

УДК 576.3/.7

Новый тип биомеханического движителя

М. И. Молодцов, Е. Л. Грищук, Р. Макинтош, Ф. И. Атауллаханов

МАКСИМ ИГОРЕВИЧ МОЛОДЦОВ — научный сотрудник лаборатории физической биохимии системы крови Гематологического научного центра РАМН (ГНЦ РАМН). Область научных интересов: динамика, свойства микротрубочек и развиваемые ими силы, математическое моделирование.

ЕКАТЕРИНА ЛЕОНИДОВНА ГРИЩУК — кандидат биологических наук, сотрудник лаборатории отделения молекулярной клеточной биологии и биологии развития Университета штата Колорадо, США. Область научных интересов: механизмы деления клеток, митоз.

РИЧАРД ДЖ. МАКИНТОШ (J. R. McIntosh) — заслуженный профессор, заведующий лабораторией отделения молекулярной клеточной биологии и биологии развития Университета штата Колорадо, США. Заведующий лабораторией электронной микроскопии трехмерной структуры Национального центра США. Область научных интересов: механизмы митотического движения хромосом, структурные и биофизические подходы в клеточной биологии.

ФАЗОИЛ ИНОЯТОВИЧ АТАУЛЛАХАНОВ — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии системы крови ГНЦ РАМН, директор Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН. Область научных интересов: биохимия, биофизика, пространственная динамика биологических систем.

125167 Москва, Новозыковский пр., д. 4а, ГУ ГНЦ РАМН, тел. (495)612-55-31, E-mail fazly@hc.comcor.ru

Введение

Процесс разделения хромосом при делении клетки демонстрирует один из самых впечатляющих примеров самоорганизации живой материи, когда молекулярная машина, называемая веретеном деления клетки, самособирающаяся при каждом акте деления, уникально точно находит все хромосомы и разводит их в разные концы клетки единственно правильным образом. В последние годы был достигнут существенный прогресс в области исследования движения хромосом, а также их структуры, но молекулярные основы генерации сил в митозе продолжают оставаться неясными.

В данной статье мы представляем нашу работу по исследованию механизмов движения хромосом в митозе. С помощью разработанной нами установки удалось измерить силу, развиваемую единичной деполимеризующейся микротрубочкой — полимером, образующим веретено деления и необходимым для движения хромосом. Механизм генерации оказался уникальным, а развиваемые при этом силы велики по сравнению с силами, развиваемыми, например, молекулами моторного белка кинезина. Это позволяет предположить, что микротрубочки являются основными биомеханическими движителями хромосом в митозе.

В начале статьи кратко остановимся на основных представлениях о структуре хромосом и их динамике в период митоза.

Деление клетки, движение хромосом и развиваемые силы

Одна из важных задач, выполняемых при делении клетки (митозе), — это точное распределение генетического материала по дочерним клеткам. В клетках

эукариот эту функцию выполняет веретено деления. На стадии профазы митоза хромосомы прикрепляются к «плюс»-концам микротрубочек веретена деления посредством специальных структур, называемых кинетохорами. «Минус»-концы микротрубочек расположены на полюсах клетки, которые являются центрами их нуклеации. Со стороны кинетохорных микротрубочек на кинетохоры действуют силы, которые обуславливают как сложные перемещения хромосом на стадии прометафазы митоза, так и равномерное движение хроматид (структурные элементы хромосом) к полюсам клетки в период анафазы.

Во время движения клетки длина микротрубочки меняется — нити удлиняются при движении хромосомы от полюса клетки (полимеризация) и укорачиваются при движении к полюсу (деполимеризация микротрубочки). Показано, что полимеризация и деполимеризация происходят в месте прикрепления микротрубочки к кинетохору, т.е. на «плюс»-конце [1, 2], а химические вещества, стимулирующие деполимеризацию микротрубочек, вызывают и/или ускоряют направленные к полюсам движение хромосом. Деполимеризация микротрубочек на их «минус»-концах также вносит вклад в движение хромосом, но этот вклад невелик [3].

По химической природе микротрубочки — это полимеры, построенные из димеров белка тубулина, состоящих из α и β мономеров (рис. 1). Связанные димеры организованы в линейные протофиламенты, а несколько протофиламентов (*in vivo* — 13), взаимодействуя латерально, образуют цилиндрическую стенку микротрубочки (диаметр 25 нм).

Микротрубочки демонстрируют тип поведения, получивший название динамической нестабильности, который был открыт в 1984 г. Митчисоном и Киршнером [4]. Поведение характеризуется тем, что при

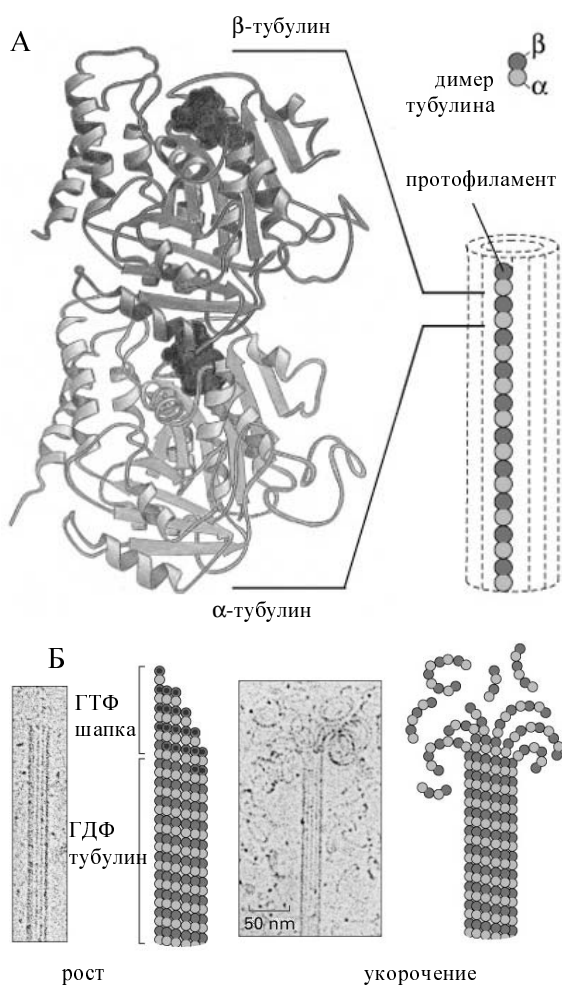


Рис. 1. Структура микротрубочки:

А — α, β -гетеродимер тубулина, составляющий протофиламенты в микротрубочке; Б — структура конца микротрубочки в фазах роста и укорочения. (ГТФ и ГДФ — соответственно гуанозинтрифосфат и гуанозиндифосфат). Рисунок взят из «Molecular Biology of the Cell». *Alberts B. e. a.*, 4th Ed. N. Y.: Garland Publishing, 2002.

полимеризации осуществляется переход тубулина между фазами медленного роста и фазами быстрого укорачивания. Такое поведение было продемонстрировано на отдельных микротрубочках с помощью методов дифференциально-интерференционного контраста (DIC микроскопии) и темного поля [5, 6].

Полимеризуется только тубулин, связанный с молекулой гуанозинтрифосфата (ГТФ) — так называемый Т-тубулин. Его сродство к концу полимерной цепи велико: полимеризация происходит даже против сжимающих микротрубочку нагрузок [7], а деполимеризуется Т-тубулин очень медленно. ГТФазная активность свободного Т-тубулина мала [8]. При полимеризации необходимые аминокислоты, входящие в α -субъединицу присоединяющегося димера, подходят к ГТФ-сайту β -мономера тубулина, находящегося на «плюс»-конце растущей цепи, значительно облегчая гидролиз связанного с ним ГТФ до гуанозиндифосфата (ГДФ) [9]. Поэтому на «плюс»-конце трубочки тубулин находится преимущественно в ГТФ-состоя-

нии, а большая часть трубочки состоит из ГДФ-тубулина, или просто Д-тубулина.

Микротрубочка, состоящая из Д-тубулина, крайне нестабильна. От разборки ее удерживает небольшой слой молекул тубулина на конце микротрубочки, еще не успевший гидролизовать ГТФ, так называемой ГТФ-шапки. Пока этот слой существует, микротрубочка продолжает расти. Потеря ГТФ-шапки приводит к деполимеризации. Эта модель, качественно объясняющая динамическую нестабильность микротрубочек, получила название «модель ГТФ-шапки».

Исследование структуры концов микротрубочки в состояниях роста и укорачивания показало, что димеры тубулина в микротрубочках уложены в прямые протофиламенты, а продукты деполимеризации имеют форму изогнутых кусков протофиламентов [10, 11, 12]. Это дало основание сделать предположение о том, что Д-тубулин в естественном состоянии образует изогнутые протофиламенты, а в стенке микротрубочки он находится в выпрямленной напряженной конформации. Если ГТФ-шапка «потеряна», то протофиламенты стремятся принять более удобную «закрученную» конформацию, разрушая тем самым микротрубочку. Эта модель в дальнейшем была подтверждена электронно-микроскопическими исследованиями. Концы разбирающихся микротрубочек из-за кривизны составляющих их протофиламентов выгибаются наружу [13]. Концы же растущих микротрубочек — это вытянутые прямые протофиламенты, видимо, состоящие из Т-тубулина или двумерных плоских образований, которые закрываются в трубку, формируя цилиндрическую структуру микротрубочки [14]. При полимеризации структура Д-тубулина находится в напряженном состоянии — химическая энергия гидролиза ГТФ запасена в виде механического напряжения связей между молекулами полимера, а стабильность всей микротрубочки обеспечивается наличием ГТФ-шапки. При деполимеризации запасенная энергия высвобождается и может быть утилизирована для выполнения механической работы.

Таким образом, конец микротрубочки может действовать как молекулярная машина, превращая химическую энергию в механическую работу. Было показано, что процессы как полимеризации, так и деполимеризации микротрубочек, могут производить работу по перемещению биообъекта за счет энергии, выделяемой при гидролитическом расщеплении ГТФ. Микротрубочки могут толкать биообъекты при полимеризации [15, 16], а также в отсутствие нуклеотидтрифосфатов могут тянуть за собой хромосомы и другие биообъекты при деполимеризации [17, 18]. Если теоретические представления о развитии силы при полимеризации хорошо разработаны [19], то механизм, по которому развивается тянущая сила при деполимеризации, остается по большей части не известным. Отчасти это связано с принципиальной трудностью представления устройства, которое бы позволило объекту следовать за концом деполимеризующейся микротрубочки, не теряя механического контакта. Такое устройство должно удовлетворять ряду требований: в месте соединения микротрубочки с устройством должна легко осуществляться ее способность полимеризоваться и деполимеризоваться; устройство должно быть достаточно крепким, чтобы при развитии силы

соединение с ним не разрушалось; сопряжение должно обеспечивать эффективную передачу силы.

Верхнюю границу силы можно оценить термодинамически безотносительно того или иного сопрягающего устройства. Оценка силы основана на определении свободной энергии реакции деполимеризации [20]:

$$F = \frac{k_B T}{\delta} \ln \frac{k_{on}^T c^T}{k_{off}^D}$$

где k_B — постоянная Больцмана; δ — среднее укорочение микротрубочки на один акт отсоединения димера тубулина (составляет 0,61 нм для микротрубочки из 13 протофиламентов при длине димера 8 нм); k_{on}^T и k_{off}^D — константа скорости присоединения и скорости отсоединения тубулина, соответственно; c^T — концентрация свободного Т-тубулина.

По данным [21], k_{off}^D составляет более 500 димеров в секунду, а значение k_{on}^T очень мало [5]. Отношение k_{on}^T/k_{off}^D составляет 0,001 или менее. Таким образом, формула дает значение силы 32 пН и более для условий нормальной температуры и концентрации тубулина порядка 2 мг/мл.

Огромная разница между k_{on}^T и k_{off}^D обусловлена гидролизом ГТФ. Другая максимальная оценка, не зависящая от способа закрепления микротрубочки с перемещаемой клеткой, основана на определении свободной энергии гидролиза ГТФ, которая составляет 7,3 ккал/моль для стандартных условий [22]. Если предположить, что вся энергия реакции гидролиза может быть использована для развития силы, то тогда получим величину силы, равную 82 пН для микротрубочки из 13 протофиламентов. Для сравнения: максимальная нагрузка, которую еще может перемещать одна молекула кинезина, составляет 5 пН [23]. Для того чтобы получить более точные оценки, необходимо рассматривать конкретные механизмы развития силы микротрубочки.

Модели сопряжения микротрубочки с кинетохором

В соответствии с представлениями Хилла [24] и Кошланда с соавт. [25] сопряжение микротрубочки с кинетохором осуществляется посредством некоторого гипотетического рукава, расположенного на внешней поверхности кинетохора. В модели Хилла, получившей название модели направленной диффузии (biased diffusion), стенки рукава связывают молекулы тубулина в микротрубочке. Движение внутри рукава происходит за счет температурных флуктуаций энергии и является «направленным» благодаря тому, что энергия взаимодействия микротрубочки с рукавом тем меньше, чем больше сайтов связывания занято. Таким образом, отсоединение димеров тубулина от конца микротрубочки освобождает некоторые сайты в рукаве, которые система стремится занять, передвигая при этом весь рукав. Двигательная сила микротрубочки, рассчитанная по этой модели, составляет 15 пН [26]. Главным недостатком модели является полное игнорирование энергии деполимеризации микротрубочки. При деполимеризации молекулы Д-тубулина стремятся принять свою естественную искривленную конформацию, выгибаясь наружу. Очевидно, что в настолько узком рукаве, что стенка микротрубочки подходит к стенке рукава на характерное расстояние белок-белкового взаимодействия, такое выгибание невозможно.

Гипотеза Кошланда с соавт. основана на данных о структуре разбирающегося конца микротрубочки; ее называют моделью «конформационной волны» (conformational wave model). Согласно этой модели, двигательная сила микротрубочки развивается вследствие изгибания протофиламентов, которые при этом дают на внутреннюю кромку рукава кинетохора, вызывая таким образом его скольжение по направлению к «минус»-концу (так называемый механизм power stroke). По этой модели связывание между микротрубочкой и кольцом отсутствует. По оценке силы [27] оказалось, что развиваемая сила может достигать максимальной верхней оценки (~80 пН), но она сильно зависит от диаметра кольца (рукава). Его оптимальный для развития силы диаметр составляет 35 нм. Данный механизм представляется вполне вероятным. Стоит, однако, заметить, что, согласно нашим расчетам, достижение максимальной силы возможно только, если она развивается уже потерявшими латеральные связи димерами тубулина. Такие димеры слабо связаны с микротрубочкой, и возможно, что данный вид соединения с кинетохором будет неустойчивым.

Существует еще одна модель развития силы деполимеризующейся микротрубочкой [28]. В этой модели в качестве перемещаемого биообъекта рассматривается шарик, покрытый белками, которые хорошо связывают тубулин, благодаря чему такой шарик может перемещаться по поверхности микротрубочки, оставаясь с ней связанным. В отсутствие внешних сил, действующих на шарик, вероятность движения шарика в направлениях к «плюс»-концу и к «минус»-концу одинакова. Перемещение осуществляется по механизму храповика — шарик может сдвинуться в сторону «минус»-конца, но после такого перемещения димер тубулина, который ушел с «минус»-конца, деполимеризуется, и перемещение в обратном направлении становится невозможным. Данная модель, как и модель Хилла, не использует энергию деполимеризации микротрубочки. Сила, оказываемая микротрубочкой, составляет 3—5 пН, что даже меньше, чем в модели Хилла.

Экспериментальные исследования сил, развиваемых микротрубочками

Кошланд с соавт. первыми показали экспериментально, что концы микротрубочек могут оставаться прикрепленными к кинетохорам изолированных хромосом в процессе деполимеризации при наличии АТФ и в его отсутствие. Последующая экспериментальная работа [17] подтвердила это положение. В эксперименте *in vitro* к микротрубочкам, растущим из специальных центров, добавляли изолированные хромосомы, которые зацеплялись за их концы. Деполимеризацию микротрубочек вызывали введением буферного раствора, бедного Т-тубулином. Как результат деполимеризации, хромосомы следовали за концами деполимеризующихся микротрубочек со скоростью, близкой к скорости деполимеризации свободного конца. При этом хромосомы двигались навстречу току буферного раствора, оказывающего силу вязкого сопротивления на хромосомы. Оценка силы сопротивления составила порядка 10 пН.

В этих экспериментах из-за сложности биохимического состава перемещаемых объектов практически не

представлялась возможность идентификации белков, ответственных за перемещение хромосом. В экспериментальной работе [18] хромосомы были заменены на покрытые белками (кинезином) пластиковые шарики микрометрового размера. Авторы показали, что в буферном растворе в отсутствие нуклеотидтрифосфатов возможно обращение движения молекул кинезина. Шарики следуют за концами деполимеризующихся микротрубочек против тока буферного раствора, при этом скорость перемещения зависит от вида кинезина и она может быть даже больше скорости деполимеризации свободного конца микротрубочки. Это означает, что существует некий механизм — сопрягающее устройство, благодаря которому взаимодействие между мотором и микротрубочкой может замедлять или ускорять скорость деполимеризации тубулина. В присутствии АТФ и при некоторых дополнительных условиях шарик с кинезинами перемещался к «плюс»-концу микротрубочки, как ему и положено. По достижении того места, где микротрубочка укорачивается, шарик менял свое направление и начинал следовать за разбирающимся концом в сторону «минус»-конца трубочки.

Мы предприняли попытку экспериментально измерить силу, развиваемую микротрубочкой в процессе деполимеризации, с помощью простого сопрягающего устройства и понять механизм развития этой силы. Для этого мы собрали установку «лазерный пинцет». Принцип действия установки основан на том, что сильно сфокусированный лазерный луч может «захватывать» и перемещать микроскопические объекты, например стеклянные шарики, действуя, как ловушка. Внешняя сила, приложенная к шарик (модель перемещаемого биообъекта) со стороны микротрубочки, может быть измерена по его отклонению от центра ловушки с помощью квадрантного фотодетектора.

Измерительная установка и схема эксперимента

Установка включает флуоресцентный микроскоп ZEISS AxioPlan 2, оборудованный также для DIC микроскопии, и два лазера: один — ловушка для шарика, второй лазер — для независимого определения его положения (рис. 2). Длины волн лазерных излучений выбраны стандартным образом так, чтобы избежать полос поглощения биологических молекул, а также флуоресцентных красителей. Лазер-ловушка (длина волны луча 1064 нм) способен генерировать непрерывное излучение мощностью до 5 Вт. Свет от лазера проходит через расширитель луча, аттенюатор и попадает на акустооптические дефлекторы, которые управляют положением луча в плоскости объекта с помощью компьютера. Выходная апертура дефлектора оптически сопряжена с входной апертурой объектива (на схеме оптически сопряженные точки обозначены звездочками).

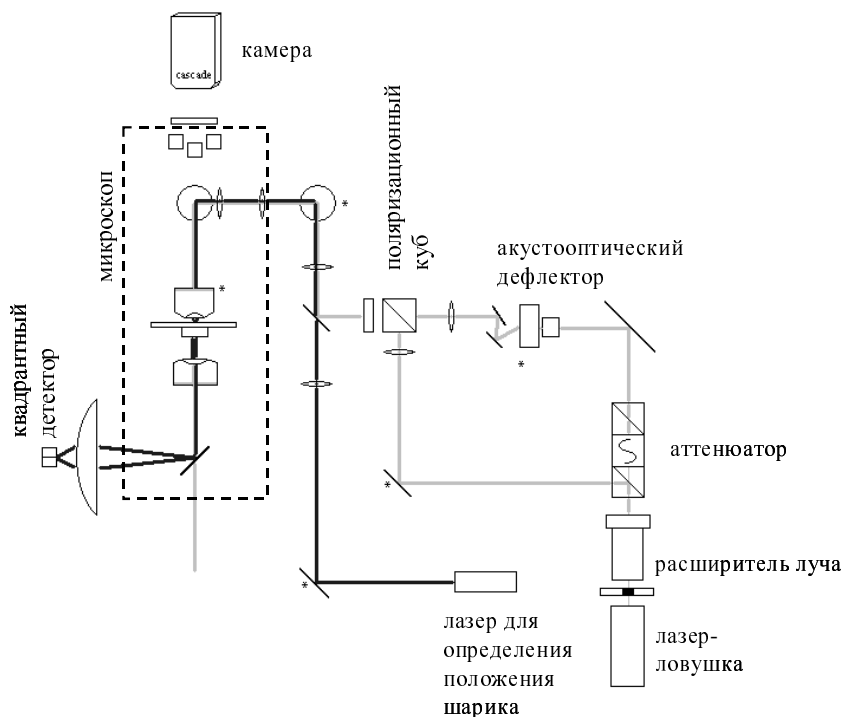


Рис. 2. Схема экспериментальной установки для измерения силы, развиваемой микротрубочкой

Квадрантный детектор состоит из четырех независимых фотоземельных элементов и регистрирует интерференционную картину от проходящего луча и луча, преломленного на шарике. Чем дальше шарик находится от центра регистрирующего луча, тем более несимметричной оказывается картина на детекторе. В небольшой области (~500 нм) напряжения на выходе детектора линейно связаны с отклонением шарика от центра ловушки, а соответствующие коэффициенты определяют калибровку.

Смещение шарика линейно связано с действующей на него силой. Коэффициент пересчета, называемый жесткостью ловушки, может быть найден различными способами. Наиболее часто используют калибровку по силе вязкого трения, по спектру и основанную на теореме о равномерном распределении. Как правило, совпадение величин жесткости, полученных этими тремя методами, гарантирует правильность выполняемых калибровок, а их несовпадение позволяет судить о неисправностях установки [29].

Процессы получения микротрубочек (полимеризация тубулина) и последующей их деполимеризации осуществлялись в проточной камере (емкость около 15 мкл). В качестве центров нуклеации микротрубочек использовались лизированные шкурки тетрахаймены [18]. Тубулин был выделен из коровьих мозгов по модифицированному биохимическому протоколу [30]. Полимеризацию проводили в два приема: сначала в камеру вводили ГТФ-тубулин с добавлением биотинилированного тубулина, затем — меченный родамином GMPCPP-тубулин. Это позволяет получать микротрубочки, состоящие из двух слоев. Первый, ГДФ, слой имеет некоторое количество биотина на поверхности и способен практически необратимо связывать покры-

тые стрептавидином шарики, но этот слой нестабилен. Второй слой полимеризован в присутствии негидролизуемого аналога ГТФ – GMPCPP и является стабильным, а также содержит большое количество связанного родамина. Если бы второго, стабильного слоя не было, все микротрубочки после промывания немедленно начали разрушаться.

После завершения полимеризации (образования) микротрубочек в камеру вносили покрытые стрептавидином шарики, которые прилипали к микротрубочкам. Начиная эксперимент, выбирали один шарик, прикрепившийся на какой-либо из микротрубочек, и захватывали его в лазерную ловушку. Положение шарика записывалось квадрантным детектором.

Деполимеризацию микротрубочек инициировали флуоресцентным освещением в полосе поглощения родамина. При выжигании красителя стабильные GMPCPP-концы микротрубочек разрушались и микротрубочки начинали деполимеризоваться. По мере разрушения микротрубочек с помощью лазерной ловушки измеряли смещения шарика, вызванные деполимеризацией, и по калибровочной кривой определяли силу, развиваемую микротрубочкой.

Аналогичные эксперименты были проведены с шариками, покрытыми БАМ белками (без биотинилирования). Эти белки обеспечивают принципиально другой тип статического закрепления шариков, но демонстрируют аналогичное поведение, как и в случае стрептавидин-биотин-прикрепления.

Математическая модель

Сложная «геометрия» эксперимента, в котором сила, развиваемая микротрубочкой, прикладывается к поверхности шарика, а измеряется в его центре, а также большое разнообразие сигналов требуют интерпретации получаемых результатов с помощью модели. В созданной модели микротрубочка имитируется как длинный упругий стержень, состоящий из двух частей. Нижняя часть моделирует цельную микротрубочку. Верхняя часть стержня может переходить из упругого состояния в менее упругое состояние, соответствующее отщепившимся одному или нескольким протофиламентам, т.е. когда концы нитей микротрубочек имеют некоторую кривизну, моделируя тем самым экспериментальную ситуацию. Для одного протофиламента кривизна и напряжение в нем известны [31]. Для связки протофиламентов кривизна меньше, а напряжение больше.

При проведении расчетов стержень разбивается на сегменты длиной в один димер или на более длинные сегменты в той части, которая соответствует недеполимеризуемому участку микротрубочки (для ускорения расчетов). Предполагается, что на шарик диаметром 1 мкм, находящийся в силовом поле ловушки, прикрепляется некоторое количество димеров. После того как «запущена» деполимеризация, сегменты один за другим начинают искривляться, что соответствует выгибанию концов протофиламента. Шарик оказывается закрепленным на выгибающемся протофиламента, который стремится вынести его из ловушки. На каждой итерации программы последующий сегмент переходит в искривленное состояние. Рассчитывается минимум потенциальной энергии всей системы с учетом напряжения стержня, напряжения изгибающегося протофиламента, связи ди-

меров с шариком и связи шарика с неподвижным центром ловушки. Таким образом находится новое положение шарика, т.е. его смещение, вызванное изменением свойств микротрубочки.

Для того чтобы извлечь параметры из экспериментальных данных, они аппроксимировались функциями для данных экспериментов, в которых регистрировалась сила:

$$y_2 = a + b \frac{e^{(t-t_1)/\tau_1}}{1 + e^{(t-t_1)/\tau_1}} + c \frac{e^{(t-t_2)/\tau_2}}{1 + e^{(t-t_2)/\tau_2}}$$

и для данных экспериментов в отсутствие силы:

$$y_1 = a + b \frac{e^{(t-t_1)/\tau}}{1 + e^{(t-t_1)/\tau}}$$

Коэффициенты a , b , c , t , t_1 , t_2 , τ , τ_1 , τ_2 находили с помощью встроенного алгоритма MATLAB 6.5. С использованием этих коэффициентов рассчитывали значения сил, напряжений и длительностей переходов.

Результаты измерения силы

На рис. 3Б-Е показаны сигналы квадрантного детектора, регистрируемые в зависимости от состояния биообъекта (шарика, покрытого белками) и микротрубочки. На рис. 3А приведен контрольный сигнал шарика, находящегося в ловушке и не связанного с микротрубочкой. После разрушения стабильных шапок GMPCPP микротрубочек начинается их разборка, и по истечении некоторого времени (0,5–2 мин) ранее закрепленный шарик отрывается от микротрубочки и становится свободным. Движения шарика носят разный характер — как очень быстрый отрыв с характерным временем в сотые доли секунды, так и довольно сложные движения, длящиеся 5–40 с. В результате отрыва шарик оказывается в центре ловушки. Это отражает факт усиления броуновского движения шарика (рис. 3Б).

Как правило, отрыву шарика предшествуют несколько событий. Такое сложное поведение шарика можно объяснить последовательной деполимеризацией нескольких микротрубочек, связанных с шариком. Поскольку нельзя наверняка знать, сколько микротрубочек было изначально прикреплено к тому или иному шарика, мы анализировали только последнее событие. Это гарантировало, что мы рассматриваем отсоединение последней микротрубочки (рис. 3В-Е).

В 61-м из 144-х экспериментов перед последним отрывом шарик немного сдвинулся от центра ловушки, прежде чем в него перейти (рис. 3В-Д). Поскольку шарик перемещается в трех направлениях, направление его движения можно соотносить с ориентацией микротрубочки, которая известна из микроскопических наблюдений. Движение шарика в сторону «минус»-конца микротрубочки произошло в 92% случаях; смещение в перпендикулярном направлении, как правило, составляло не более 20% от смещения вдоль микротрубочки. Это смещение, вызванное деполимеризацией, мы интерпретируем как силу, развиваемую микротрубочкой.

Точность измерения силы на нашей установке 0,04 пН. В результате измерений мы получили целый спектр сил — от минимально регистрируемой до 0,5 пН, которые могут развивать микротрубочки (рис. 4А).

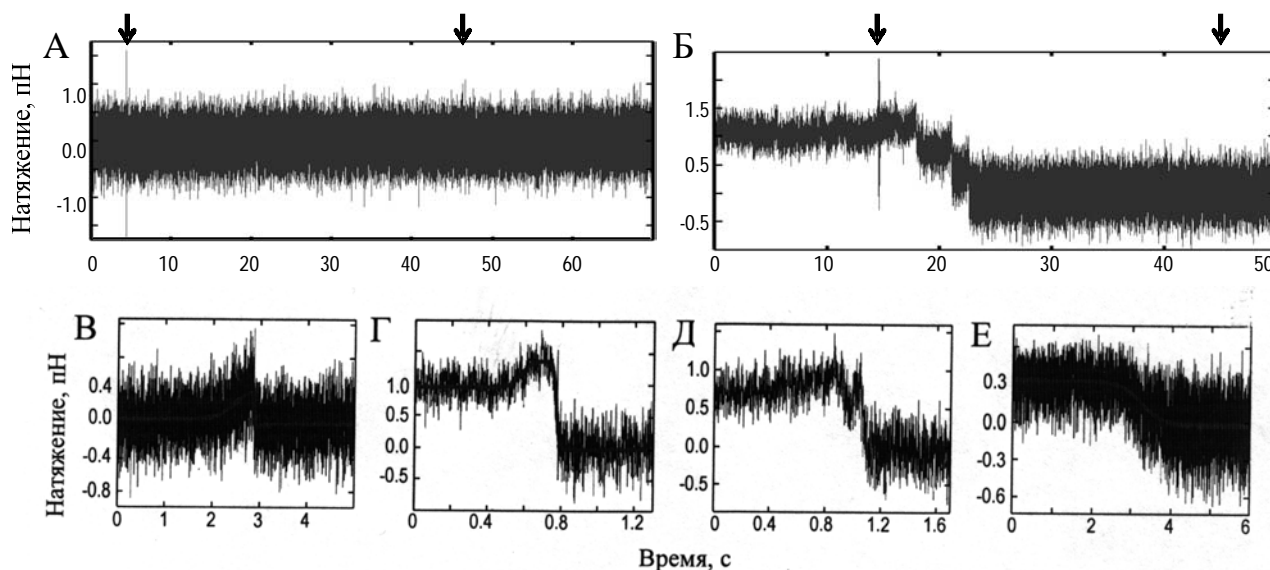


Рис. 3. Необработанные сигналы квадрантного детектора в эксперименте по измерению силы микротрубочки, действующей на биообъект (шарик):

А — захваченный оптической ловушкой свободный шарик. Стрелки — включение и выключение света, запускающего разборку микротрубочек; Б — уменьшение амплитуды броуновского движения шарика, прикрепленного к микротрубочке и находящегося под натяжением со стороны ловушки; В–Е — примеры сигналов, В, Г — типичные сигналы при развитии микротрубочкой силы, Д — сложный сигнал, Е — сигнал в отсутствие силы (свободная релаксация к центру ловушки)

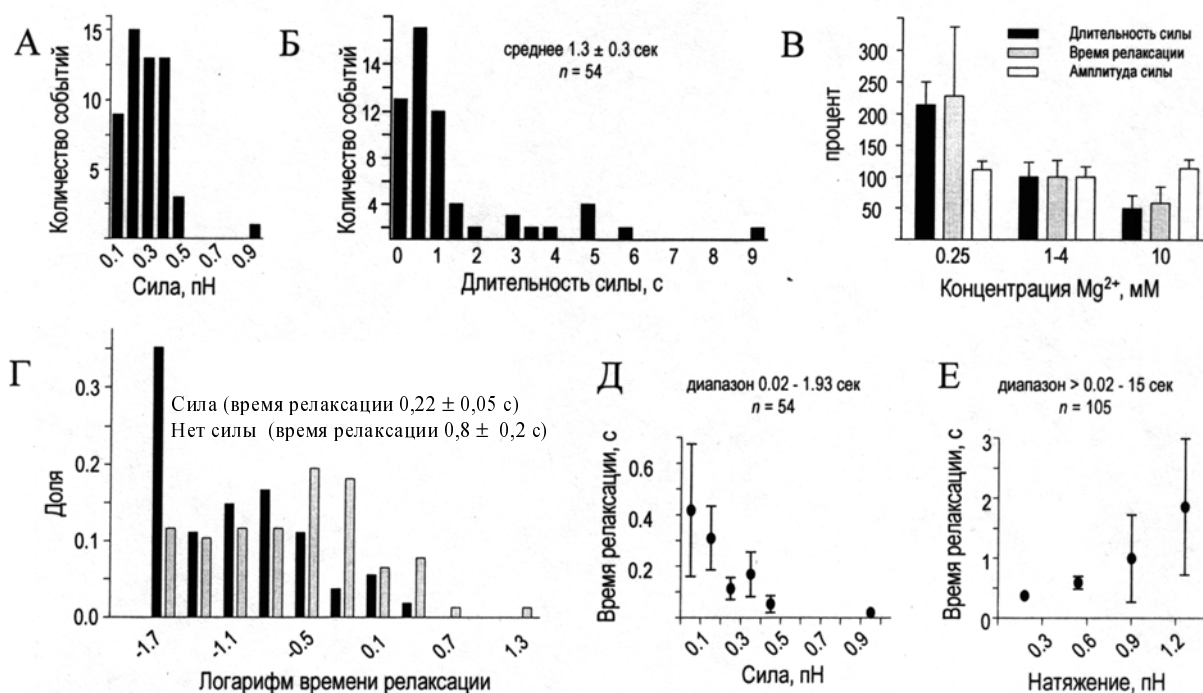


Рис. 4. Анализ событий в эксперименте по измерению силы, развиваемой микротрубочкой:

А — гистограмма амплитуд сил; Б — гистограмма длительности развития сил; В — характеристики сил в зависимости от концентрации Mg^{2+} в исследуемой биологической системе; длительности сил и релаксаций больше для медленнее деполимеризующихся микротрубочек, амплитуды сил постоянны; Г — гистограмма логарифма времен релаксации (по ординате отложена доля от всех экспериментов для каждой категории); Д — время релаксации в зависимости от силы; Е — среднее время релаксации в зависимости от приложенного напряжения

Средняя величина развиваемой силы в наших экспериментах составила $0,24 \pm 0,02$ пН. На развиваемую силу не влияет добавление раствора биотина (2 мкМ), значит свободный биотин не конкурирует с уже занятыми сайтами прикрепленного шарика. При использовании БАМ белков в качестве связи между шариками и микротрубочками средняя развиваемая сила составила $0,22 \pm 0,04$ пН, что совпадает с величиной для случая биотин-стрептавидинового закрепления в пределах экспериментальной погрешности.

Приведенные на рис. 4 гистограммы, полученные путем обработки результатов экспериментов с помощью модели, раскрывают картину развития сил, возникающих при деполимеризации микротрубочек.

Дадим некоторые комментарии относительно рис. 4. «Количество событий» на рис. 4 — количество экспериментов из общего числа (144), для которых была измерена сила, находящаяся в диапазоне значений, указанных на оси абсцисс. «Сила» (на рис. А и Д) — увеличение сигнала вверх перед самым отрывом шарика; на рис. 3В и Г это величина пика, т.е. на сколько сигнал вырос, прежде чем начать уменьшаться. «Напряжение» — это разница начального и конечного уровней сигнала. «Процент» на рис. 4В — отношение одной из указанных величин (длительность силы, время релаксации, амплитуда силы) для данной концентрации ионов Mg^{2+} к этой же величине, измеренной при концентрации 1–4 мМ. «Диапазон» — диапазон минимального и максимального значения для выборки.

Величины развиваемых сил не зависят ни от расстояния до центров нуклеации (длины микротрубочки), ни от начально приложенного напряжения. Как показывает рис. 4А, распределение сил резко снижается практически до нуля при значении $0,45$ пН. На этом основании мы предполагаем, что это есть максимальная сила, которая может быть развита при деполимеризации микротрубочек.

Сила, измеряемая в эксперименте, приложена к центру шарика. Чтобы узнать силу, которую потенциально может развивать микротрубочка вблизи поверхности при удачном закреплении, требуется сделать пересчет. Геометрически один или, что гораздо более вероятно, два протофиламента могут быть прикреплены к шарикам так, чтобы изгибание протофиламентов могло вызвать его перемещение (радиус шарика 500 нм, а размер области прикрепления 20–60 нм). Связь между шариком и димерами в микротрубочке осуществляется посредством молекул стрептавидина и альбумина. Если предположить, что связь между молекулой стрептавидина и биотином на тубулине может образовываться за счет термических флуктуаций на расстоянии 0,1–1 нм, то это означает, что всего 3–4 димера в протофилamente могут быть связаны с шариком, что соответствует средней протяженности взаимодействия в 40 нм. Таким образом, сила, развиваемая в центре шарика, уменьшена в ~10 раз из-за соотношения длин рычагов. Следовательно, максимальная сила, развиваемая вблизи поверхности микротрубочки, составляет 5 пН, что по величине равно силе, развиваемой моторным белком. Если бы энергия всех 13-ти протофиламентов могла использоваться подходящим устройством для совершения работы по перемещению,

можно было бы ожидать, что развиваемая при этом сила составит 30–60 пН.

Сила, развиваемая в результате деполимеризации, нарастает постепенно, по мере разрыва латеральных связей димеров с шариком, причем распределение нарастания сил довольно широкое (рис. 4Б) — от 0,03 с до 9,5 с, что частично можно объяснить различными скоростями деполимеризации микротрубочек. Для проверки этой гипотезы мы провели эксперимент, варьируя концентрацию ионов Mg^{2+} в исследуемой системе, влияющих на скорость деполимеризации. Как видно из рис. 4В, уменьшение концентрации ионов магния, что снижает скорость деполимеризации [32], приводит к увеличению времени релаксации. При физиологических значениях концентрации Mg^{2+} (1–4 мМ) среднее время развития силы в условиях эксперимента составляет 1,3 с.

Для того чтобы оценить скорость разборки микротрубочек, мы воспользовались расчетами модели (рис. 5А). Из расчетов следовало, что при параметрах модели таких, как в эксперименте, нарастание силы длится по мере отщепления порядка 10 димеров. Это означает, что скорость деполимеризации в наших экспериментах составляет 8–12 димеров/с на протофиламент, что намного меньше, чем скорость деполимеризации свободных микротрубочек (65 димеров/с на протофиламент [5]). Вполне вероятно, что такое различие вызвано, во-первых, действием со стороны ловушки силы, противодействующей выгибанию протофиламента, а во-вторых, влиянию поверхности шарика, которая ограничивает возможность протофиламентов легко изгибаться.

Подобными причинами можно объяснить замедление деполимеризации микротрубочек на кинетохорах [33].

Сигналы, в которых отрыву шарика не предшествовало развитие силы, зарегистрированы в 45% проведенных экспериментов. В этих случаях шарик монотонно перемещается к центру ловушки, пик силы отсутствует. Скорость данного движения была довольно разной. Релаксации, которым предшествовало развитие силы, как правило, происходили быстрее (см. рис. 4Г). Аналогичный характер прослеживается в зависимости времени релаксации от амплитуды развитой силы: после меньших сил, как правило, следовали более медленные релаксации (см. рис. 4Д). Этот результат означает, что развитие силы, приложенной к шарикам, может быть осложнено тем же процессом, который приводит к более медленной релаксации.

В чем же причина такого большого разнообразия экспериментально наблюдаемых сигналов — большой разброс измеряемых сил или отсутствие силы? С помощью построенной модели (рис. 5А–Г) мы делаем вывод, что причиной служит случайный характер разрушения связей между протофиламентами. Микротрубочка не разбирается симметрично, а разваливается на связки из отдельных протофиламентов, и трещины между ними «бегут» с разной скоростью. К выводу о разборке такого рода подводят электронно-микроскопические исследования [11] и он полностью соответствует нашим экспериментальным данным.

По мере разрыва латеральных связей прикрепленный к микротрубочке шарик начинает двигаться, причем скорость движения зависит от того, какие

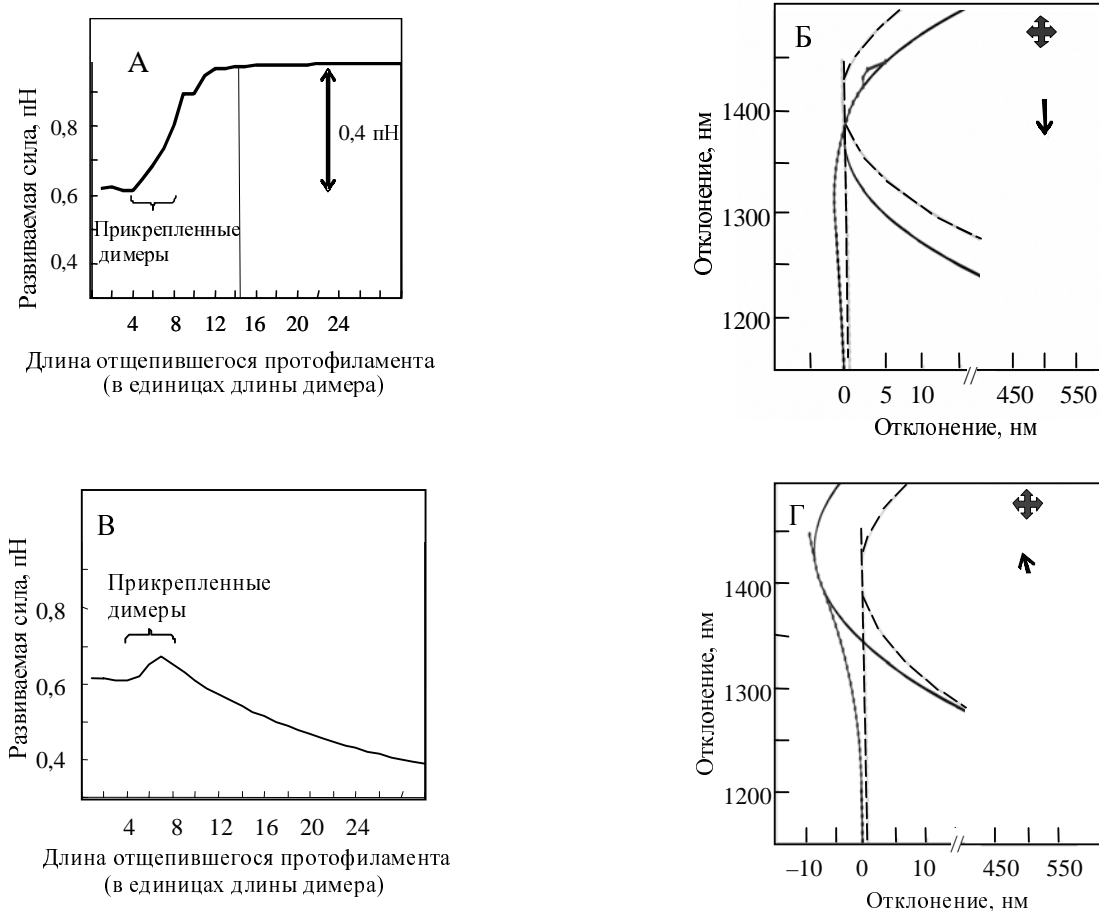


Рис. 5. Модельные расчеты:

А, В — расчетные кривые перемещения шарика при развитии силы соответственно двумя протофиламентами или большой связкой; Б, Г — профили протофиламентов для двух видов развития силы. Пунктирные кривые — начальное положение протофиламента и прикрепленного шарика; стрелки показывают смещение шарика

протофиламенты на уровне закрепления шарика отщепятся первыми: те, на которых закреплен шарик, или протофиламенты, находящиеся с другой стороны закрепления. Наша модель показывает, что если первыми отщепятся протофиламенты, на которых закреплен шарик, то развивается наибольшая сила (см. рис. 5А,В и рис. 6).

Сила, полученная в расчетах, прекрасно согласуется с максимальной силой, измеренной экспериментально. Если же вместе с прикрепленными к шарикам протофиламентами отщепятся дополнительные протофиламенты, так что их окажется в связке более двух, то развиваемая сила будет меньше максимально возможной. Это связано с тем, что эффективная кривизна связки из нескольких протофиламентов

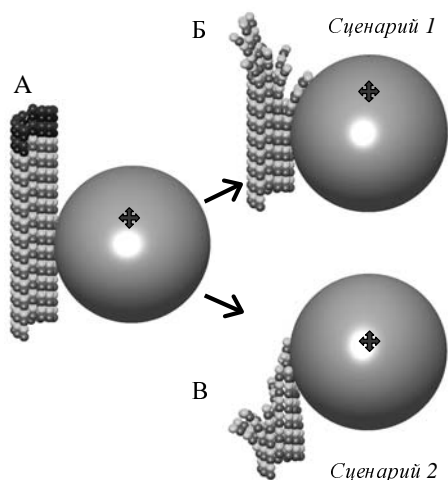


Рис. 6. Модели развития силы.

Димер тубулина показан двумя шариками, более светлый — β -тубулин. Шарик прикреплен к микротрубочке шестью димерами в двух соседних протофиламентах. Крест обозначает центр ловушки. А — микротрубочка с шапкой из GMPCPP-тубулина; Б — два сценария развития силы. Сценарий 1 — протофиламенты, закрепленные на шарике, отрываются раньше и развивают максимальную силу, толкая шарик дальше от центра ловушки. Сценарий 2 — протофиламенты, закрепленные на шарике, отрываются последними, шарик долгое время остается закрепленным на конструкции из многих протофиламентов, гораздо менее жесткой, чем вся микротрубочка. Приложенное к шарикам напряжение вынуждает микротрубочку изгибаться, приводя шарик ближе к центру ловушки

и, следовательно, вызванное их изгибанием перемещение шарика меньше, чем для одного протофиламента.

Если шарик присоединен к более жесткой конструкции, но менее напряженной, состоящей более чем из 5 протофиламентов, развиваемая сила будет либо совсем малой, либо ее не будет вообще (рис. 5Б,Г). Поскольку несколько протофиламентов составляют гораздо менее жесткую конструкцию, чем одна целая микротрубочка, под действием ловушки они начнут изгибаться, позволяя шарiku вернуться к ее центру. Этим мы объясняем наличие медленных релаксаций.

Медленные релаксации к центру ловушки являются довольно неожиданными — согласно полученным данным, шарик может оставаться связанным с частично разобранный микротрубочкой в течение нескольких секунд, в то время как за одну секунду латеральные связи в протофиламентах должны потерять от 8 до 65 димеров. Продольные связи в протофиламентах остаются не разорвавшимися, поскольку шарик не является свободным. Более того, согласно нашим данным, большие времена релаксации соответствовали большим напряжениям (см. рис. 4Е). Таким образом, время жизни продольной связи в протофиламенте возрастает благодаря приложенному напряжению, которое противодействует выгибанию протофиламентов. Это результат может оказаться ключом к пониманию важного свойства кинетохоров. Если напряжение присоединенных к кинетохору микротрубочек велико из-за сил, действующих с другой стороны хромосомы, они не отрываются, как этого можно было бы ожидать, а наоборот, переходят в состояние полимеризации. В наших экспериментах приложенное к микротрубочке напряжение замедляло выгибание протофиламентов и тем самым тормозило разборку полимера. Следовательно, *in vivo* это свойство микротрубочек может помочь правильной сегрегации хромосом без присутствия каких-либо регуляторных белков, чувствительных к напряжению.

Таким образом, перемещение хромосом в митозе определяется кинетикой полимеризации-деполимеризации микротрубочек. В ходе деполимеризации микротрубочки развивают силы, вполне достаточные для обеспечения движения хромосом. Измеренная сила равна 30–60 пН на одну микротрубочку, что примерно равно сумме всех сил, действующих на движущуюся хромосому в митозе.

Итак, микротрубочки являются биомеханическим двигателем с уникальным механизмом генерации силы: молекулы белка тубулина, из которых состоят стенки микротрубочек, при полимеризации присоединяются к растущей трубке в «выпрямленной» конформации и в связанном с гуанозинтрифосфатом состоянии. После полимеризации происходит расщепление ГТФ, и выделившаяся энергия запасается в «напряженном» состоянии тубулина. При этом каждая молекула тубулина стремится «выгнуться» наружу из стенки трубочки. Это напряжение, высвобождаясь в процессе деполимеризации микротрубочки, может развивать значительные силы и совершать работу по движению хромосом, если разбирающийся конец микротрубочки соединен с хромосомой соответствующим устройством сопряжения.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИИ, грант № GM33787 для JRM.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Geuens G., Hill A.M., Levilliers N., Adoutte A., DeBrabander J.* Cell Biol., 1989, v. 108, p. 939–953.
2. *Mitchison T.J., Evans L., Schulze E., Kirschner M.* Cell, 1986, v. 45, p. 515–527.
3. *Mitchison T.J.* J. Cell Biol., 1989, v. 109, p. 637–652.
4. *Mitchison, T., Kirschner M.* Nature, 1984, v. 312, p. 237–242.
5. *Walker R.A., O'Brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H.P., Salmon E.D.* J. Cell Biol., 1988, v. 107, p. 1437–1448.
6. *Horio T., Hotani H.* Nature, 1986, v. 321, p. 605–607.
7. *Inoue S., Salmon E.D.* Mol. Biol. Cell., 1995, v. 16, p. 619–1640.
8. *Caplow M., Shanks J.* J. Biol. Chem., 1990, v. 265, p. 8935–8941.
9. *Nogales E., Whittaker M., Milligan R.A., Downing K.H.* Cell, 1999, v. 96, p. 79–88.
10. *Mandelkow E.M., Mandelkow E.* J. Mol. Biol., 1985, v. 181, p. 123–135.
11. *Mandelkow E.M., Mandelkow E., Milligan R.A.* J. Cell Biol., 1991, v. 114, p. 977–991.
12. *Tran P.T., Joshi P., Salmon E.D.* J. Struct. Biol., 1997, v. 118, p. 107–118.
13. *Müller-Reichert T., Chretien D., Severin F., Hyman A.A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1998, v. 95, p. 3661–3666.
14. *Chrétien D., Fuller S.D., Karsenti E.* J. Cell Biol., 1995, v. 129, p. 1311–1328.
15. *Dogterom M., Yurke B.* Science, 1997, v. 278, p. 856–860.
16. *Janson M.E., Dogterom M.* Phys. Rev. Lett., 2004, v. 92, № 248101.
17. *Coue M., Lombillo V. A., McIntosh J. R.* J. Cell Biol., 1991, v. 112, p. 1165–1175.
18. *Lombillo V. A., Stewart R. J., McIntosh J. R.* Nature, 1995, v. 373, p. 161–164.
19. *Mogilner A., Oster G.* Curr. Biol., 2003, v. 13, p. R721–R733.
20. *Howard J.* Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. Sinauer Associates, 2001.
21. *Gildersleeve R.F., Cross A.R., Cullen K.E., Fagen A.P., Williams R.C.Jr.* J. Biol. Chem., 1992, v. 267, p. 7995–8006.
22. *Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M.* Principles of Biochemistry, 2nd ed. NY: Worth, 1993, p. 377.
23. *Svoboda K., Block S.M.* Cell, 1994, v. 77, p. 773–784.
24. *Hill T.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, v. 82, p. 4404–4408.
25. *Koshland D. E., Mitchison T. J., Kirschner M. W.* Nature, 1988, v. 331, p. 499–504.
26. *Joglekar A. P., Hunt A. J.* Biophys. J., 2002, v. 83, p. 42–58.
27. *Molodtsov M.I., Grishchuk E.L., Efremov A.K., McIntosh J.R., Ataulkhanov F.I.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, v.102, № 12, p. 4353–4358.
28. *Tao Y. C., Peskin C. S.* Biophys. J., 1998, v. 75, p. 1529–1540.
29. *Sheetz M.* Laser tweezers in cell biology. V. 55. San Diego: Academic Press, 1998.
30. *Weingarten M.D., Suter M.M., Littman D.R., Kirschner M.W.* Biochemistry, 1974, v. 13(27), p. 5529–5537.
31. *Janson M.E., Dogterom M.* Biophys. J., 2004, v. 87, p. 2723–2736.
32. *O'Brien E.T., Salmon E.D., Walker R.A., Erickson H.P.* Ibid., 1990, v. 29, p. 6648–6656.
33. *Hunt A.J., McIntosh J.R.* Mol. Biol. Cell., 1998, v. 9, p. 2857–2871.