ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Т.Г. ШЕВЧЕНКО
Медицинский факультет
Кафедра биологии и физиологии человека

ЦИТОСКЕЛЕТ

Часть 2
Микротрубочки.
Промежуточные филаменты

Учебное пособие

Тирасполь
Издательство Приднестровского Университета
2021

УДК 576.311.348(075.8)
ББК Е 705.132я73
Ц 74

Составители:
К. К. Вдовиченко, канд. биол. наук, доц. каф. биологии и физиологии человека
Л. И. Гарбуз, канд. биол. наук, доц., зав. каф. биологии и физиологии человека
А.В. Васильчук, ст. преп. каф. биологии и физиологии человека
С.С. Гайдей, преп. каф. биологии и физиологии человека
Р.В. Урсан, преп. каф. морфологии и общей патологии Института фундаментальной медицины Казанского (Приволжского) федерального университета

Рецензенты:
В. А. Шептицкий, д.б.н., зав., проф. каф. физиологии и санокреатологии естественно-географического факультета ПГУ им. Т. Г. Шевченко
А. И. Леорда, к.б.н., доц., вед. науч. сотр. Института физиологии и санокреатологии Академии Наук Молдовы

Ц74 **Цитоскелет.** Часть 2. Микротрубочки. Промежуточные филаменты: учебное пособие / сост.: К. К. Вдовиченко, Л. И. Гарбуз, А. В. Васильчук и др. – Тирасполь: Изд-во Приднестр. ун-та, 2021. – 88 с.

Одним из важнейших достижений современной цитологии является открытие системы фибриллярных структур клетки, объединяющих в единое целое все компоненты клеточной цитоплазмы, и получивших название цитоскелета. Среди трех известных в настоящий момент типов цитоскелетных структур (микрофиламенты, промежуточные филаменты, микротрубочки) важное место занимает система микротрубочек и промежуточных филаментов.

В данном пособии подробно представлено описание строение, функции, значение микротрубочек, промежуточных филаментов, описание белков, связанных с данными структурами цитоскелета.

Данное учебное пособие рекомендовано студентам 1-3 курсов медицинских специальностей «Лечебное дело», «Педиатрия», «Фармация», «Стоматология», а также биологических специальностей вузов.

УДК 576.311.348(075.8)
ББК Е 705.132я73

Рекомендовано Научно-методическим советом ПГУ им. Т. Г. Шевченко

© Вдовиченко К. К., Гарбуз Л. И., Васильчук А.В.,
Гайдей С.С., Р.В. Урсан, составление, 2021

ЦИТОСКЕЛЕТ
Часть 2: Микротрубочки. Промежуточные филаменты.
Учебное пособие

Составители: Константин Константинович Вдовиченко, Людмила Ильинична Гарбуз,
Анастасия Валерьевна Васильчук, Елена Ефимовна Пищенко
Издается в авторской редакции

ИЛ № 06150. Сер. АЮ от 21.02.02. Подписано в печать 19.05.21
Формат 60x90/16. Усл. печ. л. 5,5. Тираж 20 экз. Заказ № 1103

Отпечатано в Изд-ве Приднестр. ун-та. 3300, г. Тирасполь, ул. Мира, 18.
Опубликовано на Образовательном портале ПГУ им. Т.Г. Шевченко *moodle.spsu.ru*

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
МИКРОТРУБОЧКИ 5
ДИНАМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МИКРОТРУБОЧЕК 8
ДИНАМИКА МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКЕ 11
БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ЦЕНТРИОЛЕЙ 19
Белковый состав перицентриолярного материала 20
ДУПЛИКАЦИЯ ЦЕНТРОСОМ ВО ВРЕМЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА 23
ФУНКЦИИ ЦЕНТРОСОМ 26
ЦЕНТРОСОМЫ И РАК 33
Белки, связывающиеся с микротрубочками 34
Белки, связывающиеся с плюс-концами микротрубочек 37
Тубулин-секвестрирующие и тубулин-отделяющие белки 39
Моторные белки, перемещающиеся по микротрубочкам 40
Перемещение органелл 46
СТРОЕНИЕ ПОДВИЖНЫХ РЕСНИЧЕК И ЖГУТИКОВ 52
Первичные реснички выполняют важную сигнальную функцию в анимальных клетках 55
ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ И СЕПТИНЫ 58
Структура ПФ 59
Механическая функция промежуточных филаментов 59
Линкерные белки промежуточных филаментов 64
Септины 66
ПОЛЯРИЗАЦИЯ И МИГРАЦИЯ КЛЕТОК 68
Перемещение клеток по поверхности 68
Роль актина в организации движения клетки 70
Строение ламеллоподий 72
Роль миозина в движении клетки 77
Роль белков семейства Rho в поляризации клетки 80
Активация белков Rho-семейства внеклеточными сигналами 84
Внешние сигналы могут диктовать направление миграции клетки 84
Коммуникация между элементами цитоскелета координирует клеточную поляризацию и движение 86
ЛИТЕРАТУРА 88

ВВЕДЕНИЕ

Каркасно-двигательная система (цитоскелет) клетки осуществляет фиксацию составных частей клетки в определенном положении и обеспечивает клеточные формы движения. Большую роль эта система играет в процессах, связанных с делением клетки. Опорно-двигательная система клетки образована тремя основными элементами: микротрубочками, микрофиламентами и промежуточными филаментами.

Эти элементы входят в состав более сложно организованных органелл (ресничек, жгутиков, микроворсинок, клеточного центра) и клеточных соединений (десмосом и др.).

МИКРОТРУБОЧКИ

Структура микротрубочек более сложная по сравнению с актиновыми филаментами. Они высоко динамичны и играют различные важные роли в клетке.

Микротрубочки – это полимеры белка тубулина. Сам тубулин – это гетеродимер, образованный из двух близкородственных глобулярных белков – α- и β-тубулина, в каждой из которых насчитывается 445-450 аминокислотных остатков, субъединицы связаны прочно друг с другом ковалентной связью (рис. 1).

Эти два тубулиновых белка находятся только в гетеродимерной форме, и каждый мономер – α и β имеет сайт связывания с одной молекулой ГТФ.

Молекула ГТФ, связанная с α-тубулином, заперта в ловушке, поскольку находится внутри димера – в месте взаимодействия мономеров, и она никогда не гидролизуется и не обменивается, поэтому её можно рассматривать как составную (интегральную) часть димерной структуры. А вот нуклеотид в β-тубулине может быть либо в форме ГТФ, либо в ГДФ и также может обмениваться в растворимой (неполимеризованной) форме тубулинового димера. Тубулин присутствует во всех эукариотических клетках, он существует во множестве изоформ. Тубулины дрожжей и человека идентичны на 75 % по аминокислотной последовательности. У млекопитающих существует как минимум 6 форм α-тубулина и такое же число β-тубулинов, каждый их которых кодируется своим геном. Различные формы тубулина очень похожи, и в общем случае они могут сополимеризоваться в пробирке в смешанные микротрубочки.

Тем не менее эти разные тубулины могут находиться в клетке в разных местах и тканях, а также выполнять слегка отличающиеся функции. В качестве наглядного примера можно привести паралич глазного яблока из-за паралича окулярного нерва, причиной которого служат мутации в определенном гене β-тубулина. Многие неврологические болезни человека связаны со специфическими мутациями в разных тубулиновых генах.

Микротрубочка – это полая цилиндрическая структура, построенная из 13 параллельных протофиламентов, каждый из которых

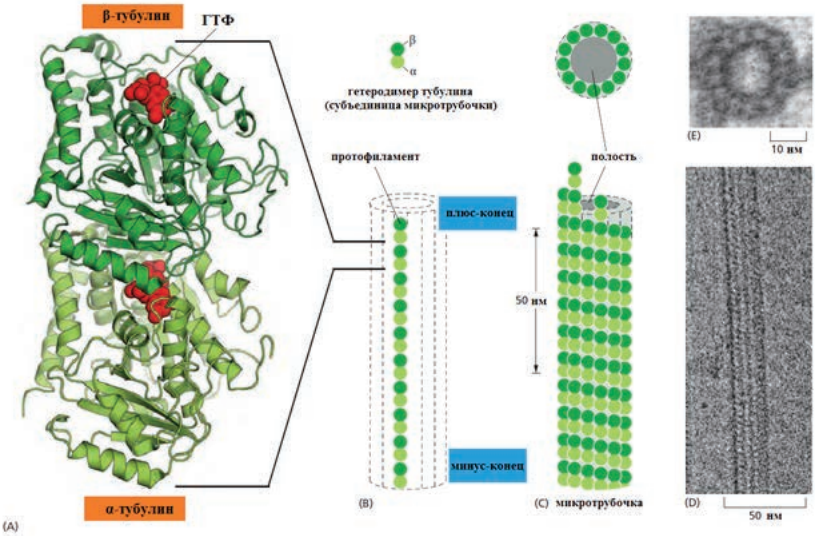


Рис. 1. Структура микротрубочки и её субъединиц.
A – субъединица каждого протофиламента – это тубулиновый гетеродимер, состоящий из прочно связанной пары α- и β-мономеров тубулина. Молекула ГТФ в α-тубулине настолько плотно связана, что можно подумать, что она – интегральная часть белка. Молекула ГТФ в β-тубулиновом мономере менее плотно связана и играет важную роль в динамике филаментов. Оба нуклеотида показаны ***красным***.
B – одна тубулиновая субъединица (αβ-гетеродимер) и один протофиламент показаны схематически. Каждый протофиламент состоит из многих примыкающих друг к другу субъединиц в одинаковой ориентации.
C – микротрубочка – это полый упругий стержень, сформированный из 13 параллельных протофиламентов.
D – короткий сегмент микротрубочки (электронная микроскопия).
E – электронная микрофотография среза микротрубочки. Видно кольцо, состоящее из 13 протофиламентов.

состоит из αβ-тубулиновых гетеродимеров, уложенных стопкой способом «голова к хвосту», а затем образующих трубку (рис. 1B). При сборке микротрубочек формируются два новых белок-белковых контакта. Вдоль продольной оси микротрубочки верхушка β-тубулиновой молекулы образует место взаимодействия с низом α-тубулиновой молекулы соседнего гетеродимера (рис. 2). Такое взаимодействие удерживает α и β-мономеры вместе в димерной субъединице, при этом энергия связи высока. Перпендикулярно этому взаимодействию соседние протофиламенты формируют латеральные контакты. Поскольку продольные и латеральные контак-

ты повторяются во время сборки, небольшой сдвиг в латеральных контактах приводит к спиралевидной форме укладки (в решётке) в микротрубочке. Поскольку множественные контакты внутри решетки микротрубочки удерживают большинство субъединиц в микротрубочке, добавление и удаление субъединиц происходит практически исключительно на концах.

Эти множественные контакты придают микротрубочке упругость, и её трудно изогнуть. Микротрубочки – это самые упругие и прочные структурные элементы из всех в большинстве клеток. Субъединицы каждого протофиламента в микротрубочке ориентированы в одном и том же направлении, а сами протофиламенты параллельны друг другу.

Таким образом, решетка микротрубочки сама по себе имеет структурную полярность: α-субъединицы находятся со стороны минус-конца, а β-субъединицы – со стороны плюс-конца.

Как и для актиновых филаментов, регулярная параллельная ориентация субъединиц придает микротрубочкам структурную полярность: плюс-концы растут или укорачиваются быстрее (рис. 3).

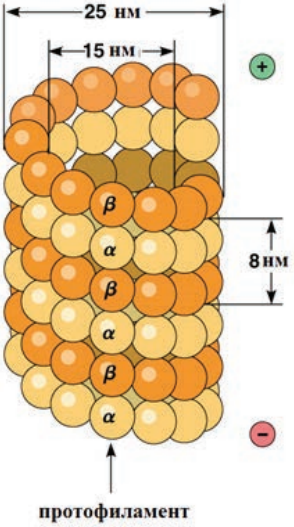


Рис. 2. Микротрубочка и входящие в её состав протофиламенты

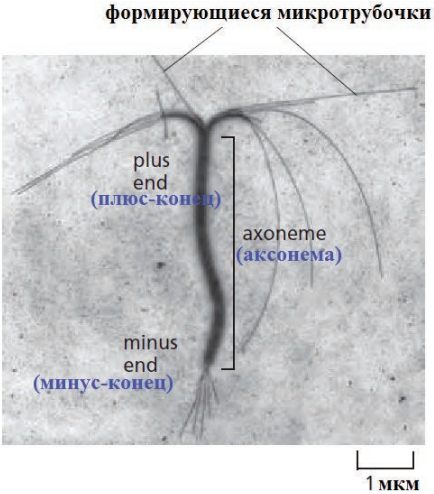


Рис. 3. Предпочтительный рост микротрубочек с плюс-конца. Микротрубочки растут быстрее с одного конца, чем с другого. Стабильный пучок микротрубочек, в центре реснички (называемый ***аксонемой***) инкубировали короткое время с тубулиновыми субъединицами в условия полимеризации. Микротрубочки росли быстрее с плюс-конца пучка микротрубочек – на микрофотографии это ***верхняя*** часть

ДИНАМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МИКРОТРУБОЧЕК

На динамику микротрубочек, как и на динамику актиновых филаментов, глубокое влияние оказывает связывание и гидролиз нуклеотидов – ГТФ в данном случае. Гидролиз ГТФ происходит только в β-субъединицах тубулиновых димеров. Гидролиз протекает очень медленно в свободных тубулиновых субъединицах, но скорость его повышается, когда эти субъединицы включаются в микротрубочки. После гидролиза ГТФ высвобождается свободная фосфатная группа (неорганический фосфат), а с β-тубулином в решетке микротрубочки остается связанным ГДФ. Таким образом, как и в случае с актиновыми филаментами, могут существовать две разных структуры микротрубочек, это Т-форма (связанная с ГТФ) и Д-форма (связанная с ГДФ). Энергия гидролиза нуклеотида запасается в виде эластичной деформации в решетке полимера, что делает изменение свободной энергии диссоциации субъединицы из Д-формы полимера более отрицательным, чем для диссоциации субъединицы из Т-формы полимера. На одной и той же микротрубочке один из концов может расти некоторое время, поскольку он находится в Т-форме, но затем он внезапно оказывается в Д-форме и начинает быстро укорачиваться, даже если концентрация свободных субъединиц поддерживается постоянной. Немного позже этот же конец может опять оказаться в Т-форме, и снова начнет расти. Такая быстрая интерконверсия между растущим и укорачивающимся состоянием при одной и той же концентрации субъдиниц называется динамической нестабильностью (рис. 4).

Смена роста на укорачивание называется ***катастрофой*** *(catastrophe),* а возобновление роста называется ***спасением*** *(rescue).* В популяции микротрубочек в каждый момент времени некоторое количество концов находится в Т-форме, а некоторое – в Д-форме в пропорции, определяемой скоростью гидролиза и концентрацией субъединиц. *In vitro* структурная разница между концами в Т- и Д-форме очень существенна. Тубулиновые субъединицы со связанными с ГТФ β-мономерами дают прочные протофиламенты, которые образуют надежные и регулярные латеральные контакты друг с другом. Но при

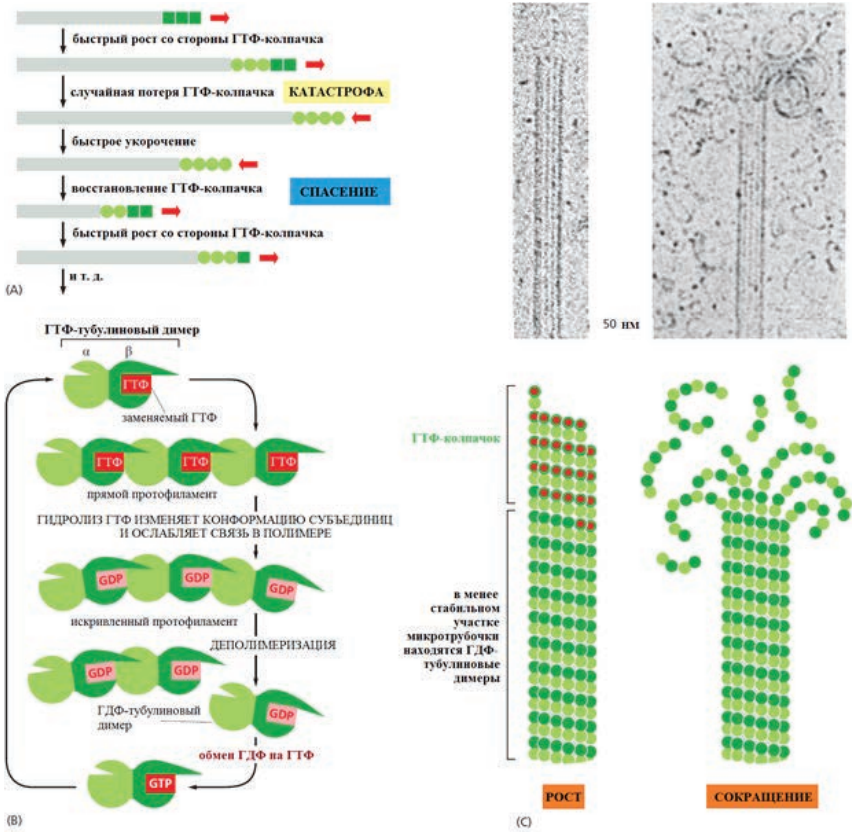


Рис. 4. Динамическая нестабильность, возникающая из-за структурных различий. между растущими и укорачивающимися концами микротрубочки

А – если концентрация свободного тубулина в растворе является промежуточной, то один и тот же конец микротрубочки может подвергаться трансформации от растущего состояния к укорачивающемуся.

В – модель последовательности структурных изменений при гидролизе ГТФ. При добавлении ГТФ-тубулина протофиламент растет в линейную конформацию, которая может легко включаться в цилиндрическую стенку микротрубочки. Гидролиз ГТФ после сборки изменяет конформацию субъединиц и стремится придать им искривленную форму, которую труднее упаковать в стенку микротрубочки.

С – в интактной микротрубочке протофиламенты, состоящие из ГДФ-субъединиц, удерживаются в линейной конформации за счет многих латеральных связей внутри стенки микротрубочки, имея стабильный колпачок из ГТФ-субъединиц. Потеря ГТФ-колпачка позволяет ГДФ-протофиламентам расслабиться и принять более искривленную конформацию, что приводит к прогрессивному разрушению микротрубочки. На электронной микрографии показаны реальные микротрубочки в каждом из перечисленных состояний.

гидролизе ГТФ до ГДФ происходят незначительные конформационные изменения в белке, которые заставляют протофиламенты изгибаться (рис. 4B). На быстрорастущей микротрубочке ГТФ-колпачок ограничивает искривление протофиламентов, и потому конец кажется ровным. Но когда оконечные субъединицы гидролизуют свои нуклеотиды, это ограничение снимается, и искривленные протофиламенты отпружинивают в сторону. Такое кооперативное высвобождение энергии гидролиза, запасенное в решетке микротрубочки, вызывает быстрое слущивание искривленных протофиламентов, а искривленные олигомеры, содержащие ГДФ-тубулин, часто обнаруживают поблизости возле деполимеризующегося конца микротрубочки (рис. 4C).

ДИНАМИКА МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКЕ

Динамика микротрубочек в живых клетках мало отличается от их динамики микротрубочек в пробирке. В любой момент времени плюс-конец множества микротрубочек скорее всего будет расти, как это было установлено благодаря наличию белков, связывающихся с концами микротрубочек (рис. 5).

Несмотря на то, что катастрофы на трубочках происходят примерно раз в минуту, микротрубочки быстро сокращаются. Множество интерфазных микротрубочек остаются длинными благодаря тому, что вероятность «спасения» высока (примерно в 5 раз выше катастрофы). Постоянный рост во время элонгационной фазы (со скоростями 0.11 мкм/с) восстанавливает длину микротрубочек ещё до того, как произойдет следующая катастрофа. Результатом такой динамической нестабильности является то, что у массы интерфазных микротрубочек время полураспада (полужизни) составляет примерно 10 минут. У большинства микротрубочек минус-концы стабилизированы γ-тубулиновым кольцевым комплексом *(см. далее)* в ЦОМТ (рис. 6) либо другими белками, однако некоторые микротру-

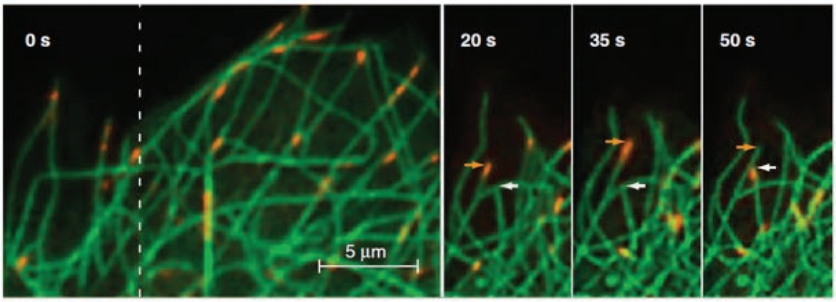


Рис. 5. Временной ряд микрофотографий из клеток яичника китайского хомячка (*Chinese Hamster Ovary,* ***CHO***), экспрессирующих белок, связывающийся с плюс-концом микротрубочек CLIP-170, помеченный зеленым флюоресцентным белком (на рисунке изображен ***красным***). В клетки также был введен тубулин, меченный краской Cy3 для визуализации микротрубочек (изображен ***зеленым***). Белок CLIP-170 концентрируется на растущих плюс-концах микротрубочек.
CLIP - cytoplasmic linker protein (цитоплазматический линкерный белок)

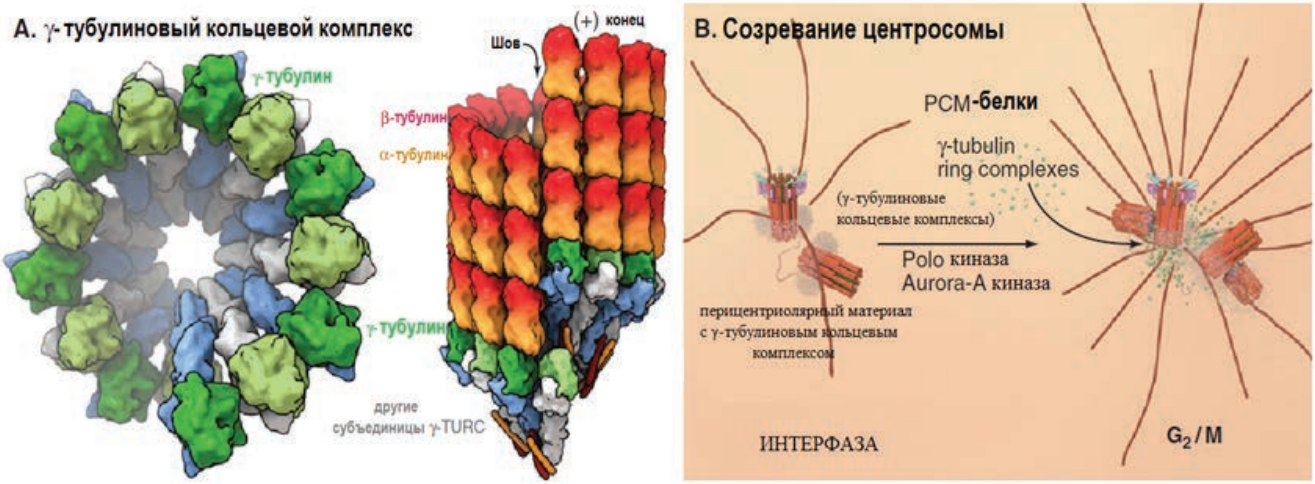


Рис. 6. **γ**-тубулиновыйкольцевой комплекс.

А – реконструкция дрожжевого γ-тубулинового малого комплеккса из электронных микрофотографий и *(справа)* модель активного γ-тубулинового кольцевого комплекса (***γ tubulin ring complex, γTuRC***) на минус-конце микротрубочки.

В – нуклеация микротрубочек с помошью γTuRC на перицентриолярном материале. По мере приближения клетки к митозу привлекаются γTuRC в ответ на активацию киназ Polo-like и Aurora-A.

бочки имеют свободные минус-концы, которые могут удлиняться и сокращаться.

Динамическая нестабильность позволяет микротрубочкам исследовать всю цитоплазму в поисках своих мишеней, например, кинетохоров на хромосомах во время митоза (рис. 7).

Динамическая нестабильность микротрубочек помогает белкам, связывающимся с концами микротрубочек, (включая сигнальные белки), концентрироваться возле подмембранного пространства (в клеточном кортексе). Флуктуации в длине микротрубочек - это использование энергии, которая запасена в теле микротрубочек для выполнения механической работы, например, перемещения грузов от центра клетки к её периферии; позиционирования ядра в центре клетки, (у делящихся дрожжей); либо для смещения митотического веретена от центра в клетках, которые делятся ассиметрично. В то же время локальное окружение может влиять на поведение микротрубочек по мере того, как они исследуют цитоплазму. Например, при помощи сигнальных путей в кортексе, с участием ГТФазы семейства ***Rho*** и киназы, микротрубочки локально стабилизируются или пучкам микротрубочек придаётся определенное направление.

Функции микротрубочек ингибируются как полимер-стабилизирующими, так и полимер-дестабилизирующими веществами. Химические вещества, влияющие на полимеризацию или деполимеризацию микротрубочек, являются мощным инструментом для исследования роли этих полимеров в клетке. ***Колхицин*** и ***нокодазол*** взаимодействуют с тубулиновыми субъединицами и приводят к деполимеризации микротрубочек.

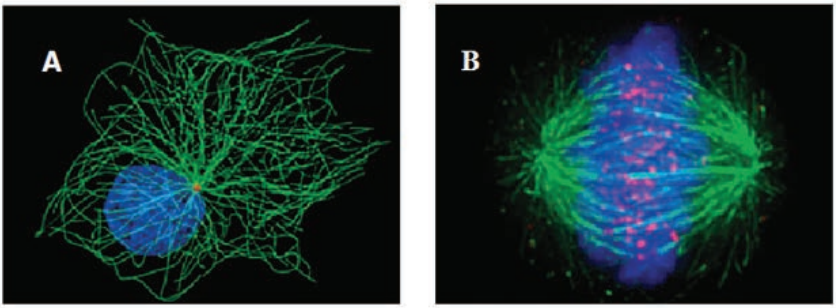


Рис. 7. Клетки позвоночных в культуре.
А – микротрубочки (***зеленые***) радиально расходятся от центросомы (***красная***) вблизи ядра (***голубое***) в интерфазной клетке.
В – клетки линии ***HeLa*** (Henrietta Lacks) в митозе. Микротрубочки (***зеленые***) расходятся от двух полюсов к хромосомам (***голубые***). Центромеры помечены ***красным.***

Таксол связывается с микротрубочками и стабилизирует их, вызывая усиленную полимеризацию тубулина (см. часть 1, табл. 1).

Подобные вышеприведенным вещества оказывают сильный и быстрый эффект на организацию микротрубочек в живых клетках. Как деполимеризующие микротрубочки вещества (такие как нокодазол), так и полимеризующие их (такие как Таксол) преимущественно разрушают делящиеся клетки, поскольку динамика микротрубочек играет ключевую роль в правильной работе митотического веретена. Некоторые из этих веществ эффективно убивают определенные типы опухолевых клеток, хотя и не без токсического эффекта на быстроделящиеся нормальные клетки, включая костный мозг, кишечник и волосяные фолликулы. Таксол, в частности, широко используется для лечения опухолей молочной железы и легких. Он часто оказывается эффективным при лечении опухолей, резистентных к другим хемотерапевтическим агентам.

Белковый комплекс, содержащий γ-тубулин, является местом зарождения микротрубочек. Для образования микротрубочки с помощью спонтанной нуклеации требуется взаимодействие сразу множества тубулиновых гетеродимеров, поэтому концентрация тубулиновых субъединиц должна быть очень высокой.

α- и β-тубулины – это строительные блоки микротрубочек. γ-тубулин участвует в инициации роста микротрубочек и присутствует в значительно меньших количествах. Он найден в организмах от дрожжей до человека.

Микротрубочки обычно начинают образовываться внутри клетки в определенном месте, известном как центр организации микротрубочек (ЦОМТ), где γ-тубулинов особенно много. Нуклеация во многих случаях зависит от γ-тубулин – кольцевого комплекса (***γ-tubulin ring complex*** или ***γ-TuRC***). Внутри этого комплекса два вспомогательных белка связываются с γ-тубулином и с несколькими другими белками, помогающими создать спиральное кольцо из молекул γ-тубулина, которое служит в качестве матрицы, на которой собирается микротрубочка из 13 протофиламентов (см. рис. 6).

У многих клеток имеется один хорошо структурированный ЦОМТ, называемый центросомой, расположенный возле ядра. В ЦОМТе микротрубочки заякориваются (нуклеируются) своим минус-концом, так что плюс-конец смотрит наружу, постоянно растет и укорачивается, зондируя весь объем клетки (рис. 8).

Нуклеация микротрубочек может происходить и в другом месте клетки, но механизм, активирующий нуклеацию микротрубочек на ЦОМТ или в других местах, пока не ясен.

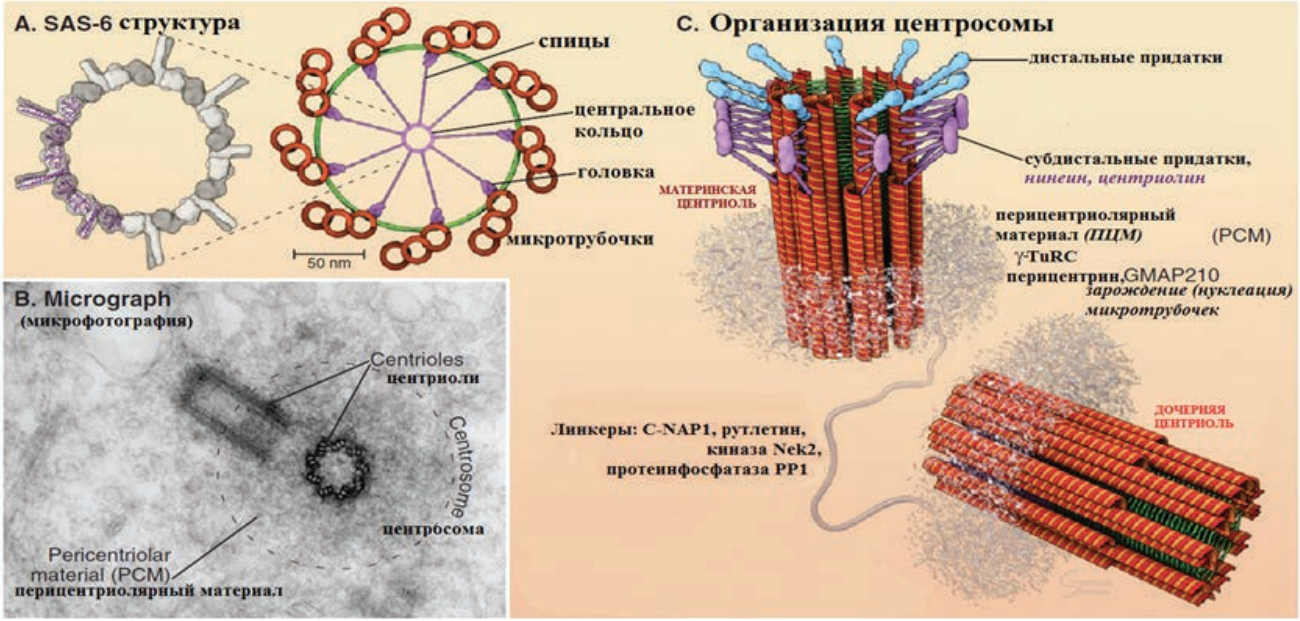


Рис. 8. Структура центриолей.

А – модель - белок SAS-6 образует структуру с 9-кратной симметрией, эта структура входит в центр центриоли.

В – электронная микрофотография тонкого среза спаренных центриолей, окруженных перицентриолярным материалом.

С – диаграмма структуры центриолей; указаны положения некоторых характерных белков.

Было обнаружено множество белков, которые заякоривают γ-TuRC на центросоме, В центромере объединены две центриоли (пара цилиндрических структур, находящихся под прямым углом друг к другу в виде латинской буквы L). Центриоль состоит из цилиндрического набора коротких модифицированных микротрубочек, уложенных в бочонкоподобную структуру с очень четкой 9-кратной симметрией (рис. 9).

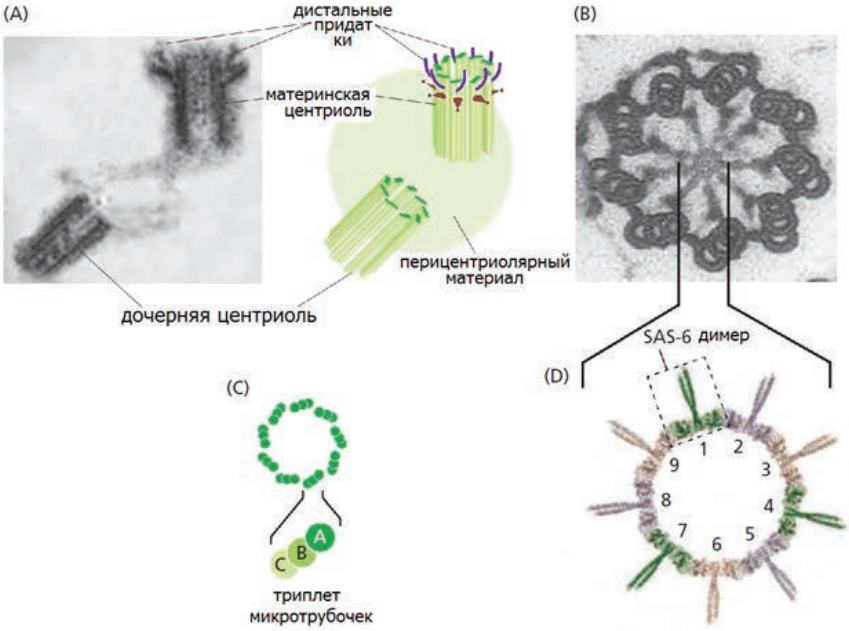


Рис. 9. Пара центриолей в центросоме.
А – электронная микрография тонкого среза выделенной центромеры показывает материнскую центриоль с её дистальными придатками и соседнюю дочернюю центриоль, образовавшуюся в результате удвоения во время S-фазы. Центриоли в центросоме окружены плотным матриксом перицентриолярного материала, из которого нуклеируют микротрубочки. Центриоли также служат в качестве базальных телец для нуклеации аксонем ресничек.
В – электронная микрография сечения через центриоль. Каждая центриоль состоит из 9 триплетов, образующих цилиндр.
С – каждый триплет содержит одну цельную микротрубочку (микротрубочка А), связанную с незавершенными микротрубочками (микротрубочки В и С).
D – центриолярный белок SAS-6 образует суперспиральный димер. Девять SAS-6-димеров самособираются в кольцо, расположенное в середине структуры наподобие колеса телеги. Полагают, что именно это SAS-6-кольцо задает 9-кратную симметрию центриоли.

Совместно со множеством вспомогательных белков, центриоли организуют ***перицентриолярный материал***, на котором происходит нуклеация микротрубочек.

Центросомы дуплицируются и разделяются на две части перед митозом, при этом каждая содержит дуплицированную пару центриолей.

Центросомы расходятся к противоположным сторонам ядра в начале митоза, и затем каждая формирует полюс митотического веретена.

Организация микротрубочек значительно варьирует у разных видов и клеточных типов.

В культивируемых клетках звездоподобная конфигурация микротрубочек довольно жесткая, динамичные плюс-концы её направлены к периферии клетки, а стабильные минус-концы собраны вблизи ядра. Система микротрубочек, радиально распространяющихся из центросомы, действует как устройство для инспектирования удаленных регионов клетки и для позиционирования центросомы посредине клетки. Даже в выделенном фрагменте клетки без центросомы динамические микротрубочки упорядочивают сами себя в звезду, в которой минус-концы кластеризуются в центре с помощью белков, связывающихся с минус-концами (рис. 10).

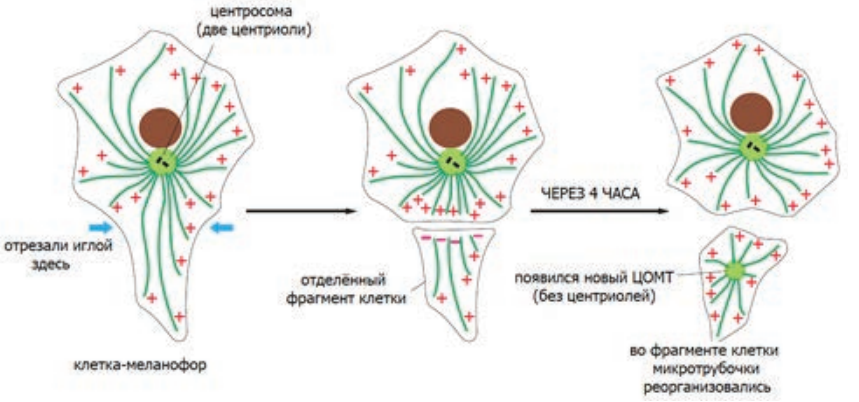


Рис. 10. Набор микротрубочек способен находить центр клетки. После того, как часть пигментной клетки рыбы была удалена при помощи иглы, микротрубочки в отделенном фрагменте клетки реорганизовались так, что их минус-концы сгруппировались в центре фрагмента, погруженные в новый центр организации микротрубочек.

Такая способность микротрубочкового цитоскелета находить центр клетки дает возможность организовать общую систему координат, которая затем используется для распределения органелл в клетке. Высокодифференцированные клетки со сложной морфологией, такие как нейроны, мышечные клетки и эпителиальные клетки, должны использовать дополнительный измерительный механизм для работы системы внутренних координат. Так, например, при образовании межклеточного контакта между эпителиальными клетками, минус-концы микротрубочек движутся к участкам возле апикальной мембраны. Из этого несимметричного положения набор микротрубочек вытягивается вдоль длинной оси клетки, при этом плюс-концы направлены на базальную мембрану.

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ЦЕНТРИОЛЕЙ

Центриоли – это цилиндрические структуры, обычно построенные из 9 триплетов микротрубочек, однако некоторые центриоли устроены проще: у мух они состоят из дублетов, а у нематоды просто одиночные микротрубочкки. У старшей **материнской центриоли** в каждой паре есть придатки, отсутствующие у **дочерней центриоли**.

С помощью электронной микроскопии была определена общая и кристаллическая структуры компонентов центриоли. В состав центриолей входит много белков. Наиболее многочисленными белками в центриолях являются α- и β-тубулин. Центриолярные микротрубочки более стабильны, чем цитоплазматические, за один клеточный цикл в них обновляется всего лишь 10 % тубулинов.

Как и в других стабильных микротрубочках, α- и β-тубулины в центриолях полиглутамилированы (полиглутамилирование – форма обратимой посттрансляционной модификации остатков глутаминовой кислоты в белках, рис. 11). При инъекции в клетку антител к глутамилированному тубулину происходит разборка центриолей и перицентриолярного материала.

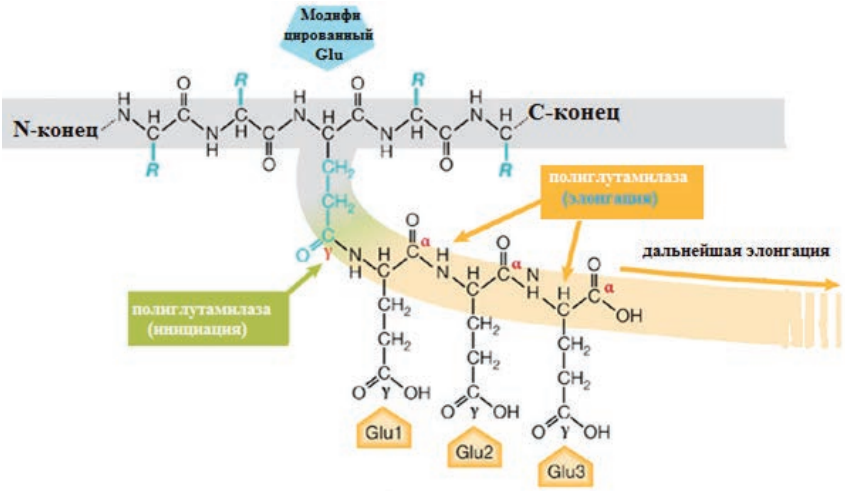


Рис. 11. Полиглутамилирование белковых цепей в тубулинах

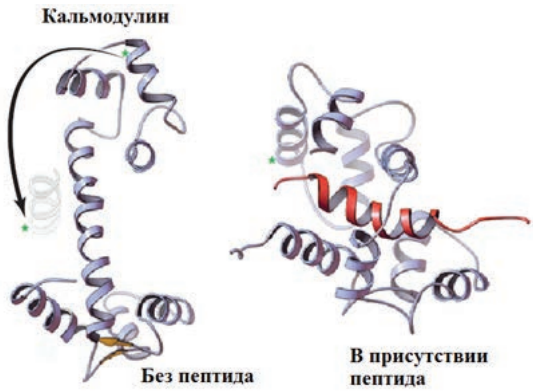


Рис. 12. Кальмодулин связывается с ионами Ca2+ и оборачивается вокруг α-спирали (***красная***) в белках-мишенях. Заметьте, как сильно изменилось положение спирали, помеченной ***звёздочкой***

Остальные белки в центриолярных структурах присутствуют в меньших количествах. Олигомеры белка SAS-6 образуют круг или спираль с девятикратной симметрией, которая лежит в основе сборки девяти триплетов микротрубочек во время формирования центриоли, как ступица в тележном колесе (см. рис. 8 А). Такая «формирующая» структура обычно отсутствует в зрелых материнских центриолях. Дистальные придатки заякоривают материнскую центриоль на плазматическую мембрану, если центриоль служит в качестве базального тельца в ресничках. Другие белки образуют субдистальные придатки на материнской центриоли (см. рис. 8 С). Нинеин (найнин) помогает заякоривать минус-концы микротрубочек на центросоме, а центриолин, вероятно, заякоривает белки, контролирующие клеточный цикл и регулирующие стабильность микротрубочек. Два больших фибриллярных (суперспиральных) белка – ***C-NAP1*** и ***рутлетин*** – образуют волокна, объединяющие перицентриолярный материал вокруг двух центриолей.

В центриолях также содержится большое количество изоформ центрина – белка, имеющего EF-hand-мотив и связывающего кальций. Этот белок похож на кальмодулин (рис. 12).

Белковый состав перицентриолярного материала

Высокомолекулярные (большие) суперспиральные белки окружают материнскую центриоль и образуют перицентриолярный материал (ПЦМ). Такая подмостковая структура объединяет в себе сеть γTuRC, киназ, фосфатаз и других белков – всего их более ста. На электронной микрофотографии тонкого среза видно, ПЦМ не представляет собой органеллу, и в нём не выявляется никаких внутрен-

них регулярных структур (рис. 8 В). При помощи флуоресцентной микроскопии определена организация белков в ПЦМ.

В течении клеточного цикла ПЦМ меняется. Во время интерфазы, белок перицентрин формирует одинарный слой вокруг центриоли. При этом один конец перицентрина связывается с центриолярными микротрубочками, а другой его конец радиально проходит по слою наружу и взаимодействует с γTuRC и другими белками (рис. 13).

Позднее в клеточном цикле митотические киназы (***Polo-like kinase*** и ***Aurora kinase***) примут участие в разрастании ПЦМ, в котором появится больше копий γTuRC и других перицентриолярных белков. На большой митотической центросоме происходит сборка новых микротрубочек быстрее, чем в интерфазе.

Комплекс γTuRC – это сборка 14 молекул γ-тубулина, поддерживаемых вспомогательными белками, при этом формируется комплекс наподобие стопорной шайбы (рис. 14).

Строительным блоком при постройке γTuRC является малый комплекс двух γ-тубулинов с двумя поддерживающими белками. На этом γ-тубулиновом кольцевом комплексе начинается сборка α-/β-тубулиновых димеров в микротрубочку из 13 протофиламентов.

Также образуется «рубец». Комплекс кэпирует минус-конец микротрубочки, а растет эта микротрубочка со своего свободного плюс-конца.

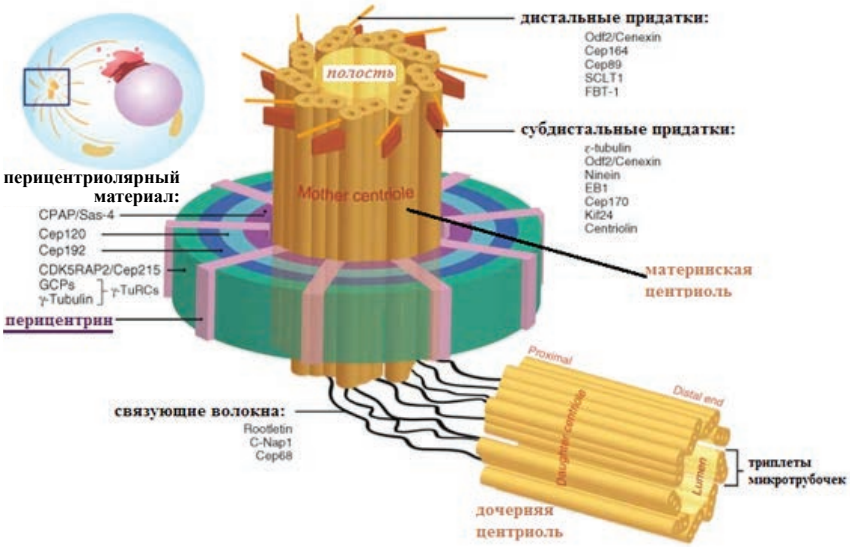


Рис. 13. Архитектура перицентриолярного материала

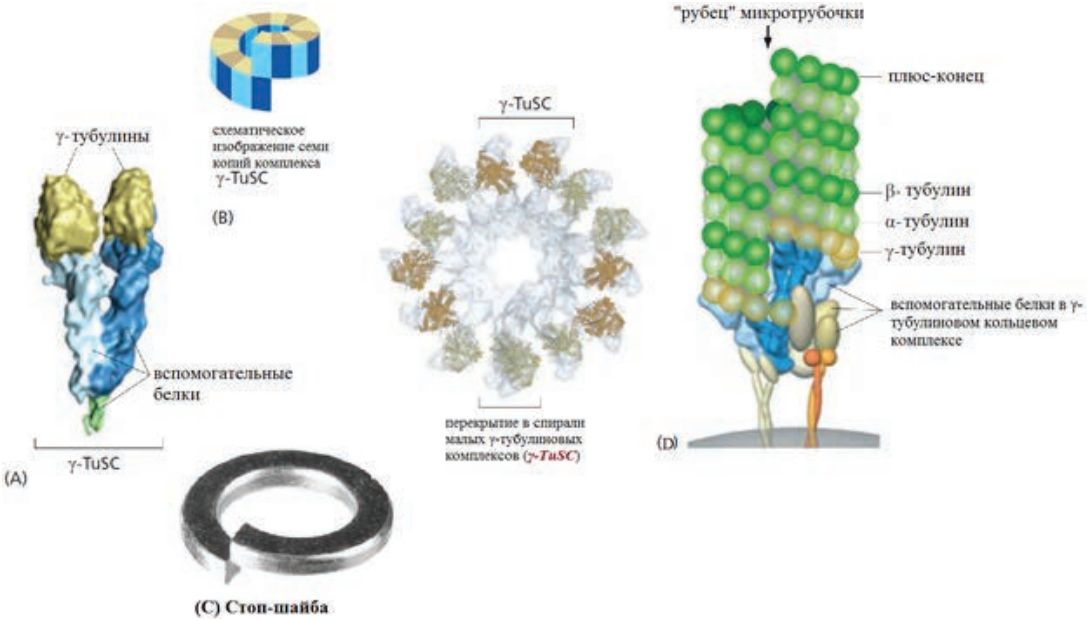


Рис. 14. Сборка микротрубочки на γ-тубулиновом кольцевом комплексе.
A – две копии γ-тубулина связываются с парой вспомогательных белков и образуют малый γ-тубулиновый комплекс (γ-TuSC).
B – семь копий γ-TuSC объединяются и образуют спиральную структуру, в которой последний γ-тубулин лежит под первым, в такой структуре 13 γ-тубулиновых субъединиц смотрят наружу, находятся в кольце, в ориентации, которая совпадает с ориентацией 13 протофиламентов в микротрубочке.
C – для сравнения дано изображение стоп-шайбы (шайбы Гровера).
D – во многих типах клеток спираль γ-TuSC объединяется с другими вспомогательными белками и образует кольцевой γ-тубулиновый комплекс (γ-TuRC), на котором заякоривается минус-конец микротрубочки.
Обратите внимание на сдвиг в продольном направлении между двумя протофиламентами вследствие спиральной ориентации γ-тубулиновых субъединиц. У микротрубочки появляется как бы рубец, который нарушает регулярную структуру на конце

ДУПЛИКАЦИЯ ЦЕНТРОСОМ ВО ВРЕМЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Цикл полуконсервативной дупликации центросом и их разделения прочно связан с клеточным циклом (рис. 15).

Репликация центросомы начинается в S-фазе - когда начинает реплицироваться ядерная ДНК. Этот процесс зависит от циклин-зависимой киназы Cdk2 (активируемой циклином E и/или циклином A). Данная киназа выключает убиквитин E3-лигазу APC/C^{CDH1}, что позволяет накопиться белкам, необходимым для репликации центриолей. В этом процессе также важна polo-like киназа (Поло-подобная киназа, у человека это PLK4), которая как раз в это время включается. Каждая центриоль запускает построение новой центриоли, которая будет расположена к ней под прямым углом к проксимальному концу начальной центриоли. И таким образом предыдущая дочерняя центриоль становится новой материнской центриолью, или $М^{нов}$ (рис. 15). Адапторный белок, находящийся на одной стороне на каждой материнской центриоли, привлекает polo-like киназу, которая активирует белки, позволяющие произвести сборку SAS-6 в большое «тележное колесо», имеющее девятикратную симметрию (см. рис. 8 А). В зависимости от биологического вида, SAS-6 образует стопку колец или спираль. Такая стопка (спираль) с другим белком, ***SAS-4***, образует матрицу, на которой будет собираться кольцо из девяти единичных микротрубочек – процентриоль. Затем это кольцо единичных (синглетных) микротрубочек будет превращено в сборку из девяти триплетов, а сам процесс такого превращения зависит от δ- и ε-тубулинов (в большинстве организмов). Дочерние центриоли постепенно удлиняются в оставшейся части клеточного цикла, достигая своей полной длины непосредственно перед митозом. Как раз тогда $М^{нов}$ приобретает дистальные и субдистальные придатки и становится морфологически и функционально эквивалентной старой материнской центриоли, или $М^{стар}$.

Таким образом, перед входом в митоз в клетке есть три типа центриолей, различающихся по возрасту, структуре и активности (см. рис. 15). Две материнские центриоли – $М^{стар}$ и $М^{нов}$ – спарены каждая с одной из идентичных дочерних центриолей. $М^{стар}$ была со-

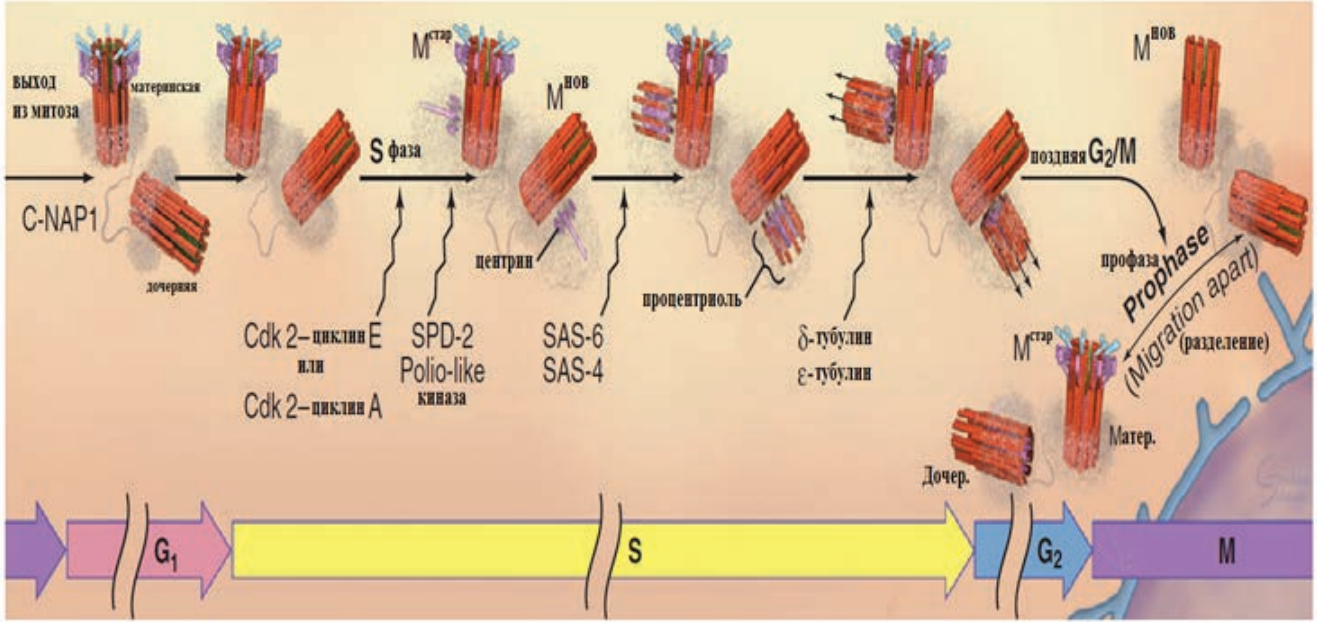


Рис. 15. Дупликация центриолей и клеточный цикл

брана еще в позапрошлом клеточном цикле, а $M^{нов}$ – в прошлом. Дочерние центриоли были собраны в S-фазе текущего клеточного цикла. В клетках человека на этой стадии «тележное колесо» из SAS-6 белков исчезает в дочерних центриолях.

«Отношения родства» среди этих четырех центриолей изменяются, когда клетка входит в митоз. Примерно во время перехода из G2-фазы в митоз киназа ***Nek2*** фосфорилирует фибриллярный белок ***C-NAP1***, при этом волокно, соединяющее две пары отреплицировавшихся центриолей, разрушается, что позволяет парам центриолей разойтись. Во время профазы кинезин-5 и другие моторные белки растаскивают две пары центриолей, шагая по поверхности ядерной оболочки, чтобы «учредить» два полюса митотического веретена. Во время анафазы каскад митотических киназ (Cdk1 → Aurora A → polo-like kinase 1) отделяют новые дочерние центриоли от материнских, но при этом центриоли в полюсах остаются связанными между собой гибкими линкерами между своими проксимальными концами (см. рис. 8 C).

Если искусственно удалить центросомы из нормальной клетки, то она всё равно может входить в митоз и строить биполярное митотическое веретено, используя при этом моторные белки для построения и реконструирования микротрубочек. Такие клетки медленно завершают митоз, а около 40 % из них разделяются цитокинезом. Они затем строят новые центриоли *de novo* («с нуля») во время S-фазы следующего клеточного цикла и восстанавливают свои клеточные центры. Однако если продолжать подавлять образование центросом с помощью препаратов, то это будет косвенным образом затруднять пролиферацию вследствие ошибок в расхождении хромосом.

ФУНКЦИИ ЦЕНТРОСОМ

Основной функцией центросом является нуклеация, заякоривание и организация микротрубочек как во время интерфазы, так и митоза. В тоже время существуют другие механизмы организации митотического веретена, включая моторные белки, поскольку растения и некоторые клетки животных способны образовывать митотическое веретено и другие структуры микротрубочек без участия центросом. Также большинство стадий развития плодовой мушки может происходить без центромер, однако отсутствие ресничек при этом становится летальным.

Вокруг материнской центриоли γTuRC-комплекс, находящийся в ПЦМ, нуклеирует микротрубочки, кэпируя (и тем самым стабилизируя) их минус-концы, а плюс-концы начинают исследовать цитоплазму, поскольку они растут, и динамически нестабильны (см. выше). Дистальные и субдистальные придатки на центриоли $M^{стар}$ помогают заякоривать минус-концы этих микротрубочек. При этом создается радиальный набор микротрубочек, в котором центриоль $M^{стар}$ располагается по центру (рис. 16). Перицентриолярный материал расширяется по мере того, как клетка входит в митоз, тем са-

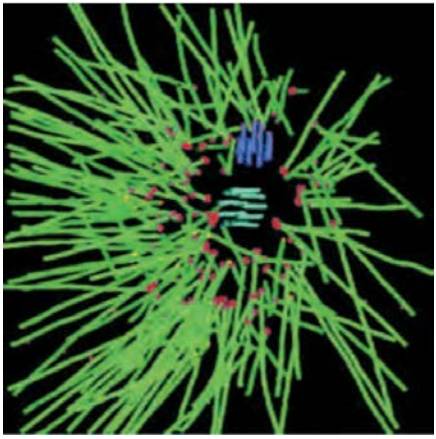


Рис. 16. Клетки *C. elegans.* На реконструкции ЦОМТ (центра организации микротрубочек) видны плотные пучки микротрубочек, отходящие от центросомы

мым увеличивается его вместимость по микротрубочкам для веретена деления (рис. 6 В).

Если экспериментально разрушить центросомы, цитоплазматические микротрубочки, исходящие из центросомы, разрушатся, однако другие цитоплазматические микротрубочки продолжат своё существование (рис. 17).

Во многих дифференцированных клетках микротрубочки вначале собираются (нуклеируют) на центросомах, затем отсоединяются от них и вновь заякориваются либо снова на центросомах, либо где-то в цитоплазме – например, на апикальной мембране в эпителиальных клетках (рис. 18). В нейронах микротрубочки открепляются от центросом и транспортируются по аксонам и дендритам (рис. 19).

Пучок поляризованных динамичных микротрубочек, расходящихся от центросомы, сильно влияет на распределение мембранных органелл в цитоплазме.

ЭПС обычно рассеян (диспергирован) по периферии цитоплазмы. Такое его положение осуществляется транспортировкой цен-

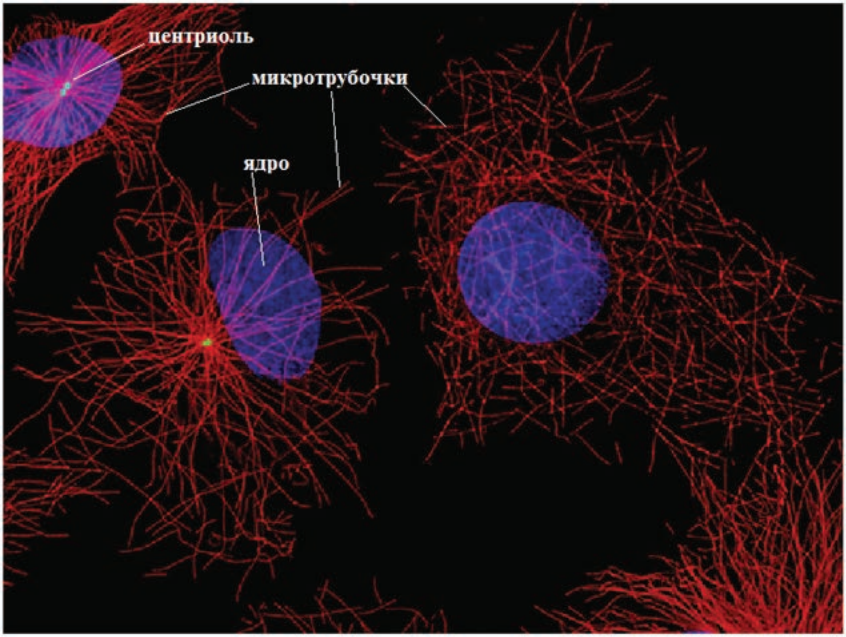


Рис. 17. Центросомы и микротрубочки в клетке.
Разрушение центросомы лазером не приводит к прекращению сборки цитоплазматических микротрубочек, однако они становятся неорганизованными

тросомы с помощью кинезинов и растущих плюс-концов микротрубочек. Таким образом, положение центросомы и ассоциированных с ней микротрубочек может поляризовать секреторные пути. Так, например, цитотоксические Т-лимфоциты перемещают центросому к клеточному кортексу, соседствующему с клеткой-мишенью, так что секреция порообразующих белков помогает лизировать мишень.

С другой стороны, аппарат Гольджи и эндосомы аккумулируются возле центросомы с помощью транспорта по направлению к минус-концам микротрубочек, осуществляемого цитоплазматическими динеинами.

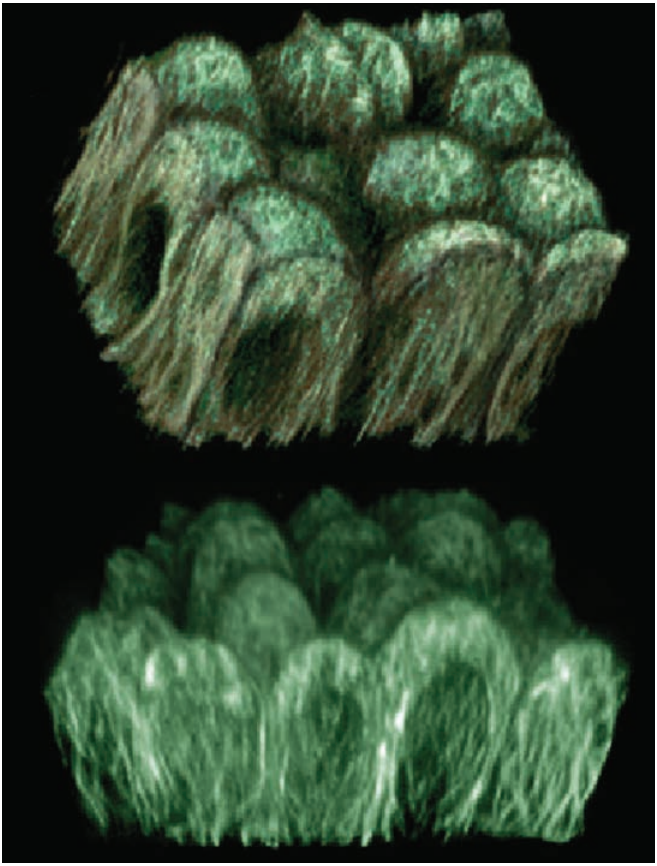


Рис. 18. Клетки колоновидного эпителия в клеточной культуре. На данной 3D-реконструкции видно, что микротрубочки ориентированы вдоль продольной оси клетки

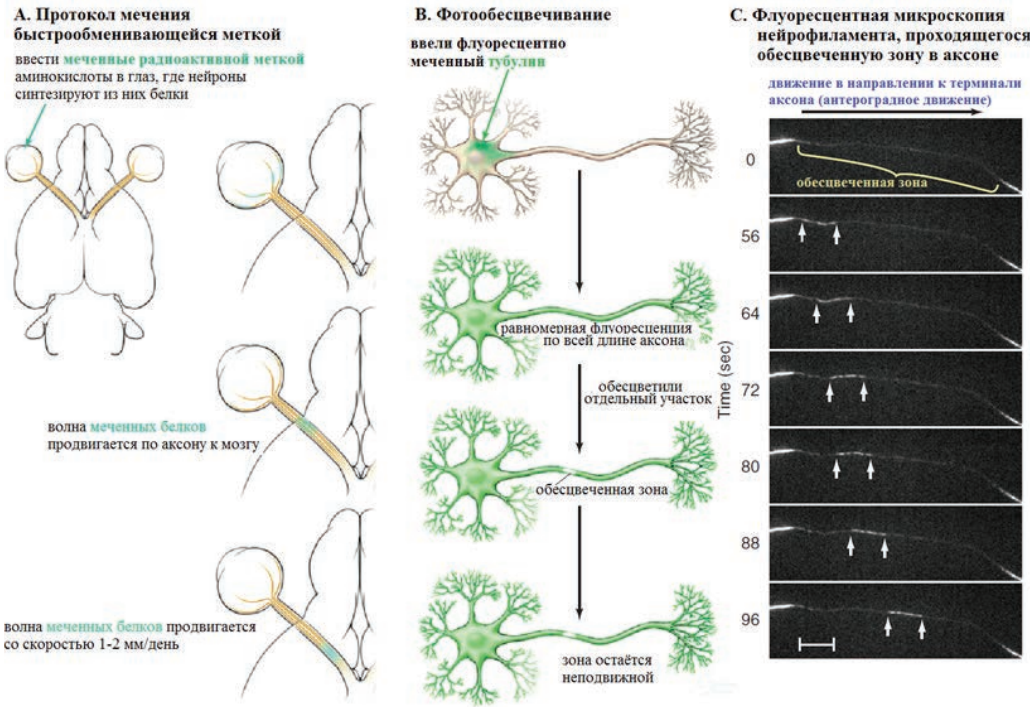


Рис. 19. Эксперименты по медленному аксональному транспорту.

А – эксперимент с введением быстрообменивающейся радиоактивной метки. Радиоактивные аминокислоты вводили в глаз экспериментальному животному. В теле нервной клетки радиоактивный свидетель (радиоактивная аминокислота) включается в белки, которые транспортируются по аксону. Некоторые белки включаются в стационарные структуры и остаются (оседают) на протяжении всего пути

В – эксперимент с фотобличингом (фотообесцвечиванием). В культивируемую нервную клетку ввели тубулин, меченный флуоресцентной краской. Тубулин заполнил цитоплазму, а также заполнял аксон в направлении его терминали. Отрезок аксона затем обесцветили с применением сильного светового импульса. Обесцвеченная зона оставалась неподвижной в течение минуты.

С – флуоресцентные микрофотографии аксона из культивируемого крысиного нейрона. Виден быстрый транспорт короткого нейрофиламента, меченного субъединицами, сшитыми с зеленым флуоресцентным белком (GFP). Обратите внимание на фотообесцвеченный участок (указан скобкой) и концы перемещающегося нейрофиламента (указаны стрелками). Нейрофиламент быстро перемещается в обесцвеченный участок, но сам этот обесцвеченный участок не перемещается, поскольку большинство нейрофиламентов в аксоне стационарны. Шкала 5 мкм

Близкое расположение центросом с ядром позволяет сети микротрубочек заякоривать ядро на клеточный кортекс во время миграции клетки. Такое заякоривание важно для ориентации ядра при развитии мозга у позвоночных.

Центросомы и отходящие от них микротрубочки также помогают в определении положения контрактильного кольца во время цитокинеза. По мере образования борозды деления во время поздней анафазы материнская и дочерняя центриоли отсоединяются друг от друга. Материнская центриоль временно перемещается в межклеточный «мостик» между двумя дочерними клетками прямо перед тем, как они разделятся. Такое перемещение материнской центриоли, возможно, как-то влияет на разрезание этого мостика.

Центриоли служат в качестве базальных телец, на которых строятся и на которых заякориваются аксонемы ресничек (рис. 20 B). На

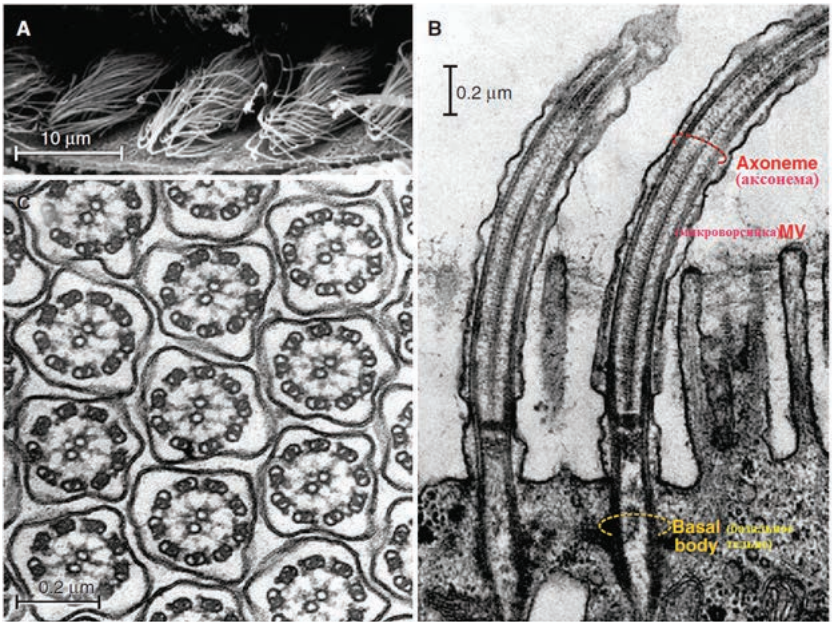


Рис. 20. Реснички на эпителиальных клетках жабр мидии.
A – на сканирующей электронной микрофотографии видно, как изгибающие движения ресничек, похожих на антенны, скоординированы и образуют волну.
B и C – трансмиссионные электронные микрофотографии ресничек.
B – на продольном разрезе видны базальные тельца и проксимальные части двух ресничек, а также видны микроворсинки.
C – поперечный разрез множества ресничек. Видны девятки внешних дуплетов и пары центральных микротрубочек

центросомальных центриолях в большинстве тканей позвоночных могут вырастать недвигательные ***первичные реснички***, которые служат в качестве сенсорных органелл (рис. 21). Когда клетка выходит из клеточного цикла, материнская центриоль «пришвартовывается» возле внутренней поверхности плазматической мембраны и на ней начинает строиться аксонема, состоящая из девяти дублетов микротрубочек.

Дефекты в первичных ресничках служат причиной поликистозной болезни почек, а также множества других заболеваний.

Центриоли помимо вышеперечисленного также образуют базальные тельца двигательных ресничек у многих простейших, сперматозоидов и реснитчатых эпителиев (рис. 22). В таких клетках базальное тело собирается для каждой реснички.

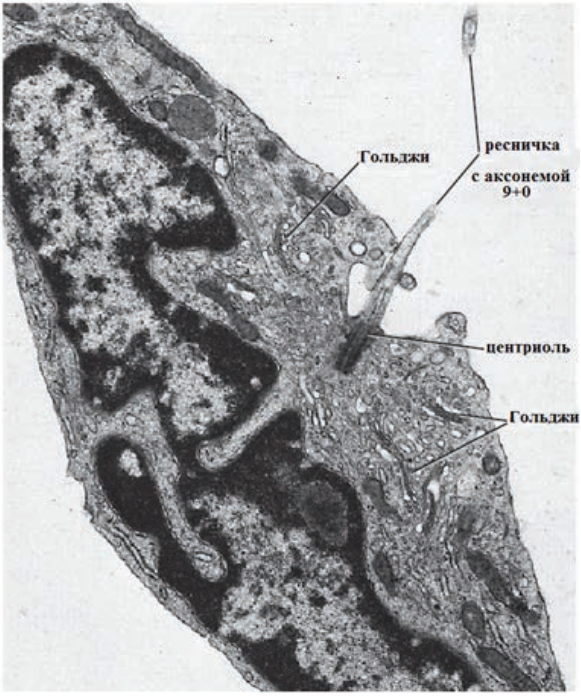


Рис. 21. Первичная ресничка.
Электронная микрофотография тонкого среза мезенхимальной клетки с первичной ресничкой, собранной на одной из двух центриолей, служащей в качестве базального тельца

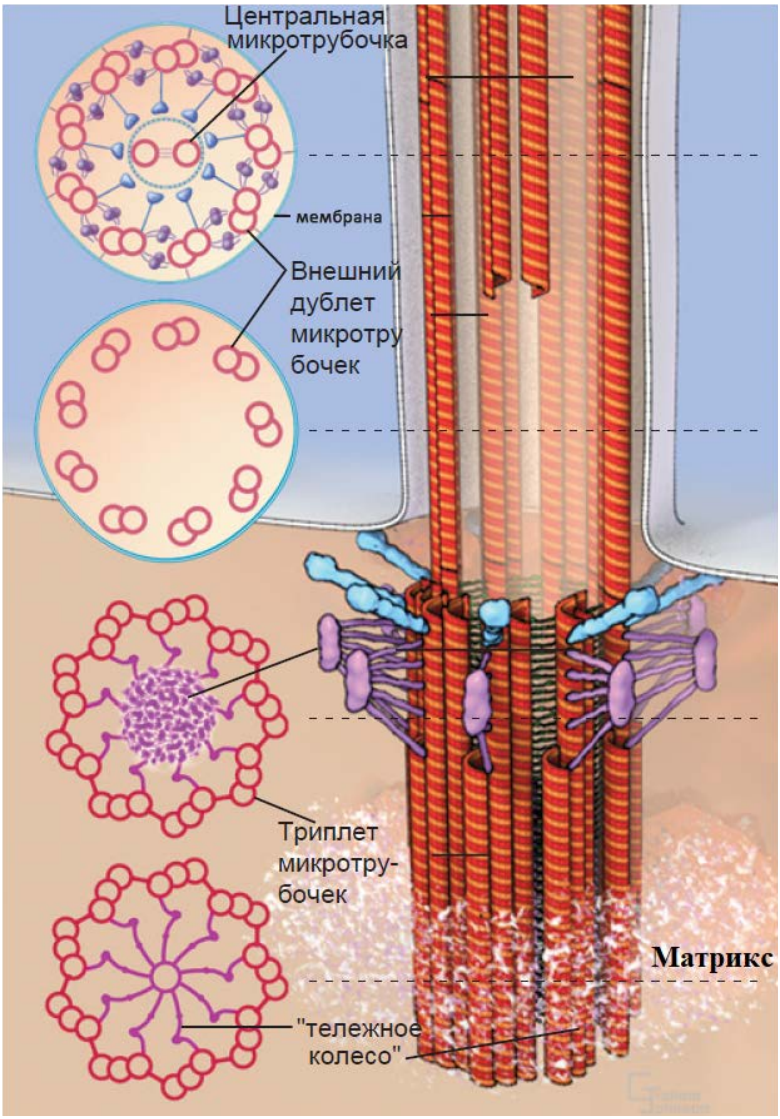


Рис. 22. Базальные тельца.
Показаны сечения и трехмерное изображение базального тельца и проксимальной части жгутика хламидомонады (Chlamydomonas). На 3D-изображении части внешних дублетов отрезаны, чтобы показать центральную пару микротрубочек

ЦЕНТРОСОМЫ И РАК

В опухолевых клетках человека редко встречаются мутации в генах центросомальных белков, но часто наблюдаются аномальные центросомы. В одном из исследований было выявлено, что в 96 % высокозлокачественных опухолей находят аномальные центросомы, включая большеразмерные (от 5 до 10 раз крупнее нормальных), с необычной формой, а также множественные центросомы. Исследователи изучают, вносят ли вклад такие дефекты в центросомах в образование опухолей или эти дефекты вторичны и появляются как следствие других мутаций, которые и являются причиной злокачественного перерождения клетки.

Одним из наиболее вероятных механизмов, способствующих образованию опухолей, является неправильное расхождение хромосом во время клеточного деления из-за дефектных центросом.

Существенное изменение числа хромосом является следствием невозможности завершить цитокинез, что порождает клетку-предшественницу с увеличенным вдвое по сравнению с нормой количеством ДНК, хромосом и центросом. Потеря или приобретение лишних хромосом ведет к неконтролируемой клеточной пролиферации, если нарушен баланс между стимулирующими рост онкогенами и генами-онкосупрессорами.

Большинство клеток позвоночных с ненормальным числом хромосом останавливают клеточный цикл, либо же умирают с помощью апоптоза. Однако во многих типах опухолевых клеток такой контроль клеточного деления нарушен, преимущественно из-за мутаций в гене-онкосупрессоре p53. Клетки, в которых этот транскрипционный фактор более не функционирует, выживают несмотря на ненормальное количество хромосом и/или центросом. В этом контексте дефекты центросом скорее всего являются следствием описанных мутаций, чем причиной опухоли.

Несколько других механизмов также могут служить причиной дефектов в центросомах и вносить свой вклад в опухолеобразование. Например, чрезмерная экспрессия ферментов, регулирующих

центросомальный цикл, может приводить к появлению излишних центросом. Действительно, в некоторых опухолевых клетках генетический локус с геном ***Aurora-A*** амплифицирован.

В результате этого чрезмерная экспрессия протеинкиназы ***Aurora-A*** вызывает аномалии в центросомах и мешает нормальному регулированию клеточного роста. Такие клетки, если их ввести подопытным мышам, образуют опухоли. Дефекты центросом также сбивают регулирование пролиферации за счет первичных ресничек, что способствует миграции метастатических опухолевых клеток, либо изменяет поведение стволовых клеток опухоли.

Белки, связывающиеся с микротрубочками

Динамика микротрубочек управляется множеством белков, связывающихся с тубулиновыми димерами или с микротрубочками, как показано на рис. 23.

Белки, связывающиеся с микротрубочками, обобщенно называют ***microtubule-associated proteins (белки, ассоциированные с микротрубочками)***, или ***MAP***. Некоторые MAP´ы предотвращают разборку микротрубочек. Подкласс MAP также может опосредовать взаимодействие микротрубочек с другими компонентами клетки. Этот подкласс особенно хорошо представлен в нейронах, где стабилизированные пучки микротрубочек формируют сердцевину аксонов и дендритов (см. рис. 24). У этих MAP´ов есть по меньшей мере один домен, связывающийся с поверхностью микротрубочки, а также домен, выступающих из белка вперед. Длина выступающего вперед домена определяет, насколько плотно покрытые MAP микротрубочки могут быть упакованы вместе, как видно из экспериментов с клетками, в которых искусственно была увеличена экспрессия того или иного белка. Клетки, в которых синтезировалось много *MAP2*, имеющего длинный выступающий домен, формировали пучки стабильных микротрубочек, занимавших много места, в то время как клетки, в которых синтезировалось много *tau*, имеющего значительно более короткий выступающий домен, формировали более плотные пучки микротрубочек (см. рис. 25).

MAP´ы являются мишенями нескольких протеинкиназ, а фосфорилирование MAP влияет как на их активность, так и на положение внутри клетки.

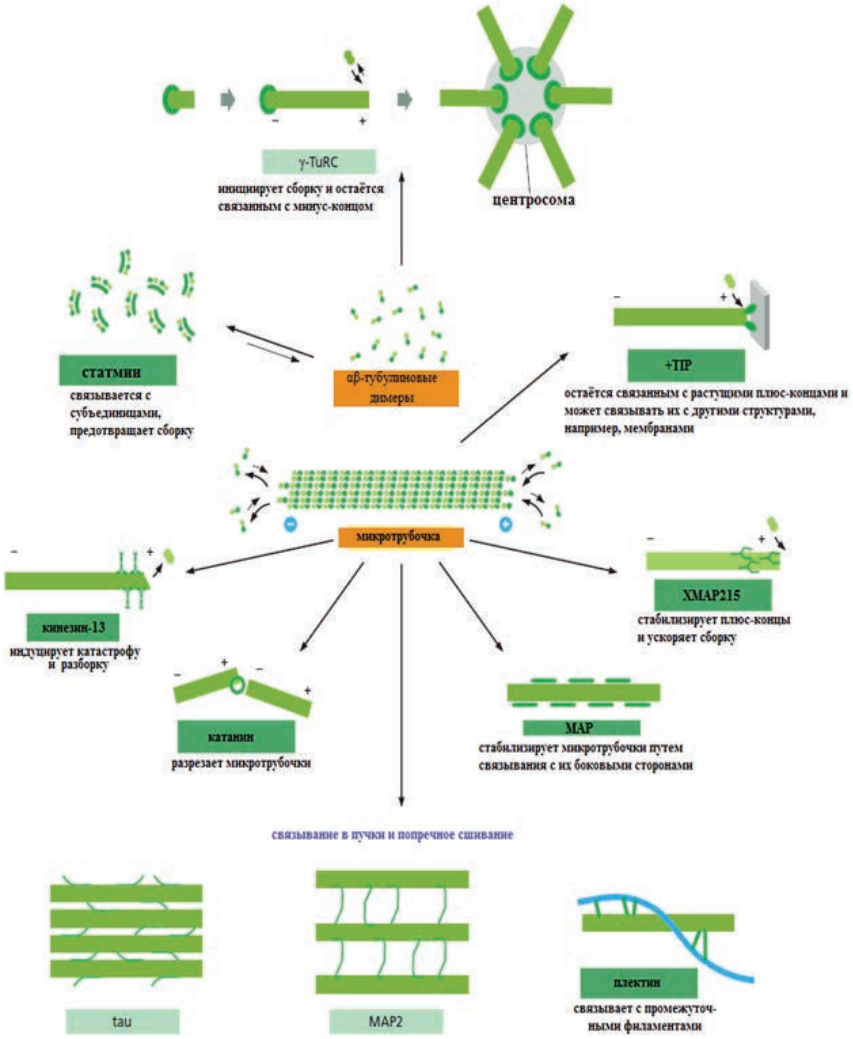
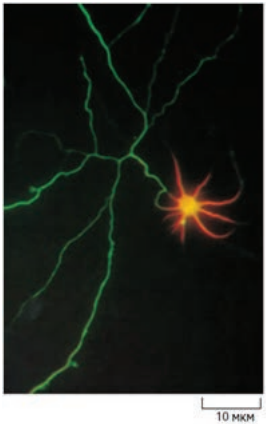


Рис. 23. Основные классы вспомогательных белков, взаимодействующих с микротрубочками

Рис. 24. Локализация MAP в аксоне и дендрите нейрона. Эта иммунофлюоресцентная микрография показывает распределение белка tau (***зеленый***) и MAP2 (***оранжевый***) в нейроне гиппокампа в клеточной культуре. Как видно, белок tau находится преимущественно в аксоне, в то время как локализация MAP2 ограничена лишь телом нейрона и его дендритами. Антитела, использованные для прокраски tau, связываются только с нефосфорилированной формой. Фосфорилированный tau также присутствует в дендритах



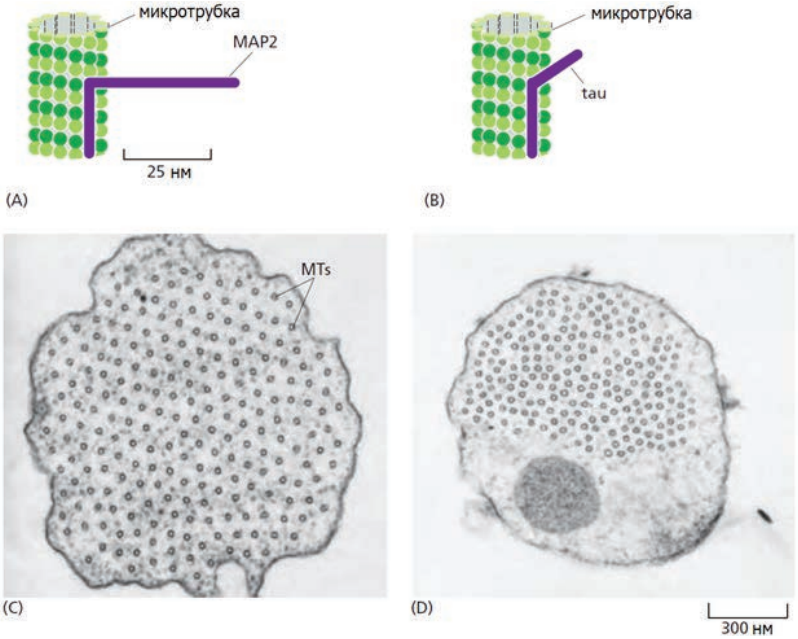


Рис. 25. Организация пучков микротрубочек при помощи MAP.
A – **MAP2** связывается продольно с микротрубочкой на одном конце, а с другого его конца торчит длинная «рука» с другим доменом связывания с микротрубочками.
B – **Tau** обладает коротким кросс-линкерным доменом.
C – Электронная микрография показывает разрез через пучок микротрубочек в клетке, синтезирующей повышенные количества **MAP2**. Одинаковые расстояния между микротрубочками обеспечиваются постоянной длиной выступающей «руки» **MAP2**.
D – Разрез через пучок микротрубочек в клетке с повышенной экспрессией **tau**. Здесь микротрубочки расположены более плотно друг к другу, чем на (C), поскольку у **tau** выступающая рука короче

Белки, связывающиеся с плюс-концами микротрубочек

В клетке есть множество белков, связывающихся с концами микротрубочек, и, тем самым, влияющих на их стабильность и динамику. Эти белки могут влиять на скорость, с которой микротрубочки переключаются между растущим и сокращающимся состоянием (то есть частотой катастроф), либо между сокращающимся и растущим (то есть частотой спасений). Так, например, член семейства кинезиноподобных белков, известный как ***фактор катастроф*** (или кинезин-13) связывается с концами микротрубочек и выгибает протофиламенты из микротрубочки, понижая барьер энергии активации. Это облегчает сгибание протофиламентов микротрубочек в искривленную форму, характерную для укорачивающегося состояния (рис. 26).

Другой белок, называемый ***Nezha*** или ***Patronin***, защищает минус-конец микротрубочек от факторов катастрофы.

Белков, связывающихся с минус-концом, описано очень мало, а белков, находящихся на плюс-концах микротрубочек, намного больше.

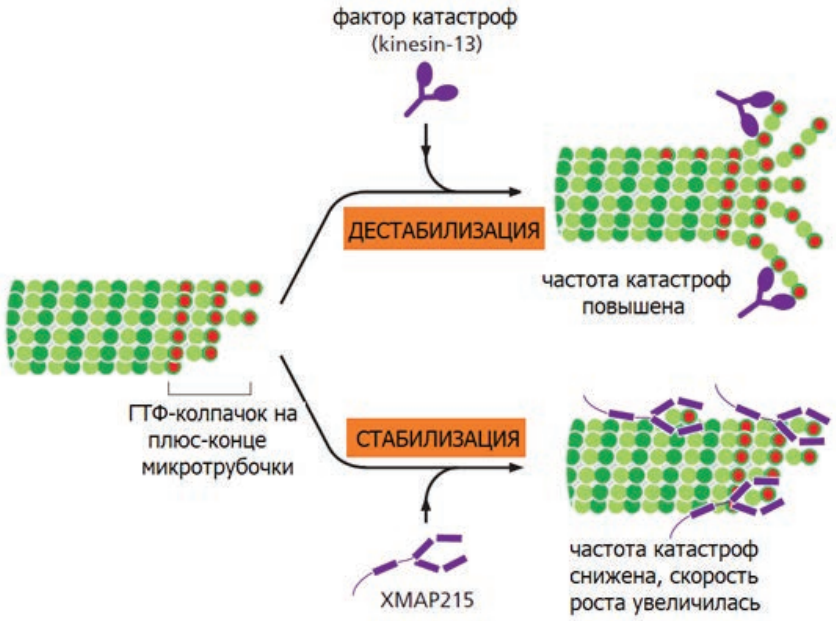


Рис. 26. Эффект белков, связывающихся с концами микротрубочек. (XMAP215 - *Xenopus* microtubule associated protein, массой 215 кДа)

Белок XMAP215 связывается со свободными тубулиновыми субъединицами и доставляет их к плюс-концу, усиливая тем самым полимеризацию микротрубочки и предотвращая активность факторов катастроф. Фосфорилирование XMAP215 во время митоза ингибирует его активность и уменьшает его конкуренцию с факторами катастрофы. Результатом такого сдвига является десятикратное увеличение динамической нестабильности микротрубочек во время митоза, что необходимо для эффективной сборки митотического веретена.

Во многих клетках минус-концы микротрубочек стабилизированы кэпирующим белком центросомы, чтобы минус-концы не служили в качестве сайтов деполимеризации микротрубочек. А вот плюс-концы эффективно обследуют все пространство клетки. Ассоциированные с микротрубочками белки, называемые *plus-end tracking proteins (+TIPs)*, аккумулируются на этих активных концах и путешествуют по клетке как пассажиры на концах быстро растущих микротрубочек, отделяясь от них, когда микротрубочки начинают укорачиваться (рис. 27).

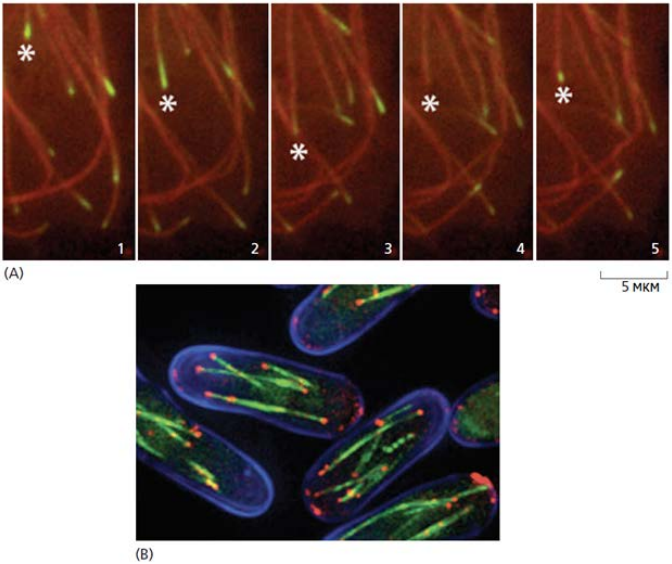


Рис. 27. TIP белки ассоциированы с растущими плюс-концами микротрубочек.
А – Последовательные кадры флюоресценции кромки клетки, экспрессирующей флуоресцентно-меченный тубулин, включающийся в микротрубочки (**красный**). +TIP белок EB1 помечен другим цветом (**зеленый**). Одна и та же микротрубочка на кадрах помечена звёздочкой. Когда микротрубочка растет (кадры 1 и 2), EB1 находится на кончике. Когда микротрубочка подвергается катастрофе и начинает укорачиваться (кадры 3 и 4), EB1 теряется. На 5-м кадре, когда микротрубочка вновь начинает расти, EB1 вновь оказывается на кончике микротрубочки.
В – В делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* плюс-концы микротрубочек (***зеленые***) связываются с гомологом белка EB1 (***красный***) на обоих концах палочковых клеток

Фактор катастроф кинезин-13 и XMAP215 ведут себя как +TIP´ы и управляют ростом и укорочением кончиков микротрубочки, к которым они присоединены. Другие +TIP´ы контролируют позиционирование микротрубочек при помощи захвата и стабилизации конца растущей микротрубочки на специфических мишенях в клетке, таких как клеточный кортекс или кинетохор митотической хромосомы. Накопление некоторых из +TIP´ов на плюс-концах зависит от EB1-белков. Прикрепившись к плюс-концу, эти факторы позволяют клетке обуздать энергию полимеризации микротрубочки и использовать её для генерирования толкающей силы, которая может быть использована для позиционирования веретена деления, хромосом или органелл.

Тубулин-секвестрирующие и тубулин-отделяющие белки

Как и в случае с актиновыми мономерами, клетка секвестрирует неполяризованный тубулин для поддержания пула активных субъединиц на уровне, близком к критической концентрации. Одна молекула статмина (*stathmin*) (также называемого Op18), связывается с двумя гетеродимерами тубулина и предотвращает их добавление к концу микротрубочки (рис. 28).

Статмин, таким образом, понижает эффективную концентрацию тубулиновых субъединиц, доступных для полимеризации (действие, аналогичное колхицину), и увеличивает вероятность, что растущая микротрубочка начнет укорачиваться. Фосфорилирование статмина ингибирует его связывание с тубулином, что повышает скорость элонгации и снижает динамическую нестабильность. Статмин задействован как в пролиферации клетки, так и её смерти. Интересно, что мыши, у которых отсутствует статмин, развиваются нормально, но менее робкие, чем мыши дикого типа, что говорит о роли статмина в нейронах амигдалы (миндалевидной железы), где он в норме экспрессируется на высоком уровне.

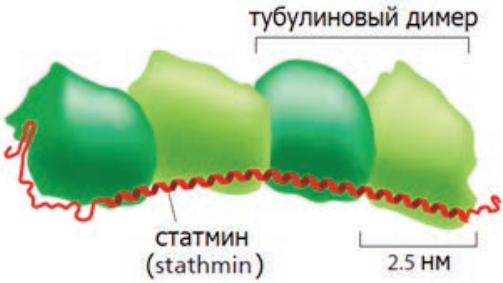


Рис. 28. Секвестрирование тубулина статмином

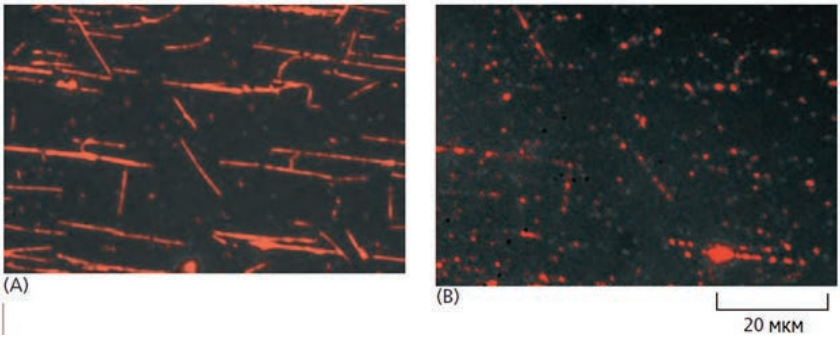


Рис. 29. Разрушение микротрубочек при помощи катанина. Стабилизированные таксолом и меченные родамином (*светится красным в ультрафиолете*) микротрубочки были адсорбированы на поверхности стеклянной пластинки, далее к ним добавили очищенный катанин и АТФ. А – наблюдается мало разрывов в микротрубочках через 30 секунд инкубации с катанином. В – то же поле через 3 минуты после добавления катанина. Филаменты разобраны во многих местах, остались лишь последовательности коротких фрагментов на месте предшествовавших длинных микротрубочек

Разборка (разъединение) – другой механизм, используемый клеткой для дестабилизации микротрубочек. Чтобы разобрать микротрубочку, нужно разрушить 13 продольных связей между протофиламентами. Белок ***катанин*** (***katanin***), названный так от японского слова «меч», выполняет такую работу (рис. 29).

Катанин состоит из двух субъединиц: малая субъединица гидролизует АТФ и выполняет само́ разрушение (разборку), а большая субъединица направляет катанин к центросоме. Катанин высвобождает микротрубочки из их контакта с ЦОМТ и вносит вклад в быструю деполимеризацию микротрубочек, наблюдаемую на полюсах веретена во время митоза.

Он также может быть вовлечен в высвобождение микротрубочек, их деполимеризацию в пролиферирующих клетках в интерфазе и постимитотических клетках, например, таких как нейроны.

Моторные белки, перемещающиеся по микротрубочкам

Как и актиновые филаменты, микротрубочки используют моторные белки для перемещения грузов и для выполнения множества других функций в клетке. Существует два основных класса моторов, перемещающихся по микротрубочкам: кинезины и динеины.

Kinesin-1, называемый ещё «обычным кинезином», впервые был очищен из нейронов кальмара, где он переносит мембранные органеллы от тела клетки к аксонной терминали, шагая в направлении плюс-конца микротрубочки. Кинезин-1 схож с миозином II в том, что так же имеет по две тяжелые цепи на активном моторе. Они формируют двухголовые моторные домены, удерживающиеся вместе за счёт суперспирального хвоста, отвечающего за димеризацию тяжелых цепей. Одна легкая цепь кинезина-1, связывается с карго и ассоциируется с каждой тяжелой цепью благодаря своему хвостовому домену. Как и миозин, кинезин является членом большого суперсемейства белков, у которых общим является моторный домен (рис. 30).

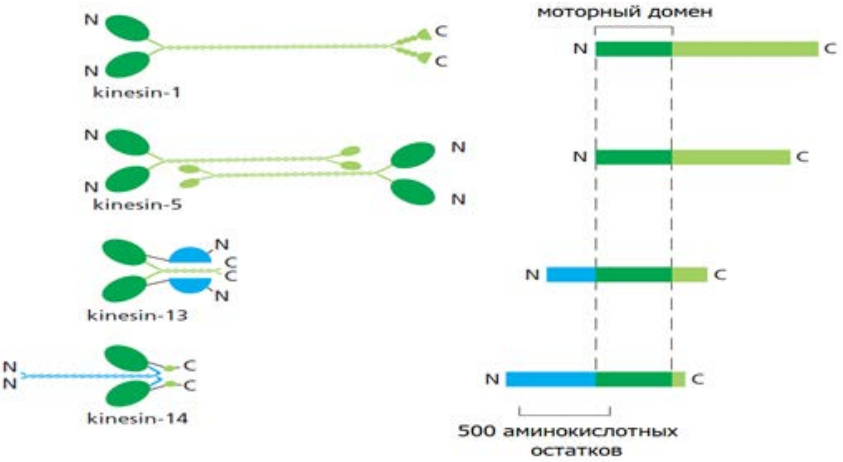


Рис. 30. Кинезин и кинезиноподобные белки.
Приведена структура четырех членов суперсемейства кинезина. Как и в суперсемействе миозина, консервативным является лишь моторный домен. Кинезин-1 имеет моторный домен на N-конце тяжелой цепи. Срединный домен образует длинную суперспираль, которая осуществляет димеризацию. С-концевой домен образует хвост, который прикрепляется к карго, таким как, например, мембранные органеллы. Кинезин-5 образует тетрамеры, у которых два димера ассоциируются посредством своих хвостовых частей. Биполярный тетрамер кинезина-5 может скользить по двум микротрубочкам одновременно, аналогично действию толстых нитей миозина II. У кинезина-13 моторный домен располагается в средине тяжелой цепи. Он является членом семейства кинезина, утратившим моторную активность, но его приобретенная функция – связываться с микротрубочками и инициировать их деполимеризацию. Кинезин-14 является С-концевым кинезином, включающим в себя белок Ncd (у *Drosophila*) и дрожжевой белок Kar3. Эти кинезины, как правило, двигаются в противоположном направлении по сравнению с большинством других кинезинов: по направлению к минус-концу вместо плюс-конца микротрубочки

У человека – 45 различных кинезинов (четырнадцать семейств). У большинства из них моторный домен располагается на N-конце тяжелой цепи, и движется он по направлению к плюс-концу микротрубочки. У одного семейства моторный домен расположен на С-конце, и движется он в противоположном направлении – к минус-концу микротрубочки. У кинезина-13 моторный домен расположен в середине, и он не двигается вовсе, но вместо движения он используя энергию гидролиза АТФ, деполимеризует концы микротрубочек, как описывалось ранее. У некоторых кинезинов тяжелые цепи являются гомодимерами, у других – гетеродимерами. У большинства кинезинов есть сайт связывания на хвостовой части с другой микротрубочкой; либо же эти хвостовые части могут связывать моторы с мембранными органеллами посредством легкой цепи или адапторного белка.

Многие члены суперсемейства кинезинов играют специальные роли в образовании митотического веретена и сегрегации хромосом во время клеточного деления (рис. 31).

Динеины – это семейство неродственных кинезинам моторов, движущихся в направлении минус-конца микротрубочек. Они состоят из одного, двух или трех тяжелых цепей (включая моторные домены) и большого переменного числа ассоциированных промежуточных, средне-промежуточных и легких цепей. Семейство динеина имеет две основных ветви (рис. 32).

К первой ветви относятся ***цитоплазматические динеины***, являющиеся гомодимерами двух тяжелых цепей. Цитоплазматический динеин 1 кодируется единственным геном у практически всех эукариот, но отсутствует у цветковых растений и у некоторых водорослей. Он используется для переноса органелл и мРНК, для позиционирования центросомы и ядра во время миграции клеток, а также для выстраивания микротрубочек в веретене деления в митозе и мейозе. Цитоплазматический динеин 2 найден только у эукариотических организмов, имеющих реснички; он используется для транспортировки материала от кончика к основанию реснички в процессе, называемом ***интрафлагеллярным транспортом***.

Аксонемальные динеины (также называемые ***цилиарными (реснитчатыми) динеинами***), составляют вторую ветвь и включают в себя мономеры, гетеродимеры и гетеротримеры с одной, двумя или тремя содержащими моторы тяжелыми цепями, соответственно. Они специализированы на быстрых и эффективных скользящих движениях микротрубочек, лежащих в основе биения ресничек и жгутиков.

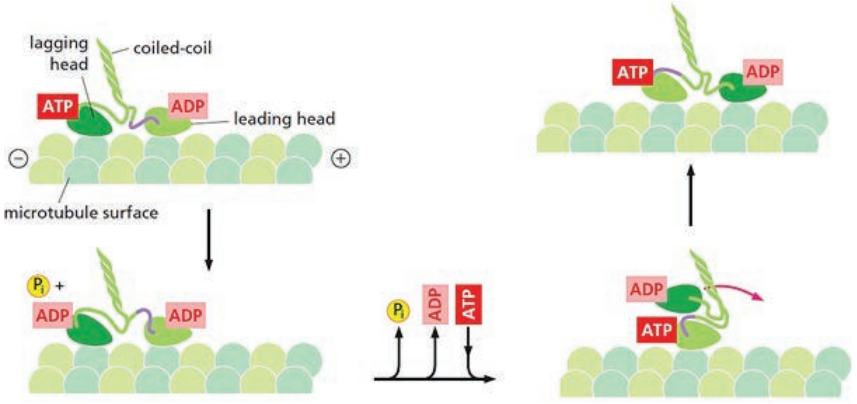


Рис. 31. Механохимический цикл кинезина.

Kinesin-1 - это димер двух нуклеотид-связывающих моторных доменов (головок), соединенных посредством длинного суперспирального хвоста. Два моторных домена работают скоординированно. Во время «шага» задняя (запаздывающая) головка отсоединяется от сайта связывания с тубулином, проходит над второй головкой и затем снова связывается со следующим доступным сайтом связывания с тубулином. Используя такое движение «голова-через голову», кинезиновый димер способен проходить большие расстояния по микротрубочке без потери своего направления.

В начале каждого шага одина из головок – задняя – (***темно-зеленая***) прочно связана с микротрубочкой и АТФ, в то время как передняя (ведущая) головка слабо связана с микротрубочкой и АДФ, находящемся в сайте связывания нуклеотида. Перемещение вперед заднего моторного домена осуществляется за счёт диссоциации АДФ от задней головки и связывания с АТФ передней головки. Связывание с АТФ с этим моторным доменом вызывает сдвиг в конформации малого пептида, называемого «шейным линкером», при этом происходит изменение его направления от указывающего назад в указывающее вперед (шейный линкер изображен сиреневым цветом, он соединяет ведущий моторный домен и суперспираль). В результате этого конформационного сдвига запаздывающая головка сдвигается вперед после того, как она отсоединилась от микротрубочки в связанном с АДФ состоянии (отсоединение требует предварительного гидролиза АТФ и высвобождения неорганического фосфата). Молекула кинезина теперь находится в состоянии готовности к следующему шагу, проходящему в точном повторении описанного процесса

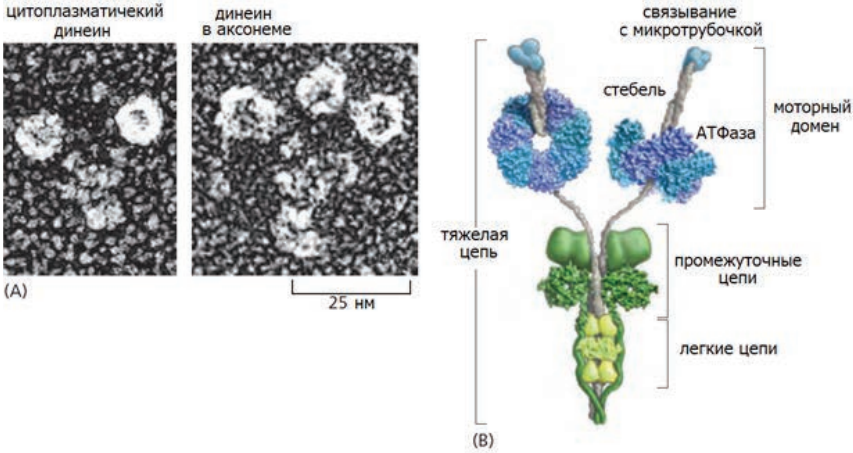


Рис. 32. Динеин.
А – электронная микрофотография молекулы динеина после замораживания-травления. Справа – цитоплазматический динеин, слева – цилиарный (аксонемальный). Подобно миозину II и кинезину-1, цитоплазматический динеин – это «двухглавая» молекула. Цилиарный динеин здесь взят из протозойных и имеет три головки. У цилиарных динеинов животных – две головки. Обратите внимание, что динеиновые головки намного больше по сравнению с таковыми у миозинов или кинезинов.
В – схематическое изображение цитоплазматического динеина, показывающее две тяжелые цепи (голубой и серый цвета), содержащие домены связывания с микротрубочками и АТФазный домен, соединенные длинным стебельком.
С – тяжелыми цепями связано множество промежуточных цепей (темно-зеленые) и легких цепей (светло-зеленые). Они помогают в осуществлении множества функций динеина

Динеины являются самыми большими из известных молекулярных моторов, а также они являются и одними из самых быстрых: аксонемальные динеины, прикрепленные к стеклянной пластинке, могут передвигать микротрубочки со скоростью 14 мкм/сек.

Динеиновые моторы структурно не родственны миозинам и кинезинам, но в них все же наблюдается общее правило сопряжения гидролиза нуклеотида и присоединения к /отсоединения от микротрубочки, а также силу-производящие конформационные изменения, происходящие при этом (рис. 33).

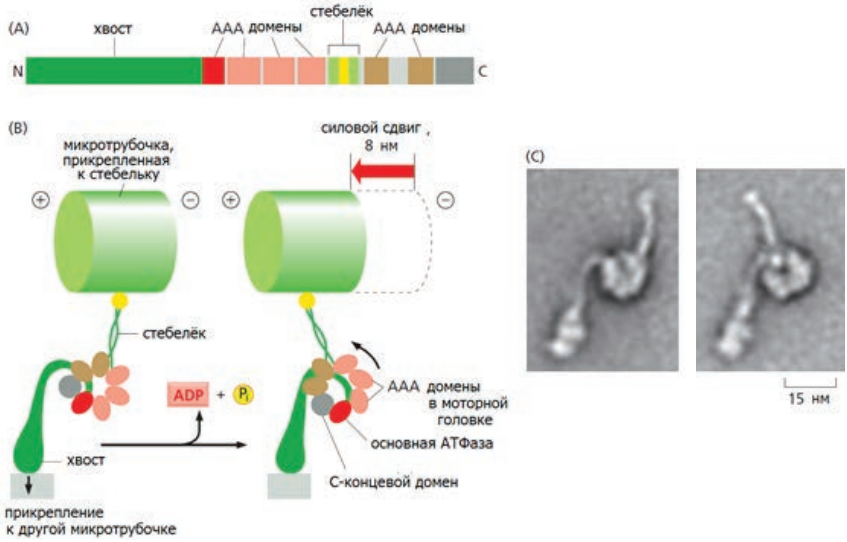


Рис. 33. Силовой шаг динеина.
А – организация доменов в тяжелых цепях динеина. Это огромный полипептид, содержащий около 4 000 аминокислотных остатков. Количество тяжелых цепей в динеине соответствует числу его моторных головок.
В – изображение динеина с – мономерного аксонемального динеина, обнаруженного у одноклеточных зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*. Большая головка мотора – это плоское кольцо, содержащее С-концевой домен (***серый***) и шесть ***ААА-доменов***, четыре из которых содержат последовательности связывания с АТФ, но лишь один из них (***темно-красный***) является главной АТФазой. Из головки выходит длинная суперспираль стебелька с сайтом связывания с микротрубочками на кончике, а хвостовая часть прикрепляется к соседней микротрубочке в аксонеме. В АТФ-связанной форме стебелек открепленн от микротрубочки, а гидролиз АТФ приводит к его связыванию с микротрубочкой (*слева*). Последующее высвобождение АДФ и фосфата приводит к значительным конформационным изменениям – «удару силы», включающим поворот головки и стебелька относительно хвоста (*справа*). В каждом цикле происходит смещение на примерно 8 нм, что и приводит к биению жгутика (см рис. 39).
В случае цитоплазматического динеина хвостовая часть прикрепляется к карго: например, к везикуле, и при каждом «ударе силы» происходит перемещение карго на те же 8 нм вдоль микротрубочки по направлению к минус-концу.
С – электронные микрографии очищенных мономерных динеинов в двух конформациях, представляющих стадии механохимического цикла

Перемещение органелл

Основной функцией цитоскелетных моторов в интерфазной клетке является транспорт и позиционирование мембранных органелл. Впервые **кинезин** был идентифицирован как белок, отвечающий за быстрый ***антероградный аксональный транспорт*** – быстрое движение митохондрий, прекурсоров секреторных пузырьков и других компонентов синапса по микротрубочковым магистралям в нервную терминаль. Цитоплазматический динеин идентифицировали как моторный белок, отвечающий за транспорт в противоположном направлении – ***ретроградный аксональный транспорт***. Хотя органеллам в большинстве клеток нет нужды преодолевать столь значительные расстояния, в нейронах им необходим транспорт в обоих направлениях. Типичный набор микротрубочек в интерфазной клетке ориентирован своими минус-концами к центру клетки возле центросомы и плюс-концами – к периферии клетки. Таким образом, в центростремительном движении органелл или везикул задействованы динеиновые, движущиеся к минус-концу моторы; в то время как центробежное перемещение органелл требует работы кинезиновых, движущихся в направлении к плюс-концу моторов. Интересно отметить, что в клетках животных практически весь транспорт к минус-концу осуществляется единственным цитоплазматическим мотором динеином 1; а для движения к плюс-концу используется 15 различных кинезинов.

Хорошим примером эффекта микротрубочек и ассоциированных с ними моторов является их роль в организации ЭПС и аппарата Гольджи. Сеть мембран ЭПС выравнивается по микротрубочкам и простирается почти до кромки клетки, в то же время аппарат Гольджи находится возле центросомы. При обработке клетки препаратами, деполимеризующими микротрубочки, такими как колхицин или нокодазол, ЭПС обваливается к центру клетки, а аппарат Гольджи распадается на фрагменты и рассеивается по цитоплазме.

In vitro кинезины способны связывать мембраны ЭПС с заранее сформированными трассами микротрубочек и шагать в направлении плюс-концов, таща за собой эти мембраны и вытягивая их в тубулярные протрузии с образованием мембранной паутины (сети), выглядящей как ЭПС в клетке. В свою очередь динеины, наоборот, требуются для позиционирования аппарата Гольджи около центра животной клетки, для этого динеины перемещают везикулы Гольджи вдоль микротрубочек к их минус-концам в направлении центросомы.

Разнообразные хвостовые части и ассоциированные с ними легкие цепи моторных белков дают возможность моторам прикрепляться к соответствующим органеллам (карго). Мембранные рецепторы моторов, сортируемые в специальные мембранные компартменты, прямо или косвенно взаимодействуют с хвостами соответствующих членов кинезинового семейства.

Многие вирусы пользуются моторным транспортом по микротрубочкам во время инфекции и используют кинезин для продвижения себя от сайта своей репликации и сборки к плазматической мембране, откуда они готовы инфицировать соседние клетки. Белок внешней мембраны вируса *Vaccinia*, например, содержит аминокислотную последовательность, выполняющую связывание с легкой цепью кинезина-1 и, таким способом, транспортировку по микротрубочке к плазматической мембране. Интересно отметить, что такая последовательность присутствует у 450 белков человека, одна треть из которых ассоциирована с болезнями человека.

Таким образом, кинезины транспортируют разнообразные грузы, вовлеченные в широкий спектр важных клеточных функций.

Цитоплазматический динеин является огромным белковым комплексом, объединяясь с другим белковым комплексом – ***динактином*** – он эффективно перемещает органеллы.

Комплекс динактина включает в себя короткий актиноподобный филамент (рис. 34).

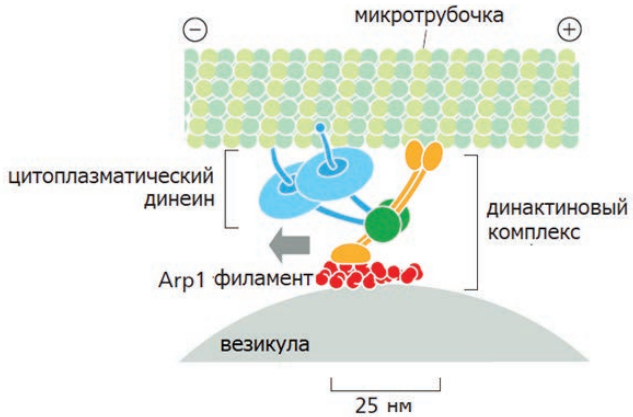


Рис. 34. Динактин выполняет прикрепление динеина к мембранным органеллам. Для динеина необходимо присутствие большого числа вспомогательных белков для прикрепления к мембранным органеллам. Динактин – это большой комплекс, содержащий слабо связывающиеся с микротрубочками компоненты, а также компоненты, связывающиеся с самим динеином, и компоненты, образующие малый актино-подобный филамент, состоящий из актиноподобного белка Arp1

Множество других белков так же вносит вклад в связывание динеинов с карго и регулирование молекулярных моторов, их функции особенно важны в нейронах, где дефекты в транспорте по микротрубочкам вызывают неврологические заболевания. Ярким примером служит лиссэцефалия, или гладкий мозг – заболевание у человека, при котором клеткам не удается мигрировать в церебральный кортекс развивающегося мозга. Один из видов лиссэнцефалии вызывается дефектами в белке **Lis1** – динеин-связывающем белке, требующемся при миграции ядер у некоторых видов. В нормальном мозге миграция ядра направляет тело развивающейся нервной клетки к её правильному положению в коре. При отсутствии Lis1 ядра мигрирующих нейронов не могут прикрепиться к динеинам, что и вызывает дефекты в миграции ядер. Динеин постоянно необходим для работы нейрона, и при мутациях в динактине или в хвостовой части цитоплазматических динеинов происходит дегенерация нейронов у человека. Эти эффекты связаны со снижением ретроградного аксонального транспорта и дают неоспоримое доказательство важности трудоемкого аксонального транспорта в жизнеспособности нейрона.

Клетка способна регулировать активность моторных белков и таким образом, изменять либо позиции мембранных органелл, либо движение всей клетки. Меланоциты рыбы дают наиболее яркий пример. Это гигантские клетки, отвечающие за быстрое изменение цвета кожи у некоторых видов рыб. Они содержат большие пигментные гранулы, способные изменять свое положение в ответ на нейронную или гормональную стимуляцию (рис. 35).

Пигментные гранулы агрегируют или рассеиваются благодаря перемещению по развитой сети микротрубочек, заякоренных на центросоме своими минус-концами. Исследование движения отдельных пигментных гранул показало, что движение по направлению к центру является быстрым и плавным, в то время как движение от центра – прерывистое, с частыми движениями назад. В движение гранул вовлечены как кинезиновые, так и динеиновые моторы.

Дерганое движение от центра является результатом «перетягивания каната» между двумя моторными белками, при котором кинезин безоговорочно выигрывает. При снижении уровня цАМФ в клетке кинезин инактивируется, давая возможность динеину свободно быстро тащить пигментные гранулы к центру клетки. Подобным же образом в результате сложного баланса между конкурирующими сигналами контролируется движение других мембранных органелл, покрытых специфическими моторными белками, где регулируется как активность, так и сила прикрепления моторных белков.

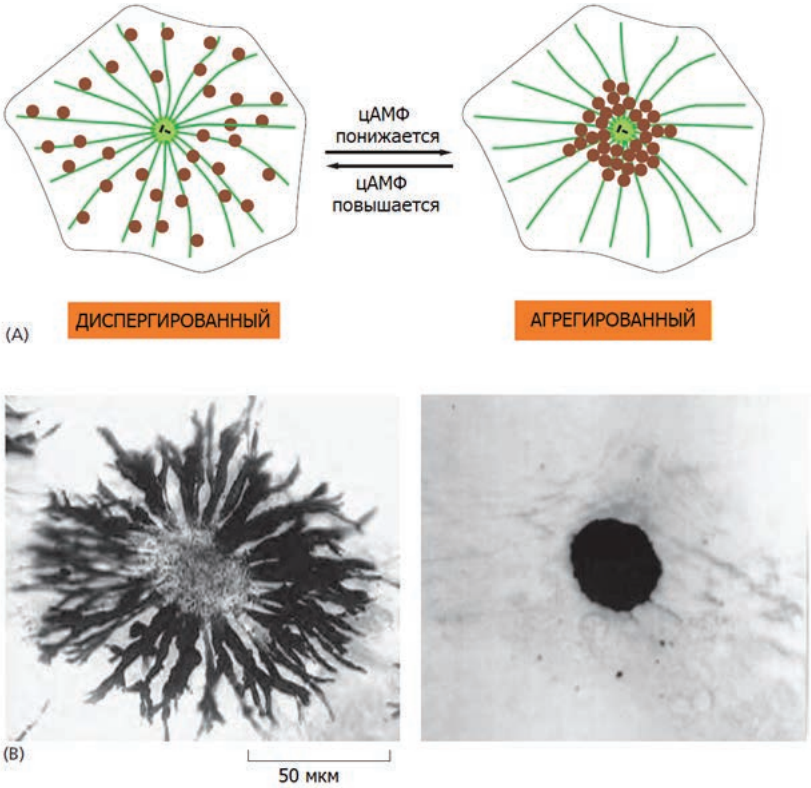


Рис. 35. Регулируемое перемещение меланосом в пигментных клетках рыбы.
А – эти гигантские клетки содержат большие пигментные гранулы, или меланосомы (коричневые). Изменение концентрации внутриклеточного цАМФ вызывает либо их перемещение к центру клетки, либо заставляет их рассеиваться по цитоплазме. Распределение меланосом по клетке осуществляется вдоль микротрубочек.
В – фотографии в светлом поле одной клетки ***тилапии*** (рыба), на которых видны меланосомы либо в диспергированном в цитоплазме (*слева*), либо в агрегированном в центральной части клетки (*справа*) состоянии

Построение митотического веретена или нейронального цитоскелета является важным и удивительным примером силы работы команды моторных белков и их взаимодействия с динамическими филаментами цитоскелета. Для сборки митотического веретена необходима реорганизация интерфазных пучков микротрубочек для формирования биполярного набора микротрубочек с заякоренными на полюсах минус-концами и плюс-концами, перекрыва-

ющимися в центре либо прикрепляющимися к хромосомам. Сборка веретена зависит от скоординированной работы нескольких моторных белков и других факторов, модулирующих динамику полимеризации. У нейронов также есть сложная структура цитоскелета. По мере дифференцировки нейроны запускают специальные процессы, в результате которых они будут либо получать электрические сигналы (дендриты), либо передавать их (аксоны). Благодаря прекрасной и развитой разветвленной морфологии аксонов и дендритов, нейроны способны создавать чрезвычайно сложную сеть передачи сигналов, взаимодействуя одновременно с множеством других клеток, что делает возможным замысловатое поведение высших животных.

Как аксоны, так и дендриты (собирательное название – нейриты) заполнены пучками микротрубочек, которые являются критичными как для их структуры, так и функции. В аксонах все микротрубочки ориентированы в одном направлении: минус-концы указывают на тело клетки, а плюс-концы – в направлении терминали (рис. 36). Микротрубочки не достают от тела клетки до самого конца аксона, каждая обычно длиной всего лишь несколько микрометров, но

Рис. 36. Организация микротрубочек в нейроне.
В аксоне все микротрубочки обладают одинаковой полярностью, при которой плюс-конец направлен к терминали. Нет микротрубочек, протянувшихся от самого начала до конца нейрона, зато есть короткие трассы для быстрого передвижения из перекрывающихся сегментов параллельных микротрубочек.
В дендритах микротрубочки имеют смешанную полярность. Везикулы могут связываться как с кинезинами, так и с динеинами и двигаться в направлении, определяемом моторным белком

большое их количество укладывается в перекрывающийся массив. Эти выровненные канаты микротрубочек действуют как высокоскоростные трассы для транспорта специфических белков, пузырьков и мРНК к аксонным терминалям, где строятся и поддерживаются в порядке синапсы. Самый длинный аксон в теле человека начинается от основания спинного мозга и оканчивается в стопе, имея длину около метра. Для сравнения, дендриты обычно намного короче аксона. Микротрубочки в дендритах лежат параллельно друг относительно друга, но имеют смешанную полярность, что похоже на антипараллельные сборки микротрубочек митотического веретена.

СТРОЕНИЕ ПОДВИЖНЫХ РЕСНИЧЕК И ЖГУТИКОВ

Как миофибриллы являются высокоспециализированными механизмами сокращения, построенными из актиновых и миозиновых филаментов, так и реснички и жгутики тоже являются высокоспециализированными и эффективными машинами движения, сконструированными из микротрубочек и динеина. Реснички и жгутики являются дополнительными органами у ворсинчатых клеток, в их основе находятся пучки микротрубочек. Жгутики есть у спермиев и многих протозойных. Благодаря их волнистым движениям клетки, к которым они прикреплены, способны плавать в жидкой среде. Реснички организованы сходным образом, но их биения являются хлыстообразными, напоминающие плавание стилем брасс. Биение ресничек может перемещать жидкость над поверхностью группы клеток в ткани. В человеческом теле огромные количества ресничек (10^9/см^2 и более) выстилают дыхательные пути, проталкивают слизь, улавливают частицы пыли и бактерии. Сходным образом реснички в маточных трубах помогают яйцеклетке переместиться в матку.

Движение реснички или жгутика осуществляется за счет изгибания её центральной части, называемой аксонемой. Она состоит из микротрубочек и связанных с ними белков, уложенных в четкую и правильную структуру. Девять дуплетов микротрубочек (состоящих из одной целостной и одной неполной микротрубочки, соединенной с целостной таким образом, что у них общая стенка) собраны в кольцо вокруг пары отдельных микротрубочек (9x2+2) (рис. 37).

Такая характерная структура наблюдается практически во всех формах жгутиков или ресничек у эукариот (от протозойных до человека). Микротрубочки имеют такую же длину, как и аксонема, которая может быть от 10 до 200 мкм. На одинаковых расстояниях друг от друга вдоль микротрубочки вспомогательные белки объединяют микротрубочки друг с другом в вышеприведенные структуры. Молекулы аксонемального динеина образуют мостики между соседними дублетами микротрубочек по окружности вокруг аксонемы (рис. 38).

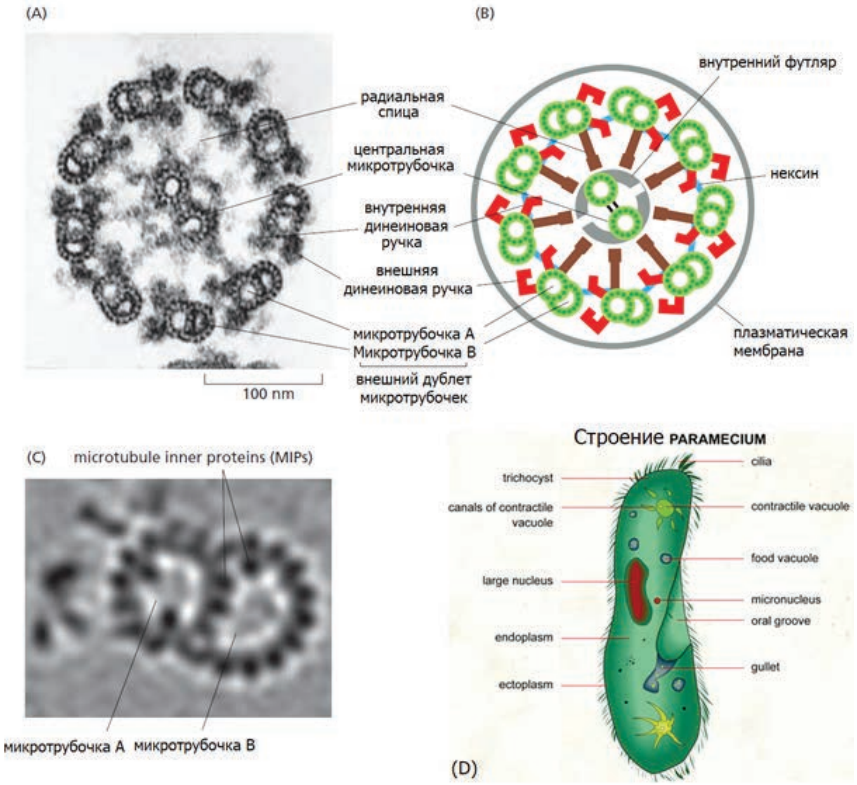


Рис. 37. Расположение микротрубочек в жгутике или ресничке.
А – электронная микрография жгутика клетки зеленых водорослей (*Chlamydomonas*), показанная в разрезе, иллюстрирует отчетливый порядок «9x2+2» в микротрубочке.
В – диаграмма части жгутика или реснички. Располагаются на одинаковых расстояниях по длине аксонемы и с соединяются с помощью разнообразных выступов из микротрубочек.
С – микрография электронной томографии высокого разрешения внешнего дублета микротрубочек показывает структурные детали и компоненты внутри микротрубочки, называемые внутренними белками микротрубочек (microtubule inner proteins (MIPs)).
D – строение клетки *Paramecium*

Когда активируется моторный домен динеина, то молекула динеина, прикрепленная к одному дублету микротрубочек, пытается сделать шаг вдоль соседнего дублета, что порождает усилие сдвига, при котором соседние дублеты смещаются вдоль друг друга, очень

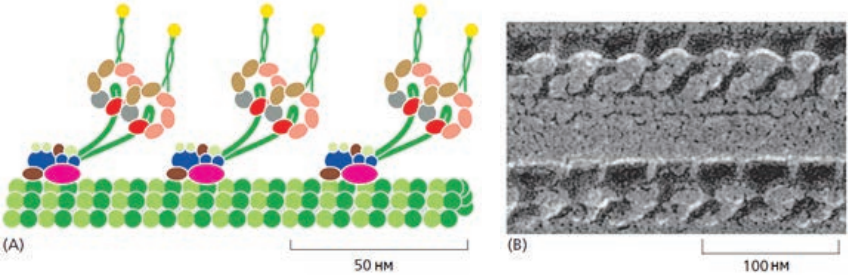


Рис. 38. Динеин ресничек.
Динеин ресничек (аксонемальный) является большой белковой сборкой (около 2 МДа), состоит из 9-12 полипептидных цепей, самой тяжелой из которых является тяжелая цепь (более 0,5 МДа).
А – тяжелые цепи образуют основную часть глобулярной головки и стеблевого домена, а множество более мелких цепей кластеризуется вокруг основания стебелька. У приведенного здесь динеина (у метазойных, многоклеточных) две головки во внешнем динеине, а у динеина протозойных – три головки, каждая из которых образована из собственной тяжелой цепи. Хвост молекулы прочно связывается с микротрубочкой А, а большие глобулярные головки имеют АТФ-зависимый сайт связывания с микротрубочкой В. После гидролиза связанного с ними АТФ головки двигаются к минус-концу микротрубочки В, чем создают скользящее усилие между соседними микротрубочками дублета в ресничке или жгутике.
В – электронная микрография замороженного скола реснички, на которой видны ручки динеина, выступающие на равных расстояниях из дублета

напоминая сдвиг актиновых филаментов во время мышечного сокращения. Тем не менее, присутствие других связей между дублетами микротрубочек предотвращает этот относительный сдвиг, и усилие, созданное динеинами, превращается в изгибающее движение (рис. 39).

У человека наследственные дефекты в аксонемальных динеинах вызывают заболевание, называемое **первичной цилиарной дискинезией** или **синдромом Картагенера.** Этот синдром характеризуется инверсией нормальной асимметрии внутренних органов (situs inversus) из-за нарушения потока жидкости в развивающемся эмбрионе, мужской стерильностью из-за неподвижности спермиев и высокой восприимчивостью к инфекциям легкого из-за неспособности ресничек очищать дыхательные пути от мусора и бактерий.

Для плавания бактерии используют структуры, называемые жгутиками, но в них не содержится микротрубочек или динеинов и они не совершают волнообразных движений или биений. Вместо этого ***бактериальные жгутики*** являются длинными упругими спираль-

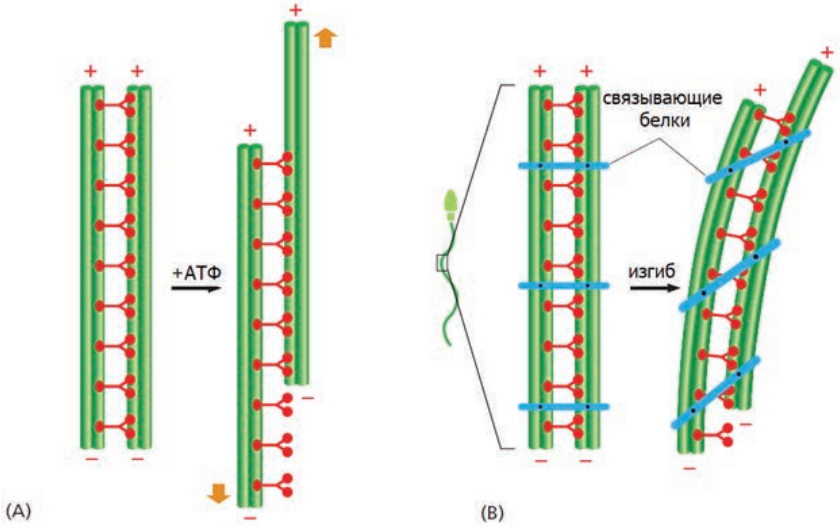


Рис. 39. Изгибание аксонемы.
А – если аксонемы обработать протеолитическим ферментом трипсином, то связи, удерживающие соседние дублеты микротрубочек вместе, будут разрушены. В этом случае при добавлении АТФ происходит движение моторов динеиновых головок, приводящее к сдвигу одного дублета вдоль другого.
В – в интактной аксонеме (как у сперматозоида, например) гибкие белковые соединения предотвращают скольжение дублетов, а усилие, созданное моторами, заставляет дублет изгибаться, создавая волнообразные движения или биения

ными филаментами, построенными из повторяющихся субъединиц белка флагеллина. Жгутики вращаются как пропеллеры, приводимые в движение специальными вращающимися моторами, встроенными в бактериальную стенку. Здесь использован один и тот же термин – жгутик для обозначения совершенно разных аппаратов движения.

Первичные реснички выполняют важную сигнальную функцию в анимальных клетках

У многих клеток есть короткие, недвигательные двойники ресничек и жгутиков, называемые ***первичной ресничкой***. Первичные реснички выглядят как специализированные клеточные компартменты или органеллы, выполняющие множество функций в клетке, но имеющие общие структурные свойства с двигательными реснич-

ками. И двигательные, и недвигательные реснички строятся клеткой во время интерфазы на ассоциированных с плазматической мембраной структурах, называемых базальными тельцами. Эти тельца прочно закрепляют реснички на клеточной поверхности. В основании каждого базального тельца лежит центриоль, такая же, как и в центросоме, с 9 группами связанных друг с другом триплетов микротрубочек, выстроенных по типу тележного колеса. Центриоли многофункциональны. Они вносят свой вклад в сборку митотического веретена в делящихся клетках, мигрируют к плазматической мембране интерфазных клеток, где служат местом построения (нуклеации) аксонемы (рис. 40).

Поскольку в ресничках трансляция не идет, создание аксонемы требует интрафлагеллярного транспорта (IFT) – транспортной системы, обнаруженной у зеленой водоросли *Chlamydomonas*. Как и в аксоне, моторы переносят грузы как в антеро- так и в ретроградном направлении. В этом случае работают кинезин-2 (антероградное направление) и цитоплазматический динеин-2 (ретроградный транспорт).

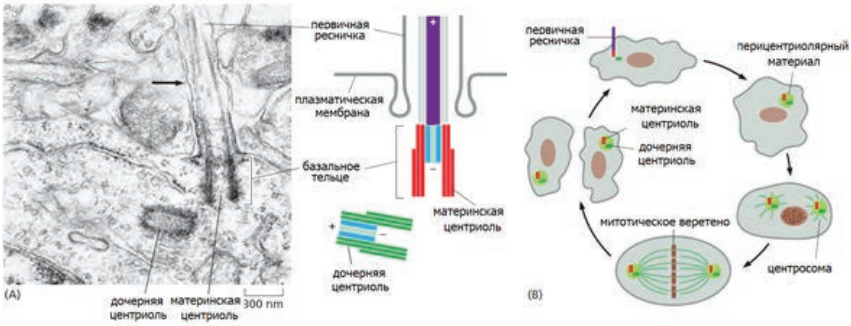


Рис. 40. Первичная ресничка.
А – электронная микрография и диаграмма базального тельца и первичной реснички в нейроне мыши. Аксонема первичной реснички (черная стрелка) заякорена на материнской центриоли базального тельца, которое расположено под плазматической мембраной вблизи клеточной поверхности.
В – центриоли работают попеременно в качестве базального тельца и сердцевины центросомы. Перед вхождением клетки в цикл деления первичная ресничка слущивается или втягивается. Центриоли привлекают перицентриолярный материал и удваиваются во время S-фазы, что приводит к появлению двух центросом, где каждая содержит по две центриоли. Центросомы нуклеируют (являются центром их организации). Микротрубочки расходятся к полюсам митотического веретена. По выходе из митоза первичная ресничка снова отрастает от материнской центриоли

Первичные ворсинки были обнаружены на поверхности почти всех типов клеток, где они чувствуют и отвечают на внешнее окружение. Наиболее наглядно это продемонстрировано на функции слуха и зрения. В назальном эпителии реснички, выступающие из дендритов олфакторных (обонятельных) нейронов, являются местом восприятия запаха и амплификации сигнала. Сходным образом палочки и колбочки сетчатки позвоночных имеют первичные реснички, снабженные развитым окончанием, называемым внешним сегментом, который предназначен для конверсии света в нервный сигнал (см. ранее). Поддержание работы внешнего сегмента требует постоянного переноса посредством IFT большого количества липидов и белков внутри реснички со скоростью до 2000 молекул в минуту. Связь между функцией реснички и восприятием света и запаха хорошо просматривается на примере синдрома Бардэ-Бидла – группы заболеваний, связанных с дефектами интрафлагеллярного транспорта в ресничках, либо с дефектами базального тельца. Пациенты с этим синдромом не способны чувствовать запахи и страдают от дегенерации сетчатки. Также в набор симптомов входят потеря слуха, поликистоз почек, диабет, ожирение, полидактилия – это дает основание говорить, что первичные реснички функционируют во многих аспектах человеческой физиологии.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ И СЕПТИНЫ

Промежуточные филаменты особенно многочисленны в клетках, подвергающихся механическому стрессу, придают механическую прочность тканям.

Цитоплазматические промежуточные филаменты входят в состав ***ядерных ламинов***, которые образуют переплетенную сеть, выстилающую внутреннюю мембрану ядерной оболочки, обеспечивая места заякоривания для хромосом и ядерных пор. Канатоподобные цитоплазматические промежуточные филаменты (ПФ) кодируются у человека 70 различными генами (табл. 1).

Таблица 1

Основные типы белков промежуточных филаментов в клетках позвоночных

Типы промежуточных филаментов	Входящие в их состав полипептиды	Расположение
Ядерные	Ламины A, B и C	Ядерная ламина
Виментин-подобные	Виментин	Клетки мезенхимального происхождения
	Десмин	Мышцы
	Глиальный фибриллярный кислый белок	Глиальные клетки (астроциты и некоторые Шванновские клетки)
	Периферин	Некоторые нейроны
Эпителиальные	Кератины I (кислые)	Эпителиальные клетки и их производные (волосы, ногти)
	Кератины II (нейтральные/щелочные)	
Аксональные	Белки нейрофиламентов (NF-L, NF-M и NF-H)	Нейроны

Структура ПФ

Структура ПФ представлена протяженными белками, имеющими суперспиральную структуру. Два мономера формируют димер, пары димеров объединяются и образуют антипараллельный смещенный тетрамер (рис. 41).

В отличие от актиновых или тубулиновых субъединиц, субъединицы ПФ не содержат сайтов связывания с нуклеотидами. Тетрамерная субъединица составлена из двух димеров, имеющих антипараллельное направление, её оба конца одинаковы.

Таким образом, сборка ПФ не имеет структурной полярности, критичной для актиновых филаментов и микротрубочек. Тетрамеры упаковываются в филамент, куда входят 8 параллельных протофиламентов, состоящих из тетрамеров. Таким образом, каждый отдельный ПФ в разрезе будет иметь 32 отдельные альфа-спирали. Все это большое количество полипептидов выровнено друг относительно друга в параллельную структуру, где присутствует сильное латеральное гидрофобное взаимодействие, типичное для белков в суперспиралях. В конечном итоге оно придает ПФ форму каната. ПФ можно легко гнуть, но их очень трудно разорвать. Их можно вытянуть более чем в три раза по отношению к их начальной длине.

Мало известно о механизме сборки и разборки ПФ по сравнению с актиновыми филаментами и МТ. В чистом белковом растворе ПФ чрезвычайно стабильны благодаря прочным связям между субъединицами, однако некоторые ПФ, включая ***виментин***, образуют динамические структуры в таких клетках, как фибробласты. Фосфорилирование белков, возможно, регулирует их разборку, практически также как и фосфорилирование регулирует разборку ядерных ламинов в митозе.

Механическая функция промежуточных филаментов

Кератины – это наиболее разнообразное семейство ПФ: их насчитывается около 20 в различных типах эпителиальной ткани у человека и еще примерно 10, являющихся специфическими для волос и ногтей. Анализ генома человека выявил 54 различных кератина. Каждый кератиновый филамент состоит из равных частей типа I (кислого) и типа II (нейтральный/щелочной) кератиновых белков.

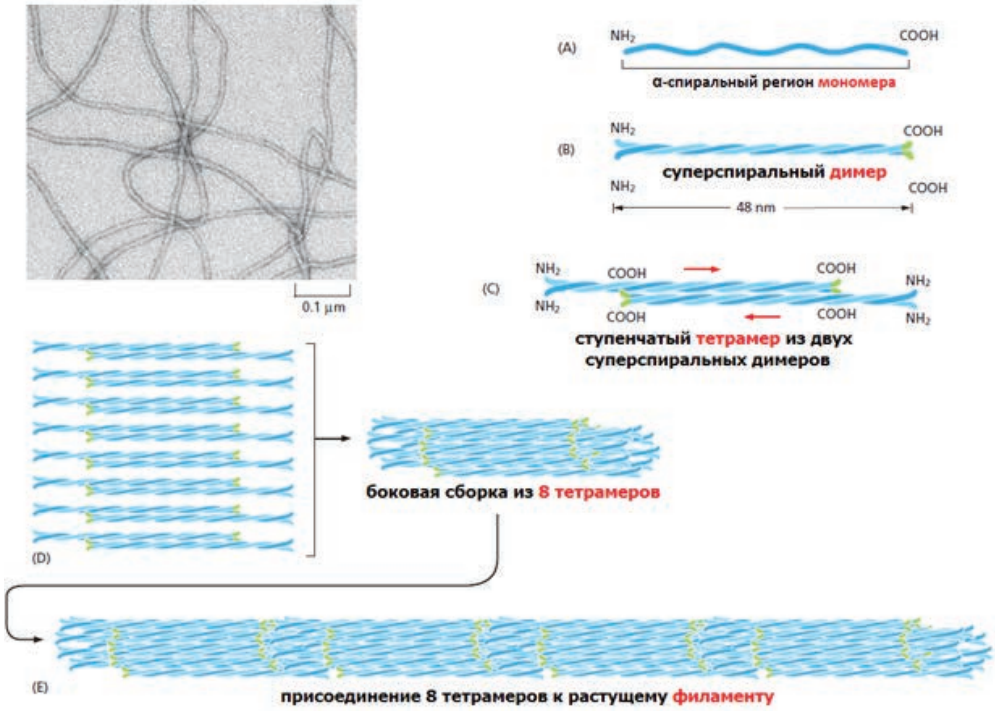


Рис. 41. Модель конструкции ПФ. Мономер, показанный на A объединяется с другим мономером и образует димер B, в котором консервативные протяженные прямые домены выравнены параллельно и переплетены друг с другом в суперспираль. C – Два димера латерально объединяются и образуют антипараллельный тетрамер. Димеры и тетрамеры являются растворимыми субъединицами ПФ. D – Внутри каждого тетрамера димеры смещены по отношению друг к другу, и это дает им возможность объединяться с другими тетрамерами. E – В конечном 10-нм филаменте тетрамеры упакованы в спиральный пучок, насчитывающий 16 димеров (32 суперспирали) в разрезе. Половина этих димеров направлена в одну сторону, а другая половина – в противоположную

Они образуют гетеродимерные субъединицы филамента. Связанные в сеть кератиновые филаменты удерживаются вместе благодаря дисульфидным связям и могут оставаться целыми даже после смерти клетки, образуя прочные покрытия, например, внешние слои кожи или волосы, ногти. Разнообразие кератинов используется в клинике для диагноза эпителиальных опухолей (карцином), поскольку конкретный набор экспрессируемых кератинов указывает на эпителиальную ткань, из которой происходит опухоль, что помогает в выборе терапии.

Эпителиальная клетка способна производить много разных типов кератина, которые сополимеризуются в единичную сеть (рис. 42).

Кератиновые филаменты придают механическую прочность эпителиальной ткани отчасти благодаря тому, что они заякоривают ПФ на сайтах межклеточных контактов, называемых **десмосомами**, либо на контактах **клетка-матрикс** (**полудесмосомы**). Вспомогательные белки, такие как ***филагрин*** *(filaggrin)*, собирают кератиновые филаменты в пучки в дифференцирующихся клетках эпидермиса, чтобы придать внешним слоям кожи особую прочность. Пациенты с мутациями в гене филаггрина очень предрасположены к болезни сухости кожи, таким как **экзема**.

Мутации в генах кератинов вызывают несколько генетических заболеваний у человека. Например, экспрессия дефектных кератинов в базальном слое эпидермиса служит причиной заболевания ***epidermolysis bullosa simplex (простой буллезный эпидермолиз)***, при котором кожа покрывается волдырями даже при незначительном механическом воздействии, которое разрывает базальные клетки (рис. 43).

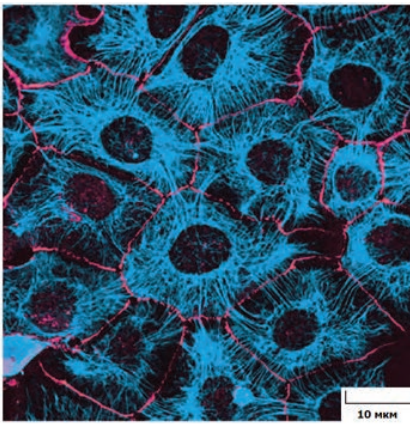


Рис. 42. Кератиновые филаменты в эпителиальных клетках. Микрография иммунофлюоресценции сети кератиновых филаментов (***голубые***) в слое культивируемых эпителиальных клеток. Филаменты каждой клетки непрямо связаны с филаментами в соседней клетке при помощи десмосом. Другой белок был прокрашен ***красным*** для того, чтобы показать положение границ клеток

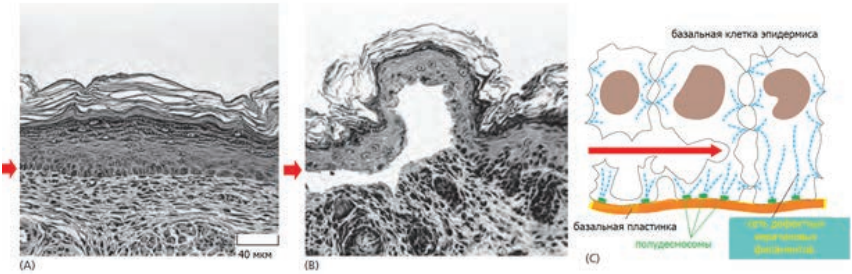


Рис. 43. Пузырение кожи, вызываемое мутантным геном кератина. Мутантный ген, кодирующий неполную форму (транкированную) кератинового белка (у которого отсутствуют N- и C-концевые домены) был экспрессирован в трансгенной мыши. Поврежденный белок ассемблируется совместно с нормальными кератинами, что приводит к разрушению сети кератиновых филаментов в базальных клетках кожи. Световые микрографии разреза (сечения): A – нормальной ткани, B – мутантной кожи показывают, что пузырение происходит из-за разрыва клеток базального слоя в мутантном эпидермисе (короткие ***красные*** стрелки). C – Рисунок трех клеток в базальном слое мутантного эпидермиса при наблюдении в электронный микроскоп. Как указано ***красной*** стрелкой, клетки разрываются между ядром и полудесмосомами, соединяющими кератиновые филаменты с подлежащей базальной пластинкой

Другие типы пузырения, такие как болезни полости рта, эпителия пищевода и роговицы, вызываются мутациями в различных кератинах, экспрессия которых специфична для данной ткани. Общим аспектом всех этих болезней является разрыв клеток как следствие механической травмы и дезорганизация или образование сгустков кератиновых филаментов цитоскелета. Множество специфических мутаций, вызывающих данные заболевания, изменяет концы центрального стержневого домена, что говорит о важности этой конкретной части белка для правильной сборки филаментов.

Члены другого семейства ПФ – нейрофиламенты – найдены в больших концентрациях в аксонах нейронов позвоночных (рис. 44).

Три типа белков нейрофиламентов (NF-L, NF-M и NF-H) дают смешанные сборки in vivo, образуя гетерополимеры. При росте аксона новые субъединицы нейрофиламентов включаются по всей длине аксона в ходе динамического процесса, который заключается в добавлении субъединиц как вдоль филамента, так и добавлении их с концов. После того, как аксон достиг нужной длины и связался со своей мишенью, его диаметр может увеличиться до пяти раз. Уровень экспрессии нейрофиламентов напрямую контролирует диаметр аксона, а от диаметра аксона зависит скорость распро-

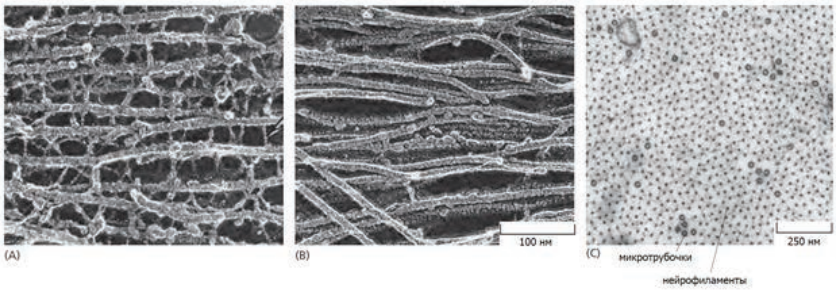


Рис. 44. Два типа ПФ в клетках нервной системы.
А – микрография холодного скола нейрофиламентов в аксоне нервной клетки. Видны многочисленные белковые мостики – упаковка, придающая этой длинной клетке эластичную прочность. Такие перекрестные мостики созданы из длинных неспиральных выступов на С-конце очень большого белка нейрофиламентов (NF-H).
В – микрография холодного скола филаментов глиальных клеток показывает, что данные ПФ гладкие и между ними мало перекрестных сшивок.
С – микрография трансмиссионной электронной микроскопии среза аксона. Видна регулярная упаковка «бок-о-бок» нейрофиламентов, по числу намного превышающих количество микротрубочек

странения электрического сигнала по нему. Помимо этого, нейрофиламенты обеспечивают прочность и стабильность клеточных процессов в длинных нейронах. Нейродегенеративное заболевание ***амиотрофический латеральный склероз*** (АЛС, или болезнь Лу-Гериг (ALS, or Lou Gehrig's disease)) ассоциировано с накоплением и неправильной сборкой нейрофиламентов в телах и аксонах моторных нейронов, что приводит к нарушению аксонального транспорта. Дегенерация аксона ведет к мышечной слабости и атрофии. Однако причинная связь между патологией нейрофиламентов и АЛС пока четко не установлена.

Виментин-подобные филаменты – это третье семейство ПФ. Десмин – член этого семейства – экспрессируется в скелетной, сердечной и гладкой мускулатуре, где он образует основание вокруг Z-дисков в саркомерах. У мышей, не экспрессирующих десмин, вначале мышцы развиваются нормально, но у взрослых мышей проявляются различные аномалии в мышечных клетках, включая неупорядоченные мышечные волокна. У людей мутации в десмине ассоциируются с различными формами мышечной дистрофии и сердечной миопатии, что показывает важность десмина в стабилизации мышечных волокон.

Помимо установленной роли в поддержании механической стабильности ядра, есть доказательства, что один из классов ламинов – А-тип – вместе с множеством белков ядерной оболочки является

скэффолдом (подмостками) для белков, контролирующих множество клеточных процессов, включая транскрипцию, организацию хроматина и передачу сигналов (сигнальную трансдукцию). В основном ламинопатии ассоциируются с мутацией ламина А и включают в себя тканеспецифические заболевания. Скелетные и мышечные аномалии связаны с ослаблением ядерной оболочки. Это приводит к повреждению клетки и её смерти, а ламинопатии возникают из-за патогенных или тканеспецифических альтераций в генной экспрессии.

Линкерные белки промежуточных филаментов

Сеть ПФ связана с семейством белков ***плакинов***. Плакины – это большие модульные белки, содержащие много доменов, соединяющих филаменты цитоскелета друг с другом и стыковочными комплексами. Например, белок плектин связывает в пучки ПФ, а также ПФ с микротрубочками, пучками актиновых филаментов и толстыми нитями моторного миозина II. Он прикрепляет пучки ПФ к адгезивным структурам на плазматической мембране (рис. 45).

Плектин и другие плакины взаимодействуют с белковыми комплексами, соединяющими цитоскелет и «внутренности» ядра. Эти комплексы состоят из белков **SUN** на внутренней ядерной мембране и белков **KASH** (также называемых ***неспринами***) на внешней ядерной мембране (рис. 46).

Белки SUN и KASH связываются друг с другом внутри ядерной оболочки, образуя мостик между ядерным и цитоплазматическим

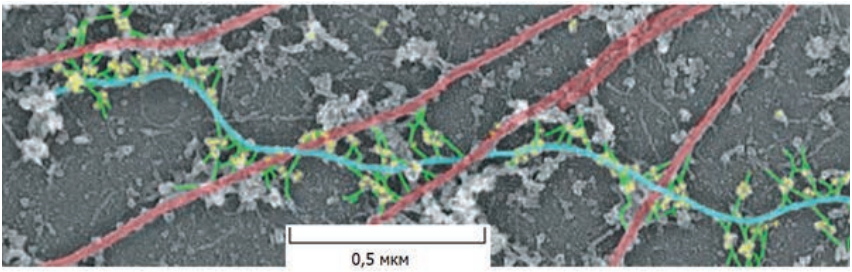


Рис. 45. Перекрестные связки различных элементов цитоскелета при помощи плектина.
Плектин (*зеленый*) создает перекрестные связи между ПФ (*голубые*) и микротрубочками (*красные*). На данной электронной микрографии точки (*желтые*) – это частицы золота, сшитые с антиплектиновыми антителами. Сеть актиновых филаментов убрана, чтобы облегчить обнаружение этого белка

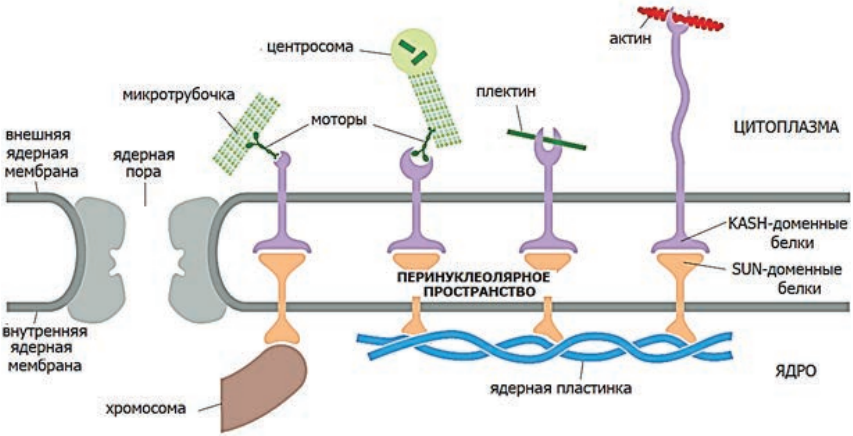


Рис. 46. SUN–KASH-белковые комплексы.
Цитоплазматический цитоскелет связывается через ядерную оболочку с ядерной ламиной или хромосомами посредством белков SUN и KASH (***оранжевые*** и ***фиолетовые***, соответственно). Домены SUN и KASH этих белков связываются друг с другом внутри перинуклеарного пространства. Белки SUN связываются с ядерной ламиной или хромосомами. Белки KASH снаружи ядерной оболочки связываются с цитоплазматическим цитоскелетом при через моторные белки, актиновые филаменты или плектин

цитоскелетом. Внутри ядра белки SUN связываются с ядерной ламиной или хромосомами. В то же время белки KASH в цитоплазме связываются с актиновыми филаментами, или, используя посредников – моторные белки и плакины, связываются с микротрубочками и ПФ. Такие связи лежат в основе механического сопряжения ядра и цитоплазматического цитоскелета. Эти связи также задействованы во многих клеточных процессах, включая перемещение хромосом внутри ядра во время мейоза, позиционирование ядра и центросомы, миграцию ядра и глобальную организацию цитоскелета.

Мутации в гене плектина вызывают ужасное заболевание у человека, сочетающее буллезный эпидермолиз (вызываемый из-за разрушения кератиновых филаментов кожи), мышечную дистрофию (вызываемую из-за разрушения десминовых филаментов) и нейродегенерацию (вследствие разрушения нейрофиламентов). У мышей с отсутствием функционирующего десмина в течение нескольких дней после рождения развивается пузырение кожи и аномалии в скелетной и сердечной мышце.

Хотя плектин не является необходимым для начала образования и сборки ПФ, он как кросс-линкерный белок обеспечивает упругость клетки и сопротивляемость её механическим воздействиям.

Септины

ГТФ-связывающие белки ***септины*** служат в качестве дополнительной системы филаментов во всех эукариотических клетках кроме наземных растений. Септины собираются в неполярные филаменты, образующие кольца. Структуры наподобие клеток, участвуют в компартментализации мембран в отдельные домены, и организуют актиновые филаменты и микротрубочки. Септин, впервые обнаруженный у почкующихся дрожжей, локализуется в перешейке между материнской дрожжевой клеткой и отпочковывающейся дочерней (рис. 47А).

В этой позиции септины блокируют перемещение белков с одной стороны перешейка на другую, обуславливая клеточный рост в дочерней клетке. Септины также участвуют в образовании актин-миозинового контрактильного кольца, необходимого для цитокинеза. В клетках животных они участвуют в клеточном делении, миграции и транспорте везикул. Так, в первичной ресничке септиновые филаменты собираются у основания реснички и служат в качестве

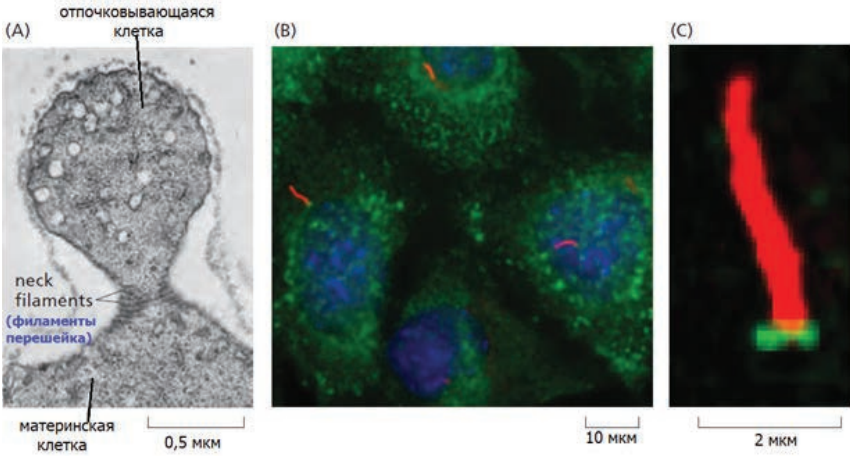


Рис. 47. Компартментализация клетки при помощи ***септина***.
А – септиновые структуры образуют филаменты в области перешейка между материнской и дочерней отпочковывающейся клетками.
В – на данной микрографии культивируемых клеток человека ДНК окрашена ***синим***, а септины – ***зеленым***. Микротрубочки в первичных ресничках мечены антителами, узнающими модифицированный (ацетилированный) тубулин (***красный***), которого много в аксонеме.
С – на увеличенной фотографии виден септиновый воротничок у основания реснички

барьера для диффузии через плазматическую мембрану, ограничивая перемещение мембранных белков и формируя особый состав мембраны реснички (Figure 16–73B and C). Снижение концентрации септинов снижает эффективность образования первичной реснички и передачу сигнала через неё.

У дрожжей обнаружено 7, а у человека 13 генов септиновых белков (4 группы по схожести последовательностей). В пробирке очищенные септины собираются в симметричные гетерогексамеры или гетероктамеры, образующие неполярные парные филаменты (рис. 48). Связывание с ГТФ необходимо для сворачивания (фолдинга) септиновых полипептидов, однако роль гидролиза ГТФ в септинах пока не выяснена. Септиновые структуры в клетке собираются и разбираются, но не столь динамичны, как актиновые филаменты или микротрубочки.

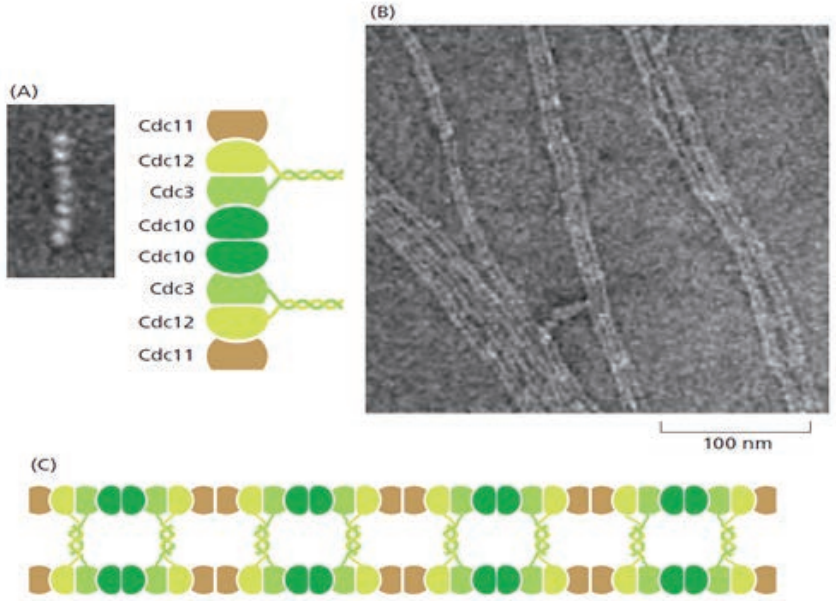


Рис. 48. Полимеризация септинов.
А – электронная микрофотография септинового стержня, собранного из комбинации двух копий каждого из 4 дрожжевых септинов (показаны справа). Восьмисубъединичный стержень неполярен, поскольку центральная пара субъединиц (Cdc10) создает симметричный димер.
В – электронная микрография спаренных септиновых филаментов, собранных из очищенных септинов при высокой концентрации соли.
С – спаренные септиновые филаменты могут собираться при помощи латеральной ассоциации между филаментами посредством суперспиралей, образуемых между С-концевыми выступами в белках Cdc3 и Cdc12

ПОЛЯРИЗАЦИЯ И МИГРАЦИЯ КЛЕТОК

Главной проблемой клеточной биологии является выяснение механизмов взаимодействия молекулярных компонентов клетки, кооперирующих друг с другом и воспроизводящих сложное клеточное поведение. В основе процесса миграции клеток лежит скоординированное развертывание механизмов: динамическая сборка и разборка цитоскелета, регулирование и модификация их структуры при помощи полимер-ассоциирующихся белков, работа моторных белков, двигающихся по полимерам или создающих напряжение в них.

Перемещение клеток по поверхности

У животных практически все перемещения клетки осуществляются за счет ползания, исключение составляют сперматозоиды. Во время эмбриогенеза структура животного создается за счет миграции отдельных клеток в свои целевые места назначения и скоординированного перемещения целых эпителиальных слоев. У позвоночных особенно примечательны своей миграцией клетки нервного гребня. Они перемещаются на дальние расстояния от места своего происхождения в нервной трубке к самым разным местам в эмбрионе. Перемещение на дальние расстояния – это фундаментальное свойство, необходимое для построения всей нервной системы: именно так обогащенные актином растущие конусы развивающихся нейронов путешествуют к своей конечной цели, направляемые комбинацией внутренних сигналов и сигналов, находящихся на поверхности клеток и во внеклеточном матриксе. В организме взрослых животных также полно ползающих клеток. Макрофаги и нейтрофилы протискиваются к месту инфекции и заглатывают бактерии. Макрофаги и нейтрофилы – критическая часть врожденного иммунного ответа. Остеокласты проползают в кость, образуя каналы, которые заполняются следующими за ними остеобластами – процесс постоянного обновления и ре-

формирования костной ткани. Подобным образом фибробласты мигрируют через соединительную ткань, ремоделируя её и выстраивая заново поврежденные структуры в месте «ранения». В упорядоченном процессе клетки эпителиальной выстилки кишечника перемещаются к вершинам ворсинок кишечника, чтобы заменить впитывающие клетки, слущившиеся с кончиков ворсинок. К сожалению, ползание клеток также играет роль и во многих типах опухолей, где клетки начальной опухоли вторгаются в соседние ткани и пробираются оттуда в кровеносное русло или лимфати-

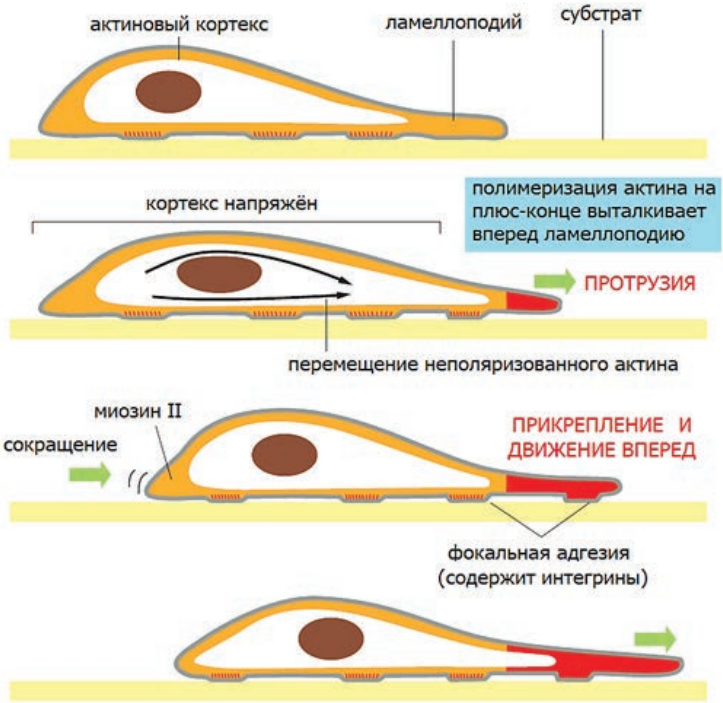


Рис. 49. Продвижение клетки вперед с помощью цитоскелета. Зависимая от полимеризации актина протрузия и прочное прикрепление ламеллоподий (выступов клетки) на лидирующем конце клетки двигают кромку клетки вперед (***зеленая*** стрелка впереди) и растягивают актиновый кортекс. Сокращение в тыльной части клетки перемещает тело клетки вперед (***зеленая*** стрелка позади) и сбрасывает до некоторой степени напряжение. Новые фокальные контакты создаются впереди, а старые задние разбираются по мере того, как клетка ползет вперед. Этот цикл повторяется, и клетка перемещается вперед пошагово. Все шаги в этом процессе слажены и скоординированы, так что перемещение клетки вперед является плавным. Полимеризующийся кортикальный актин показан ***красным***

ческие сосуды, а оттуда попадают в другие части организма, образуя там метастазы.

Миграция клеток – сложный процесс, зависящий от обогащенного актином кортекса под плазматической мембраной. Здесь задействовано три основных процесса: ***протрузия*** (выпячивание частей клетки), при которой плазматическая мембрана вытягивается вперед перед клеткой; ***прикрепление***, при котором актиновый цитоскелет связывается сквозь плазматическую мембрану с субстратом; и наконец, ***тракция***, в процессе которой порция перемещающейся цитоплазмы двигается вперед (рис. 49).

У некоторых ползающих клеток, таких как кератиноциты рыбьего эпидермиса, все эти действия совершаются одновременно, и кажется, что клетка плавно скользит вперед, не изменяя форму. В других же клетках, таких как фибробласты, эти шаги более независимы друг от друга, потому движение кажется дерганым и неравномерным.

Роль актина в организации движения клетки

Первый шаг перемещения – протрузия лидирующей кромки – зависит от сил, генерируемых полимеризацией актина, при которой плазматическая мембрана выпячивается вперед. Разные типы клеток производят разные протрузивные структуры, включая филоподии (известные также как микрошипы) и ламеллоподии. Они наполнены плотной сердцевиной из нитчатого актина, которая выталкивает мембранные органеллы. Эти структуры различаются в основном по способу организации актина кросслинкерными белками. Филоподии, образуемые на мигрирующем конусе роста нейронов и некоторых типах фибробластов, по сути дела одномерные. В них содержатся центральные длинные, собранные в пучки филаменты, очень напоминающие таковые в микроворсинках, но более длинные и тонкие, а также более динамичные.

Ламеллоподии, образуемые эпителиальными клетками и фибробластами, а также и некоторыми нейронами, двумерные, лоскутоподобные структуры. В них содержится сеть перекрестно связанных актиновых филаментов, множество из которых лежит в плоскости, параллельной твердому субстрату.

Инвадоподии и относящиеся к ним структуры, известные как подосомы, представляют собой третий тип обогащенных актином про-

трузий. Такие образования уже трехмерные, они являются важными для клеток, преодолевающих тканевые барьеры, например, когда метастатические опухолевые клетки вторгаются (инвазируют) в прилежащие ткани. Инвадоподии содержат множество таких же, как и фило- и ламеллоподии, регулирующих актин компонентов, а также они иногда разрушают внеклеточный матрикс, что требует синтеза везикул с матрикс–деградирующими протеазами.

Другая форма выпячивания мембраны – блебинг (волдырение) – часто наблюдается in vivo или в культивируемых на мягком субстрате внеклеточного матрикса клетках. Пузыри образуются, когда плазматическая мембрана локально отсоединяется от подлежащего под ней актинового кортекса, позволяя цитоплазме втечь в эту щель и выпятить мембрану вперед (рис. 50). Формирование пузыря зависит и от гидростатического давления внутри клетки, которое создается благодаря сокращению актин-миозиновых сборок. После того, как пузырь выпятился, актиновые филаменты снова собираются на мембране пузыря и образуют новый кортекс. Привлечение миозина II, а также сокращение актина и миозина приводит к обратному впячиванию пузыря. И, наоборот, выпячивание новых пузырей из старых приводит к миграции клетки.

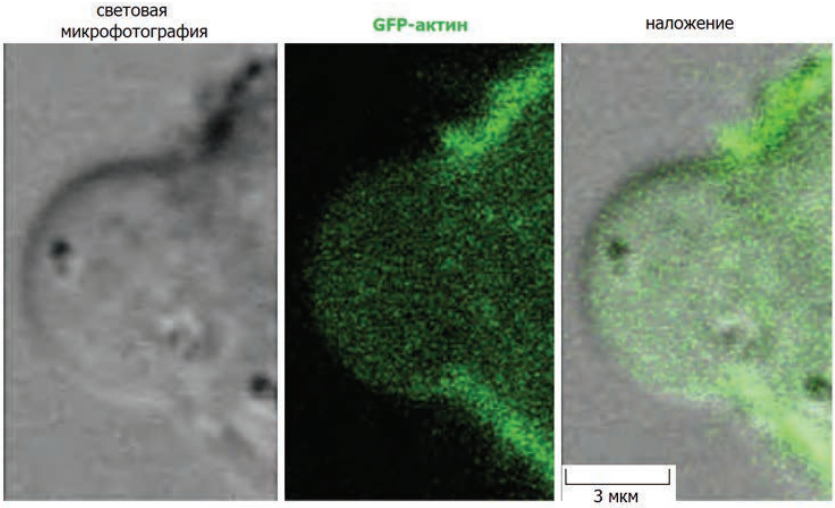


Рис. 50. Мембранный пузырь, образовавшийся при разрушении актинового кортекса.
Слева приведена микрография световой микроскопии, на которой виден сферический выступ мембраны (пузырь), вызванный разрушением при помощи лазера небольшого участка актинового кортекса. Кортекс помечен зеленым на изображении посередине (экспрессируется конъюгированный белок «GFP-актин»)

Строение ламеллоподий

Ламеллоподии были хорошо изучены на примере эпителиальных клеток эпидермиса рыб и лягушек – ***кератоцитах***, названных так из-за повышенного содержания в них кератиновых филаментов. Эти клетки покрывают животное в виде сформированных эпителиальных слоёв: кератоциты приспособлены к быстрому закрытию ран, перемещаясь со скоростями до 30 мкм/мин.

При культивировании отдельных клеток ими приобретаются определенная форма: очень большая ламеллоподия и маленькое, перемещающееся тело, не прикрепленное к субстрату (рис. 51, 52). Фрагменты ламеллоподии можно отрезать при помощи микропипетки. Эти кусочки ламеллоподии продолжают ползать, выглядя как маленькие кератиноциты.

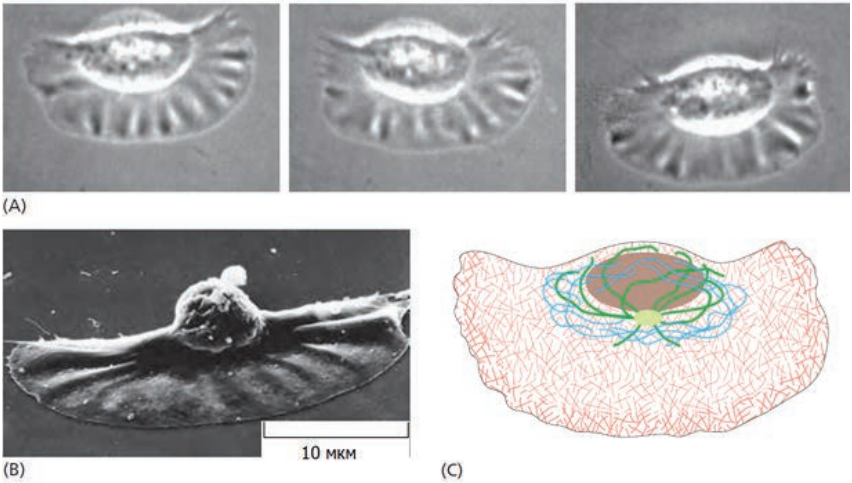


Рис. 51. Мигрирующий кератиноцит из эпидермиса рыб.
А – световые микрографии кератиноцита в культуре, сделанные с интервалом в 15 секунд. Данная клетка перемещается со скоростью примерно 15 мкм/мин.
В – кератиноцит при наблюдении с помощью сканирующего электронного микроскопа. Видна широкая плоская ламеллоподия и маленькое тело клетки, включающее ядро. Это тело приподнято над субстратом.
С – распределение филаментов цитоскелета в данной клетке. Актиновые филаменты (***красные***) заполняют широкую ламеллоподию и отвечают за быстрое передвижение клетки. Микротрубочки (***зеленые***) и ПФ (***голубые***) ограничены районами вблизи ядра

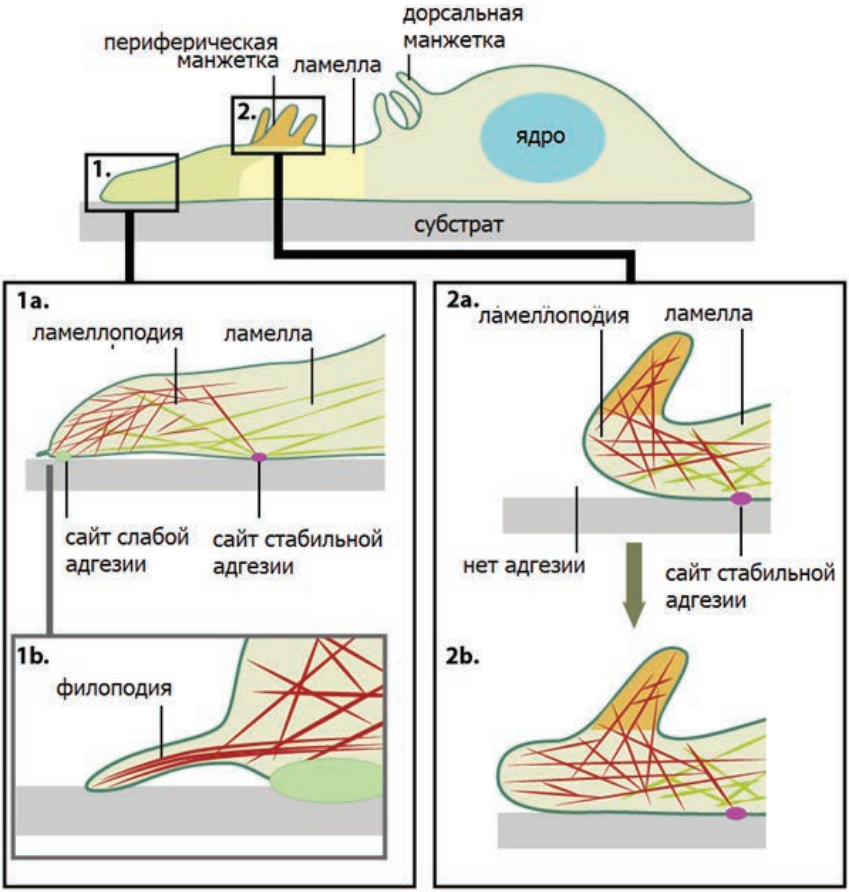


Рис. 52. Строение протрузивных структур клетки
Ламеллоподия (1a) и филоподия (1b) – основанные на актине структуры, используемые клеткой для зондирования клеточного окружения впереди мигрирующей клетки. Адгезия к подлежащей поверхности (внеклеточный матрикс, другие клетки и т.п.) определяет скорость и направление сборки актина во время расхождения клеток или их перемещения. При миграции клетки, недавно образовавшиеся сайты адгезии на передней кромке клетки «созревают» в сайты стабильной адгезии по мере продвижения этих точек адгезии по направлению к ламелле. В отсутствие адгезии на передней кромке (2a, 2b), происходит ретроградное перемещение актиновых филаментов и образуются манжетки

Во время выпячивания ламелиподии вперед актиновые филаменты остаются неподвижными по отношению к субстрату. Большинство этих филаментов ориентировано плюс-концами вперед. Минус-концы присоединены к другим филаментам при помощи Arp 2/3-комплекса, помогающего образовать двумерную сеть (рис. 53). Вся сеть как единое целое подвержена тредмилингу: передние участки собираются, задние участки разбираются, что очень похоже на тредмилинг отдельных актиновых филаментов (обсуждавшийся ранее).

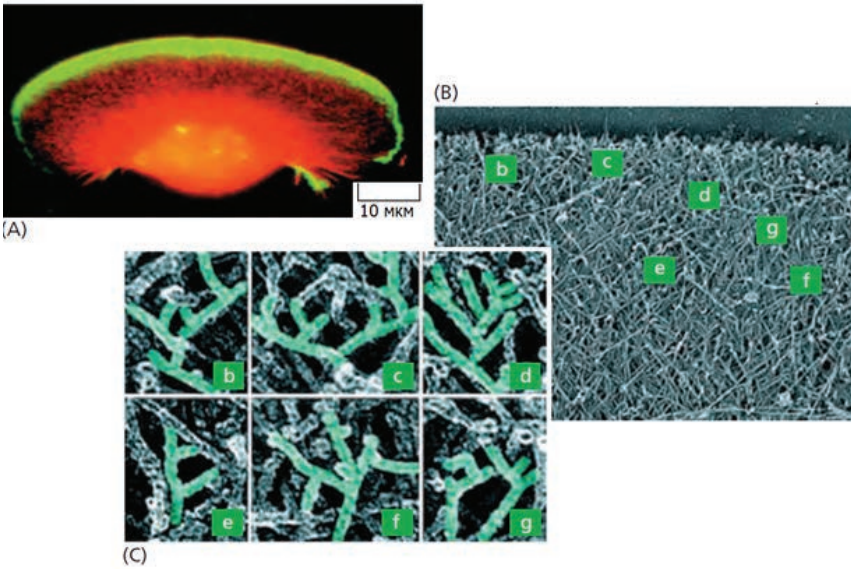


Рис. 53. Зарождение актиновых филаментов и образование сети в ламеллиподии при помощи Arp2/3-комплекса.
A – кератиноцит с актиновыми филаментами, меченными красным (флюоресценция фаллоидина и Arp 2/3-комплекса мечена зеленым). Как видно, Arp 2/3-комплекс концентрирован на переднем крае ламеллиподии, когда нуклеация актина очень активна.
B – электронная микрография оттененной платиной реплики лидирующей кромки кератиноцита. Видна плотная сеть актиновых филаментов. Метки отображают участки, показанные на (C).
C – увеличение помеченных регионов актиновой сети в лидирующей кромке, показанной в (B). Можно увидеть многочисленные ветвящиеся филаменты с характерным углом 70 градусов, образуемом при включении комплекса Arp 2/3 в процесс нуклеации новых актиновых филаментов за пределами уже существующих филаментов

Однонаправленность движения ламеллоподии требует кооперации и механической интеграции нескольких факторов. Нуклеация филаментов происходит на лидирующей кромке, где и происходит основной рост новых актиновых филаментов, чтобы обеспечить выпячивание мембраны вперед.

Основная деполимеризация филаментов происходит позади лидирующей кромки. Поскольку кофилин связывается кооперативно и преимущественно с актиновыми филаментами, содержащими АДФ-актин (Д-форма), новосинтезируемые Т-филаменты должны быть устойчивы к его действию в лидирующей кромке (рис. 54).

По мере старения филаментов и протекания гидролиза АТФ кофилин способен эффективно разбирать устаревшие филаменты. Таким образом, замедленный гидролиз АТФ в полимеризованном актине, как полагают, обеспечивает основу механизма по поддер-

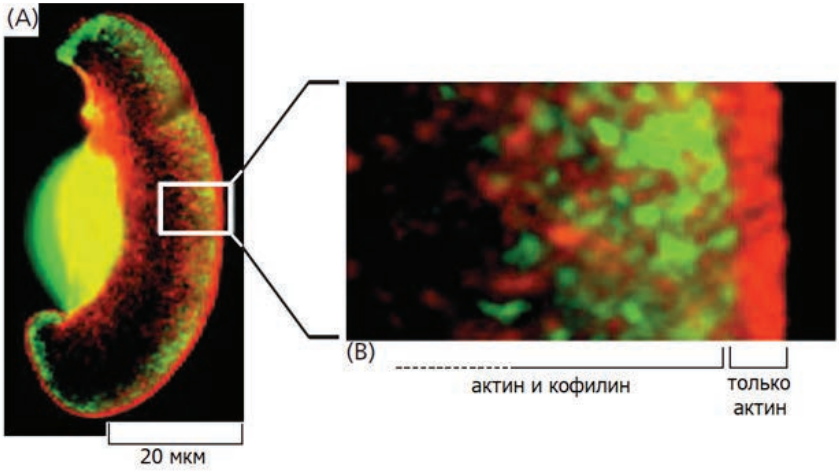


Рис. 54. Кофилин в ламелоподии.
А – кератиноцит с актиновыми филаментами, меченными флюоресцентным фаллоидином (***красный***), а кофилин помечен ***зеленым*** при помощи флюресцентных антител. Хотя плотная сеть актина простирается на всю ламеллоподию, кофилина не видно на самом переднем участке лидирующей кромки.
В – близкое рассмотрение региона, помеченного белым прямоугольником. Актиновые филаменты, находящиеся вблизи лидирующей кромки – сформировавшиеся совсем недавно и содержащие АТФ-актин (а не АДФ-актин), в общем случае не ассоциированы с кофилином

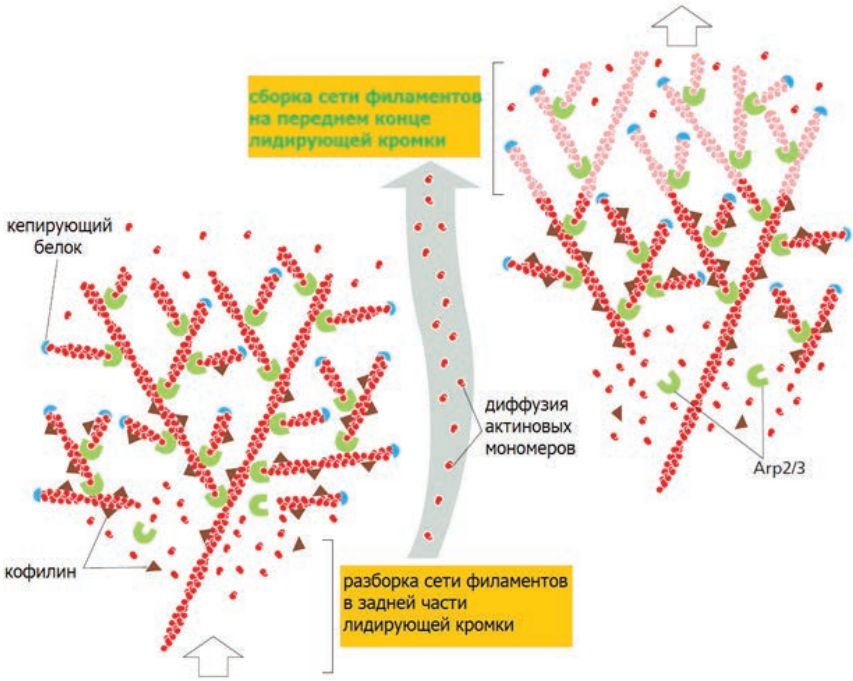


Рис. 55. Модель протрузии актиновой сети
в лидирующей кромке.
Два момента времени в жизни ламеллоподии: новосинтезированные структуры в более поздней точке времени показаны светлым оттенком. Нуклеация идет с помощью комплекса Arp 2/3 на переднем крае. Нуклеированные актиновые филаменты прикрепляются к боковой стороне уже существующих филаментов, в основном под углом 70 градусов. Филаменты удлиняются, продвигая плазматическую мембрану вперед благодаря своего рода заякориванию филаментов сзади. Плюс-концы актиновых филаментов с постоянной скоростью кэпируются.
После того, как недавно полимеризованные субъединицы гидролизуют связанный с ними АТФ, филамент становится восприимчивым к кофилину, деполимеризующему его. Это цикл пространственно разделяет преимущественную сборку на переднем крае и преимущественную разборку филаментов позади актиновой сети, при этом вся актиновая сеть движется вперед, даже если отдельные филаменты внутри неё остаются неподвижными по отношению к субстрату. Разбирается не весь актин, а актин в задней части ламеллоподии вносит вклад в миграцию вместе с ним миозина

жанию эффективного однонаправленного тредмилинга в ламелиподиях (рис. 55). Это также объясняет и внутриклеточное движение патогенов, таких как *Listeria*.

Роль миозина в движении клетки

Полимеризация актиновых филаментов на передней стороне мигрирующей клетки прикладывает её к субстрату и продвигает клетку. На лидирующей кромке мигрирующей клетки протрузия мембраны должна сопровождаться адгезией к субстрату. А на задней части клетки происходит открепление её от субстрата. Таким образом, миграция клетки строго регулируется в пространстве и во времени: полимеризация актина, динамическая адгезия и сокращение миозина – всё для координированного передвижения. Миозин II действует по меньшей мере двумя способами. Первый – это помощь в соединении актинового цитоскелета с субстратом посредством интегриновой адгезии. Силы, генерируемые полимеризацией актина и работой миозина, создают напряжение в месте прикрепления, которые затем превращаются в места ***фокальной адгезии*** – динамические сборки структурных и сигнальных белков, соединяющих мигрирующую клетку и внеклеточный матрикс. Второй механизм вовлекает биполярные миозиновые II филаменты, которые связываются с актиновыми филаментами на заднем конце ламеллоподии и перетаскивают клетку в новое положение – из недавнего перпендикулярного к лидирующей кромке положения в почти параллельное ей. Такая похожая на саркомер конструкция предотвращает выпячивание и подгибание края движущейся ламеллоподии, помогая подобрать края клетки при движении вперед (рис. 56).

Образуемые при помощи актина выступы (протрузии) могут проталкивать лидирующую кромку клетки вперед лишь в том случае, если имеется сильное взаимодействие между актиновой сетью и сайтами фокальной адгезии, в которых клетка прикрепляется к субстрату. Если такое взаимодействие нарушить, то давление полимеризации на лидирующей кромке и сокращение миозина в тылу приводят к тому, что вся актиновая сеть соскальзывает назад – феномен, известный как ретроградный поток (рис. 57).

Силы, генерируемые перемещающейся клеткой, создают существенное тянущее усилие относительно субстрата (рис. 58). И наоборот, внешнее механическое напряжение или растяжение, приложенное к клетке, вызывает в ней сборку стрессовых волокон и фокальных адгезий, и клетка становится более прочной.

Эти, пока еще недостаточно изученные двусторонние механические взаимодействия между клеткой и её физическим окружением, помогают в самоорганизации тканей позвоночных.

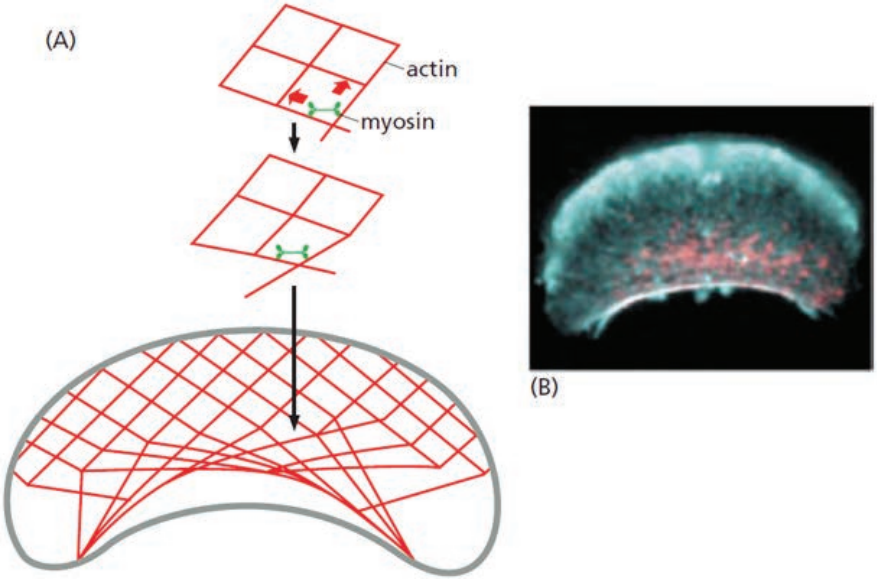


Рис. 56. Вклад миозина II в перемещение клетки.
А – биполярные миозиновые II филаменты связываются с актиновыми филаментами в сети ламеллоподии и вызывают ее сокращение. В результате направляемой миозином реориентации актиновых филаментов образуются пучки актиновых филаментов, привлекающие еще большее количество миозина II, что помогает сгенерировать контрактильные силы, необходимые для перемещения задней кромки ползущей клетки.
В – фрагмент большой ламеллоподии кератиноцита, отделенный от самой клетки. Такие кусочки продолжают быстро перемещаться, сохраняя порядок общей реорганизации цитоскелета как и в самом кератиноците. Актин (***голубой***) образует протрузивную сеть впереди фрагмента. Миозин II (***розовый***) собрался в полоску в задней части

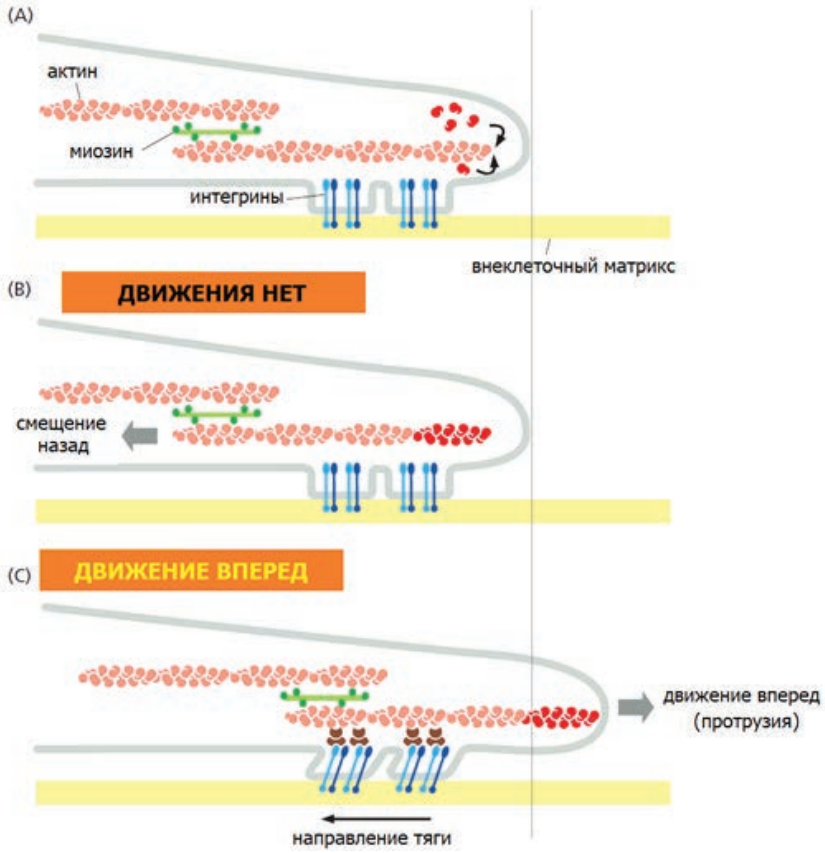


Рис. 57. Контроль адгезии клетки к субстрату на лидирующей кромке мигрирующей клетки.
А – актиновые мономеры включаются в актиновые филаменты в лидирующей кромке. Трансмембранные интегрины (***голубые***) помогают образовать фокальную адгезию, связывающую мембрану клетки и субстрат.
В – если взаимодействия между актиновыми филаментами и фокальной адгезией нет, то сам актиновый филамент съезжает назад под действием новосинтезированного актина. Миозин (***зеленый***) так же вносит вклад в движение филамента.
С – взаимодействие между связывающимися с актином адапторными белками (***коричневые***) и интегринами приводит к связи актинового цитоскелета и субстрата. Генерируемые миозином контрактильные силы через фокальную адгезию превращаются в напряжение относительно внеклеточного матрикса, приводящее к движению. Новосинтезированный кончик актинового филамента упирается в лидирующую кромку и вызывает её выпячивание (протрузию)

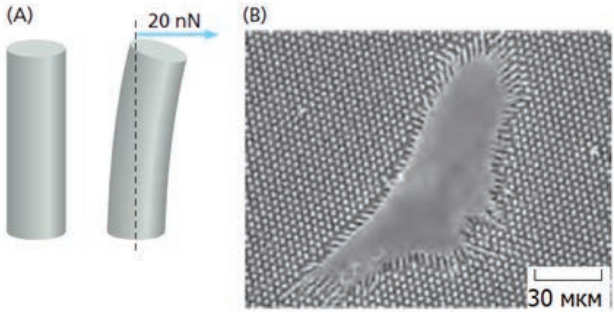


Рис. 58. Тянущие усилия, развиваемые подвижной клеткой.
А – маленькие гибкие штырьки прикреплены к субстрату и могут изгибаться под действием прикладываемой силы.
В – сканирующая электронная микроскопия клетки на поверхности, покрытой такими штырьками (высотой 6,1 мкм). Отклонения штырьков используются для подсчета векторов силы, соответствующей тянущим вперед усилиям, развиваемым клеткой по отношению к субстрату

Роль белков семейства Rho в поляризации клетки

Миграция клетки требует коммуникацию и координацию между одним концом клетки и другим. Во время направленной миграции важно, чтобы передний край клетки оставался структурно и функционально отличным от заднего края. Помимо участия в локальных механических процессах, таких как выпячивание переднего конца и подтягивание заднего, цитоскелет отвечает еще и за форму клетки, её организацию и механические свойства на всем протяжении клетки, длина которой у животных бывает несколько десятков микрометров.

Взаимодействия цитоскелета формируют полярность клетки. Клетка выстраивает разные структуры из разных молекулярных компонентов на переднем крае по сравнению с задним, либо же на верхнем крае по сравнению с нижним. Для перемещения клетки требуется установление полярности в соответствующем направлении.

Контроль процессов клеточной поляризации необходим также и при ориентации клеточного деления для образования когерентных, организованных многоклеточных структур. Генетические исследования на дрожжах, червях и мухах раскрыли детали молекулярных основ поляризации клеток. Механизмы, приводящие к полярности клеток у позвоночных, только начинают изучаться. Однако во всех известных экспериментах установлено, что цитоскелет играет центральную роль, а многие молекулярные компоненты являются эволюционно консервативными.

Создание разных видов клеточной полярности зависит от локального регулирования актинового цитоскелета внешними сигналами. Множество таких сигналов взаимодействует с группой близкородственных мономерных ГТФаз, относящихся к семейству Rho - *Cdc42*, *Rac* и *Rho*. Как и другие мономерные ГТФазы, белки Rho работают как молекулярные переключатели, циклирующие между активным ГТФ-связанным состоянием и неактивным ГДФ-связанным. Активация Cdc42 на внутренней поверхности плазматической мембраны запускает полимеризацию актина и образование филоподий. Активация Rac вызывает полимеризацию актина на периферии клетки, что приводит к образованию лоскутоподобной ламеллоподии. Активация Rho запускает два процесса: собирание в пучки актиновых и миозиновых II филаментов в стрессовые волокна и группировку интегринов и ассоциированных с ними белков в фокальные адгезии (рис. 59).

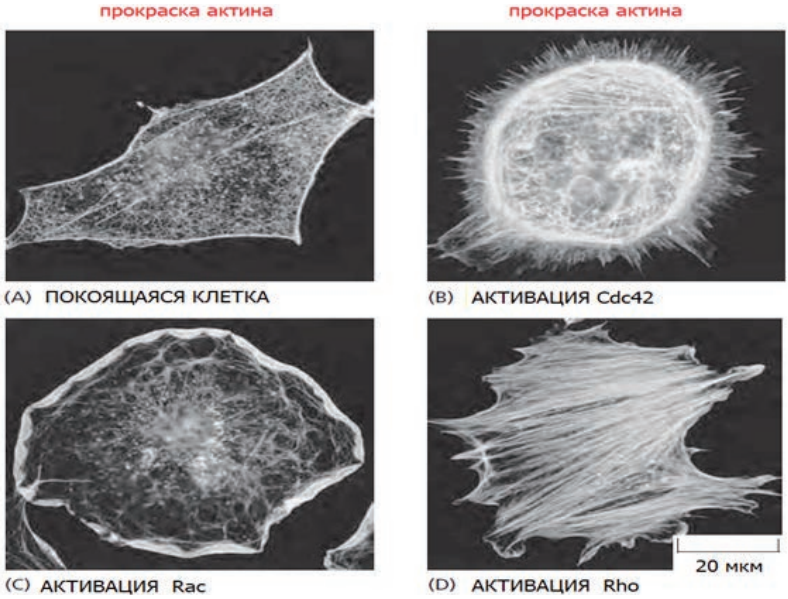


Рис. 59. Драматические эффекты Cdc42, Rac и Rho на организацию актина в фибробластах.
В каждом случае актиновые филаменты были мечены флуоресцентным фаллоидином.
A – при культивировании на истощенной сыворотке фибробласты располагали актиновые филаменты в основном в кортексе, а также имели мало стрессовых волокон.
B – микроинъекция конститутивно активированного Cdc42 вызывает образование множества мелких филоподий на периферии клетки.
C – микроинъекция конститутивно активированного Rac – близкородственной ГТФазы – вызывала образование огромной ламеллиподии по всей окружности клетки.
D – микроинъекция конститутивно активированного Rho приводила к быстрой сборке множества заметных стрессовых волокон

Сложные структурные изменения происходят потому, что каждый из данных молекулярных переключателей имеет **даунстрим** множество белков мишеней, которые воздействуют на организацию и динамику актина.

Некоторые ключевые мишени Cdc42 – это члены семейства WASp белков. У людей с дефектами в данных белках развивается синдром Вискотт-Олдридж (Wiskott-Aldrich Syndrome) – тяжелая форма иммунодефицита, при которой клетки иммунной системы имеют аномальную актин-зависимую подвижность, и тромбоциты формируются ненормальными. Хотя сам WASp экспрессируется лишь в клетках крови и иммунной системы, другие более распространенные его версии дают возможность активированному Cdc42 увеличивать полимеризацию актина во многих типах клеток. Белки WASp могут существовать в неактивной свернутой конформации и в активной развернутой. Ассоциация с Cdc42-GTP стабилизирует открытую форму WASp, давая ей возможность связываться с Arp 2/3-комплексом и сильно увеличивать нуклеацию актина. Таким способом активация Cdc42 ведет к увеличению нуклеации актина.

Rac-GTP также активирует членов семейства WASp. Вдобавок, он активирует кросс-линкерную активность образующего гели белка филамина и ингибирует контрактильную активность моторного миозина II таким образом, он стабилизирует ламеллоподии и предотвращает образование сократительных стрессовых волокон (рис. 60А).

У Rho-GTP совершенно другой набор мишеней. Вместо активации комплекса Arp 2/3 для построения актиновой сети, Rho-GTP включает формин для построения параллельных актиновых пучков. В то же время Rho-GTP активирует протеинкиназу, которая косвенно ингибирует активность кофилина, что приводит к стабилизации актиновых филаментов. Та же протеинкиназа ингибирует фосфатазу легких цепей миозина. Последующее увеличение фосфорилированных (поскольку фосфаты с них больше не снимаются данной фосфатазой) легких цепей миозина повышает сократительную активность моторного миозина в клетке, а это приводит к появлению большего количества стрессовых волокон.

В некоторых типах клеток Rac-GTP активирует Rho, обычно с малыми скоростями по сравнению со скоростью, с которой Rac-GTP активирует Arp 2/3 комплекс. Это дает возможность клеткам вначале использовать Rac-каскад для построения новых актиновых структур, а затем при активации Rho-каскада производить сократительные усилия, создающие напряжения в этой структуре. Так происходит, например, во время формирования и созревания межкле-

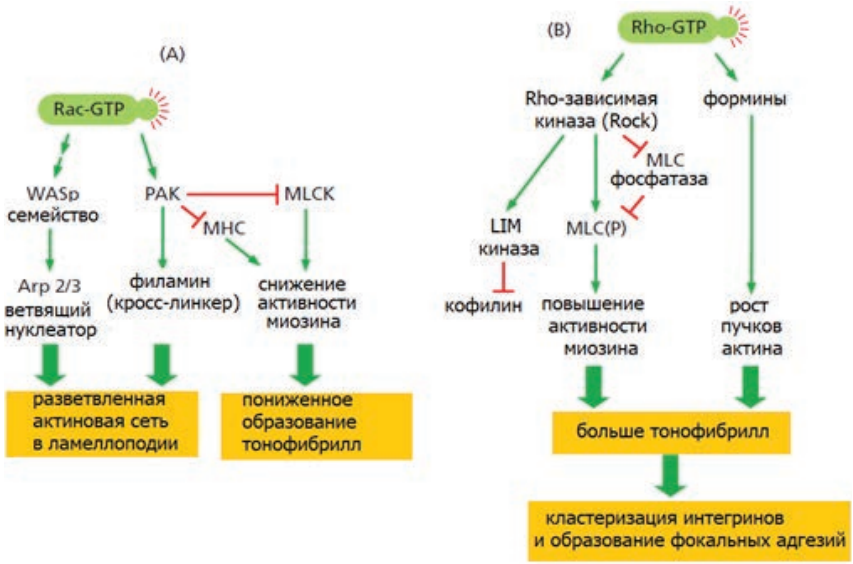


Рис. 60. Различие в эффектах после активации ***Rac*** и ***Rho*** на организацию актина.

А – активация малой ГТФазы Rac приводит к изменениям вспомогательных белков, что благоприятствует образованию актиновой сети, как в ламеллиподиях. Несколько различных каскадов работают независимо друг от друга. ***Rac-GTP*** активирует белки ***WASp***, которые в свою очередь активируют нуклеацию и образование разветвленной сети с помощью Arp 2/3-комплекса. Параллельно с этим Rac-GTP активирует протеинкиназу ***PAK***, имеющую несколько мишеней, включая образующий сети кросс-линкерный филамин, который активируется при его фосфорилировании; а также киназу легких цепей миозина (*myosin light chain kinase,* ***MLCK***), которая ингибируется при фосфорилировании. Ингибирование MLCK приводит к уменьшению фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина, что ведет к разборке миозиновых II филаментов и снижению их сократительной активности. В некоторых клетках PAK непосредственно ингибирует активность миозина II, фосфорилируя его тяжелые цепи (*myosin heavy chain,* ***MHC***)

В – активация ГТФазы Rho ведет к нуклеации актиновых филаментов с помощью формина и увеличению сократительной активности миозина II, что вызывает образование контрактильных актиновых пучков, таких как, например, стрессовые волокна. Для активации миозина II белком Rho необходима Rho-зависимая протеинкиназа ***Rock***. Она ингибирует фосфатазы, снимающие активирующий фосфат с легких цепей миозина II (*myosin II light chains,* ***MLC***); она также способна непосредственно фосфорилировать в некоторых типах клеток самые легкие цепи миозина. Rock также активирует другие протеинкиназы, такие как LIM kinase, которая, в свою очередь, принимает участие в образовании пучков стабильных контрактильных актиновых путем ингибирования деполимеризующего актин фактора кофилина. Похожий сигнальный каскад играет важную роль в образовании контрактильного кольца при цитокинезе

точных контактов. Кроме того, связь между Rac- и Rho-каскадами облегчает поддержание различий между «фронтом» и «тылом» клетки во время её миграции.

Активация белков Rho-семейства внеклеточными сигналами

Активация мономерных ГТФаз Rho, Rac и Cdc42 происходит при обмене прочно связанного ГДФ на ГТФ, этот процесс катализируется гуанин-нуклеотид обменными факторами (GEFs). Среди множества идентифицированных у человека GEF некоторые специфичны к отдельным ГТФазам Rho-семейства, в то время как другие, похоже, воздействуют на многих других членов семейства. GEFs ограничены экспрессией в специфичных тканях, и иногда даже внутриклеточным местоположением, они чувствительны к разного рода регуляторным сигналам. GEF могут активироваться либо внеклеточными компонентами через рецепторы клеточной поверхности, либо в ответ на внутриклеточные сигналы. Кроме того, они могут служить подмостками, направляющими ГТФазы к их мишеням. Также интересным является факт, что некоторые GEFs из семейства Rho ассоциируются с растущими кончиками микротрубочек при помощи связывания с одним из +TIPs. Это обеспечивает связь между динамикой цитоскелета микротрубочек и организацией актинового цитоскелета; такая связь важна для интеграции формы клетки и её движения.

Внешние сигналы могут диктовать направление миграции клетки

Хемотаксис – это движение клетки к или от источника растворимого химического вещества. Внешние сигналы действуют через Rho-белки для установления полярности клетки посредством влияния на организацию ее двигательного аппарата. Хорошо изученным примером хемотаксиса может служить хемотактическое движение белых кровяных клеток – нейтрофилов – по направлению к источнику бактериальной инфекции. Рецепторные белки на поверхности нейтрофила позволяют ему детектировать очень низкие концентрации *N*-формилированных пептидов – производных бактериальных белков (лишь прокариоты начинают синтез белка с *N*-формилметионина). Используя эти рецепторы, нейтрофилы на-

правляются к бактериям благодаря способности уловить всего лишь 1 % разницы в концентрациях этих растворимых пептидов (концентрация на противоположных концах клетки) (рис. 61).

В этом случае и в случае хемотаксиса амёбы *Dictyostelium* по направлению к источнику цАМФ, связывание хемоаттрактанта с GPCR

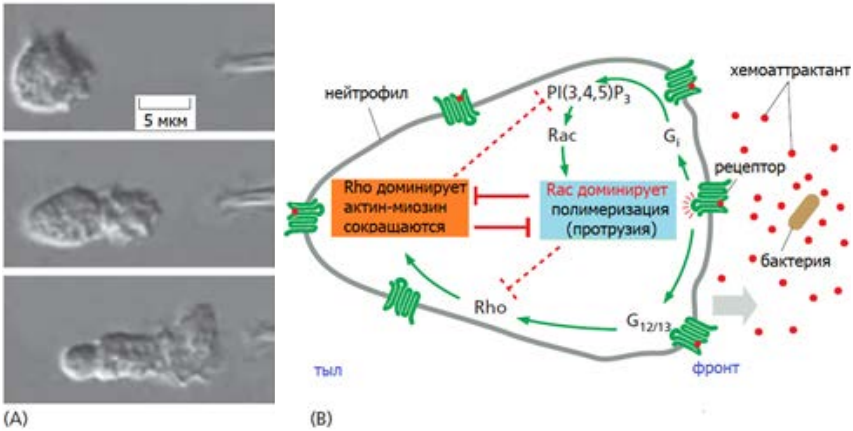


Рис. 61. Поляризация нейтрофила и хемотаксис.
А – из наконечника пипетки справа вытекает малое количество бактериального пептида (formyl-Met-Leu-Phe), который узнается нейтрофилом как чужеродный продукт. Нейтрофил быстро выпячивает новую ламеллиподию по направлению к источнику хемоаттрактанта (сверху). Затем он удлиняет эту ламеллиподию и поляризует цитоскелет таким образом, что контрактильный миозин II располагается преимущественно в тылу, в противоположном относительно ламеллоподии месте (середина). Наконец, клетка ползет к источнику пептида (нижний снимок). Если бы вместо тестового пептида была настоящая бактерия, нейтрофил поглотил бы её и разрушил.

В – связывание бактериальных молекул с GPCR на нейтрофиле стимулирует направленное движение. Эти рецепторы расположены по всей поверхности клетки, но вероятность их связаться с бактериальным пептидом выше в передней части (той, что ближе к источнику пептида). Два разных сигнальных каскада задействованы в поляризации клетки. На переднем крае клетки стимуляция Rac-каскада приводит к тому, что через тримерный G-белок G_i, начинается рост протрузивной актиновой сети. Вторичные мессенджеры в этом каскаде короткоживущие, поэтому протрузия ограничена регионом клетки, наиболее близкими к стимулу. Эти же рецепторы активируют второй сигнальный путь, через тримерные G-белки G_{12} и G_{13}, которые запускают активацию Rho. Оба пути являются взаимными антагонистами. Поскольку вызванная Rac активацией протрузия активна на переднем конце клетки, Rho активируется лишь на тыльной стороне, стимулируя сокращение задней части клетки и тем самым помогая направленному её движению

активирует фосфоинозитид-3 киназы (PI3Ks), которая синтезирует сигнальную молекулу [PI(3,4,5)P_3]. Она, в свою очередь, активирует ГТФазу Rac, которая затем активирует Arp 2/3-комплекс, что приводит к протрузии ламеллоподии. Посредством неизвестного механизма аккумуляция сетки поляризованного актина на лидирующей кромке вызывает дальнейшее увеличение активности PI3K в петле положительной обратной связи, то есть протрузия усиливается. PI(3,4,5)P_3, активирующий Rac, не может диффундировать на большие расстояния от сайта своего синтеза, поскольку он быстро превращается обратно в фосфатидил-инозитол (4,5) бисфосфат благодаря постоянно активной липидной фосфатазе. В то же самое время, связывание хемоаттрактанта со своим рецептором запускает на другой сигнальный путь, активирующий Rho и увеличивающий сократимость посредством миозина. Эти два процесса прямо ингибируют друг друга, и активация Rac доминирует в передней части клетки, а активация Rho – в задней. Это дает возможность клетке поддерживать свою функциональную полярность таким образом, что протрузия происходит на лидирующей кромке, а сокращение (контракция) – на тыльной части клетки.

Нерастворимые химические соединения, прикрепленные к внеклеточному матриксу или к поверхности клетки, так же могут влиять на направление миграции. Когда эти сигналы активируют рецепторы, они могут вызывать усиление клеточной адгезии и направленную актиновую полимеризацию.

Миграции клеток на большие расстояния у животных, включая выселение из нервного гребня и путешествие конуса роста нейрона, в основном зависят от комбинации растворимых и нерастворимых сигналов для направления мигрирующих клеток или конуса роста к правильному месту назначения.

Коммуникация между элементами цитоскелета координирует клеточную поляризацию и движение

Связи между элементами цитоскелета являются очень важными для миграции клеток. И хотя передвижение в основном связано с полимеризацией актина и сокращением миозина, септины и ПФ так же в этом участвуют. Например, виментиновая сеть ПФ связывается с интегринами в сайтах фокальной адгезии, а дефицитные по виментину фибробласты имеют ослабленную механическую стабильность, способность мигрировать и сокращаться. Более того, разрушение линкерных белков, соединяющих различные элементы

цитоскелета, включая некоторые плакины и белки KASH, ведет к дефектам в поляризации клетки и её миграции. Таким образом, взаимодействие между системами цитоплазматических филаментов, а также механическая связь с ядром, необходимы для осуществления комплексных процессов в целой клетке, например, таких как миграция.

Клетки также используют микротрубочки для организации стабильного перемещения по определенным направлениям. У многих перемещающихся клеток положение центросомы зависит от места протрузии полимеризующегося актина. Активация рецепторов на протрузирующей лидирующей кромке может локально активировать динеиновые моторные белки, которые будут двигать центросому, перемещаясь по её микротрубочкам. Несколько эффекторных белков даунстрим от Rac и Rho модулируют динамику микротрубочек напрямую: например, протеинкиназа, активируемая Rac, фосфорилирует (и тем самым ингибирует) тубулин-связывающийся белок статмин, таким образом, стабилизируя микротрубочки.

В свою очередь, микротрубочки влияют на перестройку актина и клеточную адгезию. Центросома нуклеирует огромное количество динамичных микротрубочек, и её (центросомы) передислокация значит, что плюс-концы множества микротрубочек упираются в протрузивный регион клетки. Прямое взаимодействие с микротрубочками помогает направлять динамику фокальной адгезии в мигрирующей клетке. Микротрубочки также могут влиять и на образование актиновых филаментов путем доставки Rac-GEFs, связывающихся с +TIPs, сидящими на кончиках и перемещающимися в процессе роста микротрубочки. Они перемещают грузы от мест фокальной адгезии и к ним, влияя на их **сигналинг** и разборку. Таким образом, микротрубочки усиливают полярность информации, которую актиновый цитоскелет получает извне, и дают возможность осуществлять ответ даже на слабые сигналы, позволяя идти движению в одном направлении в течение долгого времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al.// Molecular Biology of the Cell. //Garland Science//6th edition 2015;

2. Cox M., Doudna J. A., O'Donnell M. //Molecular Biology. // W. H. Freeman and Company//2nd ediotion 2015;

3. Iwasa J., Marshall W. Karp's Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments// John Wiley & Sons, Inc.// 8th edition 2016;

4. Pollard T. D., Earnshaw W et al. Cell Biology// ELSEVIER// 3d edition 2017;

5. Lodish H., Berk A., Kaiser C. et al. Molecular Cell Biology//W. H. Freeman and Company// 8th edition 2015.