

## ОБ ОТНОШЕНИИ ДЛИНЫ И ДИНАМИКИ МИКРОТРУБОЧЕК: КРАЕВОЙ ЭФФЕКТ И СВОЙСТВА ПРОТЯЖЕННОЙ РАДИАЛЬНОЙ СЕТИ

© И. А. Воробьев,<sup>1</sup> И. В. Малый<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета  
<sup>2</sup> Кафедра вычислительной биологии Медицинского факультета, Университет Питтсбурга, США;  
 электронный адрес: ivanmaly@pitt.edu

Микротрубочки (МТ) в интерфазных клетках образуют протяженную радиальную сеть. Длина индивидуальных МТ претерпевает существенные стохастические флуктуации, в то время как статистическое распределение длин МТ в клетке остается приблизительно постоянным. Мы предлагаем количественную модель, которая описывает взаимоотношение средней длины МТ и динамики их плюс-концов, с использованием минимального набора параметров (радиуса клетки, концентрации тубулина, критической концентрации тубулина для удлинения плюс-конца и числа сайтов нуклеации). Сеть МТ аппроксимируется радиальной системой, где минус-концы связаны с сайтами нуклеации на центросоме, а плюс-концы растут и укорачиваются. Динамическая нестабильность плюс-концов рассматривается как случайное блуждание с краевыми условиями, а поведение МТ характеризуется коэффициентами диффузии и сноса (Vorobjev et al., 1997, 1999). Мы показываем, что формирование протяженной сети в стационарном состоянии может быть достигнуто одним лишь ограничением роста МТ краем клетки. Для радиуса клетки, концентрации тубулина, критической концентрации тубулина для элонгации плюс-конца и числа затраток мы определили базисную точку в пространстве параметров, в которой плюс-концы индивидуальных МТ в среднем ни удлиняются, ни укорачиваются. В этом случае средняя длина МТ равна половине радиуса клетки. Когда какой-либо из параметров уклоняется от своего базисного значения, МТ становятся длиннее или короче и соответственно возникает положительный или отрицательный снос плюс-концов. Вблизи базисной точки изменение любого параметра оказывает сильное влияние на длину МТ и слабое — на снос. Когда средняя длина МТ близка к радиусу клетки, снос плюс-концов становится значительным. Это приводит к процессивному росту МТ во внутренней цитоплазме и кажущейся стабилизации плюс-концов на краю клетки. В этих условиях небольшие изменения параметров оказывают значительное влияние на величину сноса. Анализ динамики МТ в различных клеточных культурах показывает, что в большинстве случаев плюс-концы имеют заметный положительный снос, что согласуется с наличием длинных МТ в рамках предлагаемой модели.

**Ключевые слова:** микротрубочка, тубулин, динамическая нестабильность, диффузия, клетка, стационарное состояние.

**Принятые сокращения:** БТПП — базисная точка в пространстве параметров, ДН — динамическая нестабильность, МТ — микротрубочки.

Динамика микротрубочек (МТ) играет важную роль в клеточной подвижности, перестройке цитоскелета и клеточном делении (Desai, Mitchison, 1997). Во многих животных клетках МТ считаются организованными радиально: с минус-концами, зажоренными на центросоме, и с плюс-концами, направленными в сторону края клетки. Динамика плюс-концов обычно описывается как чередующиеся фазы роста и укорочения в ходе процесса, именуемого динамической нестабильностью (ДН) (Mitchison, Kirschner, 1984).

Исходной предпосылкой исследований динамики МТ является предположение о том, что их система находится в клетке в стационарном состоянии. Однако никакого количественного описания или формального определения стационарного состояния системы МТ с учетом ДН до сих пор не предложено. Мы определяем стационарное состояние системы МТ в клетке как состояние, в котором

распределение тубулина между полимерной и мономерной формами, число МТ и распределение их длин не изменяются со временем. Очевидно, что стационарное состояние достигается в интерфазных клетках, оно может также достигаться в митозе, особенно в метафазе, принимая во внимание быстрое обновление МТ во время деления. В опытах *in vitro*, однако, стационарное состояние никогда не достигалось: когда соотношение полимеризованного и неполимеризованного тубулина оставалось постоянным, средняя длина МТ значительно росла со временем и не выходила на постоянный уровень в течение эксперимента (Mitchison, Kirschner, 1984; Kristofferson et al., 1986).

МТ в интерфазной клетке считаются довольно длинными — до 200 мкм (Glikman et al., 1993). Распределение длин цитоплазматических МТ, проанализированное с использованием метода вычитания последовательных изоб-

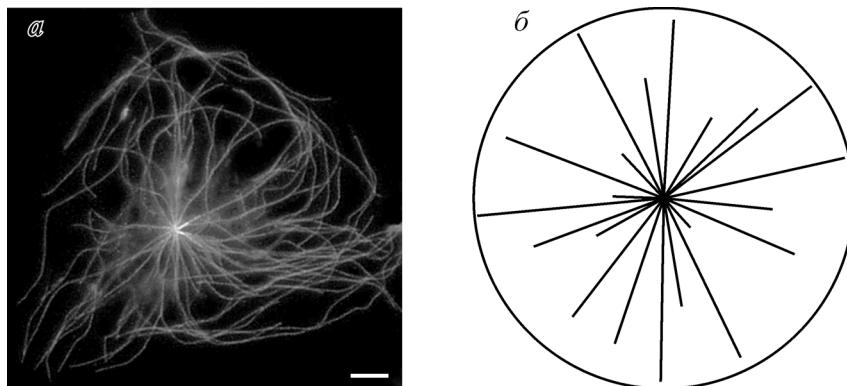


Рис. 1. Радиальная сеть микротрубочек (МТ) в интерфазной клетке.

*a* — кератоцит тернции, инъецированный тубулином, меченым флуорофором Су-3. Микроинъекция была произведена, изображение снято охлаждаемой ПЗС-камерой, как описано ранее (Vorobjev et al., 1997). *б* — диаграмма модельной радиальной сети МТ в клетке. *Масштабный отрезок — 5 мкм.*

ражений, подтвердило это предположение и показало, что большинство плюс-концов расположено вблизи края клетки (Vorobjev et al., 1999; Komarova et al., 2002). Мы называем этот тип организации МТ протяженной радиальной сетью (рис. 1, *a*), которая характерна для многих клеток в интерфазе (Alberts et al., 2002).

МТ, полимеризующиеся на изолированных центросомах *in vitro*, могут образовывать радиальные сети, однако в стационарном состоянии распределение длины МТ — нисходящее или подобное гамма-распределению, в котором короткие МТ численно преобладают над длинными (Fygenson et al., 1994). Таким образом, существует значительная разница между радиальной сетью МТ в интерфазной клетке и сетью, моделируемой *in vitro*.

### Динамика МТ *in vivo*

Динамика МТ в интерфазных клетках обычно описывается вблизи границы клетки. Однако в клетках многих типов наблюдалось ограничение роста МТ, например в пневмоцитах (Cassimeris et al., 1988), фибробластах (Mikhailov, Gundersen, 1998), клетках легкого тритона (Waterman-Storer, Salmon, 1997; Waterman-Storer et al., 2000) и меланофорах рыбы (Vorobjev et al., 1999). Это позволяет предположить, что динамика МТ на краю клетки нерепрезентативна для всей цитоплазмы. Действительно, в некоторых клетках поведение МТ в глубине цитоплазмы отличается от такового на периферии клетки (Komarova et al., 2002; Mimori-Kiyosue et al., 2005). Во внутренней цитоплазме МТ росли с редкими перерывами от центросомы к краю клетки, где они осциллировали в течение продолжительного времени (Komarova et al., 2002).

Детальное рассмотрение данных по ДН, представленных в литературе, показывает, что интерфазные МТ проявляют заметный дисбаланс роста и разборки (Komarova et al., 2002; Maly, 2002). Произведение времени, проведенного в фазе роста, на скорость роста обычно превышает произведение времени, проведенного в фазе укорочения, на скорость укорочения:  $v_p t_p > v_y t_y$ . Этот дисбаланс вызывает вопросы: 1) был анализ динамики МТ проведен в стационарном состоянии или в переходном? 2) быть может, определение фаз и частот неверно или ДН не описывает всех черт динамики МТ?

Для ответа на эти вопросы необходимо проанализировать поведение МТ в промежутках времени, значительно превышающих длительность индивидуальных фаз роста и укорочения. Поскольку фазы роста и разборки МТ чередуются стохастически, очевидно, что по прошествии некоторого времени вероятность того, что данная МТ находится в фазе роста (или разборки), достигает постоянного значения. Иными словами, поведение плюс-концов становится не зависимым от исходного состояния (Maly, 2002). Это обстоятельство позволяет рассматривать динамику плюс-конца как случайное блуждание (*random walk*) (Berg, 1993). Модель случайного блуждания была предложена для описания динамики плюс-конца на основании анализа смещений концов МТ в клетках PtK (Vorobjev et al., 1997), меланофорах рыб (Vorobjev et al., 1999) и в фибробластах 3T3 (Grigoriev et al., 2006). Использование данного подхода позволяет анализировать некоторые свойства сети МТ, привлекая математический аппарат из теории диффузионных процессов.

### Модель радиальной сети МТ

При построении модели мы предполагаем следующее.

1. Прямые МТ закреплены на центросоме, расположенной в центре клетки (рис. 1, *б*). Таким образом, динамика МТ обусловлена поведением их плюс-концов, а длина МТ ( $l_{MT}$ ) в клетке заключена между нулем и клеточным радиусом:  $0 \leq l_{MT} \leq R$ .

2. Плюс-концы МТ находятся в равновесии с растворенным тубулином, т. е. полная длина всех МТ и концентрация растворенного тубулина не меняются со временем. Концентрация растворенного тубулина, отношение ГТФ- и ГДФ-связанных форм и свойства белков, регулирующих динамические свойства МТ, одинаковы повсюду в цитоплазме.

3. Скорости роста и укорочения на плюс-концах конечны. Ввиду этого в любой данный момент времени доля растущих концов МТ, умноженная на среднюю скорость роста, равняется доле разбирающихся концов, умноженной на среднюю скорость укорочения.

4. Критическая концентрация растворенного тубулина для роста плюс-конца значительно ниже минимальной концентрации для спонтанной сборки МТ (Nyman, Kar-

senti, 1998), поэтому вероятность спонтанной сборки МТ бесконечно мала. Ввиду этого максимальное число МТ ограничено числом сайтов нуклеации.

5. Поскольку на центросомальной затравке (в клеточном экстракте) рост МТ начинается практически мгновенно (Glikman et al., 1992), мы следуем предположению, согласно которому незанятые сайты рассматриваются просто как «МТ нулевой длины», которые не в состоянии укорачиваться (Glikman et al., 1993; Holy, Leibler, 1994). Таким образом, с учетом предположения 4 полное число МТ в модели всегда равно числу сайтов нуклеации.

6. Ранее было показано, что поведение МТ можно характеризовать величиной среднего смещения их концов за продолжительный промежуток времени — сносом (Votobjev et al., 1997, 1999). Рассмотрим, какой знак будет иметь величина сноса для МТ ненулевой длины в различных условиях.

Рассмотрим сначала поведение МТ в большом сосуде (практически бесконечном по отношению к возможной длине МТ), в котором центросома содержит сайты нуклеации МТ. В стационарном состоянии некоторые МТ будут иметь нулевую длину (незанятые сайты) и потому могут только удлиняться, но не укорачиваться, в то время как остальные МТ претерпевают оба типа изменений. Таким образом, вся популяция МТ может быть разделена на две — МТ нулевой длины и остальные. Чтобы скомпенсировать рост МТ нулевой длины, МТ ненулевой длины будут в среднем укорачиваться. Благодаря этому в стационарном состоянии короткие МТ будут преобладать и средняя длина всех МТ будет определяться продолжительностью фазы роста (Glikman et al., 1993). Средняя скорость укорочения МТ (отрицательный снос) будет определяться долей пустых сайтов нуклеации. Если доля МТ нулевой длины мала, то отрицательный снос будет трудно измерить. Однако во всех случаях в полу-бесконечном сосуде (т. е. в отсутствие внешней границы, лимитирующей рост МТ) не существует механизма, который обеспечивал бы положительный снос плюс-концов. Описанный выше тип поведения, который мы называем ограниченным ростом (следуя Fygenson et al., 1994), приводит к формированию компактной радиальной сети.

Рассмотрим далее ячейку конечных размеров с центросомой в середине, где рост МТ ограничен стенкой сосуда. Если средняя длина МТ в стационарном состоянии достаточно велика, то значительная часть плюс-концов будет не в состоянии удлиняться. Популяция МТ теперь должна быть разделена на три группы: МТ нулевой длины, МТ промежуточной длины, которые могут расти и укорачиваться, и МТ максимальной длины, которые могут лишь укорачиваться. Поведение МТ промежуточной длины зависит от баланса двух групп МТ — нулевой и максимальной длины. Следовательно, для свободных плюс-концов становится теперь возможным нулевой и положительный снос. Если группы МТ нулевой и максимальной длины равны, поведение плюс-концов между двумя границами будет выглядеть как случайное блуждание без смещения. Мы называем этот тип поведения случайным ростом, и он приводит к формированию промежуточной радиальной сети, где средняя длина МТ равна, как будет показано ниже, половине радиуса сосуда. Если средняя длина МТ приближается к клеточному радиусу, первая группа МТ пренебрежимо мала (почти все сайты нуклеации заняты МТ значительной длины), в то время как третья группа становится сравнительно большой.

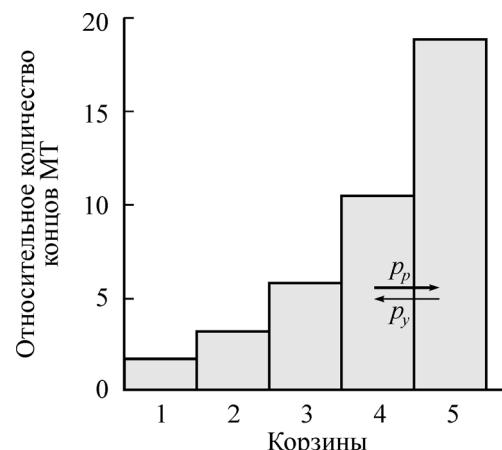


Рис. 2. Диаграмма, представляющая восходящее распределение длины МТ.

МТ различной длины сгруппированы в пять «корзин» (1—5), тенденция МТ к удлинению (положительный снос) представлена как вероятность роста  $p_p$ , превосходящая в стационарном состоянии вероятность укорочения ( $p_y$ ).

В результате дисбаланса между двумя группами МТ промежуточной длины будут в основном расти, демонстрируя несимметричное случайное блуждание плюс-концов. Стационарное (во времени) распределения плюс-концов по радиусу клетки будет достигнуто в таком случае, когда вероятность того, что МТ промежуточной длины удлиняется, будет превышать вероятность укорочения (рис. 2; также см.: Komarova et al., 2002). Модель для количественного описания данного распределения приведена ниже.

### Количественная модель

В количественной модели радиальной сети МТ  $N$  сайтов нуклеации собраны на центросоме в центре круглой клетки радиуса  $R$  и прямые МТ расходятся в направлении периферии клетки. Клетка является плоской и обладает радиальной симметрией. Тогда случайное блуждание плюс-концов вдоль клеточных радиусов может быть описано единственной пространственной координатой — расстоянием от центра клетки. Мы характеризуем состояние системы функцией численной плотности  $p(x)$ , такой, что  $p(x)dx$  — число плюс-концов МТ в бесконечно малой окрестности  $dx$  на расстоянии  $x$  от центросомы или число МТ, длина которых принадлежит окрестности  $dx$  длины  $x$ .

Случайное блуждание плюс-конца. Как было показано, поведение типа ДН с продолжительными периодами быстрого роста и укорочения индивидуальных МТ как *in vivo*, так и *in vitro* в математическом смысле сводится к поведению типа случайного блуждания, когда время наблюдения намного превышает длительность индивидуальных фаз (Hill, 1987; Maly, 2002). Химические механизмы, лежащие в основе роста и укорочения МТ, остаются малопонятными (Desai, Mitchison, 1997; Valiron et al., 2001; Morrison, 2007), и мы упростим анализ, предположив, что критическая концентрация тубулина для плюс-концов выражается как  $c_k = k_y/k_p$ , где  $k_y$  — константа скорости, относящаяся к средней (не мгновенной) скорости укорочения МТ,  $k_p$  — константа скорости, относящаяся к средней (не мгновенной) скорости роста МТ.

При концентрации растворенного тубулина ниже  $c_k$  свободные плюс-концы в среднем укорачиваются (отрицательный снос), в то время как при концентрации, превышающей  $c_k$ , свободные плюс-концы в среднем удлиняются (положительный снос).

В диффузионной аппроксимации обратимой линейной полимеризации динамика полимера описывается кажущимися коэффициентами диффузии и сноса конца полимера (Hill, 1987). Коэффициент диффузии  $a$  характеризует величину случайных флуктуаций положения конца полимера, по мере того как полимеризация и деполимеризация данной полимерной цепи чередуются стохастически и изменяют его длину. Коэффициент сноса  $b$  характеризует среднюю скорость роста длины полимера. Мы предполагаем линейную зависимость коэффициента сноса от концентрации  $c$  растворенного тубулина в окрестности критической концентрации  $c_k$  для роста МТ:

$$b(c) = k(c - c_k), \quad (1)$$

где  $k$  — постоянная.

Стационарное распределение длины МТ. В диффузионном приближении динамики МТ (Hill, 1987) плотность распределения длины МТ подчиняется уравнению Фоккера—Планка (Keizer, 1987):

$$\frac{\partial p}{\partial t} = a \frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - b \frac{\partial p}{\partial x}. \quad (2)$$

Поскольку в стационарном состоянии распределение плюс-концов вдоль клеточного радиуса не меняется со временем,  $\partial p / \partial t = 0$  и

$$bp - a \frac{\partial p}{\partial x} = 0. \quad (3)$$

Условие нормализации для решения уравнения (3) заключается в том, что  $N$  МТ имеют длину между 0 и  $R$ :

$$\int_0^R p(x) dx = N. \quad (4)$$

Решение уравнения (3), которое удовлетворяет условию (4), определяет стационарное распределение длины МТ:

$$p(x, c) = \frac{\frac{b}{a} N}{\exp\left(\frac{b}{a} R\right) - 1} \exp\left(-\frac{b}{a} x\right). \quad (5)$$

Таким образом, стационарное распределение МТ монотонно и его форма зависит от знака коэффициента сноса  $b$ . Распределение является экспоненциально восходящим (преобладают длинные МТ), когда коэффициент сноса положителен (МТ проявляет тенденцию к удлинению), и нисходящим (преобладают короткие МТ), когда коэффициент сноса отрицателен (МТ имеет тенденцию укорачиваться). Особый случай  $b = 0$  важен для дальнейшего анализа. При этом условии предельной формой (5) является равномерное распределение длины МТ между нулем и клеточным радиусом.

Концентрация с растворенным тубулином в модельной клетке удовлетворяет следующему уравнению:

$$c = c_t - \frac{1}{\lambda V} \int_0^R xp(x) dx. \quad (6)$$

В уравнении (6) длина МТ в клетке интегрируется и делится на длину  $\lambda$ , приходящуюся на гетеродимер тубулина, и на клеточный объем  $V$ , чтобы получить концентрацию полимеризованного тубулина, которая затем вычитается из полной концентрации тубулина  $c_t$ , чтобы получить концентрацию растворенного тубулина. Таким образом, концентрация растворенного тубулина, которая определяет динамику плюс-концов (1), сама зависит от их распределения вдоль радиуса клетки. В результате коэффициент сноса  $b$  в уравнении (2) является функцией  $p$ , что делает нелинейным уравнение Фоккера—Планка, описывающее динамику МТ в пределах клетки. Если  $p$  в (6) является стационарным распределением длины МТ (5), единственное решение (6) относительно переменной  $c$  является стационарной концентрацией растворенного тубулина в клетке. Она является функцией параметров клетки (объема, радиуса, числа затравок и полной концентрации тубулина) и критической концентрации полимеризации. Стационарная концентрация растворенного тубулина может быть затем использована при вычислении сноса плюс-концов МТ (1) и распределения длины МТ (5). В общем случае стационарная концентрация растворенного тубулина и соответствующие ей коэффициент сноса и распределение длины МТ могут быть найдены из (1), (5) и (6) лишь численно.

### Численный анализ

Приступая к численному анализу модели, начнем с оценки значений параметров. Длина МТ, приходящаяся на один гетеродимер тубулина в составе стенки МТ, составляет  $\lambda = 0.612$  нм (Salmon et al., 1984). Объем сравнительно больших пневмоцитов тритона оценивался как 8 пиколитров (пл) (Glikman et al., 1993) и для более мелких клеток — как 2.5 пл (Hiller, Weber, 1978). Мы предполагаем объем клетки  $V = 4$  пл. Полная концентрация тубулина в клетках была оценена как 20—30 мкмоль/л (Pfeffer et al., 1976; Hiller, Weber, 1978). Мы предполагаем полную концентрацию тубулина  $c_t = 25$  мкмоль/л. Приблизительно 55—60 % тубулина в стационарном состоянии находится в составе МТ (Zhai, Borisy, 1994; Rodionov et al., 1999). С учетом этого концентрация растворенного тубулина может быть оценена как 10—12 мкмоль/л. Эта концентрация, однако, может отличаться от критической. Зависимость динамики МТ от концентрации растворенного тубулина *in vitro* анализировали Валкер с коллегами (Walker et al., 1988). При расчете коэффициента сноса плюс-концов МТ по этим данным мы воспользуемся выражением Хилла для коэффициента сноса как функции параметров ДН (Hill, 1987). Линеаризация концентрационной зависимости коэффициента сноса в соответствии с уравнением (1) приводит к критической концентрации для результирующего роста МТ  $c_k = 11.5$  мкмоль/л и к константе  $k = 1 \text{ мкм} \cdot \text{л} \cdot \text{мкмоль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ . Таким образом, как опытные, так и расчетные значения оказываются в одном и том же диапазоне, и мы использовали  $c_k = 11.5$  мкмоль/л в вычислениях. Коэффициент диффу-

зии был рассчитан для клеток нескольких типов (Vorobjev et al., 1997, 1999; Воробьев и др., 2000; Komarova et al., 2002) и варьировал от 2.4 мкм<sup>2</sup>/мин в клетках PtK до 11.3 мкм<sup>2</sup>/мин в клетках СНО. Мы выбрали  $a = 7.5$  мкм<sup>2</sup>/мин, что равняется значениям, измеренным в меланофорах рыб и в мышиных эмбриональных фибробластах.

Используя вышеприведенные значения параметров, рассчитаем стационарную концентрацию растворенного тубулина (6), соответствующий коэффициент сноса (1) и распределение длины МТ (5).

Изменяя значения радиуса клетки  $R$  и числа МТ  $N$  мы обнаружили, что при  $R = 50$  мкм и  $N = 800$  стационарная концентрация растворенного тубулина  $c = 11.495$  мкмоль/л практически равняется критическому значению  $c_k = 11.5$  мкмоль/л. Соответственно коэффициент сноса  $b = -0.005$  мкм/мин практически равен нулю и распределение длины МТ почти равномерно при средней длине 24.9 мкм, или половине клеточного радиуса. Даные условия, таким образом, с высокой точностью соответствуют равномерному распределению длин МТ. Мы пользуемся этими условиями ( $\lambda = 0.612$  нм,  $c_t = 25$  мкмоль/л,  $V = 4$  пл,  $a = 7.5$  мкм<sup>2</sup>/мин,  $c_k = 11.5$  мкмоль/л,  $k = 1$  мкм · л · мкмоль<sup>-1</sup> · мин<sup>-1</sup>,  $R = 50$  мкм,  $N = 800$ ) как базисной точкой в пространстве параметров (БТПП) при изучении реакции модели на изменения параметров.

Мы решили уравнения модели, варьируя параметры по одному и фиксируя остальные параметры на их значениях в БТПП. Результаты представлены в табл. 1. Чтобы облегчить сравнение распределений длины МТ в разных условиях, мы представляем длину  $x$  как долю радиуса клетки  $R$ . Средняя относительная длина, превышающая 0.5, подразумевает восходящее распределение длины, в то время как значения меньше 0.5 указывают на то, что распределение является нисходящим. Как показано в табл. 1, возрастание числа МТ  $N$  приводит к падению стационарной концентрации растворенного тубулина ниже критического значения. В соответствии с этим коэффициент сноса становится отрицательным, отражая тенденцию МТ к разборке. Вследствие этого формируется нисходящее стационарное распределение длины МТ (рис. 3). Уменьшение числа МТ, напротив, ведет к установлению восходящего распределения длины МТ. Такое стационарное состояние характеризуется концентрацией растворенного тубулина выше критической и положительным коэффициентом сноса МТ. Подобным же образом возрастание полной концентрации тубулина при неизменном числе затравок сдвигает стационарное состояние к восходящему распределению длины МТ, которое сопровождается положительным сносом, а уменьшение полной концентрации тубулина дает обратный эффект (табл. 1). Кинетическое регулирование сборки МТ, которое повышает критическую концентрацию  $c_k$ , вызывает формирование компактной сети МТ с нисходящим распределением длины. Если критическая концентрация понижается, то сеть МТ в стационарном состоянии становится протяженной (табл. 1). Наконец, изменение радиуса клетки также является эффективным способом регуляции стационарной структуры модельной сети МТ. Уменьшение клеточного радиуса  $R$  делает сеть МТ протяженной, где распределение длины МТ является восходящим. И наоборот, увеличение  $R$  приводит к нисходящему распределению длины МТ (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация растворенного тубулина ( $c$ ) в стационарном состоянии в клетке, коэффициент сноса плюс-конца МТ ( $b$ ) и средняя длина МТ по отношению к радиусу клетки ( $\bar{x}/R$ ) при различных значениях параметров

Значения параметров	$c$ , мкмоль	$b$ , мкм/мин	$\bar{x}/R$
БТПП ( $N = 800$ , $c_t = 25$ мкмоль/л, $c_k = 11.5$ мкмоль/л, $R = 50$ мкм)	11.495	-0.005	0.49
$N = 500$	12.100	0.580	0.76
$N = 2000$	10.800	-0.680	0.21
$c_t = 20$ мкмоль/л	11.200	-0.340	0.33
$c_t = 30$ мкмоль/л	11.800	0.330	0.67
$c_k = 10.5$ мкмоль/л	10.600	0.100	0.52
$c_k = 15$ мкмоль/л	14.800	-0.230	0.38
$R = 25$ мкм	13.500	1.970	0.85
$R = 100$ мкм	11.200	-0.260	0.26

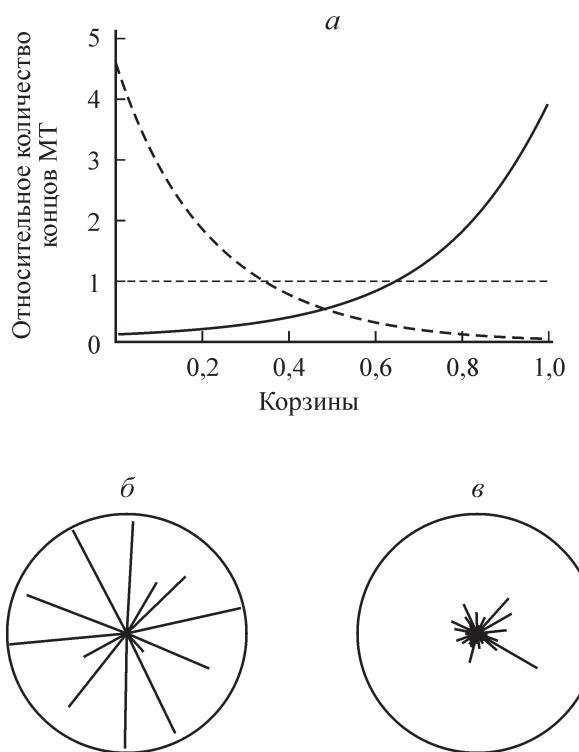


Рис. 3. Длина МТ в модельной клетке.

а — распределение длин МТ в модельной клетке. Длина МТ дана в единицах клеточного радиуса ( $x/R$ ), частота встречаемости МТ определенной длины нормализована на полное число МТ и на максимальную длину ( $R p(x)/N$ ). Пунктирная линия показывает равномерное распределение длины МТ в стационарном состоянии при условиях в БТПП. Увеличение числа МТ до  $N = 2000$  приводит к нисходящему распределению длины (штриховая линия), уменьшение числа МТ до  $N = 500$  ведет к установлению восходящего распределения длины МТ (непрерывная линия). б — диаграмма двух распределений, соответствующих относительно малому (слева) и относительно большому (справа) числам сайтов нуклеации.

Таблица 2

**Концентрация растворенного тубулина ( $c$ ) в стационарном состоянии в клетке, коэффициент сноса плюс-конца МТ ( $b$ ) и средняя длина МТ по отношению к радиусу клетки ( $\bar{x}/R$ ) при различных значениях числа затравок ( $N$ ) для нуклеации МТ**

$N$	$c$ , мкмоль/л	$b$ , мкм/мин	$\bar{x}/R$
120	21.000	9.500	0.984
150	20.000	8.500	0.982
200	18.350	6.850	0.978
300	15.240	3.740	0.960
400	12.890	1.390	0.892
500	12.100	0.580	0.760
800 (БТПП)	11.495	-0.005	0.490

Воспользовавшись функцией плотности вероятности перехода для конца полимера в диффузионном приближении (см.: Hill, 1987, уравнение 6.22), мы провели компьютерную симуляцию динамики МТ при различных значениях коэффициента сноса, начиная из БТПП и меняя каждый из параметров в окрестности его значения в БТПП. Вычисления показывают, что смещение любого параметра из его значения вблизи БТПП оказывает сильное влияние на среднюю длину МТ, но не на значение сноса (см. табл. 1). Когда один из параметров отклоняется от своего значения в БТПП на 15 или -15 %, средняя длина МТ изменяется приблизительно до 0.65 или 0.35 от радиуса клетки, однако величина сноса меняется лишь на  $\pm 0.3$  мкм/мин. Симуляции ДН с использованием этих значений показывают (данные не представлены), что смещения индивидуальных концов МТ при больших промежутках времени будут иметь различные знаки независимо от знака сноса. Таким образом, для наблюдателя, оценивающего поведение МТ по прямой цейтраферной съемке, отдельные фазы роста и разборки будут намного более очевидны, чем их дисбаланс.

Наиболее интересное поведение МТ модель предсказывает вдали от БТПП, когда коэффициент сноса велик. Эта ситуация может быть достигнута значительным изменением любого параметра ( $c_t$ ,  $c_k$ , клеточного радиуса, числа сайтов нуклеации) или одновременным изменением нескольких параметров. Чтобы проанализировать случай большого сноса, мы уменьшили число сайтов нуклеации на центросоме (табл. 2), однако похожие результаты могут быть получены изменением и других параметров. Зависимость сноса от средней длины МТ представлена на рис. 4. В нашей модели максимальное значение сноса, которое может быть достигнуто изменением числа затравок нуклеации, равняется 13.5 мкм/мин. Когда снос равен 10 мкм/мин, соответствующее число МТ равно 120, а их средняя длина составляет 0.985 клеточного радиуса. Чтобы оценить динамику индивидуальных МТ в случае большого положительного сноса, мы провели компьютерное моделирование. Были использованы следующие значения: снос 5 мкм/мин и коэффициент диффузии 7.5 мкм<sup>2</sup>/мин. При этих значениях коэффициентов МТ проявляет выраженную тенденцию к удлинению (рис. 5): плюс-концы из внутренней части клетки быстро достигают края клетки и после этого осциллируют вблизи края.

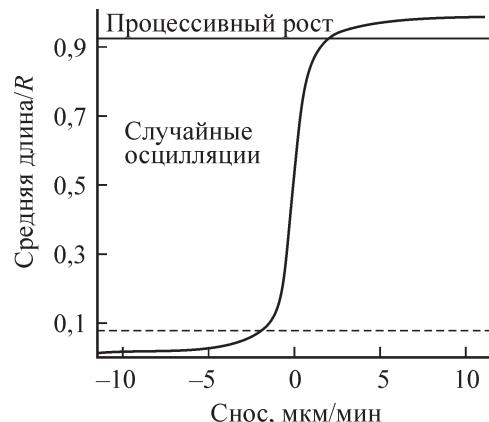


Рис. 4. Зависимость сноса плюс-концов МТ от средней длины МТ при остальных параметрах, зафиксированных на их значениях в базисной точке в пространстве параметров (БТПП).

Когда средняя длина близка к половине радиуса клетки, малые изменения сноса сопровождаются существенными изменениями длины МТ (зона случайных осцилляций). Когда средняя длина близка к клеточному радиусу, малые изменения длины МТ вызывают большие изменения в значении сноса (зона процессивного роста).

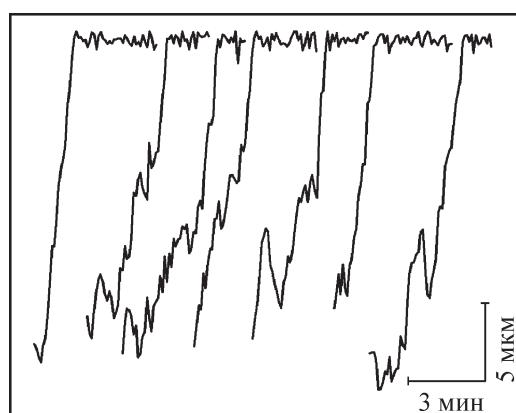


Рис. 5. Симулированные истории динамики плюс-концов МТ из области «процессивного роста» на рис. 4.

Расстояние между плюс-концом радиальной МТ и центром клетки (центросомой) вычислялось с интервалами в 5 с. При условии значительного отношения коэффициента сноса к коэффициенту диффузии ( $a = 7.5$  мкм<sup>2</sup>/мин,  $b = 5$  мкм/мин) статистически ожидаемое поведение плюс-конца МТ во внутренней части цитоплазмы (здесь 20 мкм от края клетки) состоит в его движении на периферию клетки. Фазы удлинения могут прерываться фазами укорочения, плюс-конец МТ быстро достигает края клетки. Там ограничение роста и тенденция к удлинению приводят к незначительным осцилляциям плюс-конца, которые могут выглядеть как «стабилизация» МТ.

## Обсуждение

Диффузионная аппроксимация динамики МТ. Ранее нами было предложено описание динамики роста и укорочения МТ в клетках как диффузионного процесса (Vorobjev et al., 1997, 1999). В настоящем исследовании мы показали, что аппроксимация динамики МТ в виде случайного блуждания плюс-концов позволяет аналитически описать распределение МТ по длинам и предсказывает поведение плюс-концов исходя из небольшого набора параметров. Диффузионная модель предсказывает, что снос плюс-концов (положительный или отрица-

тельный) должен иметь место во всех клетках, в которых длина МТ и радиус клетки не строго сбалансированы ( $l_{MT} \neq 1/2 R$ ). Для проверки данного предсказания мы проанализировали результаты работ, в которых динамика МТ была детально исследована.

В рамках диффузионной модели средняя величина сноса плюс-концов может быть вычислена исходя из параметров двухстадийной динамической нестабильности по формуле

$$b = (v_1 t_1 + v_2 t_2) / (t_1 + t_2), \quad (7)$$

где непосредственно измеряемыми параметрами (Cassimeris et al., 1988; Walker et al., 1988) являются скорости концов МТ в фазах роста ( $v_1$ ) и укорочения ( $v_2$ ), а также средние продолжительности соответствующих фаз ( $t_1$  и  $t_2$ ). Величина сноса плюс-концов в интерфазных клетках действительно оказалась ненулевой. Так, в пневмоцитах тритона (Cassimeris et al., 1988) и клетках СНО (Mikhailov, Gundersen, 1998) преобладает рост МТ, на что указывает положительное значение сноса, вычисленного с использованием формулы (7) (1.4 и 4.0 мкм/мин соответственно). В клетках BSC-1, однако (Dhamodharan, Wadsworth, 1995), вычисленный коэффициент сноса отрицателен ( $-0.9$  мкм/мин), что указывает на преобладание разборки в динамике индивидуальных МТ. Это согласуется со свойствами сети МТ в клетках BSC-1, у которых многочисленные свободные МТ имеют стабильные минус-концы и поэтому эквивалентное число сайтов нуклеации — в терминах нашей модели — велико.

Коэффициент диффузии для плюс-конца также может быть определен из параметров ДН (Hill, 1987; Dogterom, Leibler, 1993; Maly, 2002). Для двухстадийной ДН может быть использована следующая формула:

$$a = (1/k_1 + 1/k_2) [(v_1 + v_2)/(k_1 + k_2)]^2, \quad (8)$$

где  $k_1$  и  $k_2$  являются частотами перехода от роста к разборке («катастрофа») и от разборки к росту («спасений»). Эта формула выведена из уравнения 15 ранее (Maly, 2002). Чтобы установить применимость данной формулы, мы сравнили вычисленные с ее помощью результаты с теми, что были прямо измерены методом линейной регрессии смещений концов МТ в клетках СНО (Kumarova et al., 2002). С использованием следующих параметров ДН (во внутренней цитоплазме) — скорость роста 17.0 мкм/мин, скорость укорочения 29.7 мкм/мин и частоты переходов  $k_1$  и  $k_2$  соответственно 0.31 и 7.20 мин<sup>-1</sup> — мы получили  $a = 11.5$  мкм<sup>2</sup>/мин, что очень близко к измеренному значению и равному 13.1 мкм<sup>2</sup>/мин.

Для трехстадийной ДН (включающей в себя фазу стабильности, или паузу), которая наблюдается в некоторых клетках (Shelden, Wadsworth, 1993; Dhamodharan, Wadsworth, 1995; Mikhailov, Gundersen, 1998; Goncalves et al., 2001), могут быть получены похожие результаты (Maly, 2002, с. 218—222). Снос, который является результатирующей скоростью удлинения в трехстадийной модели, может быть также вычислен по формуле

$$b = f(v_1 t_1 + v_2 t_2) / (t_1 + t_2). \quad (9)$$

В уравнении (9) мы модифицировали выражение, исходно предложенное для параметра  $J$  в теории двухстадийного поведения МТ (Hill, 1987, гл. 26; Verde et al.,

1992), введя множитель  $f$ , который представляет собой долю времени, которое МТ проводит в фазах роста и разборки.

Таким образом, снос является внутренним свойством, присущим радиальной сети длинных МТ, и дисбаланс роста и укорочения является обычным явлением.

Распределение длин МТ и их кажущаяся динамика. В первую очередь мы проанализировали модель вблизи БТПП, где средняя длина МТ равна половине клеточного радиуса и распределение плюс-концов по радиусу должно быть равномерным.

При равномерном распределении длины 50 % МТ будут оканчиваться в пределах первой половины клеточного радиуса, которая обычно называется «внутренней цитоплазмой», и лишь немногие МТ будут достигать границы клетки. Плотность МТ в пространстве будет быстро убывать вдоль радиуса клетки. В то же время рост и укорочение индивидуальных МТ будут сбалансированы. Изменения концентрации растворенного тубулина или числа сайтов нуклеации вблизи БТПП оказывают значительное влияние на среднюю длину МТ, но не на значение сноса (см. табл. 1). Это означает, что зависимость между числом сайтов нуклеации или концентрацией, с одной стороны, и кажущимся поведением плюс-концов — с другой — в этом диапазоне слаба. Так, флуктуации массы полимера величиной ±10 %, приводящие к изменениям средней длины МТ в пределах от 0.2 до 0.8 радиуса клетки, не вызывают изменений в поведении плюс-концов МТ, которые могли бы быть легко определены при оценке динамики МТ методом ДН.

При средней длине МТ, приближающейся к радиусу клетки ( $R$ ), модель предсказывает, что МТ во внутренней цитоплазме будут демонстрировать существенный положительный снос. Снос становится заметным в симуляциях на компьютере лишь тогда, когда средняя длина МТ достигает  $0.9R$  или выше (табл. 2) и приводит к процессивному росту плюс-концов во внутренней цитоплазме (рис. 5). Процессивный рост, как показывает модель, весьма чувствителен к изменениям концентрации тубулина, или критической концентрации полимеризации, или числа сайтов нуклеации. В этой области параметров сдвиг эффективной концентрации тубулина на 5 % изменит среднюю длину МТ от величины 0.98 лишь до 0.93 от радиуса клетки, однако приведет к более чем трехкратному уменьшению сноса — от 7.5 до 2.2 мкм/мин. Такое малое изменение может быть достигнуто в клетке, например, посредством обратимого фосфорилирования Op18/статмина (Marklund et al., 1996; Howell et al., 1999; Amayed et al., 2002), однако его трудно обнаружить в прямых экспериментах. Сходное влияние на динамику длины МТ оказалось бы уменьшение (возрастание) числа сайтов нуклеации. Действительно, увеличение числа растущих МТ и одновременное уменьшение процессивности их роста было продемонстрировано в экспериментах по модуляции экспрессии центросомного белка сервивина (Rosa et al., 2006).

Таким образом, вблизи БТПП сеть МТ обладает «буферными» свойствами в отношении сноса и изменения параметров оказывают влияние в основном на среднюю длину МТ, но не на их кажущееся поведение, в то время как при длине МТ, близкой к радиусу клетки, сеть становится «буфером» в отношении средней длины МТ и изменения тех же параметров оказывают влияние в основном на кажущееся поведение МТ.

Кроме того, модель диффузионного случайного блуждания показывает, что в случае, когда длина МТ при-

ближается к радиусу клетки, не требуется никакого специального механизма для каждой стабилизации концов МТ на периферии клетки. С использованием формулы переходной вероятности (Hill, 1987, уравнение 6.22) можно рассчитать вероятность того, что плюс-конец МТ остается в пределах 0.5 мкм от края клетки в следующем видеомикроскопическом кадре (через 5 с), после того как этот конец достиг края в нашей модельной системе. С введенными выше параметрами ( $a = 7.5 \text{ мкм}^2/\text{мин}$  и  $b = 5 \text{ мкм}/\text{мин}$ ) эта вероятность составляет 0.46. Такая высокая вероятность означает, что плюс-концы у края клетки при наблюдении под флуоресцентным микроскопом часто казались бы находящимися в паузе, хотя их динамические свойства на самом деле те же, что и во внутренней части цитоплазмы, где МТ процессивно растут. «Стабилизация» ввиду этого может попросту быть следствием, а не причиной формирования протяженной сети МТ в клетке.

Таким образом, стабилизация плюс-конца МТ, неоднократно описанная в литературе (Kirschner, Mitchison, 1986; Brunner, Nurse, 2000; Zimmerman, Chang, 2005), может быть результатом увеличения средней длины МТ, а не воздействия специфических факторов, удерживающих плюс-конец около мембранных клетки, как предполагали авторы. Неслучайная стабилизация плюс-концов МТ, учитывающая их распределение по длине, была недавно показана для белков CLASP (Mimori-Kiyosue et al., 2005).

Как можно рассматривать краевой эффект в условиях ДН? Большой положительный снос в несимметричном случайному блужданию эквивалентен поведению типа ДН, в котором частота катастроф низка и частота спасений высока, т. е. частоты переходов между фазами несимметричны. Низкая частота катастроф в ДН приводит к длинным периодам непрерывного (процессивного) роста. Предположим, что характерная длительность фазы роста составляет 20 с, укорочения — 10 с, и возьмем средние скорости роста и укорочения соответственно 10 и 20 мкм/мин. В БТПП соотношение между временем, проводимым данным плюс-концом в росте и укорочении, будет 2 : 1. При сносе 7 мкм/мин соотношение между временем, проводимым плюс-концом в фазах роста и укорочения, возрастет до 9 : 1. При таком соотношении МТ проведет в среднем 1.5 мин, удлиняясь, и затем претерпит катастрофу. Это предсказание согласуется с наблюдениями в клетках СНО (Komarova et al., 2002), где растущие от центросомы МТ обычно достигают края клетки (в течение 1.5—2.5 мин) без катастроф.

ДН вблизи края клетки характеризуется относительно высокими частотами переходов с типичной длительностью фазы порядка 10 с (Shelsen, Wadsworth, 1993; Vorobjev et al., 1999; Komarova et al., 2002). Анализ методом вычитания последовательных кадров (Vorobjev et al., 1999; Komarova et al., 2002) показывает, что скорости удлинения и укорочения одинаковы повсюду в цитоплазме. Так как же можно оценить эффект края путем измерения параметров ДН? Как следует из ограничения роста МТ границей, частота катастроф на краю клетки будет выше, чем внутри. Действительно, в клетках СНО частота катастроф возрастает вблизи края по сравнению с внутренней цитоплазмой более чем в 10 раз (Komarova et al., 2002), а *in vitro* частота катастроф у МТ, дораставших до границы ячейки, увеличивалась в 20 раз (Janson et al., 2003).

Заключение. Разработанная нелинейная модель позволяет предсказать динамику МТ в клетке в стационарном состоянии и распределения их длины исходя из огра-

ниченного набора клеточных и кинетических параметров. Она удовлетворительно описывает все опубликованные к настоящему времени данные по измерению динамики МТ. Поддержание протяженной радиальной сети МТ требует эффективной нуклеации МТ на лимитированном количестве сайтов и ограничения роста МТ краем клетки. В протяженной радиальной сети все МТ, не достигшие края клетки, имеют выраженную тенденцию удлиняться.

Модель предсказывает два типа регуляции сети МТ. Когда средняя длина МТ варьирует в довольно широких пределах — от 0.2 до 0.8, но не приближается к радиусу клетки, изменение числа сайтов нуклеации или концентрации тубулина приводит главным образом к изменению длины МТ и слабо сказывается на изменении поведения их плюс-концов. Когда длина МТ близка к радиусу клетки ( $l \geq 0.9 R$ ), число сайтов нуклеации и концентрация тубулина могут быть эффективными регуляторами процессивного роста плюс-концов.

Поскольку рост МТ ограничен с обеих сторон (эффективная нуклеация на центросоме и прекращение удлинения на краю клетки эквивалентны отражающим границам), динамическая нестабильность *in vivo* не ведет к изменению числа и длины МТ со временем, а ее параметры зависят от области клетки, где они были измерены. Поэтому мы предлагаем называть поведение МТ в живых клетках «динамической нестабильностью с границами условиями».

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49847).

## Список литературы

- Vorob'ev I. A., Griгорьев И. С., Бориси Г. Г. 2000. Динамика микротрубочек в культивируемых клетках. Онтогенез. 31 (6) : 420—428.  
 Alberts B., Roberts Lewis J., Raff M., Bray D. 2002. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publ. 1042 p.  
 Amayed P., Pantaloni D., Carlier M.-F. 2002. The effect stathmin phosphorylation on microtubule assembly depends on tubulin critical concentration. J. Biol. Chem. 277 : 22 718—22 724.  
 Berg H. C. 1993. Random walks in biology. Princeton, N. J.: Princeton Univ. Press. 246 p.  
 Brunner D., Nurse P. 2000. CLIP170-like tiplp spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. Cell. 102 : 695—704.  
 Cassimeris L. U., Pryer N. K., Salmon E. D. 1988. Real-time observations of microtubules dynamic instability in living cells. J. Cell Biol. 107 : 223—2231.  
 Desai A., Mitchison T. J. 1997. Microtubule polymerization dynamics. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 13 : 83—117.  
 Dhamodharan R., Wadsworth P. 1995. Modulation of microtubule dynamic instability *in vivo* by brain microtubule associated proteins. J. Cell Sci. 108 : 1679—1689.  
 Dogterom M., Leibler S. 1993. Physical aspects of the growth and regulation of microtubule structures. Phys. Rev. Lett. 70 : 1347—1350.  
 Fygenson D. K., Braun E., Libchaber A. 1994. Phase diagram of microtubules. Phys. Rev. E. 50 : 1579—1588.  
 Glikman N. R., Parsons S. F., Salmon E. D. 1992. Okadaic acid induces interphase to mitotic-like microtubule dynamic instability by inactivating rescue. J. Cell Biol. 119 : 1271—1276.  
 Glikman N. R., Skibbens R. V., Salmon E. D. 1993. How the transition frequencies of microtubule dynamic instability (nucleation, catastrophe, and rescue) regulate microtubule dynamics in interphase and mitosis: analysis using a Monte Carlo computer simulation. Mol. Biol. Cell. 4 : 1035—1050.

- Goncalves A., Braguer D., Kamath K., Martello L., Briand C., Horwitz S., Wilson L., Jordan M. A. 2001. Resistance to Taxol in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 11 737—11 742.
- Grigoriev I., Borisy G., Vorobjev I. 2006. Regulation of microtubule dynamics in 3T3 fibroblasts by Rho family GTPases. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 63 : 29—40.
- Hill T. L. 1987. Linear aggregation theory in cell biology. New York: Springer. 462 p.
- Hiller G., Weber K. 1978. Radioimmunoassay of tubulin: a quantitative comparison of the tubulin content of different established tissue culture cells and tissues. *Cell.* 14 : 795—804.
- Holy T. E., Leibler S. 1994. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 5682—5685.
- Howell B. H., Deacon H., Cassimeris L. 1999. Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer *in vivo*. *J. Cell Sci.* 112 : 3713—3722.
- Hyman A., Karsenti E. 1998. The role of nucleation in patterning microtubule networks. *J. Cell Sci.* 111 : 2077—2083.
- Janson M. E., de Dood M. E., Dogterom M. 2003. Dynamic instability of microtubules is regulated by force. *J. Cell Biol.* 161 : 1029—1034.
- Keizer J. 1987. Statistical thermodynamics of nonequilibrium processes. New York: Springer. 584 p.
- Kirschner M. W., Mitchison T. 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell.* 45 : 329—342.
- 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 the cell boundary. *J. Cell Sci.* 15 : 3527—3539.
- Kristoffersson D., Mitchison T., Kirschner M. 1986. Direct observation of steady-state microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* 102 : 1007—1019.
- Maly I. V. 2002. Diffusion approximation of the stochastic process of microtubule assembly. *Bull. Math. Biol.* 64 : 213—238.
- Marklund U., Larsson N., Gradin H. M., Brattsand G., Gulberg M. 1996. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *EMBO J.* 15 : 5290—5298.
- Mikhailov A., Gundersen G. G. 1998. Relationship between microtubule dynamic and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 41 : 325—340.
- Mimori-Kiyosue Y., Grigoriev I., Lansbergen G., Sasaki H., Matsui C., Severin F., Galjart N., Grosfeld 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.* 168 : 141—153.
- Mitchison T., Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312 : 237—242.
- Morrison E. E. 2007. Action and interactions at microtubule ends. *Cell. Mol. Life Sci.* 64 : 307—317.
- Pfeffer T. A., Asnes C. F., Wilson L. 1976. Properties of tubulin in unfertilized sea urchin eggs: quantitation and characterization by the colchicine-binding reaction. *J. Cell Biol.* 69 : 599—607.
- Rodionov V., Nadezhina E., Borisy G. 1999. Centrosomal control of microtubule dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 115—120.
- Rosa J., Canavas P., Islam A., Altieri D. C., Doxsey S. J. 2006. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Mol. Biol. Cell.* 17 : 1483—1493.
- Salmon E. D., Leslie R. J., Saxton W. M., Karow M. L., McIntosh J. R. 1984. Spindle microtubule dynamics in sea urchin embryos: analysis a fluorescein-labeled tubulin and measurements of fluorescence redistribution after laser photobleaching. *J. Cell Biol.* 99 : 2165—2174.
- Sheldan 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.
- Valiron O., Caudron N., Job D. 2001. Microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 : 2069—2084.
- Verde F., Dogterom M., Stelzer E., Karsenti E., Leibler S. 1992. Control of microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 118 : 1097—1108.
- 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 : 2277—2289.
- Vorobjev I. A., Svitkina T. M., Borisy G. G. 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J. Cell Sci.* 110 : 2635—2645.
- Walker R. A., O'Brien E. T., Pryer N. K., Soboeiro M. F., Voter W. A., Erickson H. P., Salmon E. D. 1988. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* 107 : 1437—1448.
- Waterman-Storer C. M., Salmon E. D. 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J. Cell Biol.* 139 : 417—434.
- Waterman-Storer C. M., Salmon W. C., Salmon E. D. 2000. Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 2471—2483.
- Zhai Y., Borisy G. G. 1994. Quantitative determination of the proportion of microtubule polymer during the mitosis-interphase transition. *J. Cell Sci.* 107 : 881—890.
- Zimmerman S., Chang F. 2005. Effects of  $\gamma$ -tubulin complex proteins on microtubule nucleation and catastrophe in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 2719—2733.

Поступила 17 X 2007

## ON THE RELATION OF THE MICROTUBULE LENGTH AND DYNAMICS: BOUNDARY EFFECT AND PROPERTIES OF AN EXTENDED RADIAL ARRAY

I. A. Vorobjev,<sup>1</sup> I. V. Maly<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A. N. Belozersky Institute for Physico-Chemical Biology, Moscow State University,  
and <sup>2</sup> Department of Computational Biology, University of Pittsburgh Medical School, USA;  
e-mail: ivanmaly@pitt.edu

In interphase cells, microtubules (MT) are long and form extended radial array. The length of individual MTs in living cells exhibits substantial stochastic fluctuations while the average length distribution in a cell remains nearly constant. We present a quantitative model that describes relation of the MT length and dynamics in the steady state in the cell using the minimal set of parameters (cell radius, tubulin concentration, critical concentration for plus end elongation, and the number of nucleation sites). The MT array is approximated as a radial system, where MT minus ends are associated with the nucleation sites on the centrosome, while plus ends grow

and shorten. Dynamic instability of MT plus ends is approximated as a random walk process with boundary conditions and the behavior of MT array is quantified using diffusion and drift coefficients (Vorobjev et al., 1997, 1999). We show that establishment of the extended steady-state array could be accomplished solely by the limitation of the MT growth by the cell margin. We determined for the cell radius, tubulin concentration, critical concentration for plus end elongation, and number of nucleation sites the reference point in the parameter space where plus ends of individual MT on average neither elongate nor shorten. In this case average length of MT is equal to the half of cell radius. When any parameter is shifted from its reference value MTs become longer or shorter and consequently acquire positive or negative drift of their ends. In the vicinity of reference point, change in any parameter has major effect on the MT length and rather small effect on the drift. When mean length of the MTs is close to the cell radius the drift of the free plus ends becomes substantial, resulting in processive growth of individual MTs in the internal cytoplasm accompanied by apparent stabilization of the plus ends at the cell margin. Under these conditions small changes in parameters have significant impact on the magnitude of drift. Experimental analysis of the MT plus ends dynamics in different cultured cells shows that in most cases plus ends display positive drift, which, in the framework of the presented model, is in agreement with the simultaneous presence of long MTs.

**Key words:** microtubule, tubulin, dynamic instability, diffusion, cell, steady state.