

РАДИАЛЬНО ОРГАНИЗОВАННЫЕ МИКРОТРУБОЧКИ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ПОДДЕРЖАНИЕ ФОРМЫ КЛЕТКИ И БОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ, ЧЕМ СВОБОДНЫЕ МИКРОТРУБОЧКИ

© *О. А. Чернобельская, И. Б. Алиева,¹ И. А. Воробьев*

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

Микротрубочки принимают участие в различных клеточных процессах, включающих в себя поляризацию, движение клеток, внутриклеточный транспорт и некоторые другие. Поэтому для нормального поведения клеток важна пространственная организация микротрубочек. Фибробласты имеют радиальную систему микротрубочек, расходящихся от centrosомы. В состав этой системы входят два компонента: 1) centrosомальные микротрубочки, закрепленные на centrosоме минус-концами, плюс-концы которых радиально расходятся в направлении периферии клетки; 2) свободные микротрубочки, концы которых не связаны с centrosомой. Различия в динамических свойствах, внутриклеточной организации и структуре микротрубочек, связанных с centrosомой и свободных, позволяют предположить, что различны и их функции в клетке. Для исследования функций свободных и связанных с centrosомой микротрубочек мы использовали цитопласты — клеточные фрагменты, экспериментальным путем лишенные ядра, а при определенных условиях и centrosомы. В таком цитопласте присутствуют только свободные микротрубочки. Цитопласты, содержащие centrosому, по форме, общей морфологии и размерам отличаются от целых клеток незначительно. В то время как цитопласты, лишенные centrosомы, сохраняют крайне разреженную сеть микротрубочек, расположенных в основном в центре цитопласта. Такие цитопласты теряют обычную для фибробластов форму и приобретают неровную, с выростами, ламеллу. Внутренняя архитектура цитоплазмы и расположение органоидов в них также нарушаются. Сальтаторные движения в цитопластах с centrosомой аналогичны таковым в целых клетках, а в цитопластах без centrosомы они происходят со скоростью вдвое меньшей и на меньшие расстояния. Кроме того, сальтаторные движения гранул в отсутствие centrosомы происходили в основном в центре цитопласта и были менее упорядоченными, чем в целых клетках и цитопластах, сохранивших centrosому. Мы полагаем, что радиально организованные микротрубочки обеспечивают эффективный транспорт и динамичное взаимодействие плюс-концов микротрубочек с кортикальными структурами клетки, достаточное для поддержания типичной для фибробласта формы, тогда как дезорганизованные свободные микротрубочки сами по себе не способны поддерживать характерную для фибробласта внешнюю форму и внутриклеточную организацию.

Ключевые слова: микротрубочки, связанные с centrosомой; микротрубочки свободные; сальтаторное движение гранул; цитопласты.

Микротрубочки как компонент цитоскелета в интерфазе выполняют ряд важнейших функций, связанных с поддержанием формы клетки, внутриклеточным транспортом и нормальным позиционированием органелл в цитоплазме. В цитоплазме клеток животных присутствуют как связанные с centrosомой, так и свободные микротрубочки (Алиева и др., 1989; Alieva et al., 1992; Vorobjev et al., 1997; Waterman-Storer, Salmon, 1997; Keating, Borisy, 1999). Связанные с centrosомой микротрубочки закреплены на ней своими минус-концами, а их плюс-концы расположены на периферии клетки, формируя радиальную систему (Brinkley et al., 1980). Концы свободных микротрубочек не связаны с centrosомой, они могут полимеризоваться от затравок, расположенных в цитоплазме (Luders, Stearns, 2007; Moss et al., 2007), в том числе от транс-компартамента аппарата Гольджи (Efimov et al., 2007).

Динамические свойства и внутриклеточная организация связанных с centrosомой и свободных микротрубочек могут различаться (Чернобельская и др., 2004; Алиева и др., 2008). Имеются данные о том, что два типа микротрубочек могут различаться также и структурно: было показано, что микротрубочки, полимеризующиеся в дифференцирующихся эпидермальных клетках крыла дрозофилы в отсутствие centrosомы, состоят из 15 протофиламентов, тогда как микротрубочки, полимеризующиеся позднее на centrosоме, состоят из 13 протофиламентов (Mogensen, Tucker, 1990). Этот факт можно объяснить, учитывая совокупность биохимических данных о гамма-тубулиновых затравках для полимеризации микротрубочек. Считается, что на centrosоме аккумулируются так называемые большие (2200 кДа) комплексы гамма-тубулина (Meads, Schroer, 1995), тогда как в цитоплазме нахо-

дятся в основном малые (280 кДа), менее стабильные комплексы (Moritz et al., 1998; Oegema et al., 1999). Учитывая сказанное, можно предположить, что два типа микротрубочек различаются и функционально.

Для того чтобы исследовать функции каждой из составляющих системы микротрубочек, можно использовать цитопласты — клеточные фрагменты, экспериментальным путем лишенные ядра (Prescott et al., 1972), а при определенных условиях эксперимента — и centrosомы (Karsenti et al., 1984; Rodionov et al., 1999). В последнем случае в цитопласте будут присутствовать только свободные микротрубочки.

Лишенные ядра цитопласты сохраняют как свойства, присущие целым клеткам (характерную форму клетки, пиноцитозную активность, способность к движению и синтезу белков), так и большинство компонентов цитоскелета, включая микротрубочки (Karsenti et al., 1984; Caron et al., 1985; Gorgidze, Vorobjev, 1995; Komarova et al., 2002; Brodsky et al., 2007). Именно поэтому цитопласты являются распространенной моделью как для экспериментальных эмбриологических исследований (Bowles et al., 2008; Mohammed et al., 2008), так и для практических разработок, благодаря которым оказалось возможным переносить ядра соматических клеток в энуклеированный оопласт и, таким образом, клонировать млекопитающих животных (Fulka, Fulka, 2007).

Центриоли, если они сохранились в энуклеированных цитопластах, находятся в центре цитопласты (Goldman et al., 1975), их нормальное расположение и строение centrosомы не нарушаются вследствие удаления ядра (Gorgidze, Vorobjev, 1995). Таким образом, цитопласты являются удобной и адекватной моделью для изучения свойств свободных микротрубочек в сравнении с centrosомальными микротрубочками.

В настоящем исследовании было проведено сравнение транспортных свойств микротрубочек в цитопластах, сохранивших и утративших centrosому. Показано, что в лишенных centrosомы цитопластах микротрубочки не обладают способностью к радиальной самоорганизации и транспорт вдоль них осуществляется со скоростью вдвое меньшей по сравнению с нормальными клетками и цитопластами с centrosомой.

Материал и методика

Клеточная культура. В работе использовали клетки перевивной линии VERO (фибробластоподобные клетки почки зеленой мартышки). Их культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в среде DMEM/F-12 (Sigma, США) с добавлением 3 % эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина. Для экспериментов клетки высаживали на покровные стекла и культивировали в течение 1 сут до достижения конфлюэнтного монослоя.

Получение цитопластов. Для получения клеточных фрагментов (цитопластов) покровные стекла с клетками инкубировали в среде с добавлением цитохалазина D (1 мкг/мл) и нокодазола (1 мкг/мл) в течение 1 ч, после чего стекла клетками вниз вмонтировали в капроновые вкладыши для центрифужных пробирок как описано ранее (Gorgidze, Vorobjev, 1995). Клетки центрифугировали при 8000 об/мин в течение 25 мин при 37 °C. Центрифугирование проводили в роторе JCS-13.5 на центрифуге J2-21 фирмы Beckman (США). Далее стекла перекладывали в чашки Петри и инкубировали в теплой

чистой среде 30 мин, сменив среду для удаления цитохалазина и нокодазола 3 раза (через каждые 10 мин), после чего клетки помещали в термостат (37 °C).

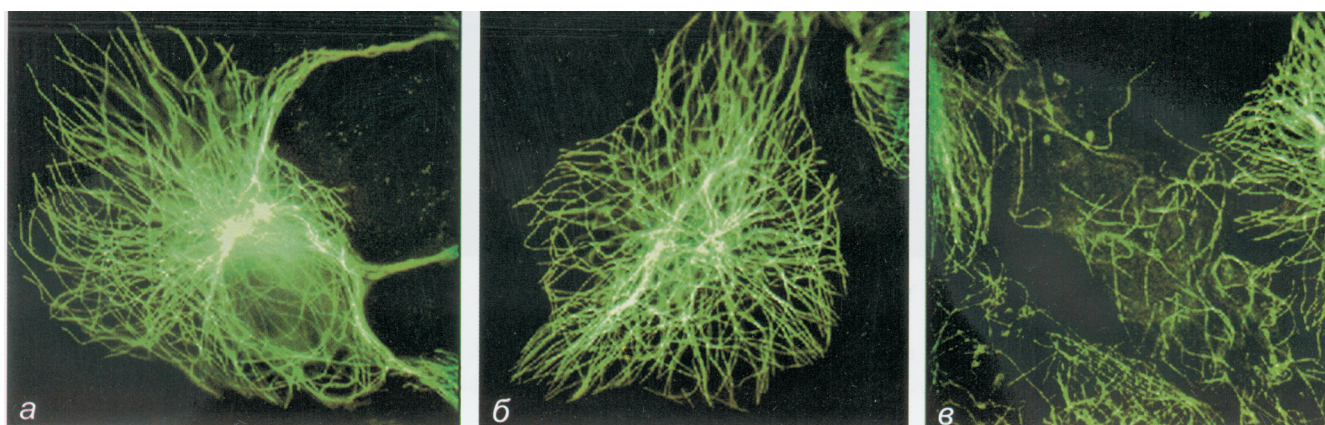
Иммунофлуоресценция. Клетки и полученные в результате центрифугирования цитопласты фиксировали на покровных стеклах 1.5%-ным раствором глутаральдегида (Merck, Германия) на физиологическом фосфатном буфере (PBS, pH 6.8) в течение 10 мин. После фиксации клетки отмывали от глутаральдегида трехкратной сменой буфера PBS (по 10 мин каждая смена). Фиксированные клетки обрабатывали 1%-ным раствором Triton X-100 (Sigma, США) на PBS в течение 1.5 ч. Далее клетки обрабатывали 2%-ным раствором NaBH₄ (Sigma, США) на буфере PBS (4 смены по 10 мин) и отмывали путем трехкратной смены буфера PBS (по 10 мин каждая смена). Для окраски микротрубочек препараты инкубировали с антителами к β -тубулину на стеклах, заливая края лаком для предотвращения высыхания заливочной смеси (Amersham, США) (разведение 1 : 100) в течение 30 мин при 37 °C, после чего избыток антител отмывали трехкратной сменой буфера PBS (по 10 мин каждая смена). В качестве вторых антител использовали меченные флуорохромом антитела Oregon green (Molecular Probes, США), после чего избыток антител отмывали трехкратной сменой буфера PBS (по 10 мин каждая смена). Препараты заключали в 2.5%-ный раствор 1,4-диазобицикло-[2,2,2]-октана (DAVCO) в глицерине. Клетки инкубировали со вторыми антителами в разведении 1 : 100 в течение 30 мин при 37 °C в глицерине. Препараты монтировали на предметных стеклах.

Интенсивности флуоресценции микротрубочек в цитоплазме не лишенных ядра клеток и цитопластов измеряли, как описано ранее (Смурова и др., 2002; Чернобельская и др., 2004).

Для прижизненных наблюдений использовали камеры на основе 35-миллиметровых чашек Петри, как описано ранее (Чернобельская и др., 2001). Клетки и цитопласты наблюдали в фазовом контрасте на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TE-200. Для уменьшения фотоповреждения клеток использовали оранжевый светофильтр (OC-4). Во время наблюдений температуру чашки с клетками и цитопластами поддерживали на уровне 35—37 °C за счет нагрева объектива и держателя для камеры.

Видеомикроскопия. Исследование препаратов и анализ полученных изображений проводили на микроскопе Nikon Eclipse TE200 с помощью объектива PlanFluor 100 \times , 1.3 NA. Изображения записывали с помощью охлаждаемой CCD-камеры RTE/CCD-1317K/2, управляемой программой WinView32 (Princeton Instruments Inc., США). Последовательные оптические срезы получали ручным перемещением столика микроскопа на половину—треть деления микровинта, т. е. приблизительно на 0.7—1.0 мкм по вертикальной оси. Анализ изображений проводили в программе Adobe Photoshop (Adobe Inc., США).

Измерение длин микротрубочек в цитоплазме клетки. Чтобы измерить длину микротрубочек, использовали методику псевдотрехмерной реконструкции клетки по оптическим микроскопическим срезам. Для получения трехмерной реконструкции с помощью программы Adobe Photoshop анализировали полный ряд последовательных изображений каждой исследуемой клетки от ее базальной части до апикальной. Отмечали все микротрубочки, лежащие в пределах отдельного оптического среза, и совмещали концы микротрубочек, располагающихся в объеме более чем одного среза, переходящие, таким образом, на один или два соседних среза.



5 мкм

Рис. 1. Иммунофлуоресцентные микрофотографии системы микротрубочек в интерфазных клетках VERO (а) и в полученных из них цитопластах (б, в).

б — цитопласты, содержащие centrosому; в — цитопласты, лишенные centrosомы.

Длину и количество микротрубочек на полученных реконструкциях измеряли в программе Scion Image (Scion Corporation, США).

Анализ салътаторных движений гранул в живых клетках. Движение гранул в клетках и цитопластах регистрировали в тонком участке цитоплазмы, ламелле, как описано ранее (Чернобельская и др., 2001). Анализ треков салътаторных движений гранул проводили по группам следующим образом: 1) треки, расположенные по отношению к радиусу клетки под углом, попадающим в интервал $0^\circ < A < 45^\circ$, и направленные в сторону ядра, учитывали как идущие к центру; 2) треки, попадающие в интервал $135^\circ < A < 180^\circ$, как идущие на периферию клетки; 3) треки, которые попадали в интервал $45^\circ < A < 135^\circ$, считали неупорядоченными. Треки, вошедшие в группы 1 и 2, считали радиальными, а треки, вошедшие в группу 3 — тангенциальными.

Результаты

После центрифугирования исследуемого препарата приблизительно две трети клеток оказывались лишенными ядра. Большая часть таких безъядерных фрагментов клеток — цитопластов — содержит centrosому (78 %), а меньшая (22 %) ее лишена. Поскольку после центрифугирования на стекле оставались клетки, сохранившие ядро,

они могли служить контролем для определения влияния метода энуклеации на структуру сети микротрубочек. Сравнение показало, что сеть микротрубочек в содержащих ядро клетках через 4 ч после центрифугирования не отличается от культуральных клеток в норме. Поэтому в качестве контроля к экспериментам с цитопластами рассматривали неэнуклеированные клетки с того же экспериментального стекла.

Морфология цитопластов. Цитопласты, содержащие centrosому, по форме и общей морфологии схожи с нормальными, содержащими ядра клетками (рис. 1, а, б). Часто встречаются хорошо распластанные цитопласты округлой или поляризованной формы, соотношение их средних длины и ширины в обоих случаях равно 1.7. Площадь цитопластов с centrosомой на треть меньше, чем у нативных клеток (табл. 1). Цитопласты, лишенные centrosомы, имеют значительно меньшую площадь (табл. 1) и отличаются по форме от клеток, сохранивших ядра, и цитопластов с centrosомой (рис. 1, в). В отсутствие centrosомы цитопласты, как правило, более вытянуты, но не поляризованы, у них неровная ламелла, часто с тонкими выростами. Степень изрезанности края и наличие значительных выростов у цитопластов, лишенных centrosомы, иллюстрируются соотношением периметр—площадь. Это соотношение у целых клеток и содержащих centrosому цитопластов вдвое ниже, чем у цитопластов, лишенных centrosомы (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Изменение геометрических параметров цитопластов, полученных из клеток VERO

Измеряемый параметр	Целые клетки (n = 10)	Цитопласты с centrosомой (n = 10)	Цитопласты без centrosомы (n = 10)
Периметр P	100 %	86 %	79 %
Площадь S	100 %	69 %	34 %
Отношение P/S	0.0067	0.0084	0.0150
Средняя длина, мкм	62.88 ± 10.06	56.39 ± 12.62	43.92 ± 14.23
Максимальная длина, мкм	94.56	76.95	71.62
Средняя ширина, мкм	36.12 ± 12.95	33.12 ± 12.49	20.69 ± 9.49
Минимальная ширина, мкм	20.07	19.73	8.13

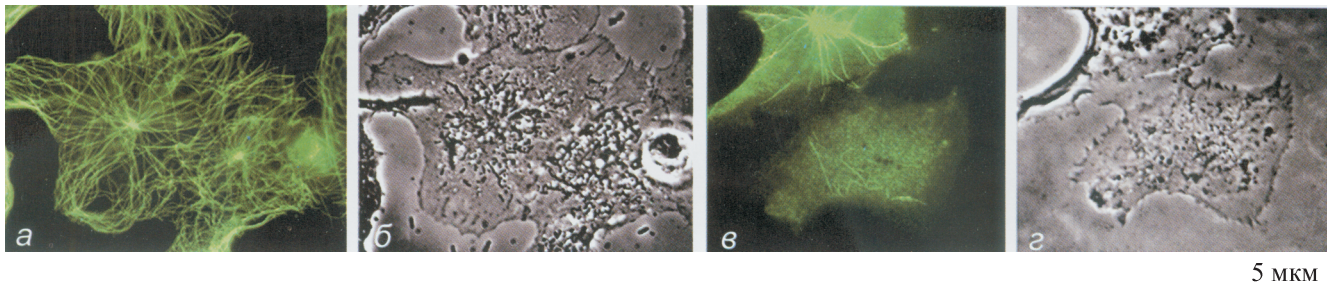


Рис. 2. Морфология цитопластов, содержащих centrosому (а, б) и лишенных ее (в, з).
а, в — иммунофлуоресцентные микрофотографии; б, з — фазовый контраст.

Общая морфология цитоплазмы в целом также различается. Если у цитопластов с centrosомой расположение органоидов соответствует нативной клетке (митохондрии и гранулы собраны в центре клетки, в районе, где ранее располагалось ядро) и хорошо различим клеточный «дворик» (область, где располагается centrosома) (рис. 2, а, б), то в цитопластах, лишенных centrosомы, митохондрии и гранулы беспорядочно разбросаны по всему объему цитоплазмы (рис. 2, в, з). Таким образом, отсутствие радиально организованной системы микротрубочек в цитопластах, лишенных centrosомы, приводит к изменению формы клетки и нарушению внутренней архитектуры цитоплазмы.

Влияние процесса центрифугирования на систему микротрубочек. Чтобы проанализировать, каким образом процесс центрифугирования влияет на оба компонента системы микротрубочек, применялся метод анализа системы микротрубочек, предложенный ранее (Смурова и др., 2002, 2007). Была измерена интенсивность флуоресценции микротрубочек в нативных клетках до центрифугирования и через 4 ч после него вдоль радиуса, проведенного от centrosомы к краю клетки или цитопласта. Графики, отражающие изменение этого параметра в клетках до центрифугирования и через 4 ч после него, не различаются; интенсивность флуоресценции убывает практически линейно от centrosомы к краю клетки (рис. 3, а, б). Линейный характер убывания графика интенсивности флуоресценции микротрубочек ($P = 0.99$) показывает, что в цитоплазме клеток помимо радиально расходящихся centrosомальных микротрубочек присутствуют и не закрепленные на centrosоме, сво-

бодные микротрубочки, количество которых убывает по мере удаления от центра. Основываясь на одинаковом характере графиков, можно заключить, что процедура центрифугирования не повлияла на сеть микротрубочек.

Система микротрубочек в цитопластах, содержащих centrosому. В цитопластах наблюдалась радиальная система слегка изогнутых микротрубочек, имеющая в центре схождения centrosому (рис. 1, б). Микротрубочки тянулись от центра клетки к ее краю, достигнув которого, по-видимому, в большинстве прекращали свой рост (загибающиеся и растущие на значительное расстояние вдоль края клетки микротрубочки были единичными). На периферии цитопласта, как и в целых клетках, можно было видеть отдельные свободные микротрубочки.

В содержащих centrosому цитопластах сеть микротрубочек нередко была достаточно плотной, и поэтому было невозможно подсчитать их среднее количество. Однако мы смогли оценить его, используя для подсчетов часть цитопластов с относительно разреженной сетью микротрубочек. В таких цитопластах в среднем наблюдалось 187.0 ± 10.1 микротрубочек, и эта цифра отражает нижнюю границу возможного количества микротрубочек. Таким образом, можно говорить, что в цитопластах с centrosомой наблюдалось в среднем не менее 200 микротрубочек. Интенсивность флуоресценции микротрубочек в содержащих centrosому цитопластах падала по мере удаления от centrosомы к краю клетки линейно, как и в клетках, сохранивших ядра (рис. 3, в). Таким образом, удаление ядра не вызывает заметных изменений в расположении как centrosомальных, так и свободных микротрубочек.

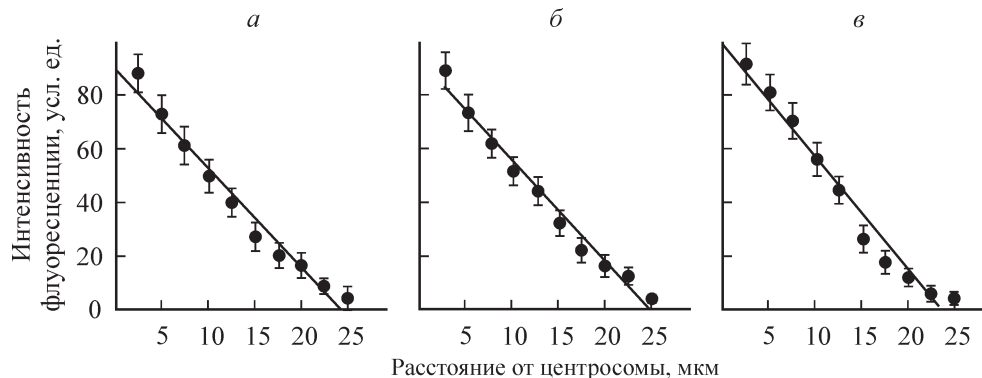


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции микротрубочек в клетках, содержащих ядра (а, б), и в цитопластах, содержащих centrosому (в).

а — интенсивность флуоресценции до центрифугирования, б — после центрифугирования. В процессе центрифугирования общая архитектура сети микротрубочек не претерпевает видимых изменений. Плотность расположения микротрубочек, измеренная по интенсивности флуоресценции, в клетках, сохранивших ядра, и в цитопластах с centrosомой аппроксимируется линейной регрессией.

Таблица 2

Анализ сальтаторных движений гранул в клетках, сохранивших ядра, и в цитопластах

Объект исследования	Среднее количество сальтаторных движений, $x \pm SD$	Скорость сальтаторных движений, $\mu\text{м}/\text{с}$, $x \pm SD$	Длина треков сальтаторных движений, $\mu\text{м}$, $x \pm SD$
Клетки, сохранившие ядро ($n = 5$)	66.79 ± 18.47	2.44 ± 0.71	5.6 ± 2.2
Цитопласты, содержащие centrosому ($n = 5$)	49.25 ± 12.54	2.19 ± 0.59	6.1 ± 1.6
Цитопласты без centrosомы ($n = 5$)	22.59 ± 8.39	0.84 ± 0.50	2.9 ± 0.7

Система микротрубочек в цитопластах, не содержащих centrosомы. Система микротрубочек в лишенных centrosомы цитопластах резко отличалась от описанной выше для контрольных клеток и цитопластов с centrosомой. В отсутствие centrosомы свободных фокусов схождения микротрубочек в цитоплазме не наблюдалось. В цитопластах, лишенных centrosомы, все микротрубочки были свободными, они хаотически распределялись по всему объему цитоплазмы, и радиально ориентированных микротрубочек не наблюдалось. Индивидуальные микротрубочки сильно различались по длине и степени изогнутости, наряду с длинными слабо извитыми микротрубочками, составляющими большинство, встречались короткие, сильно закрученные микротрубочки (рис. 1, в). Среднее количество микротрубочек в цитопластах без centrosомы составило 23.0 ± 8.7 (от 5 до 34 микротрубочек на цитопласт), что значительно меньше, чем в неэнуклеированных клетках, и почти в 10 раз меньше, чем в цитопластах с centrosомой (Чернобильская и др., 2004). Средняя длина микротрубочек составила $11.0 \pm 5.2 \mu\text{м}$ (от 3.7 до 21.2 $\mu\text{м}$), что превышает среднюю длину свободных микротрубочек в нативных клетках (Чернобильская и др., 2001).

Анализ траекторий сальтаторных движений гранул в клетках и цитопластах, содержащих центриоль и лишенных центриоли. Известно, что в ламелле поляризованных на краю раны фибробластов наблюдается сальтаторное движение цитоплазматических гранул, которое происходит по микротрубочкам (Freed, Lebowitz, 1970). Анализ треков движений гранул проводили в клетках, сохранивших ядра, цитопластах с centrosомой и без нее, находясь на одном стекле, через 4 ч после энуклеации. Треки движений анализировали в течение 180 с, причем учитывали все треки, наблюдаемые за это время (табл. 2). Как по-

казали предварительные наблюдения, все смещения органелл на расстояния свыше 1 $\mu\text{м}$ происходили скачкообразно, т. е. их можно определить как сальтаторные. Траектории сальтаторных движений гранул представляли собой прямые или слегка изогнутые линии (рис. 4, а—г).

Около 3 % треков были зигзагообразными — в этом случае гранула, не останавливаясь, меняла первоначальное направление своего движения на угол, близкий к 90° . Еще реже встречались такие треки, когда гранула меняла направление своего движения на противоположное. Среднее количество треков сальтаторных движений гранул в клетках, сохранивших ядра, было равно 66.79 ± 18.47 за время наблюдения (180 с). В цитопластах, содержащих centrosому, количество сальтаторных движений было несколько меньшим, а в цитопластах, лишенных centrosомы, количество снижалось в 3 раза по сравнению с целыми клетками (табл. 2). Тем не менее в пересчете на одну микротрубочку количество треков сальтаторных движений было значительно больше в цитопластах, лишенных centrosомы: полученные значения различаются в 4 раза (0.26 для цитопластов с centrosомой и 0.98 для цитопластов без centrosомы). Средняя длина треков сальтаторных движений гранул в клетках, сохранивших ядра, и в содержащих centrosому цитопластах практически не различалась и составила 5.6 ± 2.2 и $6.1 \pm 1.6 \mu\text{м}$ соответственно, что соответствует длинам треков, полученным для клеток VERO ранее (Сперанская и др., 1995; Григорьев и др., 1997). В то же время в цитопластах без centrosомы средняя длина треков была в 2 раза меньше, чем в цитопластах, содержащих centrosому. Измеренные скорости сальтаторных движений в клетках, сохранивших ядра, и цитопластах с centrosомой совпадают со скоростями сальтаторных движений гранул, измеренных в других клетках (Alien et al., 1982; Gilbert, Sloboda, 1984; Григорьев

5 $\mu\text{м}$

Рис. 4. Сальтаторные движения гранул в клетках VERO.

а — фазовый контраст; б — прорисовка треков сальтаторных движений гранул; в — иммунофлуоресцентная микрофотография микротрубочек, окрашенных антителами к β -тубулину; г — наложение треков сальтаторных движений гранул и микротрубочек.

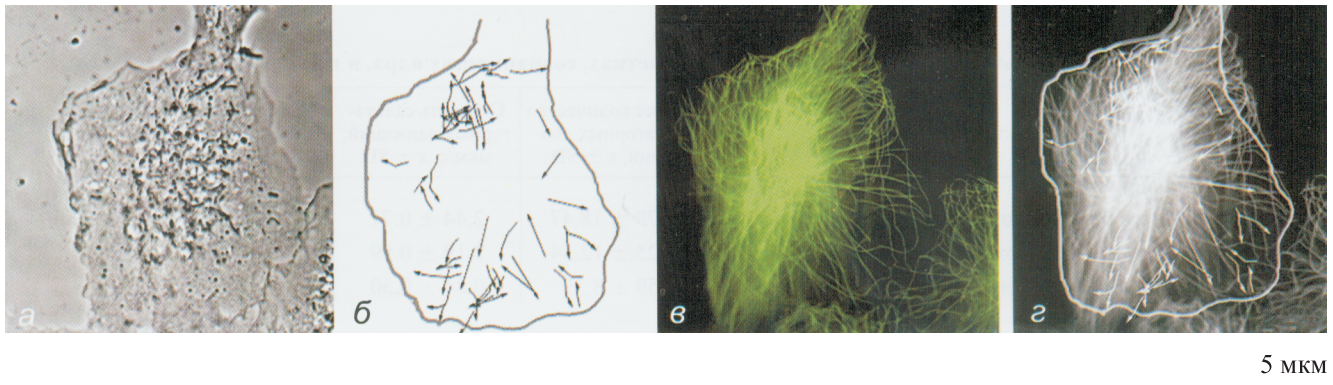


Рис. 5. Сальтаторные движения гранул в цитопластах, содержащих centrosому.

a — фазовый контраст; *b* — прорисовка треков сальтаторных движений; *v* — иммунофлуоресцентная микрофотография микротрубочек, окрашенных антителами к β -тубулину; *z* — наложение треков сальтаторных движений гранул и микротрубочек.

ев и др., 1997), а также со скоростями передвижения моторов вдоль микротрубочек (Vale et al., 1992). В цитопластах без centrosомы скорость сальтаторных движений гранул вдоль микротрубочек была в 2.5 раза ниже.

Прорисовки треков сальтаторных движений гранул, суммированные за все время наблюдения в клетке, и в содержащем centrosому цитопласте представлены на рис. 4, *a—z* и рис. 5, *a—z*. В клетках, сохранивших ядра, и цитопластах, содержащих centrosому, треки сальтаторных движений гранул проходят преимущественно по радиальным линиям, группируясь на периферии клетки. При этом треки сальтаторных движений гранул в отсутствие centrosомы располагались беспорядочно — нельзя было выделить преимущественную ориентацию линий сальтаторных движений и основные движения происходили в центральном районе цитоплазмы (рис. 6, *a—z*).

Анализ упорядоченности треков гранул показал, что на долю тангенциальных перемещений в сохранивших ядра клетках приходится 32.47 % от общего числа треков, а в цитопластах, содержащих centrosому, — 29.46 % треков. В цитопластах без centrosомы доля тангенциальных движений гранул была больше и составляла 58.49 % от общего числа треков, что, с одной стороны, объяснимо, если учесть неупорядоченность существующей системы свободных микротрубочек, а с другой — свидетельствует о том, что преимущественного направления сальтации по свободным микротрубочкам не существует. Таким образом, данные сравнительного анализа движения цитоплазматических гранул по микротрубочкам позволяют заключить, что centrosомальные микротрубочки обеспечивают более продолжительное и более упорядоченное движение гранул.

Обсуждение

Для изучения различий в свойствах связанных с centrosомой и свободных микротрубочек, выбрана модельная система — цитопласты, неоднократно использованная для исследования не зависящих от ядра свойств centrosомы. В энуклеированных клеточных фрагментах присутствует радиальная сеть микротрубочек, схожая с системой микротрубочек в интактных клетках, а в цитопластах, лишенных centrosомы, присутствуют отдельные, беспорядочно расположенные микротрубочки (Karsenti et al., 1984; Rodionov et al., 1999; Komarova et al., 2002). В процессе восстановления динамика роста количества связанных с centrosомой микротрубочек, а также их длины в цитопластах лишь незначительно отстает от целых клеток (Чернобельская и др., 2004).

Существенные различия между целыми клетками и цитопластами без centrosомы состоит в различиях динамических свойств микротрубочек. В лишенных centrosом цитопластах, полученных из фибробластов, для микротрубочек характерен тредмиллинг, т. е. почти непрерывный рост с плюс-конца и укорочение с минус-конца (Rodionov et al., 1999, 2001). Следует отметить, что тредмиллинг происходит лишь в лишенных centrosом цитопластах, полученных и фибробластов. Поведение микротрубочек в бесcentросомальных цитопластах, полученных из эпителиальных клеток, представляет собой обычную динамическую нестабильность — осцилляции плюс-концов при стабильных минус-концах. При этом общее количество микротрубочек в цитопластах, полученных из эпителиальных клеток, было значительно

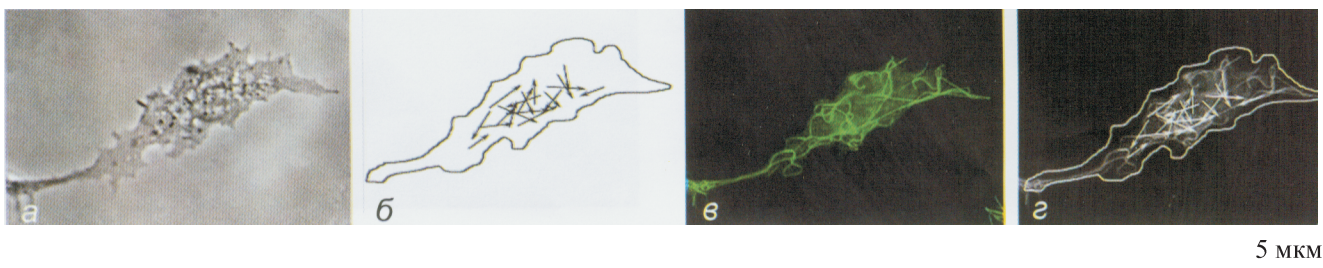


Рис. 6. Сальтаторные движения гранул в цитопластах, лишенных centrosомы.

a — фазовый контраст; *b* — прорисовка треков сальтаторных движений гранул; *v* — иммунофлуоресцентная микрофотография микротрубочек в той же клетке, окрашенных антителами к β -тубулину; *z* — наложение треков сальтаторных движений гранул и микротрубочек.

больше, чем в цитопластах, полученных из фибробластов (Rodionov et al., 1999). Авторы предполагают, что в цитоплазме эпителиальных клеток и полученных из них цитопластов присутствует некий фактор, стабилизирующий минус-концы микротрубочек. В цитоплазме фибробластов и полученных из них цитопластов такой фактор отсутствует, вероятно полностью локализуясь на центросоме (Rodionov et al., 1999). Небольшое число микротрубочек в лишенных центросомы цитопластах клеток VERO в наших экспериментах позволяет предположить, что в них также происходил тремиллинг и минус-концы микротрубочек были нестабильными. Очевидно, что измененная динамика микротрубочек (если она имеет место в лишенных центросомы цитопластах) должна влиять на те внутриклеточные процессы, в которых принимают участие микротрубочки: в первую очередь на поддержание формы клетки и транспортные процессы.

Роль центросомальных и свободных микротрубочек в поддержании формы клетки и организации ламеллы. Микротрубочки, направляя внутриклеточный транспорт, участвуют в поддержании полярности клетки (Rodionov et al., 1993; Wacker et al., 1997) и в поляризации и движении различных клеток (Vasiliev et al., 1970; Goldman, 1971; Koonce et al., 1984; Schliwa, 1984). При деполимеризации микротрубочек, вызванной воздействием различных митостатиков, фибробласт теряет поляризованную форму (Vasiliev et al., 1970; Goldman, 1971). Считается, что полярность фибробласта задается либо взаимодействием динамичных плюс-концов микротрубочек с актиновыми филаментами, ассоциированными с клеточным кортексом (Tanaka, Sabry, 1995; Goode et al., 2000; Gundersen, 2002; Small et al., 2002; Rodriguez et al., 2003; Bershadsky et al., 2006), либо клеточными контактами (Kaverina et al., 1998, 1999, 2002; Small, Kaverina, 2003), либо клеточным кортексом (Mimori-Kiyosue et al., 2005; Brodsky et al., 2007). В фибробластах организованная сеть микротрубочек представляет собой радиальную систему, за поддержание которой, по-видимому, ответственна центросома. При повреждении центросомы фибробласты теряют способность выдвигать ламеллу, и в них дезорганизуются салътаторные движения (Григорьев и др., 1996; Maly, Vorobjev, 2002). Аналогично повреждение центросомы приводит к нарушению направленного движения эозинофилов (Koonce et al., 1984) и нейтрофилов (Узбеков и др., 1989).

Согласно нашим данным и данным других исследователей (Rodionov et al., 1999; Brodsky et al., 2007), в лишенных центросомы цитопластах количество микротрубочек на порядок ниже, чем в цитопластах с центросомой. Поскольку в цитопластах без центросом треки салътаторных движений гранул группируются в центральной части клетки, это приводит к резкому снижению транспорта вдоль микротрубочек в краевых участках цитопласта. Возможно также, что при столь значительном снижении количества микротрубочек не важно, как они направлены и каким образом организованы в объеме клетки, а решающим фактором оказывается их дефицит. Как показали визуальные наблюдения и измерения параметров клетки, цитопласты, лишенные центросомы, теряя полярность, приобретают извилистые, нехарактерные для фибробластов очертания и не формируют ламеллу. По-видимому, резкое снижение количества динамичных концов микротрубочек, контролирующих реорганизацию актинового цитоскелета и фокальных контактов, делает невозможным стабильное выделение клеточного края и их поляризацию.

Участие центросомальных и свободных микротрубочек в организации салътаторных движений. В данной работе мы анализировали салътаторные движения гранул для оценки участия свободных микротрубочек во внутриклеточном транспорте. Соответствие движений гранул расположению микротрубочек было показано ранее (Freed, Lebowitz, 1970; Murphy, Tilney, 1974; Herman, Albertini, 1984; Bridgeman et al., 1986; Morris, Hollenbeck, 1997; Сперанская и др., 1995). При деполимеризации сети микротрубочек салътаторные движения гранул прекращаются (Григорьев и др., 1999). Проведенный нами анализ показал, что при наличии радиальной сети микротрубочек салътаторные движения носят преимущественно радиальный характер. В отсутствие центросомы, при наличии дезорганизованной системы микротрубочек, гранулы двигаются хаотично, поэтому тангенциальные и радиальные перемещения становятся равновероятными. Аналогичный эффект дезорганизации салътаторных движений был показан при подавлении динамической нестабильности микротрубочек при воздействии митостатиков в наномолярных концентрациях (Григорьев и др., 1999), а также после инактивации центросомы с помощью лазерного облучения (Maly, Vorobjev, 2002).

Поскольку в пересчете на одну микротрубочку количество треков салътаторных движений в бесцентриолярных цитопластах вчетверо превышает количество треков в цитопластах с центросомой и составляет 0,98, можно предположить, что таким образом цитопластом осуществляется компенсаторная реакция — гранулы движутся практически по каждой существующей микротрубочке. С другой стороны, скорость движения гранул и длина треков в бесцентриолярных цитопластах вдвое ниже, что может свидетельствовать о нарушении функционирования осуществляющих транспорт моторных белков. Поскольку процессивность мотора определяется вероятностью отсоединения мотора от микротрубочки, существует среднее время «удерживания» мотора на микротрубочке. И если мотор движется медленнее (в цитопластах без центросомы), вероятность того, что он потеряет связь с микротрубочкой на коротком отрезке, повышается, и как следствие треки салътаторных движений становятся короче. Таким образом, возможно, что в лишенных центросомы цитопластах моторные белки — кинезин и динеин — сохраняют ограниченную процессивность, и длину треков может лимитировать среднее время связи моторного белка с микротрубочкой.

Относительно большое количество салътаторных движений гранул в цитопластах, лишенных центросомы, позволяет предположить, что часть салътаторных движений и в нативных клетках может происходить по микротрубочкам, не связанным с центросомой. Полученные результаты указывают на то, что транспорт по свободным микротрубочкам может быть организован иначе, чем по радиальным микротрубочкам. Значительно различаются описывающие его количественные характеристики: длина треков салътаторных движений и скорость движения гранул по центросомальным микротрубочкам. Они более чем в 2 раза превышают длину треков и скорость салътаторных движений гранул по свободным микротрубочкам в цитопластах, лишенных центросомы. Таким образом, мы полагаем, что транспорт цитоплазматических гранул по свободным микротрубочкам менее эффективен, чем по микротрубочкам, связанным с центросомой.

Авторы благодарят проф. Н. Б. Гусева (биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова) за предоставление термостатируемой центрифуги.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01350, 06-04-49233 и 09-04-00363).

Список литературы

- Алиева И. Б., Бориси Г. Г., Воробьев И. А. 2008. Пространственная организация связанных с centrosомой и свободных микротрубочек в цитоплазме фибробластов 3Т3. Цитология. 50 (11): 936—946.
- Алиева И. Б., Воробьев И. А., Ченцов Ю. С. 1989. Стереотаксический анализ расположения микротрубочек вокруг centrosомы в клетках культуры тканей. ДАН СССР. 305 (5): 1232—1234.
- Григорьев И. С., Чернобельская А. И., Воробьев И. А. 1997. Количественный анализ движений в поляризованных фибробластах. Биол. мембр. 14 (2): 160—173.
- Григорьев И. С., Чернобельская А. А., Воробьев И. А. 1999. Влияние наномолярных концентраций нокадазола, винбластина и таксола на движение фибробластов и на салтаторные движения органелл. Биол. мембр. 16 (1): 21—41.
- Смурова К. М., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2002. Динамика восстановления цитоплазматических микротрубочек после их разрушения нокадазолом в клетках культуры VERO. Биол. мембр. 19 (6): 472—482.
- 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.
- Сперанская С. Р., Вотчал М. С., Воробьев И. А. 1995. Салтаторные движения цитоплазматических гранул в клетках культуры ESK. Цитология. 37 (8): 783—790.
- Узбеков Р. Э., Воробьев И. А., Драчев В. А. 1989. Влияние лазерного микроблучения клеточного центра на подвижность нейтрофилов. Цитология. 31 (8): 874—881.
- 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.
- Чернобельская О. А., Григорьев И. С., Алиева И. Б., Воробьев И. А. 2001. Анализ различных методических подходов к измерению длины микротрубочек в цитоплазму культивируемых клеток. Онтогенез. 32 (1): 58—66.
- Alien R. D., Metural J., Tosaki I., Brady S. T., Gilbert S. P. 1982. Fast axonal transport in squid giant axon. Science. 218: 1127—1129.
- Alieva I. B., Nadezhdina E. S., Vaisberg E. A., Vorobjev I. A. 1992. Microtubule and intermediate filament patterns around the centrosome in interphase cells. In: V. C. Kalnins. (Ed.). The centrosome. Acad. Press. 103—129.
- Bershadsky A. D., Ballestrem C., Carramusa L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A. Y., Verkhovskiy A. B., Shemesh T., Kozlov M. M. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. Eur. J. Cell Biol. 85: 165—173.
- Bowles E. J., Tecirlioglu R. T., French A. J., Holland M. K., St John J. C. 2008. Mitochondrial DNA transmission and transcription after somatic cell fusion to one or more cytoplasts. Stem Cells. 26: 775—782.
- Bridgeman P. C., Kacher B., Reese T. S. 1986. The structure of cytoplasm in directly frozen cultured cell. 2. Cytoplasmic domains associated with organelle movement. J. Cell Biol. 102: 1510—1521.
- Brinkley B. R., Wible L. J., Asch B. B., Medina D., Mace M. M., Beall P. T., Cailleau R. M. 1980. The microtubule cytoskeleton in normal and transformed cells *in vitro*. Results Probl. Cell Differ. 11: 132—138.
- 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.
- Caron J. M., Jones A. L., Rall L. B., Kirschner M. W. 1985. Autoregulation of tubulin synthesis in enucleated cell. Nature. 317: 648—651.
- 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., Khodkakov A., Akhmanova A., Kaverina I. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. Develop. Cell. 12: 917—930.
- Freed J. J., Lebowitz M. M. 1970. The association of a class of saltatory movements with microtubules in cultured cells. J. Cell Biol. 45: 334—354.
- Fulka J., Jr., Fulka H. 2007. Somatic cell nuclear transfer (SCHT) in mammals: the cytoplasm and its reprogramming activities. Adv. Exp. Med. Biol. 591: 93—102.
- Gilbert S. P., Sloboda R. D. 1984. Bidirectional transport of fluorescently labeled vesicles introduced into extruded axoplasm of squid *Loligo pealei*. J. Cell Biol. 99: 445—452.
- Goldman R. D. 1971. The role of free cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. Microtubules and effects of colchicine. J. Cell Biol. 51: 752—762.
- Goldman R. D., Pollak R., Chang C. M., Bushnell R. 1975. Properties of enucleated cells. Changes in cytoplasmic architecture of enucleated BHK cells following trypsinization and replating. Exp. Cell Res. 93: 175—183.
- Goode B. L., Drubin D. G., Barnes G. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. Curr. Opin. Cell Biol. 12: 63—71.
- Gorgidze L. A., Vorobjev I. A. 1995. Centrosome and microtubules behavior in the cytoplasts. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 27: 381—389.
- Gundersen G. G. 2002. Microtubule capture: IQGAP and CLIP-170 expand the repertoire. Curr. Biol. 12: 645—647.
- Herman B., Albertini D. F. 1984. A time-lapse video image intensification analysis of cytoplasmic organelle movements during endosome translocation. J. Cell Biol. 98: 565—576.
- 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 centrosome. 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., Krylyshkina O., Small J. V. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34: 746—761.
- 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.
- 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.
- Koonce M. P., Clonely R., Berns M. W. 1984. Laser irradiation of centrosome in newt eosinophils: evidence of centriole role in motility. J. Cell Biol. 98: 1999—2010.
- Luders J., Stearns T. 2007. Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8: 161—167.
- Maly I. V., Vorobjev I. A. 2002. Centrosome-dependent anisotropic random walk of cytoplasmic vesicles. Cell Biol. Intern. 9: 791—799.
- Meads T., Schroer T. A. 1995. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. Cell Motil. Cytoskeleton. 32: 273—288.
- Mimori-Kiyosue Y., Grigoriev I., Lansbergen G., Sasaki H., Matsui C., Severin F., Galjart N., Grosveld F., Vorobjev I., Tsukit 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., Tucker J. B. 1990. Taxol influences control of protofilament number at microtubule-nucleating sites in *Drosophila*. J. Cell Sci. 97: 101—107.

- Mohammed A. A., Karasiewicz J., Modliński J. A. 2008. Developmental potential of selectively enucleated immature mouse oocytes upon nuclear transfer. *Mol. Reprod. Develop.* 75 : 1269—1280.
- 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.
- Morris R., Hollenbeck P. 1997. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J. Cell Sci.* 104 : 917—927.
- 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.
- Murphy D., Tilney L. 1974. The role of microtubules in the movement of pigment granules in the teleost melanophores. *J. Cell Biol.* 61 : 757—779.
- 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.
- Prescott D. M., Myerson D., Wallance J. 1972. Enucleation of mammalian cells with cytochalasin B. *Exp. Cell Res.* 71 : 480—485.
- Rodionov V. I., Gyoeva F. K., Tanaka E., Bershadsky A. D., Vasiliev J. M., Gelfand V. I. 1993. Microtubule-dependent control of cell shape and pseudopodial activity is inhibited by the antibody to kinesin motor domain. *J. Cell Biol.* 123 : 1811—1820.
- Rodionov V. I., Nadezhdina E., Borisy G. 1999. Centrosomal control of microtubule dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 115—120.
- Rodionov V. I., Nadezhdina E., Peloquin J., Borisy G. 2001. Digital fluorescence microscopy of cell cytoplasm with and without the centrosome. *Methods Cell Biol.* 67 : 43—51.
- 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.
- Schliwa M. 1984. Mechanism of intracellular organelle transport. *Cell Muscle Motil.* 5 : 1—82.
- 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.
- Small J. V., Kaverina I. 2003. Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 40—47.
- Tanaka E., Sabry J. 1995. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell.* 83 : 171—176.
- Vale R. D., Malik F., Brown D. 1992. Directional instability of microtubule transport in the presence of kinesin and dynein, two opposite polarity motor proteins. *J. Cell Biol.* 119 : 1589—1596.
- Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Domnina L. V., Ivanova O. Y., Komm S. C., Olsheschkaja L. V. 1970. Effects of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 24 : 625—640.
- Vorobjev I. A., Svitkina T. M., Borisy G. G. 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J. Cell Sci.* 110 : 2635—2645.
- Wacker I., Kaether C., Kromer A., Migala A., Almers W., Gerdes H. H. 1997. Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualised in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J. Cell Sci.* 110 : 1453—1463.
- 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 treadmill. *J. Cell Biol.* 139 : 417—434.

Поступила 13 X 2008

RADIAL-ORGANIZED MICROTUBULES PROVIDE MAINTENANCE OF THE CELL SHAPE
AND MORE EFFECTIVE INTERCELLULAR TRANSPORT THAN
IN THE CASE OF FREE MICROTUBULES

O. A. Chernobelskaya, I. B. Alieva, I. A. Vorobjev

A. N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Moscow State University;
e-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru

Microtubules take part in very different cell processes including cell polarization and migration, intercellular transport and some others. Therefore the microtubules spatial organization is crucial for normal cell behaviour. Fibroblasts have radial microtubule array consisting of microtubules running from the centrosome. This microtubule array includes two components: 1) centrosomal microtubules with their minus ends attached to the centrosome and with their plus ends radiating to the cell periphery and 2) free microtubules with the ends non-attached to the centrosome. Distinction in the dynamic properties, intercellular organization and structure of centrosome-attached and free microtubules allow us to assume that their functions in the cell are also different. In order to investigate centrosome-attached and free microtubules functions we used the cytoplasm — experimentally denucleated cellular fragments and under certain condition lacking of the centrosome as well — which contain only free microtubules. Centrosome-containing cytoplasm do not differ significantly in the form, general morphology and the size from the intact cells. At the same time centrosome-lacking cytoplasm keep extremely thinned out network of microtubules located in the central area of the cytoplasm. These cytoplasm lose the original cell shape usual for fibroblasts and get rough, with protrusions, lamella; the internal architecture of the cytoplasm and organoids arrangement is also broken. Saltatory movements in the centrosome-containing cytoplasm are similar to those in the intact cells, and saltatory movements in centrosome-lacking cytoplasm show half the speed and smaller distances compared with intact cells. Besides, the saltatory movements of granules in the centrosome-lacking cytoplasm occur mainly in the central regions of the cytoplasm and they are less ordered than in the intact cells and in the cytoplasm kept the centrosome. We believe that radial organization of the microtubules provide effective transport and dynamical interactions of microtubules plus ends with cortical structures of the cell, which are sufficient for maintenance of typical fibroblast-like shape, whereas disorganized free microtubules by themselves cannot keep up the shape and intercellular organization characteristic of fibroblasts.

Key words: centrosome-attached microtubules, free microtubules, cytoplasm, saltatory movements of granules.