

СВОБОДНЫЕ И СВЯЗАННЫЕ С ЦЕНТРОСОМОЙ МИКРОТРУБОЧКИ: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ДВУХКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ

© К. М. Смурова,¹ И. Б. Алиева,^{1,*} И. А. Воробьев^{1,2}

¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ² Кафедра клеточной биологии и гистологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;
* электронный адрес: irina_alieva@belozersky.msu.ru

В культивируемых *in vitro* интерфазных клетках животных микротрубочки образуют сеть, наиболее плотную в центральной части клетки, в районе centrosомы, и разреженную на периферии. Поскольку в центральной области клетки идентификация индивидуальных микротрубочек значительно затруднена, а чаще невозможна, существует ряд подходов для исследования микротрубочек во внутренней цитоплазме клетки, основанных на снижении их плотности — как реальной, за счет их частичной деполимеризации (воздействие холода или митостатиков) или уменьшения толщины клетки (анализ цитопластов), так и видимой (за счет фотообесцвечивания предсуществующих микротрубочек и анализа тех, что полимеризуются заново). В настоящей работе предлагается метод, позволяющий на основе определения оптической плотности оценить состояние системы цитоплазматических микротрубочек в целом. Метод состоит в сравнении зависимостей, описывающих изменение оптической плотности микротрубочек от центра клетки к периферии в контроле и эксперименте. Анализ предложенным методом живых клеток показал, что характер кривых, описывающих падение оптической плотности от центра клетки к ее периферии, различен для разных типов клеток, зависимость может описываться как экспоненциальной (культура СНО), так и линейной (культуры NIH-3T3 и REF) регрессией. Наши предыдущие исследования позволили предположить, что характер зависимости определяется соотношением свободных и связанных с centrosомой микротрубочек и положением их концов в цитоплазме клеток. Для проверки данного предположения были рассмотрены модельные системы, где все микротрубочки предполагались прямыми и радиально расходящимися от centrosомы, но с различным расположением плюс- и минус-концов. В модельной системе, в которой все минус-концы микротрубочек связаны с centrosомой, а плюс-концы находятся на различном расстоянии от нее, плотность микротрубочек описывается экспонентой ($f(x) = ae^{-bx}$). Введение в систему свободных микротрубочек приводит к изменению характера зависимости, и система, в которой свободных микротрубочек, имеющих минус-концы на различном расстоянии от centrosомы, в 5 раз больше, чем связанных с centrosомой, описывается уравнением линейной регрессии ($f(x) = k \cdot x + b$), что соответствует экспериментально полученным зависимостям для клеток 3T3 и REF. Таким образом, мы полагаем, что даже в клетках с радиальной системой микротрубочек свободные микротрубочки могут составлять большинство.

Ключевые слова: centrosомы, связанные с centrosомой микротрубочки, свободные микротрубочки, распределение микротрубочек в клетке, видеомикроскопия.

Микротрубочки — универсальный компонент цитоскелета животной клетки — были впервые описаны и подробно исследованы на электронно-микроскопическом уровне после введения в практику альдегидной фиксации (Ledbetter, Porter, 1963; Porter, 1966; Stubblefield, Brinkley, 1966; De Harven, 1968). Метод трансмиссионной микроскопии позволял выявлять микротрубочки на ультратонких срезах клеток и тканей, но проследить за протяженными микротрубочками было сложно. С появлением моноспецифических антител к тубулину микротрубочки стали изучать с помощью метода иммуноцитохимического окрашивания (Brinkley et al., 1975; Weber et al., 1975). Метод позволил видеть отдельные индивидуальные микротрубочки на периферии клетки или в тонких участках ламеллы, но не во внутренней цитоплазме клетки (где высокая плотность микротрубочек и боль-

шая толщина клетки препятствовали их выявлению). Предложенные позднее высоковольтная электронная микроскопия целых клеток (Osborn et al., 1978) и метод реплик (Svitkina, Borisy, 1998), несмотря на большое увеличение, которое обеспечивает электронный микроскоп, также могли использоваться только для анализа клеток с незначительной плотностью микротрубочек.

Появившиеся в конце прошлого века методы видеомикроскопии с усилением контраста дали возможность вернуться на уровень светооптических наблюдений, а развитие методики микроинъекций меченого тубулина в клетку позволило исследовать микротрубочки в живых клетках (Keating et al., 1997; Vorobjev et al., 1997, 1999; Borisy, Rodionov, 1999; Wadsworth, 1999). Оказалось, что общее число микротрубочек в культивируемой животной клетке колеблется от 100—200 в небольших по раз-

мерам клетках СНО (Komarova et al., 2002) или кератоцитах рыб (Vorobjev et al., 2003) до 5000 и более в меланофорах рыб (Vorobjev et al., 1999). В те же годы были детально описаны динамические характеристики индивидуальных микротрубочек (Shelden, Wadsworth, 1993; Dhamodharan, Wadsworth, 1995; Danowski, 1998; Yvon et al., 1999; Rusan et al., 2001). Однако со временем стало ясно, что, используя параметры, хорошо описывающие поведение отдельной микротрубочки, охарактеризовать поведение всей их популяции в клетке затруднительно.

Для количественной характеристики поведения популяции микротрубочек в целом была предложена модель, в которой концы микротрубочек рассматриваются как точки, а их поведение в живой клетке описывается как одномерная диффузия (Vorobjev et al., 1997, 1999). Такой подход дает возможность предсказывать изменения в системе микротрубочек на основании изменения поведения индивидуальных микротрубочек (Vorobjev et al., 1997; Komarova et al., 2002; Mimori-Kiyosue et al., 2005), однако он приложим только к клеткам, в которых плюс-концы микротрубочек можно идентифицировать.

Существует ряд экспериментальных подходов для исследования микротрубочек во внутренней цитоплазме клетки, связанных с уменьшением их плотности. Все используемые методы подразумевают потерю части микротрубочек — либо действительно происходящую в реальности (при частичной деполимеризации микротрубочек или энуклеации клеток), либо мнимую, выявляемую только лишь визуально (когда за счет фотообесцвечивания предсуществующих микротрубочек экспериментатор наблюдает только вновь полимеризующиеся). Таким образом, сама методика проведения подобных экспериментов не позволяет анализировать всю популяцию микротрубочек, оставляя проблему открытой. Необходимы характеристики, которые позволяют оценить изменения в системе микротрубочек в условиях, когда плотность микротрубочек велика и выделить индивидуальные микротрубочки невозможно. Ранее нами была предложена одна из таких характеристик — оптическая плотность флуоресценции меченых микротрубочек, измерение которой на фиксированных препаратах позволяет оценить их количество в данном районе клетки (Смурова и др., 2002). Метод позволил установить, что в ходе экспериментальных воздействий распределение микротрубочек между центральной частью и периферией клеток изменяется (Смурова и др., 2002; Чернобельская и др., 2004).

Развивая предложенный подход, в настоящей работе мы поставили задачу исследовать распределение микротрубочек во внутренней цитоплазме нативных живых клеток разных линий по плотности флуоресценции экзогенного Су3-меченного тубулина и полученные для живых клеток зависимости воспроизвести на модельной системе из радиально расходящихся прямых микротрубочек. Предлагаемый метод позволит оценить соотношение свободных и связанных с центросомой микротрубочек во внутренней цитоплазме клетки.

Материал и методика

Культуры клеток. Клетки линии СНО культивировали в среде F-10 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина. Обе клеточные линии культивировали при 37 °С и 5 % CO₂ и высевали для экспериментов в чашки Петри, в дно которых были

вмонтированы разлинованные покровные стекла (Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ).

Клетки линии NIH-3T3 культивировали в среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина.

Клетки линии REF культивировали при 37 °С и 5 % CO₂ в среде DMEM/F12 (Sigma, США) с добавлением 3 % эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина и высаживали для экспериментов на покровные стекла.

Обесцвечивание флуоресцентно меченых микротрубочек в живой клетке. Клетки культивировали в течение 2 сут, после чего в цитоплазму инъецировали Су3-меченный тубулин в концентрации 10 мг/мл по методике, описанной ранее (Komarova et al., 2002). Наблюдения начинали спустя 3—4 ч после микроинъекции, во время наблюдения температуру на столике микроскопа поддерживали на уровне 36—37 °С. Для наблюдения за микротрубочками, полимеризованными из экзогенного Су3-тубулина, в среду культивирования добавляли оксиразу (Oxurase, Inc., Ashland, OH), позволяющую снизить эффекты фотообесцвечивания и фотоповреждения клеток (Mikhailov, Gundersen, 1995). Затем поверх культуральной среды наносили слой минерального масла, что позволяло предотвратить закисление среды в ходе эксперимента, возникающее за счет ее контакта с воздухом.

Обесцвечивание микротрубочек проводили, используя аргоновый лазер мощностью 3 Вт, на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse, как описано ранее (Keating et al., 1997). Для удобства измерения фокусировка лазера была изменена таким образом, что область воздействия лазерного излучения увеличилась до полосы шириной 8—10 мкм и длиной 40—50 мкм (рис. 1).

Клетки наблюдали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse с объективом Plan 100×, 1.3 NA, 16-битные изображения получали с помощью охлаждаемой CCD-камеры (CH250, Photometrics Ltd., Tucson, AZ), управляемой программой Metamorph (Universal Imaging Corp., Westchester, PA). Серии из 100—200 изображений фотографировали с интервалом 3 с; съемку начинали за 30—60 с до фотообесцвечивания микротрубочек.

Измерение интенсивности флуоресценции тубулина в цитоплазме живых клеток. Интенсивность флуоресценции Су3-тубулина в цитоплазме живых клеток СНО, NIH-3T3 и REF измеряли через 3—4 ч после микроинъекции (т. е. после достижения равновесного состояния) в десяти квадратных участках со стороной 3.5 мкм, расположенных один за другим, от района центросомы (1-й участок измерения) до края клетки (10-й участок измерения). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью программы MetaMorph (Universal Imaging, США) как среднюю оптическую плотность на необработанных изображениях клеток. Для определения собственной флуоресценции микротрубочек из значений общей интенсивности флуоресценции в каждом данном участке измерения были вычтены значения интенсивности, соответствующие деполимеризованному тубулину, которые были получены следующим образом. Первую серию измерений в выбранных участках каждой клетки проводили до воздействия лазерным пучком (рис. 1, а), а вторую серию в тех же участках измерения, но через 6—9 с после облучения (т. е. в то время, когда все микротрубочки были обесцвечены) и она отражала интенсивность флуоресценции только растворен-

ного СуЗ-тубулина, поскольку константа диффузии тубулина достаточно велика и равновесие за этот период времени достигалось (рис. 1, б). Данный подход позволяет исключить поправку, которую мы делали в предыдущих работах, на различие фонового свечения растворенного СуЗ-тубулина в разных участках клетки в связи с неоднородностью ее толщины, значительно большей в центральной области клетки по сравнению с ее периферией (Смулова и др., 2002; Чернобельская и др., 2004).

Плотность микротрубочек (ρ_{MT}) в каждом участке измерения рассчитывали по формуле

$$\rho_{\text{MT}} = I_{\text{туб.}} - I_{\text{р/туб.}}$$

где $I_{\text{туб.}}$ — полная интенсивность флуоресценции тубулина, а $I_{\text{р/туб.}}$ — интенсивность флуоресценции растворенного в цитоплазме тубулина.

Рассчитанные значения плотности микротрубочек для данного участка измерения, усредненные по 10 клеткам, использовали для построения гистограмм.

Моделирование системы микротрубочек. Для анализа системы микротрубочек был применен метод их моделирования с использованием компьютерной программы векторной графики Corel Draw 10 (Corel Corporation, США). В программе моделировали изображения клеток, содержащих систему микротрубочек с заданными параметрами, прорисовывали контуры, изображающие клетки с определенным соотношением и взаимным расположением свободных и связанных с центросомой микротрубочек. В модельной системе предполагается, что микротрубочки прямые, и их изображали прямыми линиями одинаковой толщины.

Как связанные с «центросомой», так и свободные «микротрубочки» были ориентированы радиально — они расходились из центральной области «клетки» (из точки, которую условно считали «центросомой») и никогда не пересекались. «Микротрубочки» располагались равномерно, т. е. на каждом заданном расстоянии от «центросомы» до края «клетки» расстояние между любыми соседними «микротрубочками» было одинаковым (рис. 3, 4). Общее число «микротрубочек» в модельной клетке составляло 400, по длине и положению концов они разделялись на несколько классов. Было рассмотрено пять типов модельных «клеток» со следующими характеристиками.

1. Система «микротрубочек» состояла только из связанных с «центросомой» «микротрубочек», имеющих длину, равную радиусу клетки (проксимальные концы всех «микротрубочек» располагались на «центросоме», дистальные — у края «клетки»).

2. Все «микротрубочки» были связаны с «центросомой», но только половина «микротрубочек» имела длину, равную радиусу «клетки»; вторая половина имела длину, равную 1/2 радиуса «клетки».

3. Также присутствовали только связанные с «центросомой» «микротрубочки», но длина их была различной — первая треть «микротрубочек» доходила до края «клетки», вторая треть «микротрубочек» имела длину, примерно равную 2/3 от радиуса «клетки», и длина оставшихся «микротрубочек» составляла 1/3 от радиуса «клетки».

4. Помимо связанных с «центросомой» присутствовали радиально расположенные свободные «микротрубочки» (их проксимальные концы не были связаны с «центросомой», а дистальные были направлены в сто-

рону «клеточной мембраны»), соотношение двух типов микротрубочек составляло 1 : 1. Длина свободных «микротрубочек» варьировала, половина их имела длину, равную 1/2 от радиуса «клетки», вторая половина — 3/4 от радиуса. Расположение проксимальных концов по отношению к центросоме было различным — первые (более короткие микротрубочки) были удалены от «центросомы» на расстояние, равное 1/2 ее радиуса, а последние — на расстояние, равное 1/4 ее радиуса. Дистальные концы как связанных с центросомой, так и свободных микротрубочек достигали края «клетки».

5. Количество свободных «микротрубочек» в 5 раз превышало количество «микротрубочек», связанных с «центросомой» (соотношение 5 : 1). Для этого в каждом секторе, ограниченном связанными с «центросомой» «микротрубочками», было прорисовано по пять свободных «микротрубочек» (рис. 4, врезка). Проксимальные концы свободных «микротрубочек» располагались на разном расстоянии от «центросомы» (в равном соотношении «микротрубочки» начинались на расстояниях 1/10, 2/10, 3/10, 4/10 и 5/10 от «центросомы»), а дистальные концы как связанных с «центросомой», так и свободных «микротрубочек» достигали края «клетки».

В полученных пяти модельных «клетках» измеряли зависимость оптической плотности «микротрубочек» от точки и схождения на «центросоме» до края «клетки». Схема измерений, использованная для модельных «клеток», была аналогична описанной выше методике: оптическую плотность измеряли с использованием программы MetaMorph в десяти квадратных участках, расположенных от «центросомы» (где плотность микротрубочек была максимальной) до края «клетки». В модельных клетках поправку на толщину клетки не делали.

Статистическая обработка данных и построение графиков. Данные обрабатывали статистически в программах Sigma Plot 7.1 (SPSS Science, США) и Excel (Microsoft Corp., США). Для определения достоверности различия между двумя выборками использовали *t*-тест (критерий Стьюдента).

Для построения графиков использовали программу Sigma Plot 7.1, для аппроксимации графиков — программы Sigma Plot 7.1 и Table Curve 2D 5.1 (Systat Software Inc., США).

Результаты и обсуждение

Несмотря на интенсивное изучение, принципы организации системы цитоплазматических микротрубочек до конца неясны, а некоторые общеизвестные факты противоречат друг другу. Так, общепринятая точка зрения гласит, что в животной клетке центросома является основным центром организации микротрубочек и что все микротрубочки растут от нее в направлении периферии клетки (Alberts et al., 2002). Однако по данным электронной микроскопии, количество микротрубочек, непосредственно ассоциированных с центросомой, составляет 20—60 (Gudima et al., 1988; Alieva, Vorobjev, 1994), т. е. оно незначительно по сравнению с их общим количеством в клетке. Даже в меланофорах, в цитоплазме которых может существовать 5000 микротрубочек и более (Vorobjev et al., 1999), с центросомой связано не более 350—400 (Schliwa, 1978; Schliwa et al., 1979). Более поздние исследования подтвердили, что от центросомы отходит значительно меньше микротрубочек, чем существу-

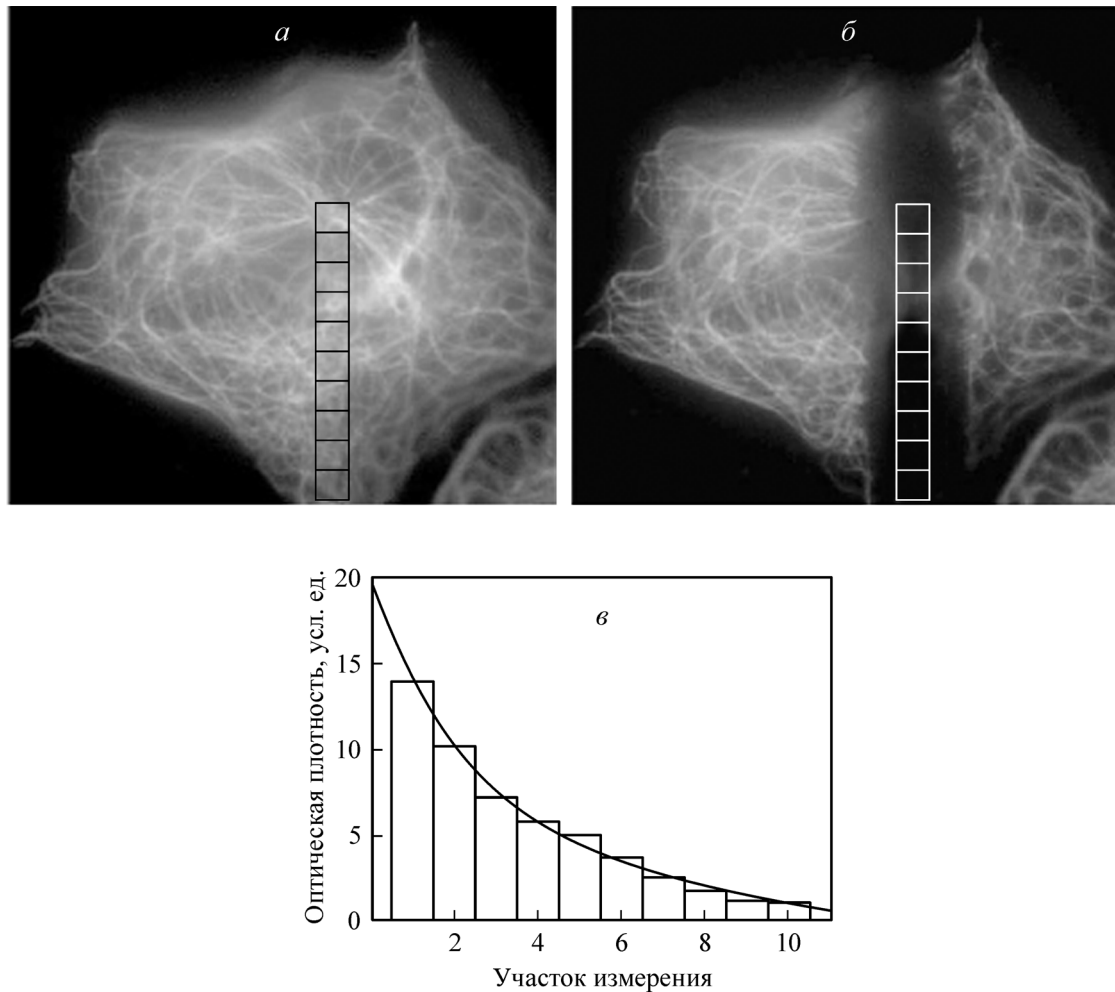


Рис. 1. Измерение интенсивности флуоресценции Cy-3-тубулина в цитоплазме живых клеток СНО.

Интенсивность флуоресценции измеряли в десяти квадратных участках со стороной 3.5 мкм, расположенных один за другим, от района centrosомы (1-й участок измерения) до края клетки (10-й участок измерения). Для определения собственной флуоресценции микротрубочек из значений общей интенсивности флуоресценции в каждом данном участке измерения (а) были вычтены значения интенсивности, соответствующие деполимеризованному тубулину (б). в — изменение интенсивности флуоресценции микротрубочек, расположенных в области между клеточным центром и ламеллой клетки, в зависимости от расстояния от centrosомы до клеточного края в клетках СНО; аппроксимация экспонентой ($P > 0.99$).

ет в клетке (Vidair et al., 1993), и что в цитоплазме существуют многочисленные микротрубочки, не связанные с какими-либо морфологически выраженными центрами организации, причем количество свободных микротрубочек может достигать 90 % от их общего числа (Vogobjev et al., 1997).

Цель настоящего исследования состояла в попытке оценить долю свободных микротрубочек в клетках с преимущественно радиальной системой микротрубочек.

Оценка состояния системы микротрубочек в живых клетках разных линий. После инъекции флуоресцентно меченного тубулина в живую клетку интенсивность ее флуоресценции складывается из интенсивности флуоресценции полимеризованного в микротрубочки тубулина и интенсивности флуоресценции тубулина, не включившегося в микротрубочки и растворенного в цитоплазме клетки. Метод обесцвечивания лазером позволяет измерить отдельно интенсивность флуоресценции растворенного тубулина, поскольку его диффузия значительно быстрее, чем процесс полимеризации микротрубочек.

Измерения интенсивности флуоресценции микротрубочек в клетках СНО представлены на рис. 1. Теоретическое предсказание состоит в том, что если бы система микротрубочек в интактных клетках СНО имела радиальную организацию, т. е. все микротрубочки были бы прикреплены на centrosоме и имели длину, равную радиусу клетки, то плотность расположения микротрубочек от centrosомы к ламелле должна была описываться уравнением $f(x) = a/x$, где x — среднее расстояние от centrosомы в пределах выбранного квадрата. Если предполагать, что длина микротрубочек различна (плюс-концы некоторых микротрубочек не доходят до края клетки), то скорость убывания плотности микротрубочек должна быть еще выше.

На практике для сравнительно небольшого числа измерений аппроксимирующие кривые, описываемые уравнениями $f(x) = a/x$ и $f(x) = a \exp^{-bx}$ (где a , b — коэффициенты), имеют сходный вид и (с учетом погрешности измерений) достоверно не различаются.

Действительно, в клетках СНО убывание интенсивности флуоресценции микротрубочек от centrosомы к

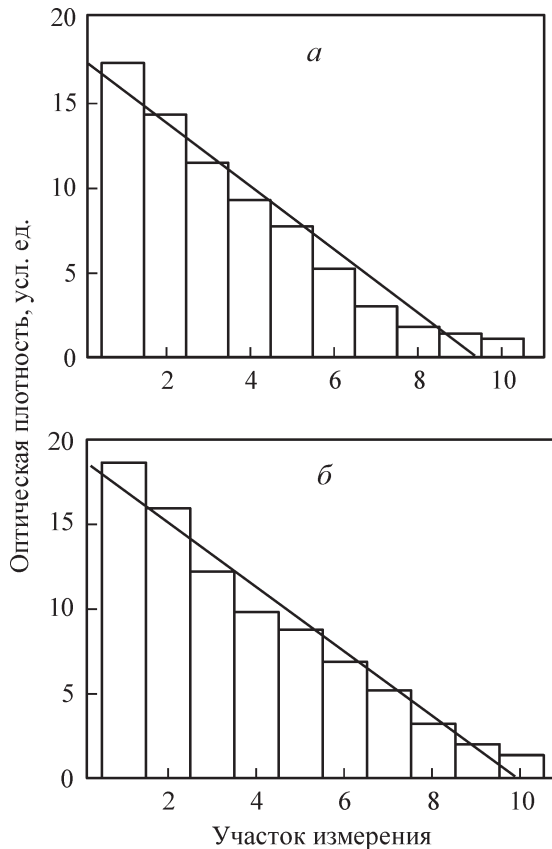


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции микротрубочек, расположенных в области между клеточным центром и ламеллой клетки, в зависимости от расстояния от centrosомы до клеточного края в клетках линии NIH-3T3 (а) и REF (б); линейная аппроксимация ($P > 0.99$).

краю клетки с вероятностью 95 % описывается экспоненциальной регрессией $f(x) = ae^{-bx}$ с коэффициентами a и b , равными 18.3 и -0.3 соответственно. Таким образом, гипотеза о том, что подавляющее число микротрубочек в клетках СНО закреплено на centrosоме, по крайней мере в первом приближении, правдоподобна.

В клетках NIH-3T3 и REF графики зависимости интенсивности флуоресценции микротрубочек вдоль радиуса клетки иные (рис. 2). В этих клетках они достоверно отличаются от экспоненциального закона и с вероятностью 95 % аппроксимируются уравнением линейной регрессии $f(x) = a + bx$. В клетках NIH-3T3 коэффициенты a и b линейной регрессии равны 17.4 и -1.9 соответственно (рис. 2, а). Таким образом, изменение интенсивности флуоресценции описывается уравнением линейной регрессии $f(x) = 17.4 - 1.9x$. В клетках REF коэффициенты a и b равны 18.9 и -1.9 соответственно: $f(x) = 18.9 - 1.9x$ (рис. 2, б). Таким образом, в культурах REF и NIH-3T3 между centrosомой и краем клетки плотность микротрубочек убывает сходным образом и существенно медленнее, чем по гиперболической ($f(x) = a/x$) или экспоненциальной ($f(x) = ae^{-bx}$) зависимости.

Поскольку рост микротрубочек во внутренней цитоплазме этих клеток происходит так же прямолинейно, как и в клетках СНО, для объяснения различий в плотности микротрубочек необходимо предположить, что у части микротрубочек минус-концы расположены на значительном расстоянии от centrosомы.

Для того чтобы оценить необходимый для формирования такой зависимости вклад свободных микротрубочек, мы рассмотрели модель, где все микротрубочки направлены от centrosомы вдоль радиуса клетки, а их концы располагаются на различных расстояниях от centrosомы и края клетки. Как указывалось ранее, толщина клетки в данной модели не учитывается, а все микротрубочки расположены так, что не пересекают друг друга.

Моделирование системы микротрубочек. В первой модельной клетке сеть состояла только из связанных с «centrosомой» «микротрубочек», имеющих постоянную длину, равную радиусу «клетки» (рис. 3, клетка 1). В такой «клетке» проксимальные концы всех «микротрубочек» располагались на «centrosоме», дистальные — у «клеточного» края. Измерения показали, что в этом случае график убывания оптической плотности с вероятностью 98 % аппроксимируется кривой экспоненциального затухания $f(x) = ae^{-bx}$ с параметрами $a = 223$ и $b = 0.9$ (рис. 3).

Перепад между первым и вторым квадратами в модельной «клетке» значительно больше, чем в клетках СНО, что может частично являться следствием наложения друг на друга проксимальных концов «микротрубочек». Однако в реальных клетках разница между первым и вторым столбцами никогда не бывает столь значительной и параметр a экспоненты всегда существенно меньше. Это может свидетельствовать о том, что не все минус-концы микротрубочек сосредоточены исключительно на centrosоме даже в клетках типа СНО.

По мере удаления в направлении периферии модельной «клетки» падение оптической плотности происходит более плавно, а начиная с 6-го участка измерения оптическая плотность практически не изменяется (выходит на плато). Это объясняется значительным уменьшением количества микротрубочек на единицу площади на периферии «клетки» по сравнению с ее центром — поскольку их количество обратно пропорционально квадрату расстояния от «centrosомы» до участка измерения, в предлагаемой модели с расстояния, равного приблизительно половине радиуса «клетки» и до ее края, количество «микротрубочек» в каждом следующем участке измерения (с 6-го по 10-й) относительно мало и в этом смысле приблизительно равно предыдущему.

Если в модельной системе присутствуют только связанные с «centrosомой» «микротрубочки», но длина их различна (в систему в соотношении 1 : 1 входят «микротрубочки», длина которых равна радиусу «клетки», и «микротрубочки», длина которых равна $\frac{1}{2}$ радиуса «клетки») (рис. 3, клетка 2), то характер зависимости существенно не изменяется и коэффициенты уравнения экспоненциальной регрессии составляют: $a = 214$ и $b = 0.4$. Таким образом, коэффициент b уменьшился более чем в 2 раза, что говорит о более плавном падении оптической плотности в центральной части модельной клетки (рис. 3).

В живых клетках микротрубочка, родившись на centrosоме, растет в направлении края клетки, а достигнув его, претерпевает короткие периоды разборки и сборки на незначительную длину, но может разобратся и до centrosомы (Komarova et al., 2002). Поэтому в таких клетках, как СНО и NRK, где предположительно до 95 % микротрубочек связаны с centrosомой, в каждый конкретный момент времени дистальные концы индивидуальных микротрубочек удалены от centrosомы на разное расстояние (Komarova et al., 2002). Моделируя систему

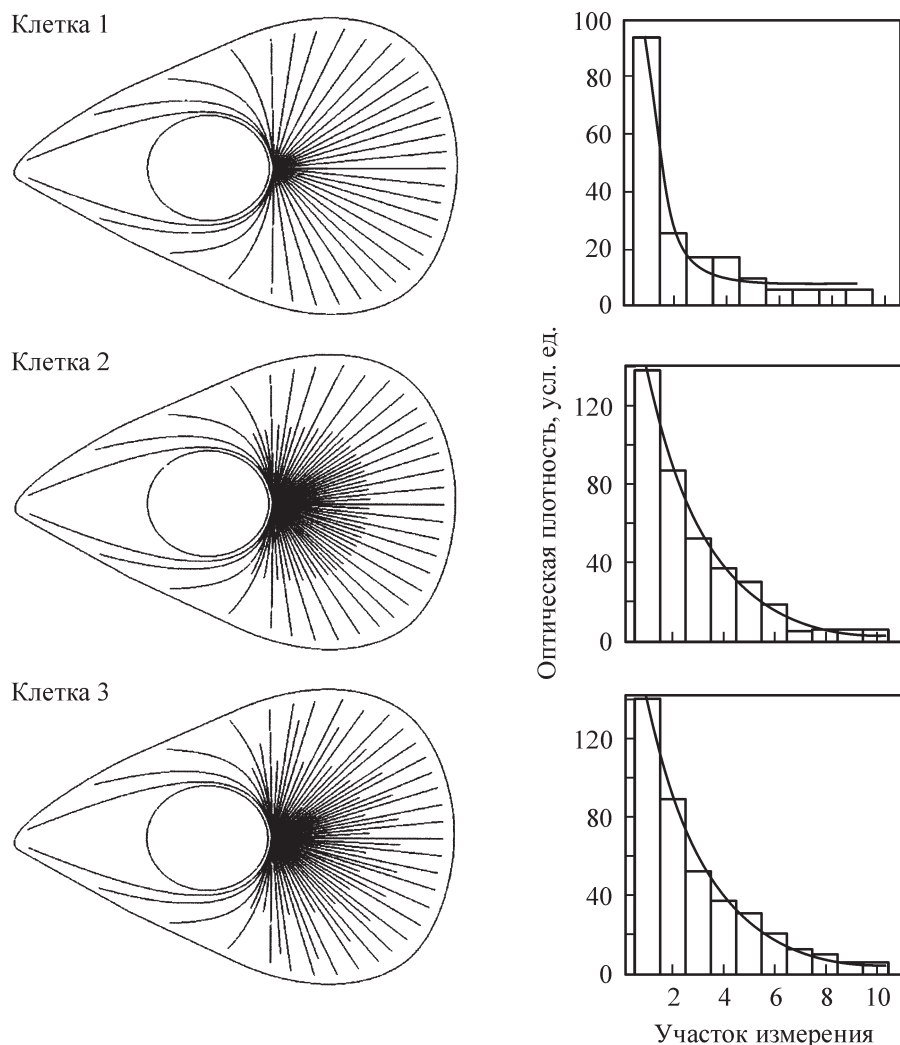


Рис. 3. Моделирование системы связанных с centrosомой микротрубочек с использованием программы Corel Draw 10 (Corel Corporation, США).

В модельных клетках 1—3 (слева) система состоит только из связанных с «centrosомой» «микротрубочек», одинаковых по длине (клетка 1) или имеющих разную длину (клетки 2 и 3). На каждой гистограмме (справа) представлены результаты измерений оптической плотности в соответствующих модельных клетках и кривые, аппроксимирующие полученные зависимости.

микротрубочек, аналогичную описанной, мы анализировали «клетку», в которой присутствовали связанные с «centrosомой» «микротрубочки» разной длины — треть «микротрубочек» доходила до края клетки, вторая треть «микротрубочек» имела длину, примерно равную $2/3$ от радиуса «клетки», а длина оставшихся «микротрубочек» была равной $1/3$ от радиуса «клетки» (рис. 3, клетка 3). В этом случае по виду экспонента незначительно отличается от кривой, описывающей расположение микротрубочек в предыдущем варианте (рис. 3, клетка 2), поскольку коэффициенты уравнения экспоненциальной регрессии практически совпадают (коэффициенты a равны 214 и 211 соответственно, коэффициент b в обоих случаях равен 0.4). Падение оптической плотности происходит плавно и на периферии клетки, включая самые крайние участки измерения, что дает лучшее приближение к экспериментальной кривой (рис. 3).

На следующем этапе исследования в модельную клетку были введены свободные микротрубочки. Первоначально количество свободных «микротрубочек» составляло половину всех «микротрубочек» в модель-

ной клетке, а длина свободных «микротрубочек» варьировала от $1/2$ до $3/4$ от клеточного радиуса (рис. 4, клетка 4).

В такой модельной клетке с вероятностью 99 % падение оптической плотности описывалось уравнением экспоненциальной регрессии с коэффициентами $a = 85$, $b = 0.2$ (рис. 4). Таким образом, скорость падения оптической плотности в районе «centrosомы» упала вдвое по сравнению с клетками 2 и 3 (поскольку коэффициент b уравнения регрессии снизился вдвое) и более чем в 4 раза по сравнению с клеткой 1 (кривизна экспоненты минимальна по сравнению с другими «клетками»). По мере удаления от «centrosомы», начиная с 3-го участка измерения оптическая плотность снижалась все более медленно, поскольку в силу заданного расположения (все дистальные концы «микротрубочек» расположены у края «клетки») количество «микротрубочек», попадающих в эти участки измерения, также уменьшалось медленно.

Результаты экспериментальных исследований показывают, что доля свободных микротрубочек может составлять до 80—90 % от их общего количества в цито-

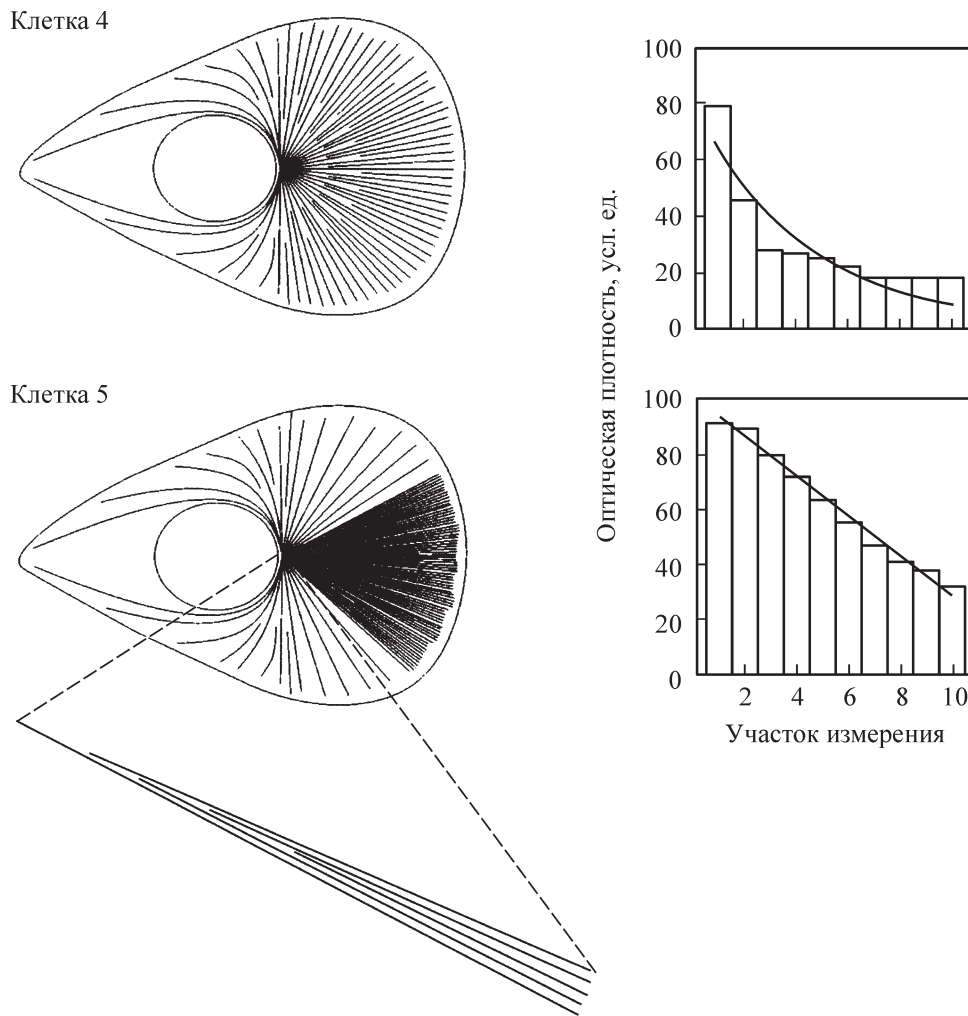


Рис. 4. Моделирование системы связанных с centrosомой и свободных микротрубочек с использованием программы Corel Draw 10 (Corel Corporation, США).

В модельных клетках 4, 5 (слева) система состоит из связанных с «центросомой» и свободных «микротрубочек». Дистальные концы всех микротрубочек находятся вблизи края клетки. Увеличенный фрагмент иллюстрирует расположение проксимальных концов «микротрубочек» относительно «центросомы» в клетке 5. Справа представлены результаты измерений оптической плотности в модельных клетках и кривые, аппроксимирующие полученные зависимости.

плазме (Vorobjev et al., 1997). Имитируя клетку такого типа, в модельную систему мы добавили столько свободных микротрубочек, что их количество в 5 раз превышало количество «микротрубочек», связанных с «центросомой» (рис. 4, клетка 5). Свободные «микротрубочки» были равномерно распределены между радиальными «микротрубочками», расходящимися из центра «клетки». По отношению к «центросоме» их проксимальные концы располагались следующим образом: четверть «микротрубочек» начиналась на расстоянии, равном $1/8$ радиуса клетки; вторая четверть «микротрубочек» начиналась на расстоянии, равном $1/4$ радиуса клетки; третья четверть «микротрубочек» начиналась на расстоянии, равном $3/8$ радиуса клетки; и последняя четверть начиналась на расстоянии, равном половине радиуса клетки (см. увеличенный фрагмент рис. 4). Дистальные концы всех «микротрубочек» находились у края «клетки». Соотношение связанных с «центросомой» и свободных «микротрубочек» составило $1 : 5$. В этом случае с вероятностью 93 % падение оптической плотности от «центросомы» до края «клетки» (участки измерения с 1-го по 10-й) представляло собой линейную зависимость, оно описывалось урав-

нением линейной регрессии $f(x) = ax + b$ (рис. 4). Для клетки 5 коэффициенты в уравнении линейной регрессии составили: $a = -6.05$, $b = 100.8$.

Проведенный нами анализ модельных «клеток», сеть «микротрубочек» в которых имитирует существующую в реальных клетках, показывает, что соотношение свободных и связанных с centrosомой микротрубочек, а также относительное положение проксимальных и дистальных концов «микротрубочек» вдоль радиуса клетки определяют характер графика, описывающего падение оптической плотности. Система, состоящая из связанных с «центросомой» «микротрубочек», радиально расходящихся от центра клетки до ее края, может быть описана экспонентой $f(x) = ae^{-bx}$, где коэффициент b меньше единицы. При уменьшении длины части связанных с «центросомой» «микротрубочек» кривизна экспоненты уменьшается, а введение в систему свободных «микротрубочек» приводит к изменению характера зависимости — система, в которой свободных «микротрубочек» не менее чем в 5 раз больше, чем связанных с «центросомой» описывается уравнением линейной регрессии ($f(x) = ax + b$).

Таким образом, для того чтобы получить линейную зависимость убывания плотности микротрубочек по мере удаления от центросомы, в систему пришлось ввести не менее 5—6 свободных микротрубочек. Данная зависимость соблюдается при дополнительном условии, что плюс-концы всех микротрубочек располагаются вблизи края клетки. Очевидно, что для сохранения линейной зависимости в том случае, когда некоторые плюс-концы находятся в глубине клетки, необходимо увеличение доли свободных микротрубочек. Поскольку в подавляющем большинстве клеток доля концов микротрубочек на последней 1/10 радиуса не превышает половины от общего их числа (Vorobjev et al., 1999; Komarova et al., 2002) и только в редких случаях практически все микротрубочки оканчиваются вблизи края клетки (Mimori-Kiyosue et al., 2005), можно с определенностью полагать, что в клетках, где плотность микротрубочек убывает примерно по линейному закону, доля свободных микротрубочек (т. е. имеющих плюс-концы на расстоянии более 2 мкм от центросомы) составляет более 80 %.

Развитие подходов к изучению микротрубочек — от общего к частному и от частного к общему. Бурный расцвет исследований цитоплазматических микротрубочек всегда был обусловлен появлением новых методических подходов. В историческом аспекте это позволяет нам наблюдать переходы от исследования системы микротрубочек как единого целого на фиксированных препаратах до изучения свойств и характеристик отдельных микротрубочек в живых клетках, а далее — возврат к попыткам понимания (но уже на более высоком уровне) динамического устройства всей системы микротрубочек в клетке.

Соответственно уровню развития методических подходов продолжительное время в литературе можно было встретить только качественное описание системы микротрубочек, выявленных на световом уровне с использованием меченных флуоресцентным красителем антител к тубулину (Osborn, Weber, 1977; Badley et al., 1980; Brinkley et al., 1980). Использование современных цифровых камер с охлаждаемой матрицей дало возможность оценивать систему микротрубочек количественно. Однако высокая плотность микротрубочек во внутренней цитоплазме клетки и большая толщина самой клетки в ее центральной части препятствует их исследованию, что по-прежнему требует новых подходов.

Плотность свечения микротрубочек можно понизить непосредственно в живых клетках. Чаще всего для этой цели микротрубочки частично или полностью деполимеризуют, используя холод или антитубулиновые агенты (Stubblefield, Brinkley, 1966; Keryet et al., 1984; De Brabder et al., 1986), а также используют цитопласты (Rodionov, Borisy, 1997a; Rodionov et al., 1999; Komarova et al., 2002). Однако оба эти подхода являются травматичными для клетки и, безусловно, нарушают ее нормальную жизнедеятельность. Удачным подходом является метод FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching), который позволяет обесцветить предсуществующие флуоресцентно меченные микротрубочки, тогда в обесцвеченной лазером цитоплазме будут видны только вновь полимеризующиеся фрагменты микротрубочек (Komarova et al., 2002). Однако все перечисленные подходы предполагают исследование только части популяции микротрубочек, но не всей популяции в целом, что заставляет искать иные методы исследования.

Метод разностных изображений позволяет в плотной массе микротрубочек выделить те, которые растут или укорачиваются, и если минус-концы укорачиваются, их можно идентифицировать (Vorobjev et al., 1999). Однако данный метод не позволяет выявить плюс-концы, стабильные более 10—15 с, поскольку боковые смещения микротрубочек не дают возможности проследить их историю.

Известно, что система микротрубочек в клетке представлена связанными с центросомой и свободными микротрубочками, соотношение которых зависит от типа клеток, причем в некоторых дифференцированных клетках (полярный эпителий, нейроны, клетки скелетных мышц) нецентросомальные микротрубочки составляют большинство (Mogensen, 2004). В предыдущих исследованиях методом измерения оптической плотности флуоресценции микротрубочек нам удалось установить, что в условиях эксперимента во внутренней цитоплазме клетки плотность расположения микротрубочек меняется по сравнению с нормой (Alieva, Vorobjev, 2000; Смурова и др., 2002, 2004; Чернобельская и др., 2004; Mimori-Kiyosue et al., 2005). В настоящей работе, анализируя изменение оптической плотности флуоресценции экзогенного Су3-меченного тубулина, мы исследовали распределение микротрубочек во внутренней цитоплазме нативных клеток СНО, NIH-3Т3 и REF и полученные для живых клеток зависимости восприняли на модельных «клетках» с заданным соотношением и расположением микротрубочек. Оказалось, что в отличие от клеток СНО, где до 95 % микротрубочек связаны с центросомой (Komarova et al., 2002), в клетках последних двух линий присутствует значительное количество (не менее 80 %) свободных микротрубочек. Таким образом, в клетках существуют два типа структур, организующих микротрубочки, — центросома (являющаяся местом локальной концентрации затравок для полимеризации микротрубочек), а также множество не связанных с центросомой затравок, рассеянных в цитоплазме.

Предложенная модель показывает, что в случае, когда все минус-концы микротрубочек связаны с центросомой, плотность микротрубочек вокруг центросомы существенно превышает характерную для живых или фиксированных клеток. Это означает, что в реальных клетках минус-концы микротрубочек как минимум распределены в центральной области клетки вокруг центросомы и большинство их удалено от центросомы на расстояние не менее 1/3—1/2 клеточного радиуса, причем такое распределение минус-концы стабильно во времени.

К сожалению, идентифицировать стабильные минус-концы микротрубочек в условиях, когда их общая плотность велика, не представляется возможным. Однако описан ряд фактов, подтверждающих, что стабильные минус-концы могут находиться не только на центросоме — они присутствуют на периферии клеток, причем не только в клетках эпителиальной природы, но и в фибробластах (Vorobjev et al., 1997). Наши предположения согласуются с тем, что около 80 % гамма-тубулиновых комплексов не ассоциированы с центросомой, а находятся в цитоплазме клетки (Moudjou et al., 1996), и укладываются в рамки представлений о существовании затравок для роста микротрубочек, которые расположены в эндоплазме клетки, но не на центросоме (Waterman-Storer, Salmon, 1997). Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают выводы о том, что даже в клетках с радиальной системой микротрубочек боль-

шинство из них может быть не связано с centrosомой. Следующий вопрос состоит в том, как и почему свободные микротрубочки могут образовывать радиальную картину. Частичный ответ на этот вопрос дают результаты экспериментов по самоорганизации радиальной системы микротрубочек во фрагменте меланофора рыбы (Rodionov, Borisy, 1997b; Vorobjev et al., 2001; Maly, Borisy, 2002; Cytrynbaum et al., 2004; Malikov et al., 2005), однако приложимость данной модели к другим клеткам требует дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность проф. Г. Г. Бориси (Северо-Западный университет, США) за предоставленные экспериментальные возможности и проф. Е. С. Надеждиной (Институт белка, РАН) за плодотворное обсуждение рукописи статьи и высказанные замечания и рекомендации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-48035, 05-04-49847 и 06-04-40233) и Совета по грантам президента РФ (проект МД 244.2003.04).

Список литературы

- Смулова К. М., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2002. Динамика восстановления цитоплазматических микротрубочек после их разрушения нокадазолом в клетках культуры Vero. Биол. мембраны. 19 (6) : 472—482.
- Смулова К. М., Бирюкова А. А., Гарсия Дж., Воробьев И. А., Алиева И. Б., Верин А. Д. 2004. Реорганизация системы микротрубочек в клетках легочного эндотелия в ответ на воздействие тромбина. Цитология. 46 (8) : 695—703.
- Чернобельская О. А., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2004. Динамика восстановления микротрубочек в клетке: быстрый рост от centrosомы и медленное восстановление свободных микротрубочек. Цитология. 46 (6) : 531—544.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. 2002. The cytoskeleton. In: Molecular biology of the cell. New York: Garland.
- Alieva I. B., Vorobjev I. A. 1994. Centrosome behavior under the action of uncoupler and the effect of disruption of cytoskeleton elements on the uncoupler-induced alterations of the centrosome. J. Struct. Biol. 113 : 217—224.
- Alieva I. B., Vorobjev I. A. 2000. Interphase microtubules in cultured cells: long or short? Membr. Cell Biol. 14 : 57—67.
- Badley R. A., Woods A., Carruthers L., Rees D. A. 1980. Cytoskeleton changes in fibroblast adhesion and detachment. J. Cell Sci. 43 : 379—390.
- Borisy G. G., Rodionov V. I. 1999. Lessons from the melanophore. FASEB J. 13 (Suppl. 2) : S221—S224.
- Brinkley B. R., Fuller E. M., Highfield D. P. 1975. Cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells in culture: analysis by tubulin antibody immunofluorescence. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72 : 4981—4985.
- Brinkley B. R., Wible L. J., Asch B. B., Medina D., Mace M. M., Beall P. T., Cailleau R. M. 1980. The microtubule cytoskeleton in normal and transformed cells *in vitro*. Results Probl. Cell Differ. 11 : 132—138.
- Cytrynbaum E. N., Rodionov V., Mogilner A. 2004. Computational model dynein-dependent self-organization of microtubule asters. J. Cell Sci. 117 (Pt 8) : 1381—1397.
- Danowski B. A. 1998. Microtubule dynamics in serum-starved and serum-stimulated Swiss 3T3 mouse fibroblasts: implications for the relationship between serum-induced contractility and microtubules. Cell Motil. Cytoskeleton. 40 : 1—12.
- De Brabander M., Geuens G., Nuydens R., Willebrords R., Aerts F., De Mey J. 1986. Microtubule dynamics during the cell cycle: the effects of taxol and nocodazole on the microtubule system of Pt K2 cells at different stages of the mitotic cycle. Int. Rev. Cytol. 101 : 215—274.
- De Harven E. 1968. Electron microscope study of human leukemic cells in tissue culture. Bibl. Haematol. 30 : 300—302.
- Dhamodharan R., Wadsworth P. 1995. Modulation of microtubule dynamic instability *in vivo* by brain microtubule associated proteins. J. Cell Sci. 108 (Pt 4) : 1679—1689.
- Gudima G. O., Vorobjev I. A., Chentsov Yu. S. 1988. Centriolar location during blood cell spreading and motion *in vitro*: an ultrastructural analysis. J. Cell Sci. 89 (Pt 2) : 225—241.
- Keating T. J., Peloquin J. G., Rodionov V. I., Momcilovic D., Borisy G. G. 1997. Microtubule release from the centrosome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 94 : 5078—5083.
- Keryer G., Ris H., Borisy G. G. 1984. Centriole distribution during tripolar mitosis in Chinese hamster ovary cells. J. Cell Biol. 98 : 2222—2229.
- Komarova Y. A., Vorobjev I. A., Borisy G. G. 2002. Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior; asymmetric transition frequencies and effects of cell boundary. J. Cell Sci. 115 (Pt 17) : 3517—3539.
- Ledbetter M. C., Porter K. R. 1963. A microtubule in plant cells: fine structure. J. Cell Biol. 19 : 239—258.
- Malikov V., Cytrynbaum E. N., Kashina A., Mogilner A., Rodionov V. 2005. Centering of a radial microtubule array by translocation along microtubules spontaneously nucleated in the cytoplasm. Nat. Cell Biol. 7 : 1213—1218.
- Maly I. V., Borisy G. G. 2002. Self-organization of treadmill cytoskeletons into a polar array. Trends Cell Biol. 12 : 462—465.
- Mikhailov A. V., Gundersen G. G. 1995. Centripetal transport of microtubules in motile cells. Cell Motil. Cytoskeleton. 32 : 173—186.
- Mimori-Kiyosue Y., Grigoriev I., Lansbergen G., Sasaki H., Matsui C., Severin F., Galjart N., Grosveld F., Vorobjev I., Tsukita S., Akhmanova A. 2005. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus end dynamics at the cell cortex. J. Cell Biol. 68 : 141—153.
- Mogensen M. 2004. Microtubule organizing centers in polarized epithelial cells. In: Centrosome in development and disease. Weinheim: WILEY-VCH.
- Moudjou M., Bordes N., Paintrand M., Bomens M. 1996. Gamma-tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. J. Cell Sci. 109 (Pt 4) : 875—887.
- Osborn M., Born T., Koitsch H. J., Weber K. 1978. Stereo immunofluorescence microscopy. I. Three-dimensional arrangement of microfilaments, microtubules and tonofilaments. Cell. 14 : 477—488.
- Osborn M., Weber K. 1977. The display of microtubules in transformed cells. Cell. 12 : 561—571.
- Porter K. R. 1966. Cytoplasmic microtubules and their function. Ciba Found. Symp. 8 : 308—356.
- Rodionov V. I., Borisy G. G. 1997a. Self-centring activity of cytoplasm. Nature. 386 : 170—173.
- Rodionov V. I., Borisy G. G. 1997b. Microtubule treadmill *in vivo*. Science. 275 : 215—218.
- Rodionov V., Nadezhkina E., Borisy G. 1999. Centrosomal control of microtubule dynamics. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 115—120.
- Rusan N. M., Fagerstrom C. J., Yvon A. M., Wadsworth P. 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. Mol. Biol. Cell. 12 : 971—980.
- Schliwa M. 1978. Microtubular apparatuses of melanophores. Three-dimensional organization. J. Cell Biol. 76 : 605—614.
- Schliwa M., Euteneuer U., Herzog W., Weber K. 1979. Evidence for rapid structural and functional changes of the melanophore microtubule-organizing center upon pigment movements. J. Cell Biol. 83 : 623—632.
- Shelden E., Wadsworth P. 1993. Observation and quantification of individual microtubule behavior *in vivo*: microtubule dynamics are cell type specific. J. Cell Biol. 120 : 935—945.

Stubblefield E., Brinkley B. R. 1966. Cilia formation in *Chinese hamster fibroblasts in vitro* as a response to colcemid treatment. *J. Cell Biol.* 30 : 645—652.

Svitkina T. M., Borisy G. G. 1998. Correlative light and electron microscopy of the cytoskeleton of cultured cells. *Methods Enzymol.* 298 : 570—592.

Vidair C. A., Doxsey S. J., Dewey W. C. 1993. Heat shock alters centrosome organization leading to mitotic dysfunction and cell death. *J. Cell. Physiol.* 154 : 443—455.

Vorobjev I. A., Alieva I. B., Grigoriev I. S., Borisy G. G. 2003. Microtubule dynamics in living cells: direct analysis in the internal cytoplasm. *Cell Biol. Int.* 27 : 293—294.

Vorobjev I., Malikov V., Rodionov V. 2001. Self-organization of a radial microtubule array by dynein-dependent nucleation of microtubules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 10 160—10 165.

Vorobjev I. A., Rodionov V. I., Maly I. V., Borisy G. G. 1999. Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 14) : 2277—2289.

Vorobjev I. A., Svitkina T. M., Borisy G. G. 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 21) : 2635—2645.

Wadsworth P. 1999. Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 42 : 48—59.

Waterman-Storer C. M., Salmon E. D. 1997. Microtubule dynamics: treadmill comes around again. *Curr. Biol.* 7 : R369—R372.

Weber K., Pollack R., Bibring T. 1975. Antibody against tubulin: the specific visualization of cytoplasmic microtubule in tissue culture cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72 : 459—463.

Yvon A. M., Wadsworth P., Jordan M. A. 1999. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol. Biol. Cell.* 10 : 947—959.

Поступила 14 IX 2006

FREE AND CENTROSOME-ATTACHED MICROTUBULES — QUANTITATIVE ANALYSIS AND THE MODELING OF TWO-COMPONENT SYSTEM

K. M. Smurova,¹ I. B. Alieva,^{1,*} I. A. Vorobjev^{1,2}

¹ A. N. Belozersky Institute, Moscow State University, and

² Department of Cell Biology and Histology, Moscow State University;

* e-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru

In the internal cytoplasm of interphase cells the density of microtubules is the highest in the centrosome area and decreases to the cell periphery. As a rule, the quantity of fluorescent microtubules cannot be counted up in the internal cytoplasm, but it is possible to estimate microtubules quantity using measuring of their optical density. In living 3T3 and CHO cells the microtubules optical density decreased according to different mathematical dependences that apparently reflected the differences of their microtubule system organization. To determine appropriateness that circumscribe the reduction of microtubules optical density from the centrosome region to the direction of cell margin, we modeled cell contours with the certain ratio and interposition of centrosome-attached and free microtubules in vector schedules CorelDraw program. The decrease of optical density was analyzed in MetaMorph program as it was described earlier (Smurova et al., 2002). It was shown that fluorescent microtubules optical density decreased exponentially ($y = ae^{-bx}$) if the system joined only microtubules growing from the centrosome up to the cell margin. The curve became smoother in the case of not all radial centrosome-attached microtubules reached the margin, and adding of free microtubules into the system led to the sharp fall in optical density in the centrosome area and to its gradual decrease at the cell periphery. The increase in free microtubules quantity changed the character of the curve describing the reduction of optical density — microtubule system which included free and centrosome-attached microtubules in proportions of 5 : 1 was described by the equation of linear regression ($f = k \cdot x + b$). Thus, the mathematical dependence describing the microtubules distribution from the centrosome to the cell periphery, depends on the ratio of microtubules and their relative positioning in the cell volume. The data obtained using model systems have coincided with the results of experiments. The graphs which described the increase in microtubules optical density during microtubule repolymerization after nocodazole treatment, corresponded to the graphs for model cells. Thus, the method we used allows to analyze the microtubule system in the cases when the direct observation of individual microtubules is difficult.

Key words: centrosome, free microtubules, centrosome-attached microtubules, video microscopy.