

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СВЯЗАННЫХ С ЦЕНТРОСОМОЙ И СВОБОДНЫХ МИКРОТРУБОЧЕК В ЦИТОПЛАЗМЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЗТЗ

© И. Б. Алиева,¹ Г. Г. Бориси,² И. А. Воробьев¹

¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
и ² Северо-Западный Университет Чикаго, США;

¹ электронный адрес: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Микротрубочки принимают участие во множестве клеточных процессов, для нормального протекания которых важна их пространственная организация в объеме клетки. Традиционно предполагается, что фибробласты имеют радиальную систему микротрубочек, расходящихся от centrosомы. Однако детальный анализ расположения микротрубочек в глубине клетки не проводился. Для анализа пространственной организации микротрубочек во внутренней цитоплазме культивируемых фибробластов ЗТЗ в настоящей работе в клетки инъецировали флуоресцентно меченный тубулин, затем с помощью лазерного облучения обесцвечивали меченые микротрубочки и наблюдали характер роста и взаиморасположение вновь полимеризующихся сегментов микротрубочек вблизи centrosомы и в удаленных частях цитоплазмы. В большинстве случаев рост микротрубочек в обесцвеченной зоне происходил прямолинейно, на расстоянии до 5 мкм их изгиб редко превышал 10—15°. Растущий фрагмент микротрубочки рассматривали как вектор с началом в точке появления и концом в точке окончания роста (или через 30 с, если непрерывный рост продолжался дольше). По полученным векторам определяли направление роста микротрубочек в разных участках клетки, анализируя угол отклонения их от вектора сравнения. В районе centrosомы использовали вектор, направленный внутри обесцвеченной полосы от centrosомы клетки к началу растущего сегмента микротрубочки, а в ламелле фибробласта и его хвосте использовали вектор, направленный вдоль длинной оси клетки от ее геометрического центра к периферии. Микротрубочки, начинающие свой рост непосредственно от centrosомы, растут вдоль радиуса клетки. Однако на расстоянии 10 мкм от centrosомы радиально растущие микротрубочки составляют 40 % от общего числа, на расстоянии 20 мкм — 25 %. Остальные микротрубочки росли в разных направлениях, преимущественный угол между направлением их роста и радиусом составлял около 90°. В ламелле и хвосте фибробласта 80 % всех микротрубочек растут вдоль длинной оси клетки или под углом не более 20°, 10—15 % микротрубочек растут в направлении centrosомы. Таким образом, в фибробластах ЗТЗ радиальная система микротрубочек существует только на расстоянии нескольких микрометров от centrosомы. Во внутренней цитоплазме система микротрубочек полностью не упорядочена, и в вытянутых частях поляризованной клетки (ламелла, хвост) система микротрубочек вновь становится упорядоченной — они вытянуты вдоль длинной оси клетки. На основании полученных данных мы полагаем, что упорядоченность микротрубочек на периферии фибробласта не является следствием их роста от centrosомы, а их ориентация задается локальными факторами.

Ключевые слова: centrosома, связанные с centrosомой микротрубочки, свободные микротрубочки, организация системы микротрубочек, видеомикроскопия, флуоресценция.

Микротрубочки участвуют в целом ряде клеточных процессов, таких как распластывание, поляризация и движение, деление клетки, направленный транспорт везикул и сигнальных молекул. Для протекания этих процессов решающим моментом являются формирование и поддержание во внутриклеточном пространстве специфической для данного типа клеток системы микротрубочек. Принято считать, что пространственная организация системы микротрубочек во многом определяется работой центров организации микротрубочек (ЦОМТ). Известны самые различные по морфологии ЦОМТ: от полярных телец дрожжей (Knop et al., 1999) и плавающих сайтов нуклеации у растений (Chan et al., 2003) до классической centrosомы, присутствующей в большинстве животных клеток

(Vorobjev, Chentsov, 1982; Воробьев, Надеждина, 1986; Moritz, Agard, 2001). На ЦОМТ в животной клетке — centrosоме — происходят нуклеация и закрепление микротрубочек: их минус-концы закреплены на centrosоме, в то время как на плюс-концах, ориентированных в сторону периферии клеток, происходит рост микротрубочек за счет присоединения новых субъединиц тубулина (McIntosh, Euteneuer, 1984; Moritz, Agard, 2001; Howard, Homan, 2003). На этом представлении основана каноническая, радиальная модель организации системы микротрубочек в клетке (Karsenti et al., 1984; Desai, Mitchison, 1997; Keating, Borisy, 1999; Doxsey, 2001). Такая организация характерна для пигментных клеток меланофоров (Rodionov et al., 1994, 1998), для некоторых других культивируемых

in vitro клеток, например CHO и NRK (Komarova et al., 2002), в также кератоцитов (Vorobjev et al., 2003). Вместе с тем известно, что во многих других клетках присутствуют свободные микротрубочки, причем нередко в количестве, значительно превосходящем количество связанных с центросомой (Bre et al., 1987; Vorobjev et al., 1997; Rodionov et al., 1999; Mogensen et al., 2000; Bartolini, Gundersen, 2006). При этом два типа микротрубочек — связанные с центросомой и свободные — могут быть различным образом организованы в пределах одной клетки (Mogensen, 2004; Bartolini, Gundersen, 2006).

Центросома ответственна не только за нуклеацию микротрубочек, но также за их заякоривание (Vornens, 2002), причем за эти функции ответственны разные белковые комплексы: кольцевой гамма-тубулиновый комплекс γ -TuRC обеспечивает нуклеацию микротрубочек (Moritz et al., 1998; Oegema et al., 1999; Moritz et al., 2000), а нинеиновый комплекс — их заякоривание (Mogensen, 2004). Возможно, что это не единственные центросомальные белки, обеспечивающие выполнение этих функций (Dammermann, Merdes, 2002; Uetake et al., 2004; Delgehyr et al., 2005; Yan et al., 2006). У дифференцированных эпителиальных клеток комплексы для нуклеации и заякоривания микротрубочек могут быть локализованы помимо центросомы в разных участках цитоплазмы, что определяет специфическую организацию системы микротрубочек в целом (Mogensen et al., 1997, 2000, 2002; Moss et al., 2007). Так, в клетках полярного эпителия многочисленные микротрубочки ориентированы в апикально-базальном направлении, и для формирования такой системы микротрубочек необходимо, чтобы заякоривающий комплекс переместился в апикальную область клетки (Mogensen et al., 2002; Mogensen, 2004; Bartolini, Gundersen, 2006). В мышечных клетках и нейронах огромное количество свободных микротрубочек располагается вдоль длинной оси клетки, вне связи с какими-либо структурно выраженными ЦОМТ (Tassin et al., 1985; Yu, Vaas, 1994; Bugnard et al., 2005; Bartolini, Gundersen, 2006). В нейронах параллельные пучки микротрубочек обеспечивают транспорт нейромедиаторов. В клетках полярного эпителия микротрубочки тянутся от апикальной части клетки к базальной и это обеспечивает не только эффективное распределение мембранных компонентов и перемещение везикул (Gilbert et al., 1991), но также и выполнение специальных функций, например передачу механических вибраций внутренними клетками Кортиева органа (Patuzzi, 1998). Очевидно, что пространственная организация микротрубочек в высокоспециализированных клетках непосредственно связана с выполняемыми ими функциями.

При движении фибробластов микротрубочки взаимодействуют с активными филаментами и клеточными контактами (Kaverina et al., 1998, 1999), а также клеточным кортексом (Mimori-Kiyosue et al., 2005; Brodsky et al., 2007). Микротрубочки регулируют натяжение клетки (D'Addario et al., 2003) и обеспечивают втягивание активных краев клеток (Добринских, Воробьев, 2006), а изменения динамики микротрубочек вызывают изменение скорости движения (Wadsworth, 1999). Выполнение этих функций связано с пространственной организацией системы микротрубочек, с ее способностью быстро перестраиваться, поэтому целью предлагаемой работы был анализ организации системы микротрубочек в подвижном фибробласте. Традиционно предполагается, что в фибробластах радиальная система организуется центросомой, однако косвенные данные о наличии большого числа свобод-

ных микротрубочек (Смурова и др., 2007) ставят под сомнение это утверждение. Приведенные выше данные о наличии большого числа свободных микротрубочек, которые организуются вне связи с центросомой или в отсутствие последней, также позволяют предполагать, что пространственная организация микротрубочек в больших клетках может быть не зависимой от центросомы. Поэтому в настоящей работе мы проанализировали характер роста и пространственное расположение микротрубочек вблизи центросомы, во внутренней цитоплазме и на периферии культивируемых in vitro фибробластов 3Т3 — эти клетки способны к движению по субстрату, а в их цитоплазме присутствуют как связанные с центросомой, так и свободные микротрубочки (Смурова и др., 2007).

Материал и методика

Культура клеток и микроинъекция Су3-тубулина. Клетки линии NIH-3Т3 выращивали на разлинованных покровных стеклах (Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ), используя культуральную среду DMEM/F-12 с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки теленка.

Обесцвечивание флуоресцентно меченых микротрубочек в живой клетке. Для наблюдения динамики микротрубочек in vivo 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. Для исследования выбирали клетки поляризованной формы с морфологически выраженными ламеллой (расположенной на ведущем крае клетки) и хвостом (задний, втягивающийся при движении, участок фибробласта) (Abergomble, 1978; Cramer et al., 1997), неподвижные в течение времени съемки (6—10 мин).

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 позволило предотвратить закисление среды в ходе эксперимента, возникающее за счет ее контакта с воздухом.

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

Обесцвечивание микротрубочек проводили, используя аргоновый лазер мощностью 3 Вт, 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.

Оценка направления роста микротрубочек. Анализ направления роста микротрубочек проводили после фотообесцвечивания микротрубочек в трех областях — в районе центросомы (для окружностей радиусами 10 и 20 мкм, центр которых совпадает с центросомой), в

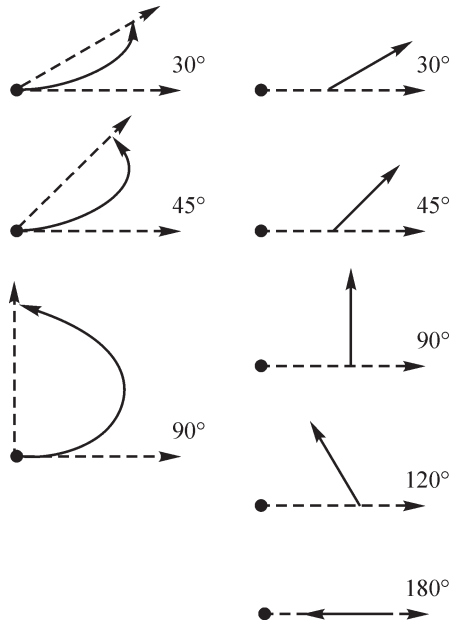


Рис. 1. Определение величины угла α° для микротрубочек, растущих от centrosомы (слева, centrosома обозначена кружком), и микротрубочек, растущих вне видимой связи с centrosомой (справа).

Полимеризующийся фрагмент микротрубочки (изображен сплошной линией; стрелкой обозначен дистальный конец) рассматривали как вектор (обозначен штриховой линией), начало которого соответствует точке начала роста фрагмента, а окончание совпадает с положением дистального конца растущей микротрубочки. Представлены углы α (30—180°) отклонения полученного вектора роста микротрубочки от заданного вектора сравнения (обозначен горизонтальной штриховой линией с началом на centrosоме).

ламелле, а также в хвосте фибробласта. Для анализа направления роста каждый из полимеризующихся в обесцвеченной зоне фрагментов микротрубочек рассматривали как вектор с началом в точке инициации роста видимого фрагмента микротрубочки. Растущий фрагмент анализировали в течение 30 с (что соответствовало интервалу в 10 кадров фильма), окончание вектора совпадало с положением дистального конца растущей микротрубочки (точка окончания роста). В разных участках клетки определяли угол отклонения полученного вектора роста микротрубочки от заданного вектора сравнения (рис. 1; 2, $z-e$; 3, $z-e$; 4, $z-e$).

Векторы сравнения выбирали отдельно для центральной части клетки и ее периферии следующим образом: а) в районе centrosомы использовали вектор, направленный от centrosомы клетки к началу вектора растущей микротрубочки, т. е. совпадающий с радиусом клетки (рис. 2, $z-e$); б) в ламелле фибробласта и его хвосте использовали вектор, направленный от геометрического центра клетки к ее периферии, вдоль длинной оси клетки (рис. 3, $z-e$; 4, $z-e$).

Направление роста микротрубочек оценивали по углу α между векторами роста и сравнения. Таким образом, если микротрубочка росла строго радиально от centrosомы (вектор, образуемый ее растущим в течение 30 с фрагментом, и вектор, совпадающий с радиусом клетки, были сонаправлены), то угол α равнялся 0° , а если микротрубочка росла в сторону centrosомы, то угол между векторами был развернутым и $\alpha = 180^\circ$ (рис. 1).

Статистическая обработка данных и построение графиков. Данные обрабатывали статисти-

чески и строили графики распределения значений угла α в программе Sigma Plot 7.1 (SPSS Science, США). Для определения достоверности различия между двумя выборками использовали t -тест (критерий Стьюдента).

Результаты

От centrosомы микротрубочки растут прямолинейно. В первой серии экспериментов облечение проводили таким образом, что centrosома оказывалась в центре обесцвеченной полосы, а сама полоса проходила перпендикулярно длинной оси поляризованной клетки (рис. 2, а—в). Уже в первые секунды после обесцвечивания centrosому можно было идентифицировать как точку, из которой в радиальном направлении растут микротрубочки (рис. 2, б, в).

Наблюдение за микротрубочками, полимеризующимися в обесцвеченной зоне непосредственно от centrosомы, показывает, что они растут от centrosомы на значительное расстояние, а отделение микротрубочки и их деполимеризация с минус-конца — крайне редкое событие. На расстояние до 10—12 мкм большинство микротрубочек растут прямолинейно и практически не изгибаются (всего наблюдали за ростом 42 микротрубочек в 7 клетках).

Только 7 из 42 микротрубочек в конце отклонялись от первоначального направления на заметный угол — в среднем на $31.0 \pm 7.5^\circ$, максимальный угол отклонения составил 42° . Таким образом, centrosома определяет радиальное направление роста связанных с нею микротрубочек, ни одна из которых не изгибается значительно и тем более не формирует петель.

Микротрубочки во внутренней цитоплазме фибробласта растут хаотично. Наряду с микротрубочками, растущими от centrosомы, в обесцвеченной центральной зоне клетки наблюдается значительное количество новых сегментов микротрубочек, растущих вне видимой связи с centrosомой (в радиусе 10 мкм от centrosомы в тех же клетках наблюдали полимеризацию 64 таких микротрубочек). Рост плюс-концов этих сегментов происходит не в радиальном направлении, а под значительным углом по отношению к радиусу клетки, иногда даже по направлению к centrosоме. При этом каждый отдельный сегмент также растет практически прямолинейно (рис. 2, з).

Используя векторный анализ направления роста микротрубочек, мы построили гистограммы распределения углов, образуемых различными популяциями растущих микротрубочек с радиусом клетки.

Для микротрубочек, растущих непосредственно от centrosомы, гистограмма имеет один пик (в диапазоне от 0 до 10°), а микротрубочки, имеющие угол наклона более 45° , отсутствуют (рис. 2, ж).

Среди микротрубочек, рост которых начинался не от centrosомы, а на некотором расстоянии от нее, степень упорядоченности была значительно меньше. На расстоянии до 10 мкм значительная часть микротрубочек (около 40%) попадает в первый класс гистограммы (рис. 2, з), 60% микротрубочек распределены вполне хаотично. Если рассматривать микротрубочки, рост которых начинался не от centrosомы (всего проанализировали 108 микротрубочек в 7 клетках), то около 20% из них растет под углом 90 — 120° к радиусу клетки; почти столько же — в направлении centrosомы ($160^\circ < \alpha < 180^\circ$), и

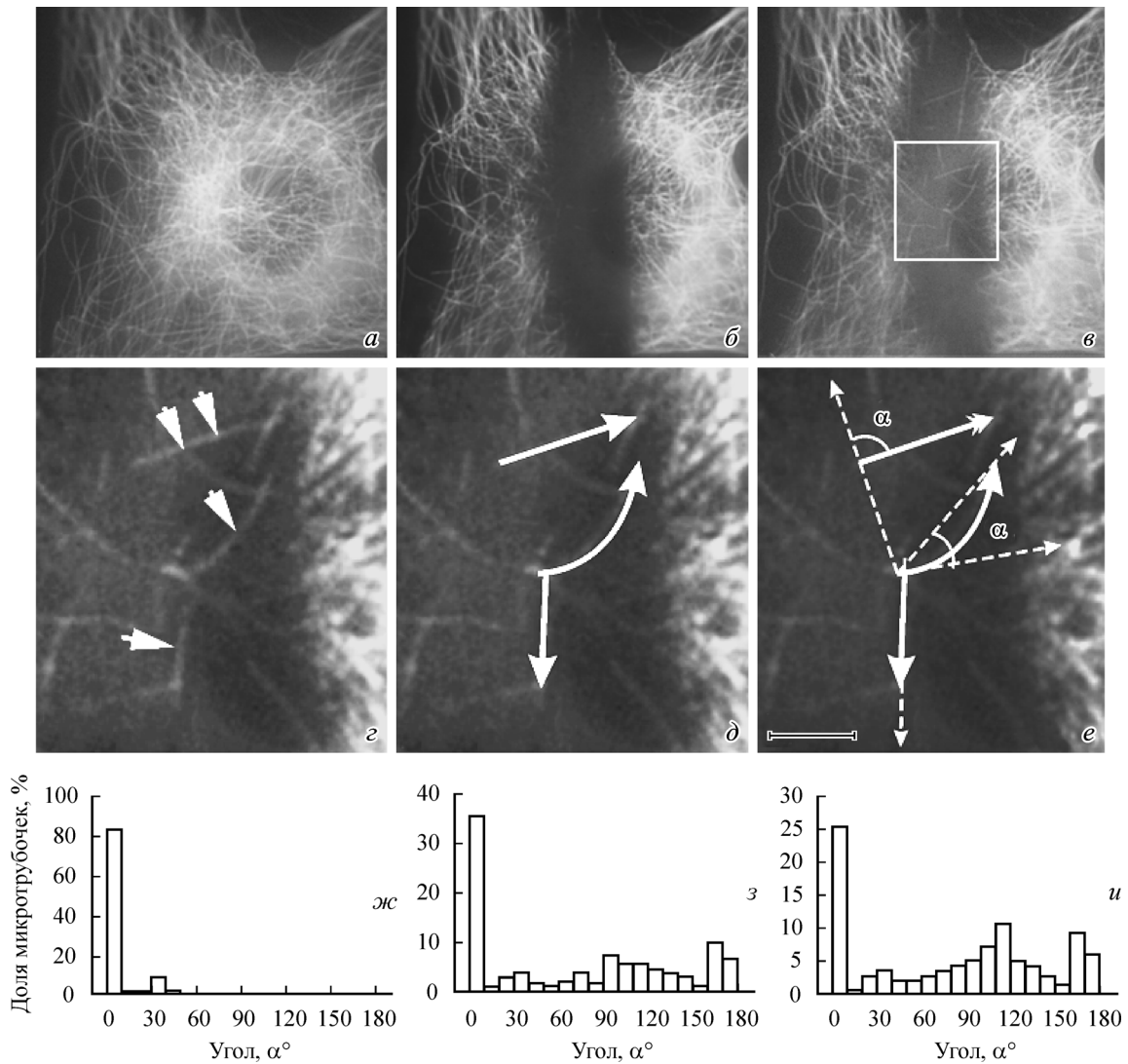


Рис. 2. Анализ ориентации микротрубочек в районе centrosомы фибробластов 3Т3.

a — клетка до облучения; *б, в* — полимеризация микротрубочек, меченных экзогенным Су3-тубулином, в обесцвеченной лазером полосе, проходящей через centrosому фибробласта 3Т3 (*б* — 0 с, *в* — 30 с после облучения); *г* — схема определения угла α на увеличенном центральном фрагменте (*в*) (область соответствует белому квадрату); визуально сниженная плотность микротрубочек (*г*) позволяет наблюдать растущие фрагменты связанных с centrosомой (стрелки) и свободных (двойные стрелки) микротрубочек; *д* — выделенные фрагменты микротрубочек выделены белым цветом; определение угла α между вектором, образуемым растущим в течение 30 с фрагментом микротрубочки (выделены белым цветом), и выбранным вектором сравнения (обозначен штриховой линией), направленным от centrosомы клетки к ее периферии; *ж*—*и* — графики распределения значений угла α для связанных с centrosомой микротрубочек (42 микротрубочки в 7 клетках) в радиусе 10 мкм от centrosомы (*ж*), а также для всей популяции микротрубочек, расположенных в радиусах 10 мкм (108 микротрубочек в 7 клетках) и 20 мкм (138 микротрубочек в 7 клетках, *и*) от centrosомы.

выделить какую-либо преимущественную ориентацию невозможно (рис. 2, з). Средний угол отклонения растущего сегмента микротрубочки от радиуса составил $105 \pm 65^\circ$.

Аналогичный анализ роста микротрубочек на расстоянии от 10 до 20 мкм от centrosомы (138 микротрубочек в 7 клетках) показывает, что только 25 % микротрубочек растут радиально, приблизительно столько же микротрубочек растут под углом $80^\circ < \alpha < 120^\circ$, 15 % растут в направлении centrosомы (угол наклона $160^\circ < \alpha < 180^\circ$) (рис. 2, и). Средний угол отклонения растущего сегмента микротрубочки от радиуса составил $98 \pm 60^\circ$.

Таким образом, на расстоянии до 20 мкм от centrosомы сосуществуют две популяции микротрубочек — радиальные микротрубочки и микротрубочки, растущие под значительными углами к радиусу клетки. Поскольку большинство centrosомальных микротрубочек во внут-

ренней цитоплазме не загибаются, то мы полагаем, что растущие под значительным углом к радиальному направлению сегменты микротрубочек не являются дистальными частями обесцвеченных centrosомальных микротрубочек, а являются частями свободных микротрубочек.

На периферии фибробласта микротрубочки растут упорядоченно. Фибробласт часто имеет поляризованную форму, и для анализа мы выделили две функционально различные его части — ламеллу и хвост (уроподу). Векторный анализ прямолинейности и направления роста микротрубочек в этих частях клетки проводили аналогично описанному выше (рис. 3, 4). Рост микротрубочек в ламелле и в хвосте также происходит прямолинейно — на полимеризации сегментов длиной до 10 мкм их изгиб не превышал $10\text{--}15^\circ$. Угол α между этим вектором, характеризующим рост микротрубочек, и

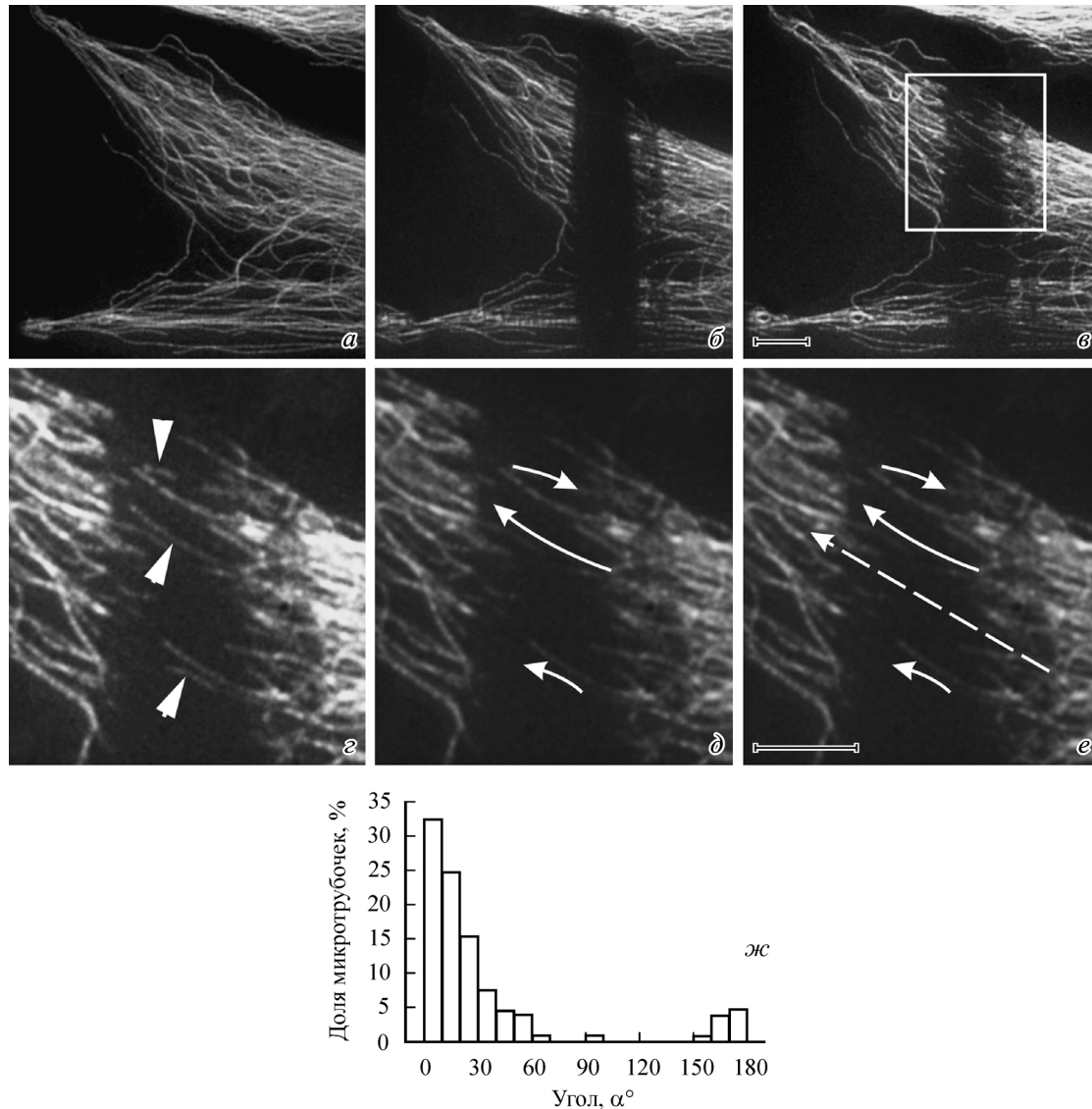


Рис. 3. Анализ ориентации микротрубочек в ламелле фибробластов ЗТЗ.

a — клетка до облучения; *b*, *в* — рост микротрубочек, меченных Су3-тубулином, в обесцвеченной лазером полосе, проходящей через ламеллу фибробласта. Область, соответствующая белому квадрату (*в*), представлена с большим увеличением (*г*—*е*). Визуально сниженная плотность микротрубочек позволяет наблюдать растущие фрагменты микротрубочек (*стрелки*). *ж* — график распределения значений угла α между полимеризующимися микротрубочками и вектором длинной оси клетки (105 микротрубочек в 5 клетках).

вектором, направленным от геометрического центра клетки к ее периферии вдоль длинной оси клетки, характеризовал направление роста микротрубочки в ламелле и хвостовой части фибробласта.

Анализ ориентации микротрубочек в ламелле (105 микротрубочек в 5 клетках) показал (рис. 3, *г*—*е*), что более 30 % из них растут преимущественно вдоль длинной оси клетки перпендикулярно ее ведущему краю ($0^\circ < \alpha < 10^\circ$). Около 40 % всех микротрубочек лишь незначительно изгибаются, отклоняясь от доминирующего направления ($10^\circ < \alpha < 30^\circ$; 2—3-й классы гистограммы). Только 1 микротрубочка росла поперек длинной оси клетки под углом ($90^\circ < \alpha < 100^\circ$), около 10 % микротрубочек растут, незначительно изгибаясь, от периферии клетки в направлении ее центра ($150^\circ < \alpha < 180^\circ$) (рис. 3, *ж*).

В хвосте фибробласта рост микротрубочек происходит также прямолинейно (рис. 4, *г*—*е*), степень упорядоченности роста микротрубочек также высока (исследовали 112 микротрубочек в 6 клетках). Почти 50 % микро-

трубочек растут строго вдоль длинной оси от центра клетки к ее периферии ($0^\circ < \alpha < 10^\circ$), 30 % микротрубочек незначительно отклоняются от преимущественного направления роста ($10^\circ < \alpha < 30^\circ$; 2—3-й классы гистограммы) и лишь 2 микротрубочки растут, изгибаясь под углом больше 40° . Однако значительное количество микротрубочек в хвосте фибробласта растет в направлении от края клетки к ее центру ($140^\circ < \alpha < 180^\circ$), 14 из них растут параллельно с вектором длинной оси клетки ($170^\circ < \alpha < 180^\circ$) (рис. 4, *ж*).

Таким образом, рост микротрубочек во всех областях фибробластов ЗТЗ происходит в основном прямолинейно. Он упорядочен в ламелле и в хвосте клетки, где микротрубочки растут вдоль длинной оси клетки. В то же время во внутренней цитоплазме рост микротрубочек неупорядочен. Радиальный рост, характерный для района centrosомы, по мере удаления в глубь цитоплазмы становится неупорядоченным и вновь сменяется «осевым» в растянутых частях клетки — в ламелле и хвосте.

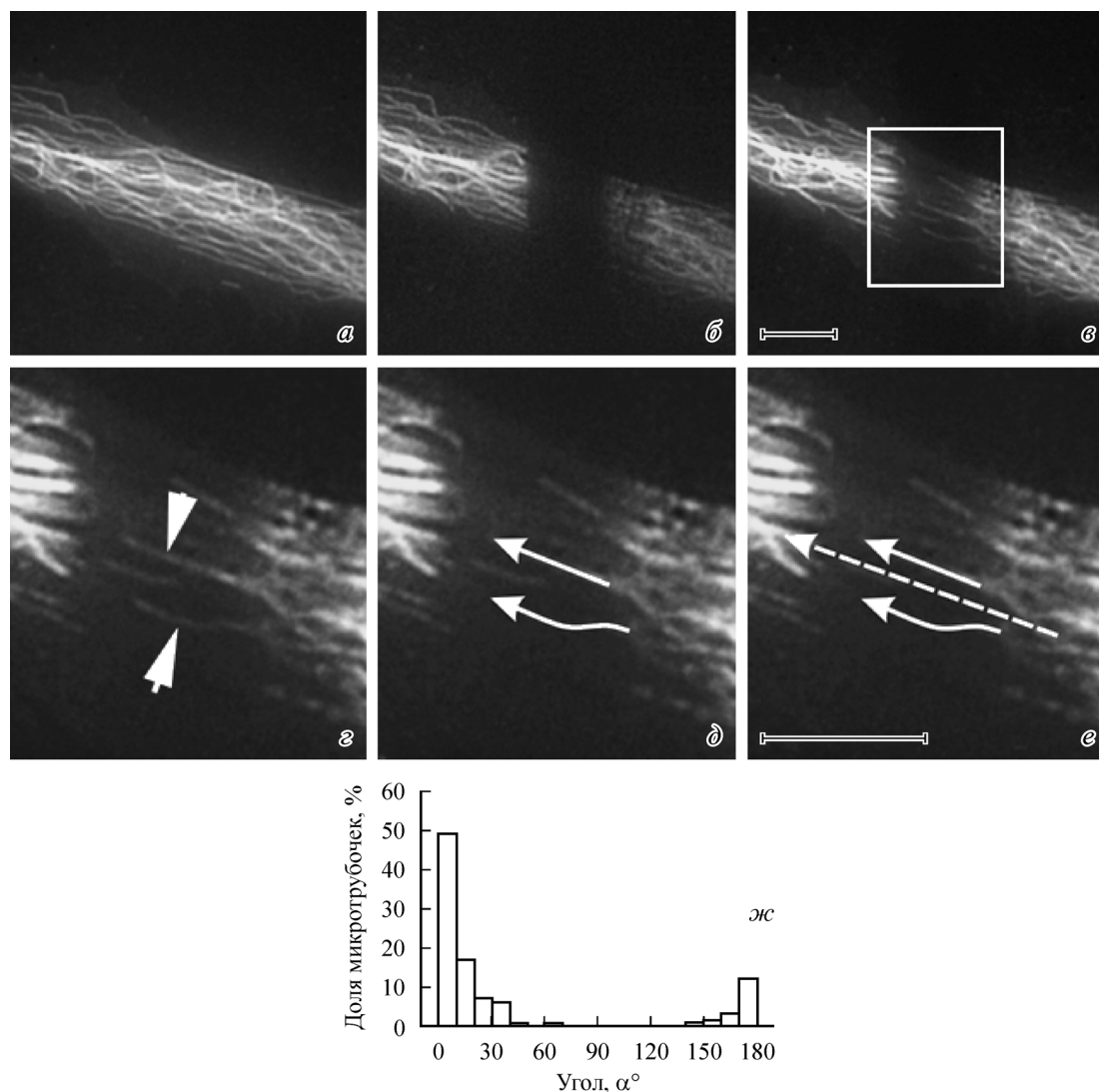


Рис. 4. Анализ ориентации микротрубочек в хвосте фибробластов 3Т3.

a — клетка до облучения; *б*, *в* — рост микротрубочек, меченных Су3-тубулином, в обесцветенной лазером полосе, проходящей через хвост фибробласта. Область, соответствующая белому квадрату (*в*), представлена с большим увеличением (*г*—*е*). Визуально сниженная плотность микротрубочек позволяет наблюдать растущие фрагменты микротрубочек (стрелки). *ж* — график распределения значений угла α между полимеризующимися микротрубочками и вектором длинной оси клетки (112 микротрубочек в 6 клетках).

Обсуждение

Организация сети микротрубочек в специфическую пространственную систему определяет морфологию клетки и ее внутреннюю структуру. Характерная для клетки пространственная организация системы микротрубочек может обеспечиваться двумя путями. Первый путь, считающийся классическим для животной клетки, предполагает, что centrosoma, расположенная в геометрическом центре клетки, работает как ЦОМТ; на ней микротрубочки нуклеируются и закрепляются минус-концами, а плюс-концы растут во всех направлениях от centrosomy к краю клетки, формируя радиальную систему (McIntosh, Euteneuer, 1984; Moritz, Agard, 2001; Howard, Hyman, 2003). Такой путь называют «авторитарным» — centrosoma является единственным организующим микротрубочки началом (Бураков, Надеждина, 2006). Второй путь — самоорганизация динамических микротрубочек, описанная *in vitro* (Nedelec et al., 1997; Surrey et al., 2001)

и *in vivo* в отсутствие centrosomy (McNiven, Porter, 1988; Rodionov, Borisy, 1997; Vorobjev et al., 2001), которая предполагает рост микротрубочек от затравок, расположенных в цитоплазме (Vorobjev et al., 2001). Образовавшиеся свободные микротрубочки могут собираться в полярную структуру в результате действия моторных белков (Heald et al., 1997; Cytrynbaum et al., 2004; Malikov et al., 2004, 2005) или образовывать систему иной конфигурации. Также возможно, что в формировании пространственной сети микротрубочек задействованы оба процесса одновременно, что характерно для множества клеток, в цитоплазме которых присутствуют в основном нецентросомальные микротрубочки: эпителиальные клетки, нейроны, мышечные клетки и клетки растений (Mogenssen, 2004; Bartolini, Gundersen, 2006).

Исследование характера роста микротрубочек, полимеризующихся от centrosomy в клетках 3Т3, показало: 1) все микротрубочки растут прямолинейно и практически не изгибаются; 2) радиальность системы быстро умень-

шается по мере удаления от centrosомы; 3) микротрубочки, растущие от centrosомы, редко отделяются от нее.

Каковы причины того, что в клетках 3Т3 радиальная составляющая системы микротрубочек не является доминирующей? Неупорядоченное расположение микротрубочек, по-видимому, не связано со слабой активностью динеина и динактина — заякоривающих белков, обеспечивающих удержание микротрубочек на centrosоме (Quintyne et al., 1999; Quintyne, Schroer, 2002; Жаппарова и др., 2007), поскольку отделения полимеризующихся микротрубочек от centrosомы были крайне редким событием. Возможная причина состоит в том, что большинство микротрубочек в фибробластах 3Т3 не достигает от centrosомы до края клетки (Vogobjev et al., 2003) и во внутренней цитоплазме доминируют свободные микротрубочки. В клетках, где радиальная система микротрубочек выражена не только в центре, но и на периферии, микротрубочки могут взаимодействовать с различными структурами, которые стабилизируют их плюс-концы (Kaverina et al., 1999; Akhmanova et al., 2001; Etienne-Manneville, Hall, 2001; Krendel et al., 2002, 2007; Small et al., 2002; Mimori-Kiyosue et al., 2005; Penman et al., 2005; Kita et al., 2006; Kroboth et al., 2007). Показано, что в стареющих цитопластах радиальное расположение микротрубочек постепенно меняется на хаотическое именно из-за нарушения взаимодействия микротрубочек с клеточным кортексом (Brodsky et al., 2007). Таким образом, вполне вероятно, что взаимодействие связанных с centrosомой микротрубочек с клеточным кортексом необходимо для их радиальной организации и незначительность радиальной составляющей в фибробластах 3Т3 отражает малую долю микротрубочек, растущих от centrosомы до края клетки.

Centrosома не определяет упорядоченность микротрубочек на периферии фибробласта. Проведенный анализ показал, что centrosома организует радиальную систему микротрубочек в клетках 3Т3, но поскольку centrosомальные микротрубочки не составляют большинства уже на расстоянии 10—20 мкм от centrosомы и часто не достигают до периферии клетки, организацию системы в целом определяют многочисленные свободные микротрубочки, растущие хаотично во внутренней цитоплазме и упорядоченно — на краю клетки. Таким образом, очевидно, что не centrosома определяет ориентацию микротрубочек в ламелле и хвосте фибробласта.

Каким образом может регулироваться организация свободных микротрубочек в ламелле и хвосте фибробласта? Существует несколько возможностей: от регуляции посредством специфических затравок, расположенных на клеточных органеллах или структурах, до локальной регуляции скорости роста микротрубочек в различных направлениях.

Радиальность системы микротрубочек может возникать не только благодаря активности centrosомы, но и ее отсутствие благодаря перемещению меланосом (Maly, Borisy, 2002; Malikov et al., 2005) и цистерн аппарата Гольджи, связанных с динеином и микротрубочками (Chabin-Brion et al., 2001; Hoogenraad et al., 2001), или перемещению иных клеточных структур (Karsenti et al., 1984; Maniotis, Schliwa, 1991; Malikov et al., 2005). Давно известно, что при восстановлении экспериментально разрушенной системы микротрубочек их реполимеризация осуществляется как от centrosомы, так и от затравок, расположенных во всей цитоплазме (Karsenti et al., 1984;

de Brabander et al., 1986; Waterman-Storer et al., 1999; Чепнобельская и др., 2004; Efimov et al., 2007; Luders, Stearns, 2007). По-видимому, именно транскомпармент Гольджи, от которого полимеризуются микротрубочки, преимущественно ориентированные в направлении лидирующего края клетки, но не centrosома организуют рост микротрубочек в ламеллу поляризованной клетки (Efimov et al., 2007). Это наблюдение объясняет асимметричность системы микротрубочек в поляризованной клетке и наличие практически параллельных многочисленных микротрубочек в ламелле фибробластов, описанное и в наших экспериментах.

Возможно, организация микротрубочек на периферии клетки, особенно в хвосте, определяется организацией системы актиновых филаментов, так как выявлены кросс-линкерные белки, непосредственно соединяющие микротрубочки и актиновые филаменты (Fuchs, Karakesisoglou, 2001; Rodriguez et al., 2003; Bershadsky et al., 2006). Также показаны многочисленные перекрестные пути регуляции микротрубочек и микрофиламентов, индуцируемые факторами, связанными как с плазматической мембраной (Etienne-Manneville, Hall, 2001; Krendel et al., 2002, 2007), так и с цитоплазматическими белками: mDia (Alberts, 2002; Wallar, Alberts, 2003; Jaffe, Hall, 2005), CLASP (Tsvetkov et al., 2007) и G-белками семейства Pho (Daub et al., 2001; Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001; Fukata et al., 2002; Jaffe, Hall, 2005). Однако в прямом эксперименте регуляция организации микротрубочек актиновыми филаментами до настоящего времени не показана.

Значительный прогресс в понимании того, каким образом неcentrosомальные микротрубочки могут организовывать пространственную сеть, связан с работами, выполненными на дрожжах *S. pombe* (Janson et al., 2005; Samejima et al., 2005; Venkatram et al., 2005). Для этих клеток поляризованность и организация системы микротрубочек крайне важны, поскольку определяют их размер и форму. По-видимому, в силу такой принципиальной важности в клетках *S. pombe* присутствуют сразу три ЦОМТ. Первые два функционируют в основном во время митоза — полярное тело (spindle pole body) нуклеирует внутриядерное веретено и астральные цитоплазматические микротрубочки (Hagan, 1998), а экваториальный ЦОМТ организует постанафазную сеть микротрубочек. Третий — интерфазный ЦОМТ (гамма-тубулиновый комплекс) — отвечает за организацию исключительно интерфазных микротрубочек, причем принцип его работы на настоящий момент не имеет описанных аналогов. Новые микротрубочки собираются на уже существующих следующим образом: интерфазный ЦОМТ связывается с микротрубочкой и полимеризует новую в антипараллельном направлении (растущий плюс-конец новой микротрубочки направлен в сторону минус-конца предсуществующей). По мере полимеризации новая микротрубочка и ее ЦОМТ движутся по предсуществующей до ее минус-конца, формируя антипараллельные пучки (Janson et al., 2005). Беккер и Кассимерис (Becker, Cassimeris, 2005) высказали предположение о том, что описанный механизм нуклеации новых микротрубочек на предсуществующих может быть общим механизмом формирования характерного расположения микротрубочек в огромном количестве разнообразных клеток. Возможно, что аналогичный механизм работает и в клетках 3Т3.

Появление функционально различных зон в клетке приводит к изменению организации системы ее микротрубочек. Ряд исследований ука-

зывает на то, что иная, чем радиальная, организация системы микротрубочек возникает при выделении функционально различных участков в клетке. При поляризации эпителиальных клеток, в процессе формирования функционально различных зон (апикальной и базальной), одновременно с присутствием centrosомальных микротрубочек возникает специфическая, ориентированная в апикально-базальном направлении система параллельных неcentrosомальных микротрубочек (Mogensen et al., 2000), причем плюс-концы микротрубочек локализованы в базальной части клетки, а минус-концы — в апикальной (Bacallao et al., 1989). Система параллельных неcentrosомальных микротрубочек в эпителии является структурной и функциональной основой его поляриности, она обеспечивает доставку белков в апикальный домен (Musch, 2004; Rodriguez-Boulan et al., 2005). Одновременно в апикальной либо базальной части клетки может присутствовать сеть коротких, хаотично расположенных неcentrosомальных микротрубочек (Reilein, Nelson, 2005; Reilein et al., 2005).

В нейронах также присутствуют как centrosомальные, так и многочисленные свободные микротрубочки. При дифференцировке параллельные пучки микротрубочек появляются в формирующихся аксонах и дендритах, где они опосредованно влияют на синаптическую активность, обеспечивая доставку мембранных везикул (Overly et al., 1996; Signor, Scholey, 2000; Horton, Ehlers, 2003). Характерно, что в аксонах микротрубочки относительно длинные, их плюс-концы всегда ориентированы дистально по отношению к телу клетки, а в дендритах микротрубочки существенно короче, их концы ориентированы как центробежно, так и центростремительно (Burton, Paige, 1981; Heidemann et al., 1981; Baas et al., 1988, 1989, 1991). Наличие параллельных пучков настолько важно для нейрона, что микротрубочки в них соединены регулярными поперечными шпиквами, имеющими длину около 65 нм в дендритах и около 25 в аксонах (Chen et al., 1992).

Еще один пример системы параллельных микротрубочек — большие многоядерные клетки скелетных мышц, образовавшиеся путем слияния одноядерных миоцитов. В процессе слияния радиальная система связанных с centrosомой микротрубочек, характерная для миоцитов, исчезает и сменяется упорядоченными пучками микротрубочек, параллельными длиной оси многоядерной клетки (Tassin et al., 1985). При этом нуклеирующий микротрубочки материал кластеризуется вокруг ядра, а центриоли исчезают по мере старения многоядерной клетки (Tassin et al., 1985; Connolly et al., 1986). Образовавшаяся линейная система неcentrosомальных микротрубочек вовлечена в процесс миофибриллогенеза и ответственна за формирование удлиненной формы новообразованного синцития (Antin et al., 1981; Tassin et al., 1985; Hill et al., 1986; Pizon et al., 2005).

Исследуемые нами фибробласты ЗТЗ (в отличие, например, от малоподвижных и неполяризующихся СНО, имеющих исключительно радиальную систему микротрубочек; Komarova et al., 2002), по-видимому, также являются клетками с функционально различными районами. Как показали результаты настоящего исследования, в относительно быстро изменяющихся ламелле и хвосте микротрубочки ориентированы параллельно друг другу и длиной оси клетки, т. е. они имеют организацию, сходную с таковой в эпителиальных клетках и отростках нейронов. Ориентация микротрубочек не зависит от направления роста — немногочисленные антипараллельные

микротрубочки (растущие от периферии к центру в ламелле и хвосте клетки) также ориентированы вдоль длинной оси клетки, что характерно для дендритов нейрона (Baas et al., 1988, 1989).

Таким образом, можно предположить, что появление функционально различных зон в фибробласте приводит к усложнению организации системы микротрубочек: помимо радиально организованной сети в этих клетках появляется система (или несколько систем) параллельных микротрубочек, не связанных с centrosомой. Эта система более эффективна как с точки зрения транспорта, так и с точки зрения взаимодействия с кортексом и локальной регуляции концов микротрубочек на периферии клетки.

Авторы благодарят К. М. Смурову за помощь в подготовке иллюстраций к публикации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01350, 06-04-49233 и 06-04-99008).

Список литературы

- Бураков А. В., Надеждина Е. С. 2006. Динеин и динактин как системы клеточных микротрубочек. Онтогенез. 37(5): 1—17.
- Воробьев И. А., Надеждина Е. С. 1986. Центриолярный аппарат и его роль в организации микротрубочек. В кн.: Общие проблемы физико-химической биологии. М.: ВИНТИ. 7: 1—164.
- Добринских Е. А., Воробьев И. А. 2006. Микротрубочки необходимы для втягивания ламеллы в культивируемых клетках Vero. Цитология. 48(11): 906—917.
- Жаппарова О. Н., Бураков А. В., Надеждина Е. С. 2007. Динеин-динактиновый комплекс необходим для удержания, но не для нуклеации микротрубочек на centrosоме. Биохимия. 72(11): 1515—1524.
- Смурова К. М., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2007. Свободные и связанные с centrosомой микротрубочки: количественный анализ и моделирование двухкомпонентной системы. Цитология. 49(4): 270—279.
- 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.
- Abercrombie M. 1978. Fibroblasts. J. Clin. Pathol. Suppl. 12: 1—6.
- Akhmanova A., Hoogenraad C. C., Drabek K., Stepanova T., Dortland B., Verkerk T., Vermeulen W., Burgering B. M., De Zeeuw C. I., Grosveld F., Galjart N. 2001. Clasp are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. Cell. 104: 923—935.
- 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. 375—388.
- Antin P. B., Forry-Schaudies S., Friedman T. M., Tapscoth S. J., Holtzer H. 1981. Taxol induces postmitotic myoblasts to assemble interdigitating microtubule-myosin arrays that exclude actin filaments. J. Cell Biol. 90: 300—308.
- Baas P. W., Black M. M., Banker G. A. 1989. Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. J. Cell Biol. 109: 3085—3094.
- Baas P. W., Deitch J. S., Black M. M., Banker G. A. 1988. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85: 8335—8339.
- Baas P. W., Slaughter T., Brown A., Black M. M. 1991. Microtubule dynamics in axons and dendrites. J. Neurosci. Res. 30: 134—153.

- Bacallao R., Antony C., Dotti C., Karsenti E., Stelzer E. H., Simons K. 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J. Cell Biol.* 109 : 2817—2832.
- Bartolini F., Gundersen G. G. 2006. Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J. Cell Sci.* 119 : 4155—4163.
- Becker B. E., Cassimeris L. 2005. Cytoskeleton: microtubules born on the run. *Curr. Biol.* 15 : 551—554.
- Bershadsky A. D., Ballestrem C., Carramusa L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A. Y., Verkhovsky A. B., Shevlesh T., Kozlov M. M. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur. J. Cell Biol.* 85 : 165—173.
- Bornens M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 : 25—34.
- Bre M. H., Kreis T. E., Karsenti E. 1987. Control of microtubule nucleation and stability in Madin-Darby canine kidney cells: the occurrence of noncentrosomal, stable detyrosinated microtubules. *J. Cell Biol.* 105 : 1283—1296.
- Brodsky I. B., Burakov A. V., Nadezhdina E. S. 2007. Microtubules' interaction with cell cortex is required for their radial organization, but not for centrosome positioning. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 50 : 1—11.
- Buynard E., Zaal K. J., Ralston E. 2005. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 60 : 1—13.
- Burton P. R., Paige J. L. 1981. Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78 : 3269—3273.
- Chabin-Brion K., Marceiller J., Perez F., Settegrana C., Drechou A., Durand G., Pouës C. 2001. The Golgi is a microtubule-organizing organelle. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 2047—2060.
- Chan J., Calder G. M., Doonan J. H., Lloyd C. W. 2003. EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* 5 : 967—971.
- Chen J., Kanai Y., Cowan N. J., Hirokawa N. 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 360 : 674—677.
- Connolly J. A., Kiosses B. W., Kalnins V. I. 1986. Centrioles are lost as embryonic myoblasts fuse into myotubes *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* 39 : 341—345.
- Cramer E. M., Norol F., Guichard J., Breton-Gorius J., Vainchenker W., Massé J.-M., Debili N. 1997. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand. *Blood.* 89 : 2336—2346.
- Cytrynbaum E., Rodionov V., Mogilner A. 2004. Computational model of dynein-dependent self-organization of microtubule asters. *J. Cell Sci.* 117 : 1381—1397.
- D'Addario M., Arora P. D., Ellen R. P., McCulloch C. A. G. 2003. Regulation of tension-induced mechanotranscriptional signals by the microtubule network in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 278 : 53 090—53 097.
- Dammermann A., Merdes A. 2002. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.* 159 : 255—266.
- Daub H., Gevaert K., Vandekerckhove J., Sobel A., Hall A. 2001. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J. Biol. Chem.* 276 : 1677—1680.
- 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.
- Delgehr N., Sillibourne J., Bornens M. 2005. Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J. Cell Sci.* 118 : 1565—1575.
- Desai A., Mitchison T. J. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell. Develop. Biol.* 13 : 83—117.
- Doxsey S. 2001. Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 : 688—698.
- Efimov A., Kharitonov A., Efimova N., Loncarek J., Miller P. M., Andreyeva N., Gleeson P., Galjart N., Maia A. R. R., McLeod I. X., Yates J. R., III, Maiato H., Khodjakov A., Akhmanova A., Kaverina I. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Development.* 112 : 917—930.
- Etienne-Manneville S., Hall A. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell.* 106 : 489—498.
- Fuchs E., Karakesisoglou I. 2001. Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Develop.* 15 : 1—14.
- Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., Kaibuchi K. 2002. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell.* 109 : 873—885.
- Gilbert T., Le Bivic A., Quaroni A., Rodriguez-Boulan E. 1991. Microtubular organization and its involvement in the biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2 intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 113 : 275—288.
- Hagan I. M. 1998. The fission yeast microtubule cytoskeleton. *Review. J. Cell Sci.* 111 : 1603—1612.
- Heald R., Tournebise R., Habermann A., Karsenti E., Hyman A. A. 1997. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J. Cell Biol.* 138 : 615—628.
- Heidemann S. R., Landers J. M., Hamborg M. A. 1981. Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* 91 : 661—665.
- Hill C. S., Duran S., Lin Z. X., Weber K., Holtzer H. 1986. Titin and myosin, but not desmin, are linked during myofibrillogenesis in postmitotic mononucleated myoblasts. *J. Cell Biol.* 103 : 2185—2196.
- Hoogenraad C. C., Akhmanova A., Howell S. A., Dortland B., De Zeeuw C. I., Willemsen R., Visser P., Grosveld F., Galjart N. 2001. Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J.* 20 : 4041—4054.
- Horton A. C., Ehlers M. D. 2003. Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J. Neurosci.* 23 : 6188—6199.
- Howard J., Hyman A. A. 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature.* 422 : 753—758.
- Ishizaki T., Morishima Y., Okamoto M., Furuyashiki T., Kato T., Narumiya S. 2001. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDial. *Nat. Cell Biol.* 3 : 8—14.
- Jaffe A. B., Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 21 : 247—269.
- Janson M. E., Setty T. G., Paoletti A., Tran P. T. 2005. Efficient formation of bipolar microtubule bundles requires microtubule-bound gamma-tubulin complexes. *J. Cell Biol.* 169 : 297—308.
- Karsenti E., Kobayashi S., Mitchison T., Kirschner M. 1984. Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *J. Cell Biol.* 98 : 1763—1776.
- Kaverina I., Krylyshkina O., Small J. V. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* 146 : 1033—1044.
- Kaverina I., Rottner K., Small J. V. 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J. Cell Biol.* 142 : 181—190.
- Keating T. J., Borisy G. G. 1999. Centrosomal and non-centrosomal microtubules. *Biol. Cell.* 91 : 321—329.
- 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.
- Kita K., Wittmann T., Nathke I. S., Waterman-Storer C. M. 2006. Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1. *Mol. Biol. Cell.* 17 : 2331—2345.
- Knop M., Pereira G., Schiebel E. 1999. Microtubule organization by the budding yeast spindle pole body. *Review. Biol. Cell.* 91 : 291—304.

- 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 : 3517—3539.
- Krendel M., Osterweil E. K., Mooseker M. S. 2007. Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis. *FEBS Lett.* 581 : 644—650.
- Krendel M., Zenke F. T., Bokoch G. M. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 4 : 294—301.
- Kroboth K., Newton I. P., Kita K., Dikovskaya D., Zumburn J., Waterman-Storer C. M., Nathke I. S. 2007. Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in cell migration and overall changes in microtubule stability. *Mol. Biol. Cell.* 18 : 910—918.
- Luders J., Stearns T. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 161—167.
- 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.
- Malikov V., Kashina A., Rodionov V. 2004. Cytoplasmic dynein nucleates microtubules to organize them into radial arrays *in vivo*. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 2742—2749.
- Maly I. V., Borisy G. G. 2002. Self-organization of treadmill microtubules into a polar array. *Trends Cell Biol.* 12 : 462—465.
- Maniotis A., Schliwa M., 1991. Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells. *Cell.* 67 : 495—504.
- McIntosh J. R., Euteneuer U. 1984. Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 98 : 525—533.
- McNiven M. A., Porter K. R. 1988. Organization of microtubules in centrosome-free cytoplasm. *J. Cell Biol.* 106 : 1593—1605.
- 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. M. 2004. Microtubule organizing centers in polarized epithelial cells. In: *Centrosomes in development and disease*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA. 299—319.
- Mogensen M. M., Mackie J. B., Doxsey S. J., Stearns T., Tucker J. B. 1997. Centrosomal deployment of gamma-tubulin and pericentrin: evidence for a microtubule-nucleating domain and a minus-end docking domain in certain mouse epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 36 : 276—290.
- Mogensen M. M., Malik A., Piel M., Bouckson-Castaing V., Bornens M. 2000. Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J. Cell Sci.* 113 : 3013—3023.
- Mogensen M. M., Tucker J. B., Mackie J. B., Prescott A. R., Nathke I. S. 2002. The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 157 : 1041—1048.
- Moritz M., Agard D. 2001. G-tubulin complexes and microtubule nucleation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 : 174—181.
- Moritz M., Braunjfeld M. B., Guenebaut V., Heuser J., Agard D. A. 2000. Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 2 : 365—370.
- Moritz M., Zheng Y., Alberts B. M., Oegema K. 1998. Recruitment of the gamma-tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds. *J. Cell Biol.* 142 : 775—786.
- Moss D. K., Bellett G., Carter J. M., Liovic M., Keynton J., Prescott A. R., Lane E. B., Mogensen M. M. 2007. Ninein is released from the centrosome and moves bi-directionally along microtubules. *J. Cell Sci.* 120 : 3064—3074.
- Musch A. 2004. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic.* 5 : 1—9.
- Nedelec F. J., Surrey T., Maggs A. C., Leibler S. 1997. Self-organization of microtubules and motors. *Nature.* 389 : 305—308.
- Oegema K., Wiese C., Martin O. C., Milligan R. A., Iwamatsu A., Mitchison T. J., Zheng Y. 1999. Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell Biol.* 144 : 721—733.
- Overly C. C., Rieff H. I., Hollenbeck P. J. 1996. Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 109 : 971—980.
- Palazzo A. F., Joseph H. L., Chen Y. J., Dujardin D. L., Alberts A. S., Pfister K. K., Vallee R. B., Gundersen G. G. 2001. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Biol.* 11 : 1536—1541.
- Patuzzi R. 1998. Exponential onset and recovery of temporary threshold shift after loud sound: evidence for long-term inactivation of mechano-electrical transduction channels. *Hear Res.* 125 : 17—38.
- Penman G. A., Leung L., Nathke I. S. 2005. The adenomatous polyposis coli protein (APC) exists in two distinct soluble complexes with different functions. *J. Cell Sci.* 118 : 4741—4750.
- Pizon V., Gerbal F., Diaz C. C., Karsenti E. 2005. Microtubule-dependent transport and organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J.* 24 : 3781—3792.
- Quintyne N. J., Gill S. R., Eckley D. M., Crego C. L., Compton D. A., Schroer T. A. 1999. Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J. Cell Biol.* 147 : 321—334.
- Quintyne N. J., Schroer T. A. 2002. Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. *J. Cell Biol.* 159 : 245—254.
- Reilein A., Nelson W. J. 2005. APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nat. Cell Biol.* 7 : 463—473.
- Reilein A., Yamada S., Nelson W. J. 2005. Self-organization of an acentrosomal microtubule network at the basal cortex of polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 171 : 845—855.
- Rodionov V. I., Borisy G. G. 1997. Self-centring activity of cytoplasm. *Nature.* 386 : 170—173.
- Rodionov V. I., Hope A. J., Svitkina T. M., Borisy G. G. 1998. Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Curr. Biol.* 8 : 165—168.
- Rodionov V. I., Lim S., Gelfand V. I., Borisy G. G. 1994. Microtubule dynamic in fish melanophores. *J. Cell Biol.* 126 : 1455—1464.
- Rodionov V., Nadezhdina E., Borisy G. 1999. Centrosomal control of microtubule dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 115—120.
- Rodriguez O. C., Schaefer A. W., Mandato C. A., Forscher P., Bement W. M., Waterman-Storer C. M. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 5 : 599—609.
- Rodriguez-Boulan E., Kreitzer G., Musch A. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 233—247.
- Samejima I., Lourenco P. C., Snaith H. A., Sawin K. E. 2005. Fission yeast mto2p regulates microtubule nucleation by the centrosomin-related protein mto1p. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 3040—3051.
- Signor D., Scholey J. M. 2000. Microtubule-based transport along axons, dendrites and axonemes. *Essays Biochem.* 35 : 89—102.
- Small J. V., Geiger B., Kaverina I., Bershadsky A. D. 2002. How do microtubules guide migrating cells? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 : 957—964.
- Surrey T., Nedelec F., Leibler S., Karsenti E. 2001. Physical properties determining self-organization of motors and microtubules. *Science.* 292 : 1167—1171.
- Tassin A. M., Maro B., Bornens M. 1985. Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis *in vitro*. *J. Cell Biol.* 100 : 35—46.

- Tsvetkov A. S., Samsonov A., Akhmanova A., Galjart N., Popov S. V.* 2007. Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64 : 519—530.
- Uetake Y., Terada Y., Matuliene J., Kuriyama R.* 2004. Interaction of Cep135 with a p50 dynactin subunit in mammalian centrosomes. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 58 : 53—66.
- Venkatram S., Jennings J. L., Link A., Gould K. L.* 2005. Mto2p, a novel fission yeast protein required for cytoplasmic microtubule organization and anchoring of the cytokinetic actin ring. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 3052—3063.
- 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 : 9—29.
- Vorobjev I. A., Chentsov Yu. S.* 1982. Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *J. Cell Biol.* 93 : 938—949.
- 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., Svitkina T. M., Borisy G. G.* 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J. Cell Sci.* 110 : 2635—2645.
- Wadsworth P.* 1999. Regional regulation of microtubule dynamics in polarized, motile cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 42 : 48—59.
- Waller B. J., Alberts A. S.* 2003. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Review. *Trends Cell Biol.* 13 : 435—446.
- Waterman-Storer C. M., Worthylake R. A., Liu B. P., Burridge K., Salmon E. D.* 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 1 : 45—50.
- Yan L. Y., Huang J. C., Zhu Z. Y., Lei Z. L., Shi L. H., Nan C. L., Zhao Z. J., Ouyang Y. C., Song X. F., Sun Q. Y., Chen D. Y.* 2006. NuMA distribution and microtubule configuration in rabbit oocytes and cloned embryos. *Reproduction.* 132 : 869—876.
- Yu W., Ahmad F. J., Baas P. W.* 1994. Microtubule fragmentation and partitioning in the axon during collateral branch formation. *J. Neurosci.* 14 : 5872—5884.

Поступила 28 I 2008

THE SPATIAL ORGANIZATION OF CENTROSOME-ATTACHED AND FREE MICROTUBULES IN 3T3 FIBROBLASTS

I. B. Alieva,¹ G. G. Borisy,² I. A. Vorobjev¹

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,

² Department of Cell and Molecular Biology, Feinberg School of Medicine, and Northwestern University, Chicago, USA;

¹ E-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Microtubules spatial organization is essential for different cellular processes to proceed normally. It is supposed traditionally, that the fibroblasts have radial microtubule array consisting of long microtubules running from the centrosome. However, the detailed analysis of the microtubule array in the internal cytoplasm has never been performed. In the current study we used laser photobleaching for the analysis of the spatial organization of microtubules in the internal cytoplasm of cultured 3T3 fibroblasts. Cells were injected with Cy-3-labeled tubulin, and then in the bleached zone growth of microtubules in the centrosome region and in the peripheral parts of cytoplasm was analyzed. In most cases microtubules growth in the bleached zone occurred rectilinearly, on the distance up to 5 μm they seldom bend more than 10—15°. We considered a growing fragment of the microtubule as a vector with the beginning in the point of occurrence and with the end in a point where growth terminated (or the end point after 30 s if microtubule's persistent growth proceeded longer). We defined the direction of microtubules growth in different parts of the cell using these vectors and measured the angle of their deviation from the vector of comparison. In the area of the centrosome we directed the vector of comparison inside of the bleached zone from the centrosome to the beginning of the growing microtubule segment; in fibroblast lamella and in fibroblast trailing part we used, the vector of comparison was directed along the long axis of the cell from its geometrical center to periphery. The microtubules growing immediately from the centrosome grew along the cell radius. However at a distance of 10 μm from the centrosome radially growing microtubules gave 40 % from the overall number, and at a distance of 20 μm — only 25 %. The rest of microtubules grew in different directions, with the preferred angle between their growth direction and cell radius around 90°. Fibroblast lamella and trailing part 80 % of all microtubules grew along the cell long axis or at the angle no more than 20°, and 10—15 % of microtubules grew along cell axis but towards the centrosome. Thus, in 3T3 fibroblasts the radial system of microtubules is perturbed starting from the distance of several microns from the centrosome. In the internal cytoplasm the microtubule system is completely disordered, and in the stretched parts of the polarized cell (lamella, trailing edge) the microtubule system again becomes well organized — microtubules are preferentially oriented along the long cell axis. From the results obtained we conclude that orderliness of microtubules at the periphery of the fibroblast is not a consequence of their growth from the centrosome, but their orientation is preset by local factors.

Key words: centrosome, centrosome-attached microtubules, free microtubules, the microtubule system organization, videomicroscopy.