle J.R., Cooper J.A. The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast. // *J. Cell Biol.* – 2003. – V.160. – P.355–364.

- Lee-Eiford A., Ow R.A., Gibbons I.R. Specific cleavage of dynein heavy chains by ultraviolet irradiation in the presence of ATP and vanadate. // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V.261. – P.2337-2342.
- Leibler, S., Huse, D.A. Porters versus rowers: a unified stochastic model of motor proteins // *J. Cell Biol.*, 1993 – 121, – p.1357–1368.
- Levy JR, Holzbaur EL. Dynein drives nuclear rotation during forward progression of motile fibroblasts. // *J Cell Sci* – 2008; – 121: – p.3187-95.
- Li S., Finley J., Liu Z.J. et al. Crystal structure of the cytoskeleton-associated protein glycine-rich (CAP-Gly) domain.// *J. Biol. Chem.* – 2002. – V.277. – P.48596-48601.
- Li J., Lee W.L., Cooper J.A. NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1. // *Nat. Cell Biol.* – 2005 –. V.7. – P. 686-690.
- Li, W., Yu, J. C., Shin, D. Y., and Pierce, J. H. Characterization of a protein kinase C-delta (PKC-delta) ATP binding mutant. An inactive enzyme that competitively inhibits wild type PKC-delta enzymatic activity. // *J. Biol. Chem.* – 1995 –.270, – p.8311–8318.
- Liao G., Nagasaki T., Gundersen G.G. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. // *J Cell Sci.* – 1995. – 108(11), – p.3473-3483.
- Liebman, J., Lasdon, L. S., Schrage, L., and Waren, A. Modeling and Optimization with GINO.// Palo Alto, CA: The Scientific Press. – 1986.
- Lippincott-Schwartz, J., Cole, N.B., Marotta, A., Conrad, P.A., Bloom, G.S. Kinesin is the motor for microtubule-mediated Golgi-to-ER membrane traffic. // *J. Cell Biol.* – 1995 – 128, – p.293.
- Luders, J., Patel, U. K., and Stearns, T. GCP-WD is a α -tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. // *Nat. Cell Biol.* – 2006. – 8, – p.137–147.
- Ma, S., Trivinos-Lagos, L., Graf, R., and Chisholm, R. L.. Dynein intermediate chain mediated dynein-dynactin interaction is required for interphase interphase microtubule organization and centrosome replication and separation in *Dictyostelium*.// *J. Cell Biol.* – 1999 – 147, – p.1261–1274.
- MacDougall N., Clark A., MacDougall E. et al. *Drosophila* gurken (TGF α) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps.// *Dev. Cell.* – 2003. – V.4. – P.307–319.
- Malikov, V., Cytrynbaum, E. N., Kashina, A., Mogilner, A., and Rodionov, V. Centering of a radial microtubule array by translocation along microtubules spontaneously nucleated in the cytoplasm. // *Nat. Cell Biol.* – 2005. – 7, – p.1213–1218.
- Malikov V, Kashina A, Rodionov V. Cytoplasmic dynein nucleates microtubules to organize them into radial arrays in vivo. // *Mol Biol Cell* – 2004; – 15 – p.2742–2749.
- Mallik, R., Carter, B. C., Lex, S. A., King, S. J., and Gross, S. P.. Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. // *Nature* – 2004 – 427, – p.649–652.

- Mallik R., Gross S. Molecular motors: strategies to get along. // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14. – P. R971-82.
- Malone CJ, Misner L, Le Bot N, Tsai MC, Campbell JM, Ahringer J, et al. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. // *Cell* – 2003; – 115: – p.825-36.
- Mandell J.W., Banker G.A. The microtubule cytoskeleton and the development of neuronal polarity // *Neurobiol. Aging.* – 1995. – Vol.16. №3. – p.229-37;
- Manneville JB, Etienne-Manneville S. Positioning centrosomes and spindle poles: looking at the periphery to find the centre. // *Biol Cell.* – 2006 – 98(9): – p.557-65.
- Maniotis A, Schliwa M. Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells. // *Cell* – 1991. – 67: – p.495–504.
- Maro B, Bornens M. The centriole-nucleus association: effects of cytochalasin B and nocodazole. // *Biol. Cellulaire* – 1980; – 39: – p.287-290.
- Matanis T., Akhmanova A., Wulf P. et al. Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. // *Nat. Cell Biol.* – 2002. – V.4. – P.986–992.
- McDonald, H.B., Goldstein, L.S. Identification and characterization of a gene encoding a kinesin-like protein in *Drosophila*. // *Cell*, – 1990 – 61, – p.991–1000.
- McDonald, H.B., Stewart, R.J., Goldstein, L.S. The kinesin-like *ncd* protein of *Drosophila* is a minus end-directed microtubule motor. // *Cell*, – 1990 – 63, – p.1159–1165.
- McGee MD, Rillo R, Anderson AS, Starr DA. UNC-83 is a KASH protein required for nuclear migration and is recruited to the outer nuclear membrane by a physical interaction with the SUN protein UNC-84. // *Mol Biol Cell* – 2006; – 17: – p.1790-1801.
- McGrath, J.L., Tardy, Y., Dewey, C.F., Jr., Meister, J.J., and Hartwig, J.H. Simultaneous measurements of actin filament turnover, filament fraction, and monomer diffusion in endothelial cells. // *Biophys. J.* – 1998. – 75, – p.2070–2078.
- Meluh, P.B., Rose, M.D. KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. // *Cell*, – 1990 – 60, – p.1029.
- Merdes A, Cleveland DW. Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components.// *J Cell Biol* – 1997; – 138: – p.953–956.
- Merdes A, Heald R, Samejima K, Earnshaw WC, Cleveland DW. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA.// *J Cell Biol* – 2000; – 149: – p.851–862.
- Merdes A, Ramyar K, Vechio JD, Cleveland DW. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. // *Cell* – 1996; – 87: – p.447–458.
- Mermall, V., McNally, J.G., Miller, K.G. Transport of cytoplasmic particles catalysed by an unconventional myosin in living *Drosophila* embryos. // *Nature*, – 1994 – 369, – p.560–562.

- Mermall, V., Miller, K.G. The 95F unconventional myosin is required for proper organization of the *Drosophila* syncytial blastoderm. // *J. Cell Biol.*, – 1995 – 129, – p.1575–1588.
- Mikami A., Tynan S.H., Hama T. et al. Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells. // *J. Cell Sci.* – 2002. – V.115. – P. 4801– 4808.
- Mikhailov, A. V., and Gundersen, G. G. Centripetal transport of microtubules in motile cells.// *Cell – Motil. Cytoskeleton* – 1995. – 32, – p.173–186.
- Minn IL, Rolls MM, Hanna-Rose W, Malone CJ. SUN-1 and ZYG-12, mediators of centrosome-nucleus attachment, are a functional SUN/KASH pair in *Caenorhabditis elegans*. // *Mol Biol Cell* – 2009; – 20 – p.4586-95.
- Mogilner, A., and Oster, G. The physics of lamellipodial protrusion. // *Eur. Biophys. J.* – 1996. – 25, – p.47–53.
- Moore AT, Rankin KE, von Dassow G, Peris L, Wagenbach M, Ovechkina Y, Andrieux A, Job D, Wordeman L. MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules.// *J Cell Biol* – 2005. – 169: – p.391–397.
- Mooseker, M.S., and Cheney, R.E.. Unconventional myosins. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1995 – 11, – p.633–675.
- Morales-Mulia S, Scholey JM. Spindle pole organization in *Drosophila* S2 cells by dynein, abnormal spindle protein (Asp), and KLP10A.// *Mol Biol Cell* – 2005; – 16: – p.3176–3186.
- Morgan JT, Pfeiffer ER, Thirkill TL, Kumar P, Peng G, Fridolfsson HN, et al. Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization. // *Mol Biol Cell* – 2011; – 22: – p.4324-34.
- Moritz M., Braunfeld M.B., Guenebaut V., Heuser J. and Agard D.A. Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation // *Nature. Cell Biol.* – 2000. – Vol.2. – p.365-370
- Moritz M., Braunfeld M.B., Sedat J.W., Alberts B., Agard D.A. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome // *Nature.* – 1995. – Vol.378(6557). – p.638-40.
- Moritz M., Zheng Y., Alberts B.M. and Oegema K. Recruitment of the γ -tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol.142. – p.775-786
- Morris, R.L., Hollenbeck, P.J. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. // *J. Cell Biol.*, – 1995 – 131, – p.1315–1326.
- Moskalewski S, Thyberg J. On the role of the nucleus in the structural organization of the cell: Dispersion and rearrangement of the Golgi complex in cytoplasts treated with antimicrotubular drugs.// *J Submicrosc Cytol Pathol* – 1988. – 20: – p.305–316.
- Mosley-Bishop KL, Li Q, Patterson L, Fischer JA. Molecular analysis of the *klarsicht* gene and its role in nuclear migration within differentiating cells of the *Drosophila* eye. // *Curr Biol* – 1999; – 9: – p.1211-1220.
- Moudjou M., Bordes N., Paintrand M., Bornens M. gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms // *J. Cell Sci.* – 1996. – Vol.109(Pt 4). – p.875-87.

Müller MJ, Klumpp S, Lipowsky R. Bidirectional transport by molecular motors: enhanced processivity and response to external forces. // *Biophys J.* – 2010 – 98(11): – p.2610-8.

Mullins, R. D. Cytoskeletal mechanisms for breaking cellular symmetry. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – 2, – p.1–16.

Muresan V., Stankewich M.C., Steffen W. et al. Dynactin dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids. // *Mol. Cell.* – 2001. – V.7. – P. 173–183.

Murthy, K., and Wadsworth, P. Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. // *Curr. Biol.* – 2005. – 15, – 724–731.

Musch, A., Cohen, D., Rodriguez" Boulan, E. Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. // *J. Cell Biol.*, – 1997 – 138, – p.291–306.

Nadezhdina ES, Fais D, Chentsov YS. On the association of centrioles with the interphase nucleus. // *Eur J Cell Biol* – 1979; – 19: – p.109-15.

Nakagawa, T., Tanaka, Y., Matsu"oka, E., Kondo, S., Okada, Y., Noda, Y., Kanai, Y., Hirokawa, N. Identification and classification of 16 new kinesin superfamily (KIF) proteins in mouse genome. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, – 1997 – 94, – p.9654–9659.

Nakata, T., Hirokawa, N. Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. // *J. Cell Biol.*, – 1995 – 131, – p.1039–1053.

Nangaku, M., Sato"Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., Hirokawa, N. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. // *Cell*, – 1994 – 79, – p.1209–1220.

Nascimento, A.A., Cheney, R.E., Tau"hata, S.B., Larson, R.E., Mooseker, M.S. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. // *J. Biol. Chem.*, – 1996 – 271, – p.17561–17569.

Nascimento, A.A., Roland, J.T., and Gelfand, V.I. Pigment cells: A model for the study of organelle transport. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2003. – 19, – p.469–491.

Navone, F., Niclas, J., Hom"Booher, N., Sparks, L., Bernstein, H.D., McCaffrey, G., Vale, R.D. Cloning and expression of a human kinesin heavy chain gene: interaction of the COOH-terminal domain with cytoplasmic microtubules in transfected CV-1 cells. // *J. Cell Biol.*, – 1992 – 117, – p.1263–1275.

Niclas, J., Navone, F., Hom"Booher, N., Vale, R.D. Two kinesin light chain genes in mice. Identification and characterization of the encoded proteins. // *Neuron*, – 1994 – 12, – p.1059

Nigg E.A. Cell division mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol.2. – p.21-32

Nobes, C.D., Hall, A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. // *Cell*, – 1995 – 81, – p.53.

- Oakley CE, Oakley BR. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. // *Nature* – 1989; – 338: – p.662–664.
- O'Connell, C. B., and Wang, Y.-L. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion.// *Mol. Biol. Cell* – 2000. – 11, – p.1765–1774.
- Oiwa, K., and Sakakibara, H.. Recent progress in dynein structure and mechanism. // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2005 – 17, – p.98–103.
- Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine, Y., Hirokawa, N. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. // *Cell*, – 1995 – 81, – p.769.
- O'Reilly, P. G., Wagner, S., Franks, D. J., Cailliau, K., Browaeys, E., Dissous, C., and Sabourin, L. A. The Ste20-like kinase SLK is required for cell cycle progression through G2. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – 280, – p.42383–42390.
- Otsuka, A.J., Jeyaprakash, A., Gar"cia"Anoveros, J., Tang, L.Z., Fisk, G., Hartshorne, T., Franco, R., Born, T. The *C. elegans* unc-104 gene encodes a putative kinesin heavy chain-like protein. // *Neuron*, – 1991 – 6, – p.113–122.
- Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, Karakesisoglou I. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. // *J Cell Sci* – 2005; – 118: – p.3419-3430.
- Palazzo A.F., Joseph Y.J., Chen D.L., Dujardin A.S., Alberts K.S., Pfister K.K., Vallee R.B. and Gundersen G.G. Cdc42, dynein and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization // *Curr. Biol.* – 2001. – Vol.11 – p.1536-1541
- Paschal B.M., Shpetner H.S., Vallee R.B. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. // *J. Cell Biol.* – 1987. – V.105. – P.1273–1282.
- Paschal BM, Vallee RB. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. // *Nature* – 1987; – 330: – p.181–183.
- Patterson K, Molofsky AB, Robinson C, Acosta S, Cater C, Fischer JA. The functions of klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. // *Mol Biol Cell* – 2004; – 15: – p.600-610.
- Pazour G.J., Dickert B.L., Witman G.B. The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. // *J. Cell Biol.* – 1999. – V.144. – P.473– 481.
- Paul, R., Wollman, R., Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Cimini, D., and Mogilner, A. Computer simulations predict that chromosome movements and rotations accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* – 2009. – 106, – p.15708–15713.
- Pearson, C. G., and Bloom, K. Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004 – 5, – p.481–492.

- Pereira, A.J., Dalby, B., Stewart, R.J., Doxsey, S.J. Mitochondrial association of a plus end-directed microtubule motor expressed during mitosis in *Drosophila*. // *J. Cell Biol.*, – 1997 – 136, – p.1081–1090.
- Perez-Ferreiro, C. M., Vernos, I., and Correias, I. Protein 4.1R regulates interphase microtubule organization at the centrosome. // *J. Cell Sci.* – 2004. – 117, – p.6197–6206.
- Pfister K. K., Wagner M. C., Stenoien D. L., Brady S. T, Bloom G. S., Monoclonal antibodies to kinesin heavy and light chains stain vesicle-like structures, but not microtubules, in cultured cells. // *J. Cell Biol.* – 1989 – 108, – p.1453;
- Piehl M, Tulu US, Wadsworth P, Cassimeris L. Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2004; – 101: – p.1584–1588.
- Piperno G, LeDizet M, Chang X.. Microtubules containing acetylated α -tubulin in mammalian cells in culture.// *J Cell Biol* – 1987. – 104: – p.289–302.
- Ploubidou A., Moreau V., Ashman K. et al. Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. // *EMBO J.* – 2000. – V.19. – P.3932-3944.
- Pollard, T.D. Actin. // *Curr. Opin. Cell Biol.*, – 1990 – 2, – p.33–40.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G.. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. // *Cell* – 2003 – 112, – p.453–465.
- Prekeris, R., Terrian, D.M. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca^{2+} -dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. // *J. Cell Biol.*, – 1997 – 137, – p.1589–1601.
- Presley J.F., Zaal K.J.M., Schroer T.A. et al. ER to Golgi transport visualized in living cells. // *Nature*. – 1997. – V. 389 –. P.81–85.
- Press, W.H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W.T., Flannery, B. P. Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing., // 2nd Edition (Cambridge, UK: Cambridge University Press). – 1999.
- Provance, D.J., Wei, M., Ipe, V., Mercer, J. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, – 1996 – 93, – p.14554–14558.
- Purohit A, Tynan SH, Vallee R, Doxsey SJ. Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization.// *J Cell Biol* – 1999; – 147: – p.481–492.
- Quintyne NJ, Gill SR, Eckley DM, Crego CL, Compton DA, Schroer TA. Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. // *J Cell Biol* – 1999; – 147: – p.321–334.
- Quintyne NJ, Schroer TA. Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes.// *J Cell Biol* – 2002; – 159 – p.245–254.
- Razafsky D, Hodzic D. Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleo-cytoskeletal connections.// *J Cell Biol* – 2009; – 186: – p.461-72.

Reck-Peterson, S.L., Novick, P.J., Mooseker, M.S. The tail of a yeast class V myosin, myo2p, functions as a localization domain // *Mol. Biol. Cell.* – 1999 – 10, – p.1001–1017.

Rehberg M., Kleylein-Sohn J., Faix J. et al. Dictyostelium LIS1 is a centrosomal protein required for microtubule/cell cortex interactions, nucleus/centrosome linkage, and actin dynamics. // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – V.16. – P.2759-2771.

Reinsch, S., and Goñczy, P. Mechanisms of nuclear positioning. // *J. Cell Sci.* – 1998. – 111, – p.2283–2295.

Ridley, A., Paterson, H.F., Johnston, C., Diekmann, D., Hall, A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. // *Cell.* – 1992 – 70, – p.401

Robinson, J. T., Wojcik, E. J., Sanders, M. A., McGrail, M., and Hays, T. S. Cytoplasmic dynein is required for the nuclear attachment and migration of centrosomes during mitosis in *Drosophila*. // *J. Cell Biol.* – 1999. – 146, – p.597–608.

Rodionov V.I., Borisy G.G. Microtubule treadmilling in vivo // *Science.* – 1997. – Vol.275(5297). – p.215-8.

Rodionov V.I., Borisy G.G. Self-centring activity of cytoplasm // *Nature.* – 1997. – Vol.386(6621). – p.170 (в тексте ссылка обозначена как Rodionov and Borisy, 1997a)

Rodionov, V.I., Hope, A.J., Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. // *Curr Biol* – 1998. – 8, – p.165-168.

Rodionov, V.I., Lim, S.S., Gelfand, V.I., and Borisy, G.G. Microtubule dynamics in fish melanophores. // *J Cell Biol* – 1994. – 126, – p.1455-1464.

Rodionov V, Nadezhdina E, Borisy G.. Centrosomal control of microtubule dynamics. // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1999 – 96: – p.115–120.

Rodionov, V.I., E. Nadezhdina, J. Peloquin, and G. Borisy. Digital fluorescence microscopy of cell cytoplasm with and without the centrosome. // *Meth. Cell Biol.* – 2001. – 67: – p.43–51.

Rogers, S.L., Karcher, R.L., Roland, J.T., Minin, A.A., Steffen, W., and Gelfand, V.I. Regulation of melanosome movement in the cell cycle by reversible association with myosin V. // *J. Cell Biol.* – 1999. – 146, – p.1265–1276.

Rogers, S.L., Gelfand, V.I. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. // *Curr. Biol.*, – 1998 – 8, – p.161–164.

Rogers, S.L., Karcher, R.L., Roland, J.T., Minin, A.A., Steffen, W., Gelfand, V.I. Regulation of melanosome movement in the cell cycle by reversible association with myosin V. // *J. Cell Biol.*, – 1999 – 146, – p.1265–1276.

Rooney C., White G., Nazgiewicz A., Woodcock S.A., Anderson K.I., Ballestrem C., Malliri A. The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. // *EMBO Rep.* – 2010. – 11(4), – 292-298.

Rosenblatt, J., Cramer, L. P., Baum, B., and McGee, K. M. Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. // *Cell* – 2004. – 117, – p.361–372.

Rusan NM, Tulu US, Fagerstrom C, Wadsworth P. Reorganization of the microtubule array in prophase/prometaphase requires cytoplasmic dynein-dependent microtubule transport.// *J Cell Biol* – 2002; – 158: – p.997–1003.

Sabourin, L. A., and Rudnicki, M. A.. Induction of apoptosis by SLK, a Ste20-related kinase. // *Oncogene* – 1999 – 18, – p.7566–7575.

Sabourin, L. A., Tamai, K., Seale, P., Wagner, J., and Rudnicki, M. A. Caspase 3 cleavage of the Ste20-related kinase SLK releases and activates an apoptosis-inducing kinase domain and an actin-disassembling region. // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – 20, – p.684–696.

Saito, N., Okada, Y., Noda, Y., Kino"shita, Y., Kondo, S., Hirokawa, N. KIFC2 is a novel neuron-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. // *Neuron*, – 1997 – 18, – p.425–438.

Salmon, W. C., Adams, M. C., and Waterman-Storer, C. M. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. // *J. Cell Biol.* – 2002. – 158, – p.31–37.

Salpingidou G, Smertenko A, Hausmanowa-Petruciewicz I, Hussey PJ, Hutchison CJ. A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. // *J Cell Biol* – 2007; – 178: – p.897-904.

Sasaki S., Shionoya A., Ishida M. et al. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. // *Neuron*. – 2000. – V. 28. – P.681– 696.

Schiff P.B., Horwitz S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1980. – 77(3), – p.1561-1565

Schnapp B. J., Vale R. D., Sheetz M. P., Reese T. S., Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. // *Cell* – 1985; – 40, – p.455

Schott, D., Ho, J., Pruyne, D., Bretscher, A. The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. // *J. Cell Biol.*, – 1999 – 147, – p.791–808.

Scholey JM, Brust-Mascher I, Mogilner A. Cell division. // *Nature* – 2003; – 422: – p.746–752.

Scholey J. M., Heuser J., Yang J. T., Goldstein L. S. B., Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. // *Nature* – 1989 – 338, – p.355.

Schrader M., King S.J., Stroh T.A. et al. Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells. // *J. Cell Sci.* – 2000. – V.113. – P.3663–3671.

Schroer, T. Dynactin. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, – 2004 – 20, – p.159–179.

Schroer T.A., Sheetz M.P. Two activators of microtubule-based vesicle transport. // *J. Cell Biol.* – 1991. – V.115. – P.1309–1318.

- Sekine, Y., Okada, Y., Noda, Y., Kondo, S., Aizawa, H., Takemura, R., Hirokawa, N. A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. // *J. Cell Biol.*, – 1994 – 127, – p.187–201.
- Sellers, J.R., and Jiang, H. In vitro motility assays with actin. // *In Cell Biology: a laboratory manual.*, Volume 2, J.E.Celis, ed. – 1998. – p.336-343.
- Severin F.F., Shanina N.A., Shevchenko A., Solovyanova O.B., Koretsky V.V., Nadezhdina E.S. A major 170 kDa protein associated with bovine adrenal medulla microtubules: a member of the centrosomin family? // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol.420. №2-3. – p.125-8.
- Shay JW, Porter KR, Prescott DM. The surface morphology and fine structure of CHO (Chinese hamster ovary) cells following enucleation. // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 1974; – 71: – p.3059-63.
- Short B., Preisinger C., Schaletzky J. et al. The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. // *Curr. Biol.* – 2002. – V.12. – P.1792–1795.
- Sibon OC, Kelkar A, Lemstra W, Theurkauf WE. DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in *Drosophila* embryos. // *Nat Cell Biol* – 2000; – 2 – p.90-95.
- Skop A.R. and White J.G. The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos // *Curr. Biol.* – 1998. – Vol.8. – p.1110-1116
- Slepchenko, B.M., Semenova, I., Zaliapin, I., and Rodionov, V.. Switching of membrane organelles between cytoskeletal transport systems is determined by regulation of the microtubule-based transport. // *J Cell Biol* – 2007 – 179, – p.635-641.
- Small, J.V. The actin cytoskeleton. // *Electron Microsc. Rev.*, – 1988 – 1, – p.155–174.
- Sokolov M., Lyubarsky A.L., Strissel K.J. et al. Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. // *Neuron.* – 2002. – V.34. – P. 95–106.
- Soppina V, Rai AK, Ramaiya AJ, Barak P, Mallik R. Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009; – 106(46) – p.19381-6.
- Splinter D, Tanenbaum ME, Lindqvist A, Jaarsma D, Flotho A, Yu KL, et al. Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. // *PLoS Biol* – 2010. – 8. – e1000350.
- Starr, D. A.. Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus. // *Mol. Biosyst.* – 2007 – 3 – p.583–589.
- Stearns T, Kirschner M. In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. // *Cell* – 1994; – 76: – p.623–637.
- Steffen W., Fajer E.A., Linck R.W. Centrosomal components immunologically related to tektins from ciliary and flagellar microtubules // *J. Cell Sci.* – 1994. – Vol.107(Pt 8). – p.2095-105.

- Steffen W, Karki S, Vaughan KT, Vallee RB, Holzbaur EL, Weiss DG, Kuznetsov SA. The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. // *Mol Biol Cell* – 1997 –8: – p.2077–2088.
- Stevens, J.M., Galyov, E.E., and Stevens, M.P. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2006. – 4 – p.91–101.
- Storbeck, C. J., Daniel, K., Zhang, Y. H., Lunde, J., Scime, A., Asakura, A., Jasmin, B., Korneluk, R. G., and Sabourin, L. A.. Ste20-like kinase SLK displays myofiber type specificity and is involved in C2C12 myoblast differentiation. // *Muscle Nerve* – 2004 – 29, – p.553–564.
- Stow, J.L., Fath, K.R., Burgess, D.R. Budding roles for myosin II on the Golgi. // *Trends Cell Biol.*, – 1998 – 8, – p.138–141.
- Sunkel CE, Glover DM. polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. // *J Cell Sci* – 1988; – 89: – p.25-38.
- Svitkina, T. Electron microscopic analysis of the leading edge in migrating cells.// *Methods Cell Biol* – 2007. – 79, – p.295-319
- Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B., Borisy, G.G.Improved procedures for electron microscopic visualization of the cytoskeleton of cultured cells. // *J. Struct. Biol.*, – 1995 – 115. – p.290–303.
- Tabb, J.S., Molyneaux, B.J., Cohen, D.L., Kuznetsov, S.A., Langford, G.M. Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. // *J. Cell Sci.*, – 1998 – 111, – p.3221–3234.
- Tabish M., Siddiqui Z. K., Nishikawa K., Siddiqui S. S., Exclusive expression of *C. elegans* osm-3 kinesin gene in chemosensory neurons open to the external environment.// *J. Mol. Biol.* – 1995 – 247, – p.377.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A., Hirokawa, N. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. // *Cell*, – 1998 – 93, – p.1147–1158.
- Takada S, Kelkar A, Theurkauf WE. *Drosophila* checkpoint kinase 2 couples centrosome function and spindle assembly to genomic integrity. // *Cell* – 2003; – 113: – p.87-99.
- Takagishi, Y., Oda, S., Hayasaka, S., Dekker" Ohno, K., Shikata, T., Inouye, M., Yamamura, H. The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. // *Neurosci. Lett.*, – 1996 – 215, – p.169–172.
- Tanaka Y., Zhang Z., Hirokawa N., Identification and molecular evolution of new dynein-like protein sequences in rat brain. // *J. Cell Sci.* – 1995 – 108 (Pt 5): – p.1883-93.
- Tanenbaum ME, Akhmanova A, Medema RH. Dynein at the nuclear envelope. // *EMBO Rep* – 2010; – 11: – p.649.
- Taunton, J. Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2001. – 13, – p.85–91.

Texada MJ, Simonette RA, Johnson CB, Deery WJ, Beckingham KM. Yuri gagarin is required for actin, tubulin and basal body functions in *Drosophila* spermatogenesis. // *J Cell Sci* – 2008; – 121: – p.1926-36.

Theriot, J.A., and Mitchison, T.J. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. // *Nature* – 1991. – 352, – p.126–131.

Theriot, J.A., and Mitchison, T.J. Comparison of actin and cell surface dynamics in motile fibroblasts. // *J. Cell Biol.* – 1992. – 119, – p.367–377.

The'ry, M., Racine, V., Piel, M., Pe'pin, A., Dimitrov, A., Chen, Y., Sibarita, J.-B., and Bornens, M. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* – 2006. – 103, – p.19771–19776.

Tolic'-Nørrelykke, I. M. Force and length regulation in the microtubule cytoskeleton: lessons from fission yeast. // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2010. – 22, – p.21–28.

Tolic'-Nørrelykke, I. M., Sacconi, L., Thon, G., and Pavone, F. S.. Positioning and elongation of the fission yeast spindle by microtubule-based pushing. // *Curr. Biol.* – 2004 – 14, – p.1181–1186.

Toyo-Oka K, Sasaki S, Yano Y, Mori D, Kobayashi T, Toyoshima YY. Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. // *Hum Mol Genet* – 2005; – 14: – p.3113-28.

Tran, P., Marsh, L., Doye, V., Inoue', S., and Chang, F. A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. // *J. Cell Biol.* – 2001. – 153, – p.397–412.

Tsou, M.F.B., Ku, W., Hayashi, A., and Rose, L. S. PAR-dependent and geometry-dependent mechanisms of spindle positioning. // *J. Cell Biol.* – 2003. – 160, – p.845–855.

Tuxworth, R.I., and Titus, M.A.. Unconventional myosins: Anchors in the membrane traffic relay. // *Traffic* – 2000 – 1, – p.11–18.

Ueda M., Graf R., MacWilliams H.K. et al. Centrosome positioning and directionality of cell movements. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – V. 94. – P. 9674–9678.

Uetake, Y., Terada, Y., Matulienė, J., and Kuriyama, R. Interaction of Cep135 with a p50 dynactin subunit in mammalian centrosomes. // *Cell Motil. Cytoskelet.* – 2004. – 58, – p.53–66.

Vaisberg E. A., Koonce M. P., McIntosh J. R., Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. // *J. Cell Biol.* – 1996. – 133, – p.831

Vale RD, Malik F, Brown D. Directional instability of microtubule transport in the presence of kinesin and dynein, two opposite polarity motor proteins. // *J Cell Biol.* – 1992 – 119(6) – p.1589-96.

Vale R. D., Reese T. S., Sheetz M. S., Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. // *Cell* – 1985 – 42, – p.39;

Valetti C.,Wetzel D.M., Schrader M. et al. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. // *Mol. Biol. Cell.* – 1999. – V.10. – P. 4107–4120.

- Vallee R, Stehman S. How dynein helps the cell find its center: A servomechanical model. // Trends Cell Biol – 2005. – 15: – p.288–294.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. // J Neurobiol – 2004; – 58: – p.189–200.
- Vasquez R.J., Howell B., Yvon A.-M.C., Wadsworth P. and Cassimeris L. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro // Mol. Biol. Cell. – 1997. – Vol.8. – p.973-985
- Vasiliev J.M., Gelfand I.M., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Komm S.G., Olshevskaja L.V. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts.// J Embryol Exp Morphol. – 1970. – 24(3), – p.625-640.
- Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Mechanisms of morphogenesis in cell cultures. // Int Rev Cytol. – 1977. – 50, – p.159-274.
- Vasiliev J.M. Spreading and locomotion of tissue cells: factors controlling the distribution of pseudopodia. // Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 1982. – 299(1095), – p.159-167.
- Vaughan K.T., Vallee R.B. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. // J. Cell Biol. – 1995. – V.131. – P.1507-1516.
- Vaughan P.S., Miura P., Henderson M. et al. A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport.// J Cell Biol. – 2002. – V.158. – P.305-319.
- Verde F, Berrez JM, Antony C, Karsenti E. Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein. // J Cell Biol – 1991; – 112: – p.1177–1187.
- Vogel, S. K., Pavin, N., Maghelli, N., Julicher, F., and Tolic-Nørrelykke, I. M.. Self-organization of dynein motors generates meiotic nuclear oscillations. // PLoS Biol. – 2009 – 7, – e1000087.
- Vogel J.M., Stearns T., Rieder C. and Palazzo R.E. Centrosomes isolated from *Spistula solodissima* oocytes contain rings and an unusual stoichiometric ratio of α/β -tubulin // J. Cell Biol. – 1997. – Vol.137. – p.193-202
- Vorobjev, I., Malikov, V., and Rodionov, V.. Self-organization of a radial microtubule array by dynein-dependent nucleation of microtubules. // Proc Natl Acad Sci U S A – 2001 – 98, – p.10160-10165.
- Vorobjev I.A., Svitkina T.M., Borisy G.G. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells // J. Cell Sci. – 1997. – Vol.110(Pt 21). – p.2635-45.
- Wada, M., and Suetsugu, N. Plant organelle positioning. // Curr. Opin. Cell Biol. – 2004. – 7, – p.626–631.
- Wade R.H., Hyman A.A. Microtubule structure and dynamics // Curr. Opin. Cell Biol. – 1997. – Vol.9. №1. – p.12-7.

- Wagner, S., Flood, T. A., O'Reilly, P., Hume, K., and Sabourin, L. A.. Association of the Ste20-like kinase (SLK) with the microtubule. Role in Rac1-mediated regulation of actin dynamics during cell adhesion and spreading. // J. Biol. Chem. – 2002 – 277, – p.37685–37692.
- Wakefield JG, Bonaccorsi S, Gatti M. The drosophila protein asp is involved in microtubule organization during spindle formation and cytokinesis.// J Cell Biol – 2001; – 153: – p.637-48.
- Walenta JH, Didier AJ, Liu X, Krämer H. The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. // J Cell Biol – 2001; – 152 – p.923-34.
- Wang, S.Z., Adler, R. Chromokinesin: a DNA-binding, kinesin-like nuclear protein. // J. Cell.Biol., – 1995 – 128, – p.761–768.
- Waterman-Storer CM, Karki S, Holzbaur EL. The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actinrelated protein centractin (Arp-1). // Proc Natl Acad Sci USA – 1995; – 92: – p.1634–1638.
- Waterman-Storer C.M., Salmon E.D. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling // J. Cell Biol. – 1997. – Vol.139. №2. – p.417-34.
- Watson, P., and Stephens, D. J.. Microtubule plus-end loading of p150(Glued) is mediated by EB1 and CLIP-170 but is not required for intracellular membrane traffic in mammalian cells. // J. Cell Sci. – 2006 – 119, – p.2758–2767.
- Weber, K. L., Sokac, A. M., Berg, J. S., Cheney, R. E., and Bement, W. M.. A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. // Nature – 2004 – 431, – p.325–329.
- Welsh G.I., Proud C.G. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. // Biochem. J. – 1993. – 294(3), – p.625-629.
- Welte MA, Cermelli S, Griner J, Viera A, Guo Y, Kim DH, Gindhart JG, Gross SP. Regulation of lipid-droplet transport by the perilipin homolog LSD2. // Curr Biol. – 2005; – 15(14) – p.1266-7.
- Welte MA, Gross SP, Postner M, Block SM, Wieschaus EF. Developmental regulation of vesicle transport in Drosophila embryos: forces and kinetics. // Cell. – 1998 – 92: – p.547-57.
- Wiese C. and Zheng Y. A new function for the γ -tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap // Nature Cell Biol. – 2000. – Vol.2. – p.358-364
- Wilkie G.S., Davis I. Drosophila wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. // Cell – 2001. – V.105. – P.209–219.
- Wittmann T, Hyman T. Recombinant p50/dynamitin as a tool to examine the role of dynactin in intracellular processes.// Methods Cell Biol – 1999; – 61: – p.137–143.
- Wittmann T. and Waterman-Storer C.M. Cell Motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? // J. Cell Sci. – 2001. – Vol.114. – p.3795-3803
- Wollman, R., Civelekoglu-Scholey, G., Scholey, J. M., and Mogilner, A.. Reverse engineering of force integration during mitosis in the Drosophila embryo. // Mol. Syst. Biol. – 2008 – 4. – p.1–13.

- Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., Hammer, J.A. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function *In vivo* // *J. Cell Biol.*, – 1998 – 143, – p.1899–1918.
- Wu J, Lee KC, Dickinson RB, Lele TP. How dynein and microtubules rotate the nucleus.// *J Cell Physiol* – 2011; – 226: – p.2666-74.
- Wuhr, M., Dumont, S., Groen, A. C., Needleman, D. J., and Mitchison, T. J. How does a millimeter-sized cell find its center? // *Cell Cycle* – 2009 – v.8 – p.1115–1121.
- Xiang X. LIS1 at the microtubule plus end and its role in dynein-mediated nuclear migration. // *J. Cell Biol.* – 2003. – V.160. – P.289-290.
- Yam, P. T., Wilson, C. A., Ji, L., Hebert, B., Barnhart, E. L., Dye, N. A., Wiseman, P. W., Danuser, G., and Theriot, J. A.. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. // *J. Cell Biol.* – 2007 – 178, – p.1207–1221.
- Yamada, E., Tsujikawa, K., Itoh, S., Kameda, Y., Kohama, Y., and Yamamoto, H. Molecular cloning and characterization of a novel human STE20-like kinase, hSLK. // *Biochim. Biophys. Acta* – 2000. – 1495, – p.250–262.
- Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., Hirokawa, N. KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. // *J. Cell Biol.*, – 1995 – 130, – p.1387–1399.
- Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., Hirokawa, N. Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, – 1996 – 93, – p.8443.
- Yan, X., Habedanck, R., and Nigg, E. A. A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. // *Mol. Biol. Cell* – 2006. – 17. – p.634–644.
- Yang J. T., Laymon R. A., Goldstein L. S. B., The primary structure and analysis of the squid kinesin heavy chain. // *Cell* – (1989). – 56, – p.879
- Young A, Dictenberg JB, Purohit A, Tuft R, Doxsey SJ. Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. // *Mol Biol Cell* – 2000. – 11. – p.2047–2056.
- Yvon, A.M.C., and Wadsworth, P.. Region-specific microtubule transport in motile cells. // *J. Cell Biol.* – 2000. – 151. – p.1003–1012.
- Zaliapin, I., A. Gabrielov, and V. Keilis-Borok.. Multiscale trend analysis. // *Fractals*. – 2004. – 12. – p.275-292.
- Zaliapin, I., Semenova, I., Kashina, A., and Rodionov, V. Multiscale trend analysis of microtubule transport in melanophores. // *Biophys. J.* – 2005. – 88. – p.4008–4016.
- Zhai Y., Borisy G.G. Quantitative determination of the proportion of microtubule polymer present during the mitosis-interphase transition // *J. Cell Sci.* – 1994. – Vol.107(Pt 4). – p.881-90.

Zhang X, Lei K, Yuan X, Wu X, Zhuang Y, Xu T et al. SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. // *Neuron* – 2009. – 64. – p.173-87.

Zhang X, Han M. Nuclear migration: rock and roll facilitated by dynein and kinesin. // *Curr Biol* – 2010. – 20. – p.1027-9.

Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. // *Nature* – 1995. – v.378. – p.578–583.

Zhu C., Zhao J., Bibikova M. et al. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – V.16. – p.3187-3199.

Zigmond S.H., Levitsky H.I., Kreel B.J. Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. // *J. Cell Biol.* – 1981. – v.89(3). – p.585-592.

Zimmerman W, Doxsey SJ. Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles. // *Traffic* – 2000. – v.1. – p.927–934.

Zinovkina, L. A., Poltarau, A. B., Solovyanova, O. B., and Nadezhdina, E. S. Chinese hamster protein homologous to human putative protein kinase KIAA0204 is associated with nuclei, microtubules and centrosomes in CHO-K1 cells. // *FEBS Lett.* – 1997. – v.414. – p.135–139.