

УДК 577.3

## **ИЗМЕРЕНИЕ СИЛЫ, РАЗВИВАЕМОЙ РАЗБИРАЮЩЕЙСЯ МИКРОТРУБОЧКОЙ В ХОДЕ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ИОНАМИ Ca**

© 2007 г. М. И. Молодцов, Е. Л. Грищук, Д. Р. Макинтош, Ф. И. Атауллаханов

Представлено академиком А.И. Воробьевым 27.09.2006 г.

Поступило 27.09.2006 г.

Микротрубочки (МТ) – это полые линейные полимеры, образующиеся в результате полимеризации  $\alpha\beta$ -гетеродимеров тубулина. Продольные взаимодействия между молекулами тубулина образуют линейные протофиламенты, которые, в свою очередь, взаимодействуя латерально, образуют стенку МТ.

Вскоре после присоединения димера связанная с  $\beta$ -мономером молекула ГТФ гидролизует; основная часть МТ состоит из ГДФ-тубулина [1]. Гидролиз молекулы ГТФ влияет на конформацию молекулы тубулина: ГДФ-тубулин является более искривленным. Принять естественную конформацию ГДФ-тубулин в стенке МТ не может и находится там под напряжением. Такая МТ является неустойчивой. Ее стабильность определяется наличием на конце небольшого участка молекул еще не гидролизовавших ГТФ. Когда такая “ГТФ-шапка” потеряна, микротрубочка деполимеризуется. При этом, начиная с конца, димеры тубулина принимают свою естественную “искривленную” форму, разрывая связи между протофиламентами. Энергия гидролиза ГТФ, запасенная в стенке МТ в виде механического напряжения, высвобождается и может совершать работу [2]. По-видимому, эта энергия в основном определяет движение хромосом в митозе. Большой интерес представляет изучение механизмов превращения этой энергии в работу. Недавно нами было показано, что деполимеризующиеся МТ могут перемещать стеклянные шарики, развивая при этом значительные силы [4, 5]. Механизм развития силы при деполимеризации и характеристики этой силы, такие как величина, и длительность, пока изучены слабо.

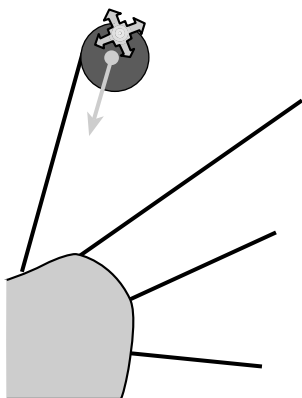
Известно, что МТ можно полимеризовать в присутствии негидролизованного аналога ГТФ – GMPCPP. Такие трубочки устойчивы, но их деполимеризацию можно вызвать ионами кальция [3]. Мы полагаем, что сравнение характеристик сил, развиваемых при такой деполимеризации, с деполимеризацией обычных МТ может помочь пониманию механизмов развития силы в нормальных условиях. Целью данной работы было экспериментальное измерение величины силы, развиваемой изгибающимися протофиламентами во время деполимеризации GMPCPP стабилизированных МТ.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Экспериментальная установка.** Для экспериментального измерения силы, нами была использована установка “лазерный пинцет” [6]. Основными компонентами установки являются: флуоресцентный микроскоп (“Zess”, AxioPlan 2), оборудованный также для DIC микроскопии и мощный лазер, дающий непрерывный гауссов пучок инфракрасного света (модель BL-106C, “Spectra Physics”). Сфокусированный объективом микроскопа лазерный луч создает трехмерный градиент света, который работает как ловушка, захватывая объекты микронного размера с диэлектрической проницаемостью, большей, чем проницаемость среды. При отклонении шарика от центра луча возникает сила, направленная к центру, пропорциональная его отклонению. С помощью квадрантного фотодетектора (специально сделанного на физическом факультете Университета штата Колорадо) отклонение шарика от центра луча можно измерить с точностью до нескольких нанометров по изменению интерференционной картины проходящего и преломленного на шарике света.

**Реагенты и белки.** Большинство реагентов было куплено у “Sigma” и “Molecular Probes”. GMPCPP приобретен у Jena Bioscience. Тубулин выделен из коровьих мозгов [7]. Мечение тубулина родамином и биотином было выполнено по

*Гематологический научный центр  
Российской Академии Медицинских наук, Москва  
Университет штата Колорадо, Боулдер, США  
Институт общей патологии и патофизиологии,  
Российской Академии медицинских наук, Москва  
Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова*



**Рис. 1.** Условная схема эксперимента. Одна из микро-трубочек связана с шариком, используемым для эксперимента. Когда волна деполимеризации доходит до шарика, на него может действовать сила, показанная стрелкой. Это приводит к перемещению шарика относительно центра ловушки, показанной крестиком.

стандартному протоколу [8]. В качестве центров нуклеации МТ использовались лизированные в стандартном буфере (0.1 M PIPES, 1mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.9 с КОН) с добавлением 0.5 % детергента (p-40, Sigma) шкурки тетрахимены. Стекланные шарики (1 мкм) были приобретены у Bangs Laboratories, Inc.

**П о с т а н о в к а э к с п е р и м е н т а.** Эксперимент проводили аналогично [6] с некоторыми модификациями. До начала эксперимента пелликулы тетрахимены помещали на покровное стекло, после чего камера заполнялась буфером, собиралась и запечатывалась силантом. После этого в камеру в присутствии GMPCPP (1mM) добавлялся тубулин (0.5 мг/мл), 1/10 часть которого была мечена биотином. После промывки в камеру были добавлены стекланные шарики микронного размера, покрытые стрептавидином [9], которые произвольно прилипали к биотинилированным микро-трубочкам. После того, как был выбран шарик для проведения измерения, он был захвачен ловушкой. Деполимеризацию микро-трубочки вызывали вмыванием в камеру буфера, содержащего 5 mM CaCl<sub>2</sub> (рис 1). После того как была запущена деполимеризация трубок, через некоторое время (от 1 до 10 мин) наблюдаемый шарик, бывший к ним прикрепленным, становится свободным. Этому сопутствовали различные перемещения шарика, анализируемые нами при помощи лазерной ловушки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

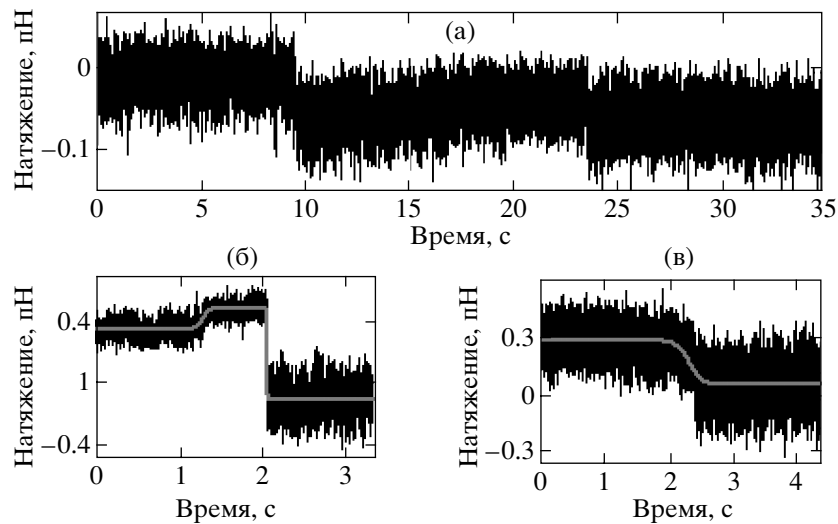
Наблюдавшиеся нами движения шарика, вызванные деполимеризацией микро-трубочки, изменялись от эксперимента к эксперименту очень сильно: некоторые шарики отрывались быстро, с

характерным временем в сотые доли секунды, тогда как другие совершали довольно сложные движения, длившиеся до минуты. Но в конце концов шарик всегда оказывался в центре ловушки освобожденным от трубки.

Сложное поведение шарика мы объясняем тем, что в этих экспериментах шарик был исходно связан сразу с несколькими трубочками и отсоединение его от разных трубочек происходило в разные моменты времени. Дошедшая до шарика волна деполимеризации каждой из этих трубок вызывала некоторое движение. Так как мы никогда не знаем точно, сколько трубок было изначально прикреплено к тому или иному шарик, мы анализировали только последнее событие. Это гарантировало нам анализ отсоединения одной, последней микро-трубочки. В том, что шарик свободен, мы убеждались, перемещая подставку и следя за положением шарика: он должен все время оставаться в центре ловушки, если шарик действительно свободен.

Средняя величина силы, измеренной в наших экспериментах, составила  $0.17 \pm 0.03$  пН. Величина развиваемых сил не зависит ни от длины микро-трубочки, ни от изначально приложенного натяжения. Распределение сил падает до нуля на значении 0.33 пН (рис 3). Мы полагаем, что эта величина близка к максимальной силе, которая может быть развита в нашей экспериментальной системе.

Примерно в половине случаев мы наблюдали развитие силы, а в половине – релаксации типа, показанного на рис. 2в. Мы интерпретировали этот результат при помощи модели, в которой волна деполимеризации доходит до места закрепления шарика и вызывает его перемещение. При этом максимальная сила всегда нарастает степенно (рис. 2б) по мере продвижения деполимеризации. Причиной того, что не каждое измерение дает амплитуду силы, является асимметрия, присутствующая кончикам разбираемых МТ. Если первыми отщепятся протофиламенты, к которым прикреплен шарик, то в этом случае будет развита наибольшая сила благодаря исходной кривизне загибающихся протофиламентов (рис. 4а). Если же первыми на уровне закрепления шарика отщепятся протофиламенты не связанные с шариком, то он останется закрепленным к МТ из более чем 2 протофиламентов. Их совместной кривизны не достаточно будет для того, чтобы развить максимальную силу, или, если протофиламентов окажется достаточно много, сила вообще не будет развиваться (рис 4б). Если шарик изначально находился под натяжением, то поскольку жесткость связки из нескольких протофиламентов значительно меньше жесткости всей микро-трубочки, протофиламенты смогут изогнуться в обратную



**Рис. 2.** Примеры сигналов, полученных с квадрантного детектора. а – два события произошли после добавления Са и до полного освобождения шарика. б – сигнал, в котором видно развитие силы; в – эксперимент, в котором силы не было, только релаксация к свободному состоянию. Сплошная кривая – аппроксимация гладкой функцией.

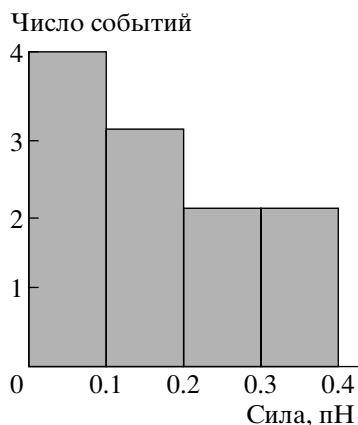
сторону, уменьшая начальное натяжение. В этом состоит природа медленных релаксаций.

Характеристики сил полученных в данной работе, мы сравнили с экспериментами, выполненными с нормальными ГДФ-микротрубочками в работе [6]. Сравнение приведено в табл. 1. Сила, развиваемая GMPCPP МТ меньше, чем сила, развиваемая нормальными МТ, так как кривизна GMPCPP протофиламентов в 2 раза меньше кривизны ГДФ-протофиламентов [10, 6].

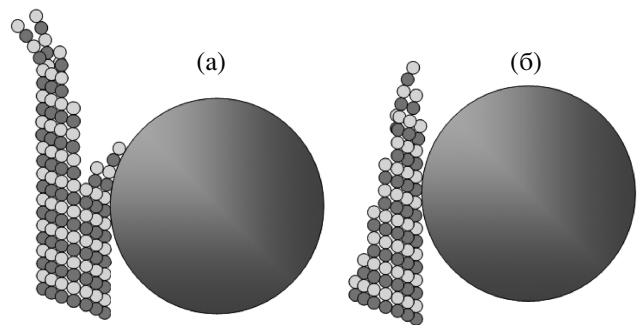
Сильный разброс в длительностях сил и релаксаций мы связываем с большим разбросом скоростей деполимеризации, присущим однородной популяции МТ [11]. Существенное различие между GMPCPP и нормальными МТ существует в длительности силы, которая является суммой времени плато и времени длительностей выхода на него

(см. рис. 2б). Это отражает тот факт, что скорость разборки GMPCPP МТ в 5мМ Са<sup>2+</sup> ниже скорости деполимеризации обычных МТ в данных условиях.

Длительное время релаксации означает, что протофиламенты, потерявшие связи со своими соседями, существуют еще довольно долгое время, находясь при этом под натяжением, в то время как в обычных условиях после потери связей между протофиламентами они довольно быстро разбираются на отдельные димеры. Как уже было упомянуто в [6], это может означать, что нали-



**Рис. 3.** Гистограмма амплитуд, измеренных в эксперименте сил.



**Рис. 4.** Два принципиальных сценария деполимеризации микротрубочки в наших экспериментах. Димер тубулина показан двумя маленькими шариками. Для наглядности шарик показан в 10 раз меньше реального размера. а – протофиламенты, прикрепленные к шарiku, отваливаются раньше других, изгибаясь они развивают максимальную силу. б – шарик долгое время закреплен за структуру из многих протофиламентов, гораздо менее жесткую, чем вся микротрубочка. Если имеется начальное натяжение, то оно вынуждает ее изгибаться.

**Таблица 1.** Сравнение параметров сил, развиваемых во время деполимеризации ГМРСРР и нормальными МТ

МТ	Амплитуда силы, пН	$\tau$ релаксации, с	Длительность силы, с	Источник
ГМРСРР	$0.17 \pm 0.03$ ( $n = 9$ )	$0.07 \pm 0.03$	$6 \pm 2$	
Нормальные	$0.28 \pm 0.04$ ( $n = 48$ )	$0.08 \pm 0.02$	$1.3 \pm 0.3$	Nature, 2005

чие натяжения увеличивает прочность связей в протофиламентах.

Механизм развития силы описанный в данной статье, является “одноразовым”. После того как деполимеризующаяся МТ “дернула” шарик, она разваливается. Для того чтобы непрерывно использовать усилие развиваемой МТ для перемещения вслед за разбирающимся кончиком протофиламента, необходимо специальное сопрягающее устройство. Таким устройством может быть, например, кольцо, одетое на кончик МТ. Изгибающиеся протофиламенты смогут давить на внутреннюю кромку кольца, непрерывно перемещая его вдоль поверхности МТ. Недавно выделенный DASH комплекс [12] образует кольца вокруг МТ и является прекрасным кандидатом на роль такого сопрягающего устройства.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Desai A., Mitchison T.J. // Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 1997. V. 13. P. 83–117.
2. Wang H.W., Nogales E. // Nature. 2005. V. 435. P. 911–915.
3. Hyman A.A., Chretien D., Arnal I., Wade R.H. // J. Cell. Biol. 1995. V. 128. P. 117–125.
4. Coue M., Lombillo V.A., McIntosh J.R. // J Cell Biol. 1991. V. 112. P. 1165–1175.
5. Lombillo V.A., Stewart R.J., McIntosh J.R. // Nature. 1995. V. 373. P. 161–164.
6. Grishchuk E.L., Molodtsov M.I., McIntosh J.R., Ataullakhanov F.I. // Nature. 2005. V. 438. P. 384–388.
7. Weingarten M.D., Lockwood A.H., Hwo S.Y., Kirschner M.W. // Proc. Mat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 1858–1862.
8. Hyman A., Drechsel D., Kellogg D. et al. // Methods Enzymol. 1991. V. 196. P. 478–485.
9. Hunt A.J., McIntosh J.R. // Mol. Biol. Cell. 1998. V. 9. P. 2857–2871.
10. Muller-Reichert T., Chretien D., Severin F., Hyman A.A. // Proc. Mat. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 3661–3666.
11. Gildersleeve R.F., Cross A.R., Cullen K.E. et al. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 7995–8006.
12. Miranda J.J., De Wulf P., Sorger P.K., Harrison S.C. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2005. V. 12. P. 138–143.