

И.А. ВОРОБЬЕВ¹, И.С. ГРИГОРЬЕВ²

¹ Лаборатория клеточной подвижности
НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского,
МГУ им. М.В. Ломоносова,

² Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
Воробьевы Горы, 119992, Москва, Россия,
ivorobjev@mail.ru

ДИНАМИКА И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ МИКРОТРУБОЧЕК В КЛЕТКЕ



Микротрубочки (МТ) в клетке постоянно растут и укорачиваются. Это свойство МТ, первоначально открытое *in vitro*, получило название динамической неустойчивости. Сравнение динамической неустойчивости *in vitro* и *in vivo* показывает различие в поведении МТ в двух системах. Особенности МТ в живых клетках по сравнению с *in vitro* являются высокая скорость роста (до 20 мкм/мин), малая продолжительность периодов укорочения (в среднем не более 15–20 с) и наличие пауз. Во многих клетках животных МТ растут от centrosомы и образуют радиальную систему. Показано, что в таких клетках рост МТ от centrosомы процессивен, т.е. происходит практически без перерывов до тех пор, пока плюс-конец не достигает края клетки. Анализ литературных и собственных данных показывает асимметричное чередование фаз: фаза роста сменяется паузой или укорочением, в то время как укорочение никогда не переходит в паузу, но всегда сменяется ростом. Мы полагаем, что динамическая неустойчивость МТ на краю клетки, многократно описанная в литературе, обусловлена не только внутренними свойствами МТ, но и наличием внешних препятствий для их роста. Поведение МТ в клетке с радиальной системой предлагается рассматривать как динамическую неустойчивость при наличии граничных условий. Граничными условиями яв-

ляются centrosома, обеспечивающая быструю инициацию роста МТ, и край клетки, ограничивающий элонгацию плюс-концов. Рост МТ происходит с постоянной средней скоростью, потенциальная продолжительность фазы роста МТ может превышать радиус клетки. Укорочение МТ, как правило, значительно меньше, чем ее полная длина, при этом скорость укорочения прямо пропорциональна его продолжительности. Случайные быстрые укорочения плюс-концов достаточны для обновления сети МТ в течение 10–20 мин в клетках диаметром не более 40–50 мкм. В клетках большего радиуса обновление сети МТ происходит за то же время, однако достигается уже с помощью другого механизма. Он состоит в отделении МТ от заправки и последующей деполимеризации с минус-конца. Время обмена МТ при минус-концевом пути обмена не зависит от радиуса клетки, а определяется частотой отделения МТ. Поэтому наличие небольшого числа свободных МТ с метастабильными минус-концами значительно уменьшает время обновления радиальной системы МТ. Суммируя все экспериментальные данные, мы предлагаем схему жизненного цикла МТ в клетке. МТ растет от centrosомы до края клетки в течение нескольких минут, ее плюс-конец осциллирует на краю клетки и затем МТ полностью деполимеризуется. В клетках небольшого размера деполимеризация происходит в результате случайного быстрого укорочения с плюс-конца. В клетках большого размера осцилляции на краю продолжаются дольше, и деполимеризация МТ наступает в результате отделения минус-конца и его укорочения.

Введение

Микротрубочки (МТ) являются универсальными цитоскелетными структурами клеток эукариот. Они состоят из консервативных белков — димеров α - и β -тубулина и представляют собой цилиндрические неветвящиеся структуры диаметром около 24 нм и длиной в несколько микрометров. Замечательным свойством МТ является то, что, несмотря на большую длину, они обмениваются с пулом растворенного тубулина только на концах. В стационарном состоянии, т.е. когда соотношение полимера и мономера не меняется со временем, отдельные МТ продолжают расти и укорачиваться. Обмен с пулом растворенного тубулина происходит наиболее интенсивно на одном конце МТ, который называется плюс-конец. Переходы между фазами роста и укорочения происходят случайным образом, а сами фазы продолжаются десятки секунд. Такое поведение МТ получило название динамической неустойчивости [1]. На противоположном — минус-конец — обмен происходит медленнее. Иногда ассоциации тубулина с МТ на минус-конец не происходят совсем.

В интерфазных клетках животных МТ образуют сеть, более густую в центре и более разре-

женную на периферии. Предполагается, что большинство МТ имеют минус-концы, закрепленные на centrosome, и тянутся, не прерываясь, от центра клетки к ее краю [2–6]. Соответственно, плюс-концы МТ обращены на периферию клетки. Такая радиальная система цитоплазматических МТ отличается от хаотичной сети МТ, возникающих при спонтанной полимеризации тубулина *in vitro*, и обладает особыми свойствами, которые будут рассмотрены ниже.

Основным способом наблюдения за МТ в живых клетках является микроинъекция флуоресцентно меченого тубулина и последующая запись изображений через микроскоп с помощью цифровой камеры [7–12]. Данная техника позволяет проследить за МТ в течение многих минут, не повреждая клетки [6, 10, 13].

Сравнение динамической неустойчивости *in vitro* и *in vivo*

Спонтанная полимеризация МТ *in vitro* происходит в растворе очищенного тубулина в диапазоне концентраций от 4 до 15 мкМ. Средняя скорость роста МТ в нестационарном состоянии зависит от концентрации тубулина в растворе. При достижении стационарного состояния концы МТ продолжают расти и укорачиваться. Такое поведение МТ получило название динамической неустойчивости [1]. Фазы роста и укорочения продолжительны — от десятков секунд до многих минут [1, 14–17]. Скорость роста МТ в стационарном состоянии составляет не более 3–4 мкм/мин [15, 18–21]. Укорочение происходит на порядок быстрее — со скоростью от 15 до 100 мкм/мин. Более тщательные исследования показали, что скорости роста и укорочения различаются у разных МТ в препарате, более того, они могут изменяться в течение одной фазы [17].

В результате динамической неустойчивости средняя длина МТ в растворе тубулина со временем растет, и за 30 мин она может увеличиться в 10 раз, от 10 до 100 мкм, при этом число МТ соответственно уменьшается [14]. Протяженность укорочений нередко лимитируется длиной МТ, так что в результате одного периода укорочения МТ может полностью деполимеризоваться.

Поведение МТ в клетке отличается от спонтанной полимеризации МТ *in vitro*. В клетках МТ в среднем растут быстрее и укорачиваются

медленнее, а также значительно чаще претерпевают смены фаз (от роста к укорочению и обратно) [22, 23]. Кроме того, в клетках, кроме фаз роста и укорочения, в поведении концов МТ появляется новая фаза, не встречающаяся *in vitro* — паузы. Рассмотрим подробнее, как соотносятся параметры динамической неустойчивости МТ в *in vivo* и *in vitro*.

Рост. Общая концентрация тубулина в клетках составляет 20–30 мкМ [24], а соотношение растворенного и полимеризованного тубулина составляет примерно 2:3 [7, 25], т.е. концентрация растворенного тубулина в клетках соответствует той, что используется в опытах по полимеризации МТ *in vitro*. Однако уже в экстракте ксенопуса скорость роста МТ на внесенных в качестве затравки centrosomes выше, чем в очищенном препарате тубулина, и составляет около 10 мкм/мин [26]. Во многих клетках млекопитающих средние скорости роста еще больше и достигают 12–20 мкм/мин [8–12, 25, 27–29]. У холоднокровных животных в клетках, которые культивируются при температуре 23–28 °С, скорости роста МТ немного ниже, 5–8 мкм/мин [30–33], но даже эти значения больше, чем скорость полимеризации тубулина при 37 °С *in vitro*. Скорости роста индивидуальных МТ в клетках широко варьируют, на что указывает большая величина стандартного отклонения, полученная разными авторами [8–11, 27, 30, 34]. По-видимому, они имеют не нормальное, а более сложное распределение [31].

Продолжительности фаз роста МТ в клетках, в отличие от препарата тубулина, невелики. В различных клеточных культурах они исчисляются секундами, что в десятки раз меньше, чем *in vitro*. Соответственно, прирост длины МТ за одну фазу роста в клетке составляет 1–9 мкм [8–12, 27, 30, 34], тогда как *in vitro* — десятки микрометров [14, 17]. Меньшая продолжительность фаз роста в клетке связана с повышенной частотой перехода из роста в укорочения («катастрофами»).

Таким образом, сравнивая параметры роста концов МТ в клетке и *in vitro*, можно заключить, что в клетке существуют факторы, увеличивающие скорость роста, и факторы, индуцирующие «катастрофы».

Укорочение. Средняя скорость укорочения МТ в клетке составляет 12–30 мкм/мин, т.е. немного меньше, чем скорость их укорочения *in vitro*

[8–12, 27, 30, 34]. Скорости укорочения МТ в клетках так же, как и скорости роста, широко варьируют, и уменьшение длины МТ за одну фазу укорочения составляет 1–9 мкм [8–12, 27, 30, 34]. В результате полная деполимеризация длинной МТ в ходе одной фазы укорочения в клетках практически не встречается. Средняя продолжительность фазы укорочения составляет в клетках 10–15 с.

Итак, в клетках наряду с факторами, инициирующими «катастрофы» и ускоряющими рост, существуют факторы, уменьшающие скорость укорочения МТ, и факторы, обеспечивающие быстрое «спасение» МТ.

Часть таких факторов уже идентифицирована, и динамика МТ была частично реконструирована *in vitro* с добавлением клеточных белков — стабилизирующего МТ ХМАР215 и дестабилизирующего ХКСМ1 [35]. По отдельности эти белки оказывают противоположное действие на МТ *in vitro* — ХМАР215 стабилизирует концы МТ и увеличивает скорость роста [36, 37], а ХКСМ1 дестабилизирует концы МТ и увеличивает частоту катастроф [38, 39]. При одновременном же добавлении к МТ эти два белка изменяют параметры динамической нестабильности, приближая их к таковым *in vivo* — увеличивается скорость роста и возрастает число укорочений концов МТ [35].

Паузы. В препарате очищенного тубулина все МТ либо растут, либо укорачиваются, и график поведения конца МТ напоминает пилу с асимметричными зубьями. Паузы встречаются исключительно редко и занимают не более 1 % времени [15]. В клетках МТ проводят в паузе 20–30 % времени [8–12, 27, 30, 34]. Наиболее выражены паузы вблизи стационарных краев клетки, где они могут занимать более 90 % времени [40]. Тем не менее паузы сами по себе анализируются довольно редко, и в полном объеме описание динамики МТ с учетом пауз было выполнено только в одной работе, на клетках BSC-1 [8].

Итак, суммируя различия в поведении МТ *in vivo* и *in vitro*, отметим, что в клетках существуют факторы, которые увеличивают эффективность полимеризации тубулина на концах МТ; уменьшают скорость деполимеризации; увеличивают частоту «катастроф» по сравнению с очищенным препаратом тубулина; увеличивают частоту «спасений», т.е. переходов от укорочения к росту; индуцируют паузы.

Как уже отмечалось, одним из факторов, увеличивающим скорость полимеризации тубулина, является белок ХМАР215 [35, 36, 37, 41]. Впрочем, при удалении этого белка из экстракта клеток скорость роста МТ не падает, что указывает на наличие других, еще не идентифицированных белков [41]. Факторами, уменьшающими скорость деполимеризации МТ, могут быть многочисленные белки, стабилизирующие МТ, например, присутствующий в большом количестве в клетках мозга белок tau и высокомолекулярные ассоциированные белки (МАРs). Наиболее известным кандидатом на роль фактора, индуцирующего «катастрофы», является белок Op18/статмин [42], однако данные о его взаимодействии с МТ *in vivo* до сих пор весьма противоречивы [43]. Также ничего не известно и про факторы, уменьшающие продолжительность укорочений. Таким образом, несмотря на кажущееся обилие информации о белках, регулирующих поведение МТ [5, 21, 37, 38, 42, 44–49], на сегодняшний день мы можем охарактеризовать динамику МТ в клетках лишь феноменологически.

Ограничение динамической нестабильности МТ в клетке

Несколько обстоятельств отличают клетку от пробирки, в которой исследуют спонтанную полимеризацию тубулина. Первое из них — в клетках животных есть centrosoma, которая содержит затравки для полимеризации тубулина. В экспериментах *in vitro* показано, что полимеризация тубулина на centrosomas может идти при концентрации меньшей, чем критическая концентрация спонтанной полимеризации [50], и число растущих от centrosomas МТ отражает количество затравок на ней [4]. Второе отличие — клетка имеет размеры в несколько десятков микрометров, и рост МТ в стационарном состоянии может ограничиваться краем клетки, тогда как размер пробирки в сотни раз больше и практически не влияет на рост МТ за время эксперимента.

Поэтому равновесное состояние системы МТ в клетке можно рассматривать как динамическую нестабильность при наличии дополнительных условий. Эти условия могут быть суммированы следующим образом (по [51], с дополнениями):

1) все МТ начинают расти от centrosomas плюс-концами вперед, минус-концы закреплены на centrosome и в обмене тубулина не участвуют;

2) нуклеация МТ высокоэффективна, т.е. при появлении свободного места нуклеации на центросоме новая МТ растет от него без задержки;

3) рост МТ ограничен краем клетки — когда плюс-конец достигает края, он более не способен удлиняться и переходит в паузу или укорачивается.

Итак, сначала рассмотрим радиальную систему МТ, растущих от центросомы, и предположим, что край клетки находится бесконечно далеко. В этом случае в стационарном состоянии суммарная длина МТ, т.е. количество полимеризованного тубулина, определяется равновесной концентрацией тубулина, остающегося в растворе. Согласно (2) число МТ будет определяться количеством затравок на центросоме. Таким образом, средняя длина МТ в стационарном состоянии есть суммарная длина их, поделенная на количество затравок. Распределение МТ по длинам в таком равновесном состоянии будет не нормальным (гауссовым), а более сложным — так называемым гамма-распределением [24].

Гамма-распределение (рис. 1) — это асимметричное распределение, которое описывается двумя параметрами — параметром формы (r) и параметром шкалы (θ). Гамма-распределение хорошо описывает кинетику сложной химической реакции (см. [19]), причем параметр r отражает порядок реакции, а параметр θ — скорость каждого перехода. Когда параметр r принимает значение 1, гамма-распределение вырождается в экспоненциальное распределение, а когда параметр r стремится к бесконечности, гамма-распределение переходит в нормальное распределение. В промежуточных случаях гамма-распределение описывает процесс, обладающий внутренней «памятью», в то время как экспоненциальное распределение описывает процесс с одним случайным переходом, т.е. «памятью» не обладающий [52]. Важным свойством гамма-распределения является то, что частота встречаемости событий, далеко отклоняющихся от среднего, в нем больше, чем в нормальном и экспоненциальном распределениях. Это свойство гамма-распределения, как будет показано ниже, существенно для описания поведения МТ в клетке.

Теперь рассмотрим случай, когда граница клетки находится на конечном расстоянии от центросомы. Если расстояние до края клетки много больше, чем средняя длина МТ, то нали-

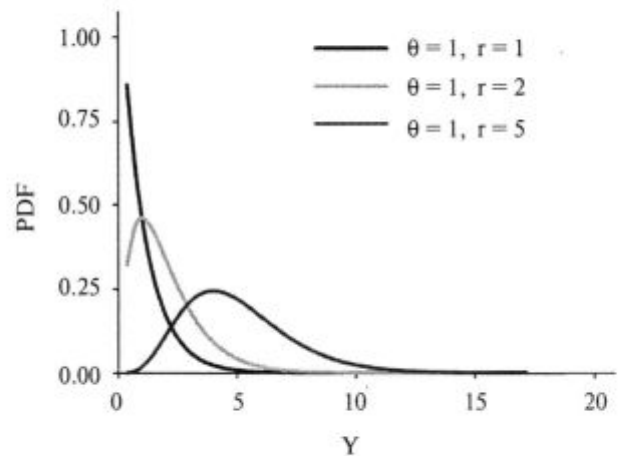


Рис. 1. Графики гамма-распределения с неизменным $\theta = 1$ и разными r . Гамма-распределение становится экспоненциальным при $r = 1$, типичное — при $r = 2$, приближается к симметричному — при $r = 5$

чием края можно пренебречь [24]. Такая ситуация, по-видимому, имеет место в митозе, где средняя длина МТ веретена значительно меньше, чем радиус клетки, и лишь единичные (астральные) МТ достигают ее края. Однако если расстояние от центросомы до края клетки близко к средней длине МТ, то многие МТ за счет случайных колебаний длины, вызванных динамической нестабильностью, будут достигать края и останавливаться в своем росте. Соответственно, равновесное распределение МТ по длинам должно измениться. Данная ситуация пока количественного описания не получила. На качественном уровне этот случай будет рассмотрен ниже. Однако прежде чем рассматривать распределение МТ в условиях, когда их рост ограничен краем клетки, необходимо доказать, что такое ограничение фактически имеет место. Для этого надо сравнить поведение МТ на краю клетки с их поведением в глубине цитоплазмы.

Если поведение МТ на краю клетки описано достаточно подробно [5, 8–12, 27, 30, 34], то в глубине клетки анализ носит далеко не полный характер. Тем не менее определенные результаты были достигнуты в последние годы, и они показывают, что в глубине цитоплазмы МТ ведут себя иным образом, нежели на краю клетки.

Динамика микротрубочек в глубине клетки

В большинстве клеточных культур возможности для непосредственного наблюдения за от-

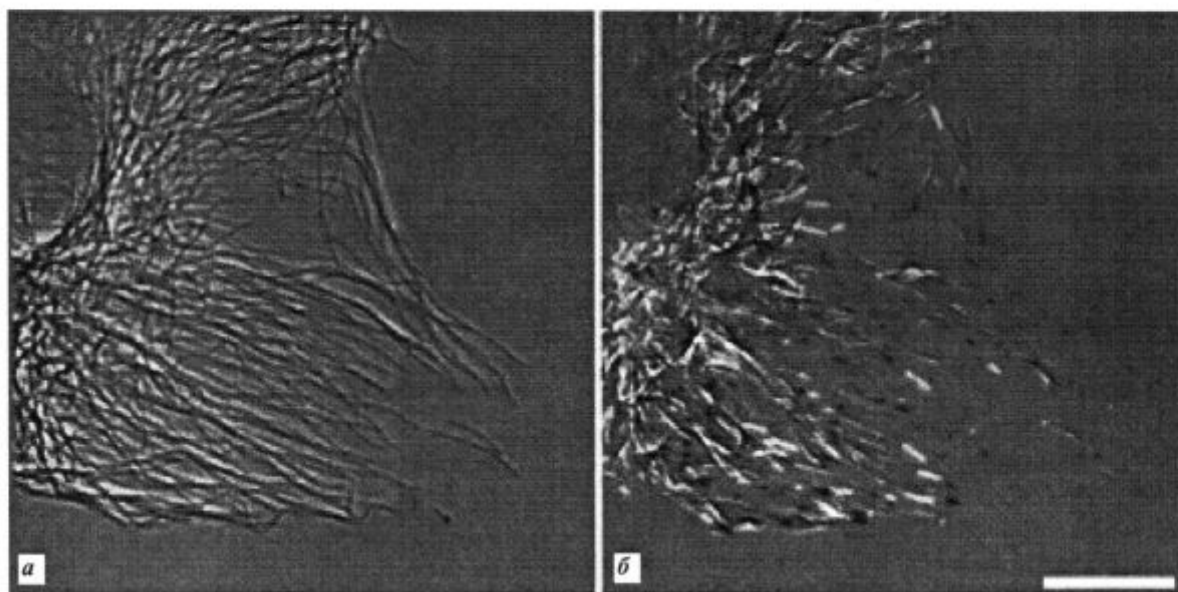


Рис. 2. Метод последовательно вычитенных кадров: *а* — кадр из фильма, использованного для последовательного вычитания кадров (МТ в ламелле фибробластов 3Т3); *б* — изображение, полученное после вычитания из кадра, представленного на рисунке *а*, следующего кадра фильма. Черные и белые сегменты отражают эпизоды роста и укорочения МТ, произошедшие за интервал времени между кадрами (3 с). Масштабный отрезок 10 мкм

дельными МТ в глубине клетки отсутствуют. Это объясняется высокой плотностью расположения МТ в глубине клетки. Поэтому для описания динамики МТ вдали от края и вблизи от centrosомы были разработаны специальные подходы. Они позволяют либо следить исключительно за концами МТ, либо направлены на уменьшение общего числа МТ в исследуемой модельной системе.

1. Анализ последовательно вычитенных кадров (sequential subtraction analysis) [33] строится на вычитании последовательных кадров друг из друга: $I_{рез.} = I_n - I_{n-1} + const$. Это позволяет выделить только изменения между ними, делая статичные участки изображения однородными. В результате становится возможным проследить за растущими или укорачивающимися концами МТ, в том числе и там, где большая плотность МТ не позволяет сделать этого при прямом наблюдении (рис. 2). В случае, если поведение МТ процессивно (т.е. смена фаз долгое время не происходит), то такие продолжительные фазы также можно идентифицировать. Первое применение метода к меланофорам рыб показало, что рост МТ в глубине не является процессивным и довольно часто прерывается [33]. Также не очень продолжительными являются укорочения. Наиболее интересная характеристика, которую можно

получить, используя метод вычитенных кадров — это баланс роста и укорочения в различных участках клетки. И если в меланофорах он был примерно постоянен, то в клетках СНО этот баланс изменяется вдоль радиуса клетки — в центре рост плюс-концов МТ встречается значительно чаще, чем их укорочение, и только на краю они практически сбалансированы [53].

2. За поведением МТ в глубине клетки можно проследить, используя специфические маркеры растущего плюс-конца. Первым из таких маркеров был описан белок CLIP-170 [28], а в последние годы — еще несколько белков [29, 54], объединенных ныне в два семейства — CLIP-170 и EB1 [55]. CLIP-170 связывается с плюс-концом МТ и находится на нем исключительно во время роста МТ. После того как рост останавливается, CLIP-170 быстро диссоциирует с конца МТ [28]. Таким образом, при трансфекции клеток гибридным геном GFP-CLIP-170 мечеными оказываются только растущие концы МТ, тогда как сами МТ остаются невидимыми. При цитраферной записи флуоресцентных изображений трансфицированных клеток видно, как от района centrosомы подобно фейерверку разбегаются длинные светящиеся треки. В клетках Vero длина отходящих от centrosомы треков достигает 10 мкм [28], а в

клетках CHO составляет $17,3 \pm 4,8$ мкм, т.е. в среднем 80 % радиуса клетки [53]. Аналогичный результат был получен с использованием двух других меченых GFP маркеров плюс-конца — EB1 и CLIP-115 [29, 54, 56]. Из анализа представленных вышеуказанными авторами видеороликов следует, что от centrosомы МТ растут процессивно вдоль радиуса клетки, а на краю рост МТ становится прерывистым и ненаправленным.

3. Фотообесцвечивание района centrosомы [52]. В клетках с флюоресцентно мечеными МТ с помощью лазера проводилось обесцвечивание полосы шириной в несколько микрометров, проходящей от centrosомы к краю клетки. Рост МТ в этой полосе мог быть прослежен непосредственно от centrosомы до тех пор, пока большая плотность МТ в обесцвеченной зоне не восстанавливалась. Оказалось, что в клетках CHO МТ растут в сторону края практически без пауз и реверсий («катастроф») со средней скоростью $17,8 \pm 13,8$ мкм/мин, а осцилляции начинаются только вблизи края клетки [53].

4. Наконец, за поведением МТ в глубине клетки можно проследить, используя цитопласты, которые имеют меньшее число МТ по сравнению с целой клеткой, поэтому рост МТ в них можно наблюдать непосредственно от centrosомы. Поведение МТ в цитопластах было аналогичным поведению в целых клетках — плюс-концы процессивно росли в цитоплазме и осциллировали на краю, однако скорость роста была на 25 % ниже, чем в целых клетках [53].

Таким образом, в глубине цитоплазмы различных клеток МТ растут в течение относительно долгого времени без пауз и «катастроф». Иначе говоря, протяженность фазы роста, измеренная в глубине, намного больше, чем измеренная на краю клетки.

Эффект края клетки

Для подробного анализа того, как край клетки влияет на поведение МТ, необходимо детально сравнить не только периоды роста МТ, но и паузы и периоды укорочений. Использование маркеров плюс-конца МТ и метода последовательно вычтенных изображений для анализа переходов из одной фазы в другую невозможно. Метод фотообесцвечивания позволяет проследить за отдельными МТ непродолжительное время — не более 1 мин, поэтому он также малоприменим для

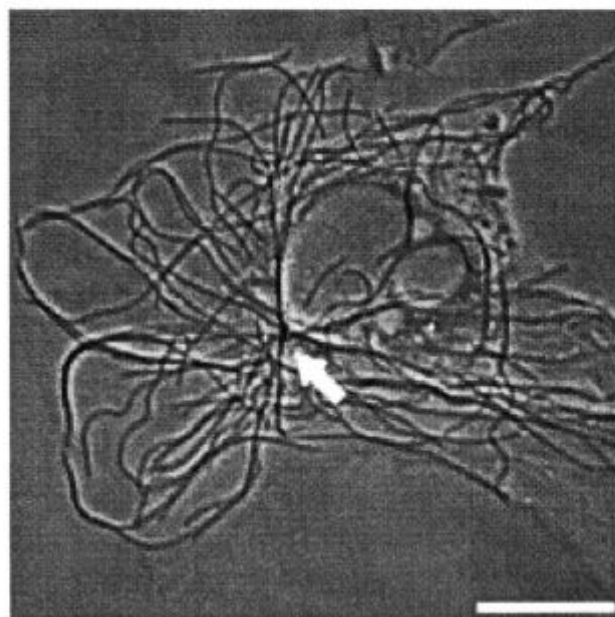


Рис. 3. МТ в кератоците. Стрелкой указана centrosома. МТ в кератоците располагаются очень редко, что существенно облегчает анализ динамики их концов. Масштабный отрезок 10 мкм

этой цели. Из всех перечисленных подходов для такого исследования приемлем лишь анализ цитопластов, однако значительное (на 25 %) уменьшение скорости роста и укорочения МТ, наблюдавшееся в цитопластах CHO по сравнению с целыми клетками [53], делает эту модель не вполне адекватной. Естественным объектом для детального сравнения поведения МТ в глубине и на краю цитоплазмы являются клетки с редко располагающимися МТ, такие как моноциты млекопитающих [57] или кератоциты рыбы [10]. Однако динамика МТ в них описана не была.

Мы использовали материал, полученный И.А. Воробьевым на кератоцитах рыбы в лабораториях G.G. Borisy (Университет Висконсина в Мэдисоне, США) и В.И. Родионова (Университет Коннектикута, США). На качественном уровне поведение МТ в кератоцитах было описано ранее [10].

Для количественного описания динамики МТ были выбраны кератоциты, не менявшие своей формы в течение всего времени наблюдения (10–20 мин). Это чрезвычайно сильно распластаные клетки толщиной около 2 мкм и радиусом в 20–30 мкм. Они обладали немногочисленными МТ, радиально расходящимися от centrosомы и

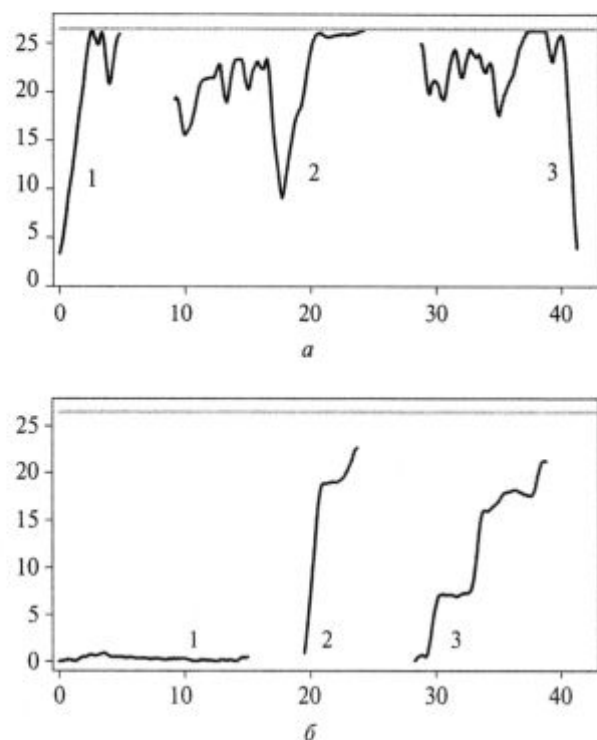


Рис. 4. Поведение концов МТ в кератоцитах: *а* — плюс-концы МТ. МТ росли непрерывно от centrosомы (чье расположение здесь соответствует 0 мкм по оси Y) до края клетки (показан светлой линией). У края клетки концы МТ начинали осциллировать. Разборка МТ вплоть до centrosомы происходила, как правило, за счет длинных фаз укорочения. Минус-концы МТ (*б*) были стабильны (МТ 1) или укорачивались (МТ 2 и МТ 3). Укорочение минус-концов МТ приводило, как правило, к полной разборке МТ. По вертикали — мкм; по горизонтали — мин

в основном доходящими до края клетки (рис. 3). В пяти клетках, использованных для детального анализа, находилось в среднем 69 ± 18 МТ, всего были проанализированы 124 МТ. Низкая плотность расположения МТ позволила проследить за поведением концов МТ от клеточного края вплоть до самой centrosомы. Таким образом, мы имели возможность проследить за окончанием фазы укорочения МТ, а также за относительно редкими эпизодами роста МТ от centrosомы. Кроме МТ, отходящих от centrosомы, в кератоцитах имелись единичные свободные МТ, что позволило проследить и за динамикой минус-концов тоже.

Поведение плюс-концов МТ в кератоцитах можно охарактеризовать как классическую ди-

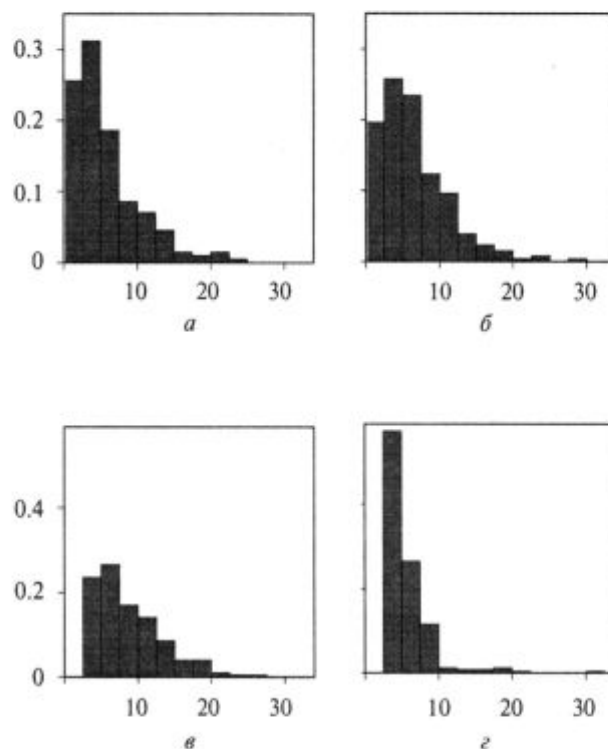


Рис. 5. Фазы роста и укорочения плюс-концов МТ. Протяженности фаз укорочения (*а*) и роста (*б*) описываются гамма-распределением ($p = 0,92$ и $p = 0,93$). Укорочение происходило в среднем на $5,7 \pm 4,4$ мкм, рост в среднем на $6,4 \pm 4,6$ мкм. Скорость укорочения (*в*) была распределена по гамма-закону ($p = 0,93$), а скорость роста (*г*) — по экспоненциальному ($p = 0,95$). Средняя скорость укорочения $8,5 \pm 4,7$ мкм/мин, средняя скорость роста $5,4 \pm 3,3$ мкм/мин. По вертикали — вероятность, по горизонтали — *а*, *б* — мкм; *в*, *г* — мкм/мин

намическую нестабильность (рис. 4), характерную для всех ранее описанных типов клеток. Фазы роста и укорочения имели продолжительность в десятки секунд. Средняя протяженность фаз роста составила $6,4 \pm 4,6$ мкм, средняя протяженность фаз укорочения $5,7 \pm 4,4$ мкм. Доля пауз была невелика (26 % по времени). Распределения протяженностей роста и укорочения описывались гамма-законом (рис. 5), т.е. вероятность длинных фаз роста и укорочения (соизмеримых с радиусом клетки) была значимой.

Рассмотрим поведение растущего от centrosомы конца МТ. У него есть три варианта поведения: рост без остановок в рассматриваемой области цитоплазмы, остановка и переход в паузу и переход к укорочению («катастрофа»). Вероят-

ность роста МТ от centrosомы по направлению к периферии клетки без остановки во внутренней цитоплазме (2/3 радиуса) составила 0,86. Вероятность его остановки и перехода в паузу или в укорочение в глубине цитоплазмы была очень низка (0,05 и 0,09 соответственно). На периферии цитоплазмы (внешняя 1/3 радиуса) вероятность перехода роста в паузу составляла 0,58 и перехода в укорочение — 0,42. Таким образом, МТ, начавшая расти от centrosомы, дорастала до края клетки практически без остановок и, как правило, не могла расти далее.

Рассмотрим теперь поведение укорачивающегося с периферии конца МТ. Он может либо укорачиваться без остановок до centrosомы, либо переходить в паузу, либо останавливаться и переходить в рост. Вероятность укорочения конца МТ в периферической области цитоплазмы (1/3 радиуса) без остановок была достаточно высока (0,41), вероятность перехода в паузу была равна 0, вероятность возвращения в фазу роста составляла 0,59. Отметим, что укорочение никогда не переходило в паузу. Во внутренней цитоплазме вероятность «спасения» укорачивающегося конца МТ и перехода в рост возрастала по сравнению с периферической цитоплазмой (0,71), вероятность разборки МТ до основания составляла 0,29. Здесь так же, как и на периферии цитоплазмы, укорочение никогда не сменялось паузами. Таким образом, вероятность того, что МТ полностью деполимеризуется в результате одного укорочения, составила 0,12.

Рассмотрим теперь кинетические аспекты поведения плюс-концов МТ в глубине и на периферии цитоплазмы. В глубине клетки гистограмма суммарного распределения скоростей роста и укорочения носила сложный характер и имела два максимума (рис. 6). Смещения с нулевыми скоростями, т.е. паузы, практически отсутствовали. Мгновенная скорость роста в глубине составила $8,7 \pm 0,2$ мкм/мин, мгновенная скорость укорочения $15,7 \pm 1,0$ мкм/мин. Обе цифры хорошо согласуются со скоростями, измеренными для других типов клеток [8–12, 25, 27–29]. В результате преобладания роста над укорочением средняя скорость смещений плюс-концов МТ (снос) в глубине клетки была положительна и составила $3,4 \pm 0,5$ мкм/мин.

На периферии клетки гистограмма суммарного распределения мгновенных скоростей роста и

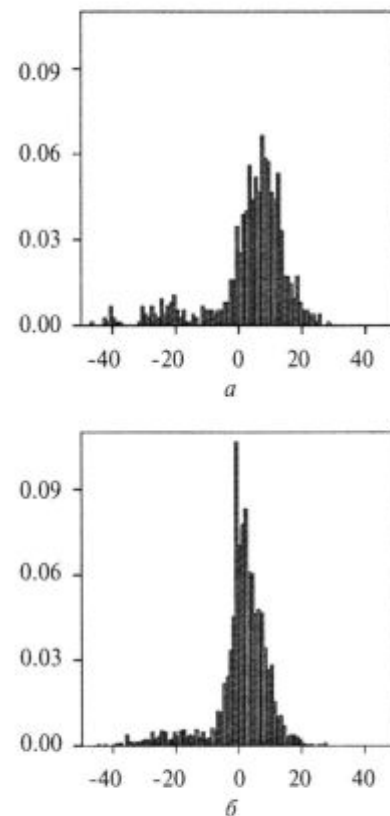


Рис. 6. Распределение смещений плюс-концов МТ в кератоците (за время 6 с). Гистограмма смещений в глубине клетки (а) бимодальна, правый пик отражает распределение смещений роста, левый — распределение укорочений. Гистограмма мгновенных смещений на периферии клетки (б) унимодальна, что отражает появление пауз. По вертикали — вероятность, по горизонтали — мкм/мин

укорочения была асимметрична, но имела унимодальный характер с максимумом около нуля (рис. 6). Аналогичное распределение было описано ранее для МТ в ламелле других клеток [33, 58]. На краю кератоцита преобладали паузы, и мгновенные скорости роста и укорочения были ниже, чем в глубине клетки ($5,3 \pm 0,1$ мкм/мин и $-7,5 \pm 0,4$ мкм/мин соответственно). Рост и укорочение на периферии были более сбалансированы, чем в глубине клетки, средняя скорость сноса плюс-концов МТ на периферии составила $1,0 \pm 0,2$ мкм/мин.

Таким образом, в кератоцитах в глубине клетки смена фаз была редка, а на периферии высока. В глубине преобладали протяженные фазы роста и укорочения, на периферии — короткие, к

которым добавлялись паузы. Такое поведение МТ полностью соответствует описанному ранее в клетках СНО [53]. Однако поведение МТ в клетках СНО было охарактеризовано не полностью — вопрос о происхождении пауз остался неисследованным, и на примере кератоцитов мы решили заполнить данный пробел.

Вынужденность пауз

Оказалось, что в кератоцитах примерно в половине случаев фаза роста МТ переходит в паузу, и лишь затем начинается укорочение. Обратный переход — «спасение» — всегда происходит без паузы. Исходя из асимметричности смен фаз можно предположить, что пауза не является специальным третьим состоянием МТ в клетке, которого нет *in vitro*, а является результатом того, что МТ в процессе роста наталкивается на препятствия.

Ограничение роста МТ внешним (механическим) препятствием было теоретически предсказано и проанализировано Хиллом [59], а затем экспериментально продемонстрировано *in vitro* [60–62]. В ячейку небольшого диаметра вносили затравки для полимеризации МТ, которые прикрепляли ко дну ячейки. После этого запускали реакцию полимеризации МТ. Растущие от затравок МТ быстро достигали краев ячейки, но из-за специального рельефа не могли изгибаться вдоль края. После того как МТ, растущая перпендикулярно к краю ячейки, достигала его, ее рост останавливался, и в некоторых случаях МТ изгибалась [60]. Остановка роста происходила при нагрузке на МТ свыше 3–4 пН [63].

Внешним препятствием, влияющим на поведение плюс-концов МТ в расплавленной клетке, является ее край. Наиболее яркий пример механического ограничения роста МТ краем клетки — меланофоры рыб. Когда пигментные гранулы в меланофоре агрегированы, подавляющее большинство МТ растут от центра строго по радиусу и упираются плюс-концами в край клетки. Плюс-концы оказываются либо неподвижными [32], либо слегка осциллируют [33]. Аналогичное явление имеет место в клетках СНО — плюс-концы около края клетки проводят довольно много времени в паузе, тогда как в глубине цитоплазмы паузы отсутствуют [53].

В кератоцитах часть МТ, дорастающих до края клетки, также переходят в паузу, а затем укорачиваются, но многие изгибаются и продолжают

рост вдоль края. В результате 41 % МТ в кератоцитах имеют длину больше, чем радиус клетки. Какова судьба МТ, растущих вдоль края клетки?

Рост МТ параллельно краю клетки был описан в пневмоцитах тритона [64]. В этих клетках существует центростремительный поток актина, сносящий растущие МТ к центру клетки. Поэтому МТ, оказавшиеся параллельными краю клетки, изгибаются, затем разламываются и деполимеризуются с минус-конца [64]. В кератоцитах МТ, растущие вдоль края клетки, не сносятся к центру. Однако рост таких МТ часто прерывается паузами и относительно сбалансирован с их укорочением. Величина сноса плюс-концов на краю составляет 1,0 мкм/мин, т.е. в три с лишним раза меньше, чем в глубине кератоцита. Поэтому мы полагаем, что для роста МТ параллельно стабильному краю клетки существуют какие-то препятствия, например, плотный актиновый кортекс.

Процессивность роста микротрубочек

Итак, в клетках СНО и в кератоцитах рост плюс-концов МТ, как правило, не заканчивается до тех пор, пока МТ не подходит к краю клетки. Является ли этот феномен широко распространенным или в цитоплазме других клеток правилом являются осцилляции плюс-концов? Для ответа на данный вопрос мы сравнили среднюю скорость сноса плюс-концов МТ в различных культурах, где динамика МТ была описана ранее. В клетках СНО и в кератоцитах, где МТ растут от centrosомы до края практически непрерывно, величина сноса составила 5 и 3,4 мкм/мин соответственно. Величина сноса может быть приблизительно оценена по формуле

$$v_c = v_p f_p - v_y f_y,$$

где v_c — скорость сноса, $v_p f_p$ — произведение скорости роста на долю растущих МТ, $v_y f_y$ — произведение скорости укорочения на долю укорачивающихся МТ (по [59]). В фибробластах NRK величина сноса составила 4,4 мкм/мин (рассчитано из [64]), на периферии клеток СНО — 3,4 мкм/мин (рассчитано из [27]) и в пневмоцитах тритона — 3,8 мкм/мин (рассчитано из [64]). Таким образом, во всех пяти культурах величина сноса оказалась практически одинаковой. Поэтому есть основания предполагать, что процес-

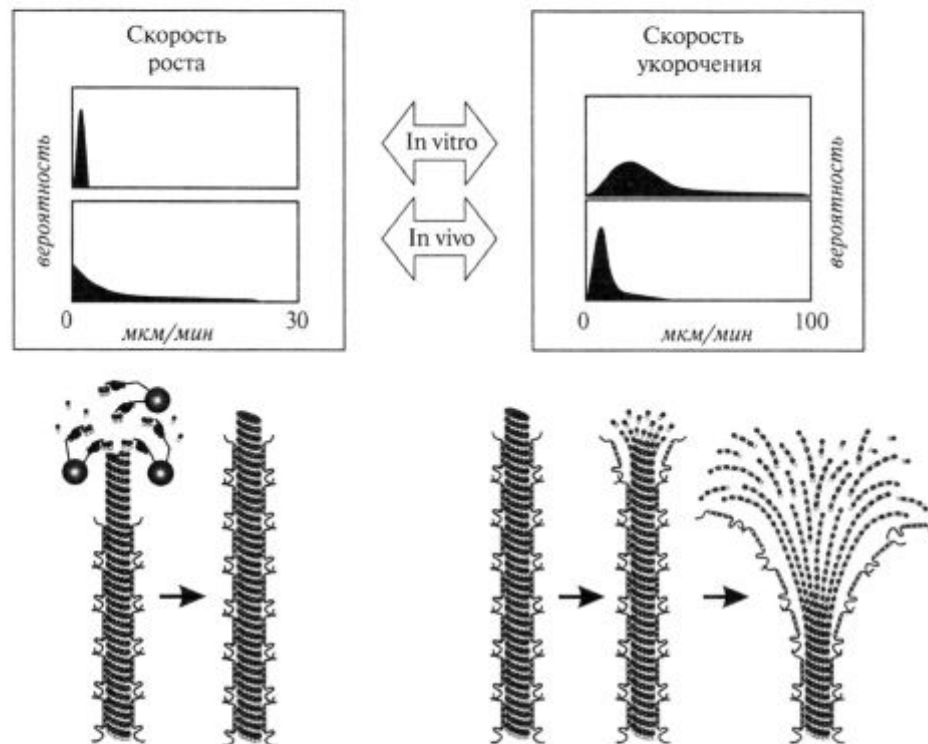


Рис. 7. Схемы, иллюстрирующие процессы полимеризации и деполимеризации плюс-конца МТ в клетке: вверху — скорости роста и укорочения МТ *in vitro* и *in vivo*, внизу — модель полимеризации и деполимеризации МТ в клетке

сивный рост МТ от centrosомы является распространенным явлением. Однако это правило не является всеобщим. Так, в эпителиальных клетках PtK1 снос плюс-концов МТ равен нулю [10], а в клетках BSC-1 величина сноса вообще оказалась отрицательной ($-1,7$ мкм/мин, рассчитано из [8]), что указывает на отсутствие процессивного роста МТ в этих случаях.

Короткие и длинные укорочения

Распределение средних скоростей фаз укорочения, в отличие от роста, зависит от протяженности укорочения (чем большее расстояние, на которое плюс-конец укорачивается, тем с большей скоростью это происходит) и точно описывается гамма-законом ($P = 0,993$). Когда МТ начинает укорачиваться, скорость процесса в первые секунды низка, и такая МТ часто вновь возвращается к росту, уменьшившись лишь на несколько микрометров. Такие короткие эпизоды типичны на краю клетки и могут лежать в основе поисковых реакций МТ в ламелле [66, 67]. Если же в ходе укорочения МТ не перешла в

рост, то скорость укорочения возрастает, и МТ имеет большие шансы разобраться до конца. Таким образом, происходящие в клетке укорочения МТ можно условно разделить на короткие медленные (их большинство) и на длинные быстрые, которые происходят редко. Длинные быстрые укорочения, которые в основном встречаются в глубине цитоплазмы, лежат в основе обмена МТ.

Чем можно объяснить увеличение скорости укорочения по ходу разборки МТ? Процессы полимеризации и деполимеризации МТ из очищенного тубулина протекают совершенно различным образом (обзор [5]). Если полимеризация представляет собой последовательную ассоциацию димеров тубулина, то деполимеризация происходит за счет диссоциации целых протофиламентов [5, 68–70]. По-видимому, именно диссоциация протофиламентов обеспечивает столь высокую скорость деполимеризации МТ (до 100 мкм/мин), которая наблюдается *in vitro*, а также в некоторых клетках растений [71, 72]. В клетках животных с МТ ассоциированы различ-

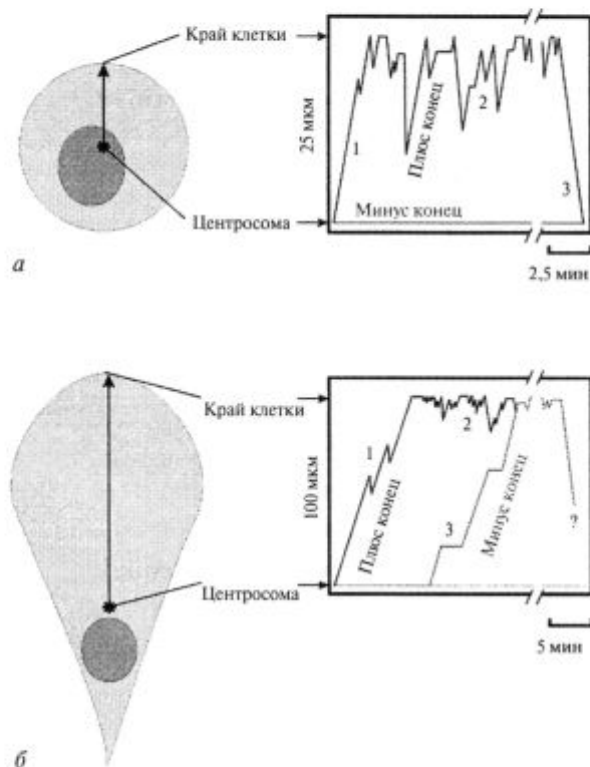


Рис. 8. Жизненный цикл МТ в клетках (по Komarova et al., 2002, с дополнениями): 1 — рост от centrosомы; 2 — осцилляции на краю; 3 — деполимеризация; *a* — клетка небольшого радиуса, деполимеризация МТ происходит за счет случайного укорочения плюс-концов; *б* — в клетках с большим радиусом или вытянутой ламеллой основную роль играет высвобождение минус-конца и его деполимеризация

ные белки. Латеральное взаимодействие белков стабилизирует МТ (см. обзор [73]) и, по-видимому, замедляет процесс укорочения. Мы полагаем, что деполимеризация плюс-конца из-за разворачивания МТ на протофиламенты приводит к дестабилизации ассоциированных с МТ белков. После этого процесс деполимеризации ускоряется и приближается к максимально возможной скорости, характерной для разборки МТ *in vitro* (рис. 7).

Жизненный цикл микротрубочки — рост от centrosомы и осцилляции на краю

Таким образом, жизненный цикл цитоплазматической МТ в клетках с радиальной системой можно представить себе следующим образом (рис. 8): МТ начинает расти от centrosомы. Рост

может быть совершенно непрерывным (как в случае клеток СНО) или с паузами, а также с редкими и непродолжительными реверсиями (по-видимому, так происходит в большинстве клеток). Однако время, в течение которого новая МТ дорастает до края клетки, обусловлено в основном только скоростью ее роста (около 10 мкм/мин) и составляет для клетки радиусом 20–30 мкм всего несколько минут.

На краю клетки большинство МТ встречаются с препятствиями для своего роста. Появление препятствий приводит к тому, что периоды роста часто переходят в паузы, которые могут сменяться укорочениями. В итоге на краю клетки плюс-концы МТ осциллируют. Поскольку вероятность спасения очень велика, то средняя глубина осцилляций определяется средней глубиной укорочений. В клетках СНО она составляет около 3 мкм [27, 53], а в кератоцитах — около 6 мкм. Средняя продолжительность осцилляций индивидуальной МТ на краю клетки, как показывают наши оценки для кератоцитов и клеток СНО, существенно больше 10 мин. Природа препятствий для роста МТ на краю клетки пока не изучена. Наиболее вероятно предположение, что препятствия носят механический характер. Однако нельзя исключить и предположения о различной регуляции поведения МТ в глубине клетки и на краю, осуществляемой специальными белками.

Динамика минус-концов

Итак, мы рассмотрели динамику плюс-концов МТ. В реальной клетке не все МТ закреплены минус-концами на centrosоме. МТ, которые не закреплены минус-концами на centrosоме, называются свободными. Свободные МТ могут возникать различными путями — спонтанно [10, 36, 75–77], в результате разламывания длинных МТ [10, 63, 76, 77], в результате отделения МТ от centrosомы [6, 26, 64, 79–81]. Отделение МТ от centrosомы является относительно редким событием, и его частота, по-видимому, не превышает одного события на 100 МТ в минуту [10, 64]. Возможно, что эта частота регулируется за счет активности специального белка — катанина [23, 82].

Какова динамика минус-концов? Поведение минус-концов МТ *in vitro* и *in vivo* различается. *In vitro* минус-концы ведут себя примерно так же, как и плюс-концы, т.е. растут и укорачиваются, только лишь скорость роста их немного

ниже [16]. Минус-концы МТ в клетках, по-видимому, не способны к росту. В некоторых клетках минус-концы стабильны, т.е. не растут и не укорачиваются в течение продолжительных промежутков времени [10, 76]. У клеток со стабильными минус-концами радиальная система МТ выражена очень плохо, а свободные МТ составляют значительную часть от общего числа цитоплазматических МТ [10, 76]. У большинства клеток с радиальной системой МТ свободные минус-концы нестабильны и деполимеризуются. Быстрая деполимеризация свободных минус-концов описана в меланофорах рыбы и в их фрагментах [32, 33], в клетках СНО [25], в мышечных эмбриональных фибробластах и фибробластоподобных клетках Vero [58]. Скорость деполимеризации минус-концов составляет от 7 до 15 мкм/мин, а продолжительность отдельной фазы разборки минус-конца может достигать 30 мкм [33].

Все изученные ранее минус-концы находились на периферии клеток, где они, как правило, деполимеризовались. Поэтому свободные МТ в меланофорах, фибробластах и фибробластоподобных клетках были немногочисленны и исчезали в течение 1–2 мин. На последовательно вычтенных изображениях можно проследить за укорочениями минус-концов и в глубине клетки [33], однако переход в паузу делает их невидимыми. Поэтому вопрос о том, сколько времени минус-концы проводят в паузе и как долго могут существовать свободные МТ, требовал специального рассмотрения.

В кератоцитах свободные МТ, как правило, появляются в результате их отделения от centrosомы, в два раза реже — при разломах уже существующих МТ, и очень редко спонтанно возникают в цитоплазме (нами был зарегистрирован всего один такой случай на 18 проанализированных свободных МТ в пяти клетках). После разламывания предсуществующей МТ новый минус-конец, как правило, укорачивался, но мог и перейти в паузу, а затем снова продолжить укорочение (рис. 4). В целом минус-концы МТ в кератоцитах около 90 % времени проводили в паузах. Скорость укорочения минус-концов в кератоцитах составила $12,0 \pm 6,9$ мкм/мин. В результате свободные МТ существуют в этих клетках в среднем 4 мин.

Какова роль немногочисленных свободных МТ в обмене всей сети цитоплазматических МТ?

Парадокс обмена МТ

Для обмена МТ в относительно небольших клетках (СНО, кератоциты) по-видимому достаточно длинных быстрых укорочений плюс-конца. Для больших по размеру клеток их частота недостаточна, поскольку вероятность спасения плюс-концов велика. Для того чтобы сделать данное утверждение очевидным, представим себе, что мы провели обесцвечивание радиальной системы МТ на разном расстоянии от края клетки (рис. 9). Тогда, предполагая стохастический характер переходов от укорочений к росту, время восстановления МТ в обесцвеченной зоне будет расти пропорционально квадрату расстояния от края клетки.

Однако, как показали результаты измерения кинетики восстановления флюоресценции после фотообесцвечивания, время обновления МТ в

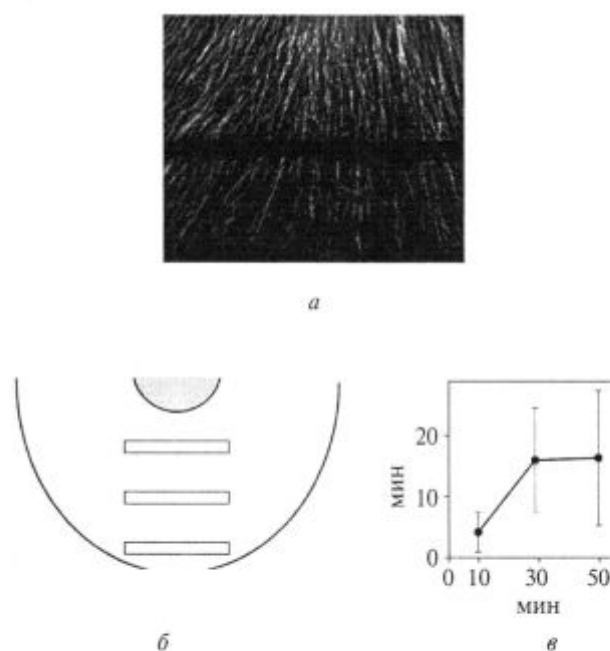


Рис. 9. Фотообесцвечивание флюоресцентно меченых МТ в меланофоре рыбы: *а* — результат фотообесцвечивания в полосе шириной 4 мкм, проходящей перпендикулярно к радиусу клетки; *б* — схема, изображающая положения полос фотообесцвечивания, первая полоса проходила в 10 мкм от края клетки, вторая — в 30 мкм (по середине ламеллы), третья — в 50 мкм (в глубине клетки); *в* — время полуобновления МТ в разных частях клетки. На краю клетки полуобновление происходит за несколько минут. На расстоянии 30 и 50 мкм от края время полуобновления одинаково и составляет 16 мин

глубине клетки относительно невелико — полуобновление (т.е. замена 50 %) МТ происходит в интервале от 5 до 20 мин [83–85] вместо часов, которые предсказывает теория [24]. Поэтому было предположено, что обмен длинных МТ происходит за счет деполимеризации минус-концов [33], однако данное предположение не было проверено экспериментально.

Чтобы проверить, насколько время обновления МТ зависит от положения обесцвеченной зоны, мы провели собственный анализ кинетики восстановления после обесцвечивания в меланофорах рыбы в зависимости от расстояния от края клетки. Диаметр меланофора составляет 200 мкм и более, а динамика плюс-концов МТ представляет собой чередование периодов роста и укорочения с незначительным положительным сносом [34]. Две или три полосы обесцвечивания наносились с помощью расфокусированного пучка аргонового лазера, как описано ранее [6], перпендикулярно к радиусу клетки на разном расстоянии от края (рис. 9, б). Время полувосстановления (рис. 9, в) по мере удаления от края клетки сначала быстро растет, чего и следовало ожидать, исходя из случайного характера катастроф. Однако на расстоянии свыше 30 мкм время полуобновления практически не изменяется, что указывает на механизм обмена МТ, не связанный с динамикой плюс-концов, а обусловленный деполимеризацией минус-концов.

Кинетика восстановления флюоресценции позволяет рассчитать частоту образования свободных МТ в меланофоре. Предполагая, что на расстоянии свыше 50 мкм от края вклад плюс-концов в общий обмен МТ пренебрежимо мал, а также считая время деполимеризации свободных МТ незначительным, получается, что для времени полуобмена, равного 16 мин (рис. 9, в), частота образования свободных МТ, рассчитанная из экспоненциального характера процесса [33], составляет $0,02 \text{ мин}^{-1}$. Ранее частота образования свободных МТ была непосредственно измерена во фрагментах меланофоров, где она составила $0,023 \text{ мин}^{-1}$ [32]. Столь хорошее совпадение независимо измеренных величин указывает на высокий уровень достоверности сделанного предположения.

В клетках с радиальной системой МТ постоянно возникает некоторое количество свободных МТ с метастабильными минус-концами, кото-

рые большую часть времени находятся в паузе, но деполимеризуются относительно часто, обеспечивая время жизни МТ порядка 5–10 мин. Появление свободных МТ было показано не только для меланофоров [33], но также и кератоцитов, клеток Vero и эмбриональных фибробластов мыши [58]. Во всех этих клетках свободные МТ постоянно возникают и спустя непродолжительное время деполимеризуются. В кератоцитах свободные МТ существовали в среднем 4 мин и составляли примерно 8 % общего числа МТ. В клетках Vero время существования свободных МТ еще меньше и составляет не более 2 мин [57], однако доля их может быть выше [86]. Несложные расчеты показывают, что если доля свободных МТ в клетке в каждый момент времени составляет около 10 %, а время их жизни — 3 мин, то время полуобмена МТ только за счет обновления свободных МТ составит как раз 20 мин. Причем существенно, что это время не будет зависеть от расстояния до края клетки, что и подтверждается вышеприведенными измерениями в меланофорах.

Итак, исчезновение длинной МТ в цитоплазме возможно либо при ее разламывании и укорочении с минус-конца, либо за счет продолжительного, вплоть до centrosомы, укорочения плюс-конца. Как показывает анализ укорочений в кератоцитах (рис. 5), частота длинных эпизодов (15 мкм и более) относительно велика, и событие это не является исчезающе маловероятным, что можно было бы предположить в случае гауссового распределения продолжительности фаз. Повидимому, аналогичным образом ведут себя МТ и в других клетках. Например, в клетках СНО в среднем 4 МТ укорачиваются каждую минуту на расстояние свыше $2/3$ радиуса клетки [53].

Суммируя изложенное, можно заключить, что в клетках относительно небольшого размера (радиусом не более 20–25 мкм) обмен МТ происходит в основном с плюс-конца (рис. 8, а). Скорость обновления сети МТ дополнительно увеличивается за счет свободных МТ, которые подвержены быстрому укорочению с минус-конца.

Для клеток большого радиуса полная деполимеризация МТ с плюс-конца не эффективна, поскольку даже самые продолжительные укорочения не будут достигать центра клетки (рис. 8, б). Поэтому для обмена длинных МТ в глубине цитоплазмы минус-концевой путь является решающим [33]. Его эффективность зависит в ос-

новном от частоты образования свободных минус-концов и почти не зависит от радиуса клетки. Разборка минус-конца приводит к полному исчезновению МТ длиной 30–50 мкм в течение нескольких минут.

Итак, в клетках большого размера, которые имеют радиальную систему, состоящую из длинных МТ, жизненный цикл индивидуальной МТ видоизменяется по сравнению с клеткой маленькой. Деполимеризация длинной МТ, как правило, есть результат отделения ее минус-конца от стабильной затравки. Поэтому плюс-концевой путь обмена МТ является доминирующим на краю клетки, тогда как минус-концевой путь обеспечивает эффективный обмен проксимальных участков длинных МТ вблизи centrosомы [33].

Заключение

Критический анализ литературных и собственных данных показывает, что для поддержания радиальной системы длинных МТ в живой клетке простого роста их от centrosомы недостаточно. В интерфазной клетке радиальная система динамических МТ поддерживается за счет одновременного выполнения следующих условий: эффективной закладки МТ на затравках, расположенных вокруг centrosомы, ограничения роста большинства МТ на краю клетки, а также постоянной элиминации свободных МТ, которая происходит за счет деполимеризации минус-концов.

Нерешенными в динамике МТ остаются проблемы, связанные с локальной регуляцией поведения плюс- и минус-концов МТ в цитоплазме, в частности, каким образом при симметричном росте от centrosомы возникает асимметричное распределение плюс-концов на различных краях клетки. На существование локальной регуляции динамики МТ указывает ряд наблюдений, однако в явном виде ее описать пока не удалось.

Поведение МТ *in vivo* с трудом укладывается в обычные представления о химической кинетике, как, впрочем, и сама динамическая нестабильность. МТ своими размерами и своими свойствами как бы перебрасывают мостик между молекулярными событиями (полимеризация тубулина) и поведением целой клетки (внутриклеточный транспорт, поляризация клеток и т.п.). Поэтому исследование сложной динамики МТ *in vivo* позволит глубже понять молекулярные закономер-

ности, лежащие в основе регуляции поведения и метаболизма клеток.

Работа выполнена при частичной поддержке грантами CRDF № RB1-2025, РФФИ № 02-04-48839, РФФИ № 02-04-06318.

Авторы благодарят Г.Г. Бориси и В.И. Родионову за предоставленные экспериментальные возможности, а также Г.Г. Бориси, И.В. Малого и В.И. Родионову за плодотворные обсуждения проблемы.

SUMMARY. In living cells microtubules (MTs) continuously grow and shorten. This feature of MTs was discovered *in vitro* and named dynamic instability. Comparison of dynamic instability of MTs *in vitro* and *in vivo* shows a number of differences. MTs *in vivo* rapidly grow (up to 20 $\mu\text{m}/\text{min}$), duration of their shortening is small (on average 15–20 s), and pauses are prominent. In different animal cells MTs grow from the centrosome and form a radial array. In such cells growth of MTs is persistent, i.e. undergo without interruptions until plus end of a MT reaches cell margin. Analysis of literature and original data shows that interconversion between phases of growth, shortening and pause is asymmetric: growth often converts into pause, while shortening always converts into growth without pause. We suggest dynamic instability described near the cell margin in numerous publications results not only from intrinsic properties of MTs, but also because of the external obstacles for their growth. MT behavior in the cells with radial array of long MTs could be treated as dynamic instability with boundary conditions. One boundary is the centrosome responsible for rapid initiation of MT growth. Another boundary is cell margin limiting MT elongation. MT growth occurs with constant mean velocity, and potential duration of growth phase might exceed cell radius. MT shortening is usually smaller than MT length however velocity of shortening increases with time. Random episodes of rapid shortening are sufficient for the exchange of MTs in 10–20 min in the cells not more than 40–50 μm in diameter. Experimental data show that similar rate of exchange of MTs is in the large cells. This is achieved employing another mechanism, namely release of MTs and depolymerization from the minus end. In the minus end pathway time required for the exchange of MTs does not depend on cell radius and is determined primarily by the frequency of releases. Thus a small number of free MTs with metastable minus ends significantly reduce time required for the renovation of the radial MT array. Summarizing all experimental data we suggest the life cycle scheme for the MT in a cell. MT is initiated at the centrosome and grows rapidly until it reaches cell margin. At the margin the plus end oscillates, and finally MT depolymerizes. MT «death» comes from a random catastrophe (shortening from the plus end) in small cells or from release and depolymerization of the minus end in large cells.

РЕЗЮМЕ. Микротрубочки (МТ) в клітині постійно ростуть і скорочуються. Ця властивість МТ, спочатку відкрита *in vitro*, отримала назву динамічної нестабільності. Порівняння динамічної нестабільності *in vitro* та *in vivo* показує відмінності в поведінці МТ у двох системах.

Особенностями МТ у живих клітинах порівняно з *in vitro* є висока швидкість росту (до 20 мкм/хв), мала тривалість періодів укорочення (в середньому — не більше 15–20 с) і наявність пауз. В багатьох клітинах тварин МТ ростуть від centrosomi і утворюють радіальну систему. Показано, що в таких клітинах ріст МТ від centrosomi процесивний, тобто відбувається практично без перерви, доки плюс-кінець не досягне краю клітини. Аналіз літературних і власних даних показує асиметричне чергування фаз: фаза росту змінюється паузою чи укороченням, в той час як укорочення ніколи не переходить в паузу, але завжди змінюється ростом. Ми думаємо, що динамічна нестабільність МТ на краю клітини, багаторазово описана в літературі, обумовлена не тільки внутрішніми властивостями МТ, але і наявністю зовнішніх перешкод для їх росту. Поведінку МТ у клітині з радіальною системою пропонується розглядати як динамічну нестабільність при наявності граничних умов. Граничними умовами є centrosoma, що забезпечує швидку ініціацію росту МТ, та край клітини, що обмежує елонгацію плюс-кінців. Ріст МТ відбувається з постійною середньою швидкістю, потенційна тривалість фази росту МТ може перевищувати радіус клітини. Укорочення МТ, як правило, значно менше, ніж її повна довжина, при цьому швидкість укорочення прямо пропорційна її тривалості. Випадкові швидкі укорочення плюс-кінців достатні для оновлення мережі МТ протягом 10–20 хв у клітинах діаметром не більше 40–50 мкм. У клітинах більшого радіуса відновлення мережі МТ відбувається за той же час, однак досягається за допомогою іншого механізму. Він полягає у відділенні МТ від початку і наступної деполімеризації з мінус-кінця. Час обміну МТ при мінус-кінцевому шляху обміну не залежить від радіуса клітини, а визначається частотою відділення МТ. Тому наявність невеликого числа вільних МТ з метастабільними мінус-кінцями значно зменшує час відновлення радіальної системи МТ. Підсумовуючи всі експериментальні дані, ми пропонуємо схему життєвого циклу МТ в клітині. МТ росте від centrosomi до краю клітини протягом кількох хвилин, її плюс-кінці осцилюють на краю клітини, і потім МТ повністю деполімеризується. У клітинах невеликого розміру деполімеризація відбувається в результаті випадкового швидкого укорочення з плюс-кінця. У клітинах більшого розміру осциляції на краю продовжуються довше, і деполімеризація МТ настає в результаті відділення мінус-кінця і його укорочення.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth // *Nature*. — 1984. — **312**. — P. 237–242.
2. Brinkley B.R., Fuller E.M., Highfield D.P. Cytoplasmic microtubules in normal and transformed cells in culture: analysis by tubulin antibody immunofluorescence // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1975. — **72**. — P. 4981–4985.
3. Osborn M., Weber K. Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1976. — **73**. — P. 867–871.
4. Kuriyama R., Borisy G.G. Microtubule-nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle // *J. Cell Biol.* — 1981. — **91**. — P. 822–826.
5. Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* — 1997. — **13**. — P. 83–117.
6. Keating T.J., Pelouquin J.G., Rodionov V.I., Momcilovic D., Borisy G.G. Microtubule release from the centrosome // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1997. — **94**. — P. 5078–5083.
7. Zhai Y., Borisy G.G. Quantitative determination of the proportion of microtubule polymer present during the mitosis-interphase transition // *J. Cell Sci.* — 1994. — **107**. — P. 881–890.
8. Dhamodharan R., Wadsworth P. Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins // *J. Cell Sci.* — 1995. — **108**. — P. 1679–1689.
9. Danowski B.A. Microtubule dynamics in serum-starved and serum-stimulated Swiss 3T3 mouse fibroblasts: implications for the relationship between serum-induced contractility and microtubules // *Cell. Motil. Cytoskeleton*. — 1998. — **40**. — P. 1–12.
10. Vorobjev I.A., Svitkina T.M., Borisy G.G. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells // *J. Cell Sci.* — 1997. — **110**. — P. 2635–2645.
11. Yvon A.M., Wadsworth P., Jordan M.A. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells // *Mol. Biol. Cell*. — 1999. — **10**. — P. 947–959.
12. Rusan N.M., Fagerstrom C.J., Yvon A.M., Wadsworth P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein- α -tubulin // *Mol. Biol. Cell*. — 2001. — **12**. — P. 971–980.
13. Mikhailov A.V., Gundersen G.G. Centripetal transport of microtubules in motile cells // *Cell Motil. Cytoskeleton*. — 1995. — **32**. — P. 173–186.
14. Kristofferson D., Mitchison T., Kirschner M. Direct observation of steady-state microtubule dynamics // *J. Cell Biol.* — 1986. — **102**. — P. 1007–1019.
15. Walker R.A., O'Brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H.P., Salmon E.D. Asymmetric behavior of severed microtubule ends after ultraviolet-microbeam irradiation of individual microtubules in vitro // *J. Cell Biol.* — 1988. — **107**. — P. 1437–1448.
16. Walker R.A., Inoue S., Salmon E.D. XKCM1: a Xenopus kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly // *J. Cell Biol.* — 1989. — **108**. — P. 931–937.
17. Gildersleeve R.F., Cross A.R., Cullen K.E., Fagen A.P., Williams R.C. Microtubules grow and shorten at intrinsically variable rates // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**. — P. 7995–8006.
18. Pryer N.K., Walker R.A., Skeen V.P., Bourns B.D., Soboeiro M.F., Salmon E.D. Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy // *J. Cell Sci.* — 1992. — **103**. — P. 965–976.
19. Odde D.J., Cassimeris L., Buettner H.M., Kinetics of microtubule catastrophe assessed by probabilistic analysis // *Biophys. J.* — 1995. — **69**. — P. 796–802.
20. Tran P.T., Walker R.A., Salmon E.D. A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that dif-

- fers significantly between plus and minus ends // *J. Cell Biol.* — 1997. — **138**. — P. 105–117.
21. Panda D., Miller H.P., Wilson L. Determination of the size and chemical nature of the stabilizing «cap» at microtubule ends using modulators of polymerization dynamics // *Biochemistry*. — 2002. — **41**. — P. 1609–1617.
22. Cassimeris L. Regulation of microtubule dynamic instability // *Cell Motil. Cytoskeleton*. — 1993. — **26**. — P. 275–281.
23. McNally F.J. Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 1996. — **8**. — P. 23–29.
24. Gliksmann N.R., Skibbens R.V., Salmon E.D. How the transition frequencies of microtubule dynamic instability (nucleation, catastrophe, and rescue) regulate microtubule dynamics in interphase and mitosis: analysis using a Monte Carlo computer simulation // *Mol. Biol. Cell*. — 1993. — **4**. — P. 1035–1050.
25. Rodionov V.I., Nadezhkina E.S., Borisy G.G. Centrosomal control of microtubule dynamics // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1999. — **96**. — P. 115–20.
26. Belmont L.D., Hyman A.A., Sawin K.E., Mitchison T.J. Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts // *Cell*. — 1990. — **62**. — P. 579–589.
27. Sheldon E., Wadsworth P. Observation and quantification of individual microtubule behavior in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific // *J. Cell Biol.* — 1993. — **120**. — P. 935–945.
28. Perez F., Diamantopoulos G.S., Stalder R., Kreis T.E. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo // *Cell*. — 1999. — **96**. — P. 517–527.
29. Mimori-Kiyosue Y., Shiina N., Tsukita S. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules // *Curr. Biol.* — 2000. — **10**. — P. 865–868.
30. Cassimeris L., Pryer N.K., Salmon E.D. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells // *J. Cell Biol.* — 1988. — **107**. — P. 2223–2231.
31. Howell B., Odde D.J., Cassimeris L. Kinase and phosphatase inhibitors cause rapid alterations in microtubule dynamic instability in living cells // *Cell Motil. Cytoskeleton*. — 1997. — **38**. — P. 201–214.
32. Rodionov V.I., Borisy G.G. Self-centring activity of cytoplasm // *Nature*. — 1997. — **386**. — P. 170–173.
33. Vorobjev I.A., Rodionov V.I., Maly I.V., Borisy G.G. Contribution of plus and minus end pathways to microtubule turnover // *J. Cell Sci.* — 1999. — **112**. — P. 2277–2289.
34. Sammak P.J., Gorbisky G.J., Borisy G.G. Microtubule dynamics in vivo: a test of mechanisms of turnover // *J. Cell Biol.* — 1987. — **104**. — P. 395–405.
35. Kinoshita K., Arnal I., Desai A., Drechsel D.N., Hyman A.A. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components // *Science*. — 2001. — **294**. — P. 1340–1343.
36. Gard D.L., Kirschner M.W. Microtubule assembly in cytoplasmic extracts of *Xenopus* oocytes and eggs // *J. Cell Biol.* — 1987. — **105**. — P. 2191–2201.
37. Vasquez R.J., Gard D.L., Cassimeris L. XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover // *J. Cell Biol.* — 1994. — **127**. — P. 985–993.
38. Walczak C.E., Mitchison T.J., Desai A. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling // *Cell*. — 1996. — **84**. — P. 37–47.
39. Desai A., Verma S., Mitchison T.J., Walczak C.E. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes // *Cell*. — 1999. — **96**. — P. 69–78.
40. Wadsworth P. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies // *Cell Motil. Cytoskeleton*. — 1999. — **42**. — P. 8–59.
41. Andersen S.S., Wittmann T. Toward reconstitution of in vivo microtubule dynamics in vitro // *Bioessays*. — 2002. — **24**. — P. 305–307.
42. Belmont L.D., Mitchison T.J. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules // *Cell*. — 1996. — **84**. — P. 623–631.
43. Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2002. — **14**. — P. 18–24.
44. Hyman A.A., Karsenti E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly // *Cell*. — 1996. — **84**. — P. 401–410.
45. Shirasu M., Yonetani A., Walczak C.E. Microtubule dynamics in *Xenopus* egg extracts // *Microsc. Res. Tech.* — 1999. — **44**. — P. 435–445.
46. Howell B., Deacon H., Cassimeris L. Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo // *J. Cell Sci.* — 1999. — **112**. — P. 3713–3722.
47. Tournebise R., Popov A., Kinoshita K., Ashford A.J., Rybina S., Pozniakovskiy A., Mayer T.U., Walczak C.E., Karsenti E., Hyman A.A. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts // *Nat. Cell Biol.* — 2000. — **2**. — P. 13–19.
48. Spittle C., Charrasse S., Larroque C., Cassimeris L. The interaction of TOGp with microtubules and tubulin // *J. Biol. Chem.* — 2000. — **275**. — P. 20748–20753.
49. Popov A.V., Pozniakovskiy A., Arnal I., Antony C., Ashford A.J., Kinoshita K., Tournebise R., Hyman A.A., Karsenti E. XMAP215 regulates microtubule dynamics through two distinct domains // *EMBO J.* — 2001. — **20**. — P. 397–410.
50. Hyman A., Karsenti E. The role of nucleation in patterning microtubule networks // *J. Cell Sci.* — 1998. — **111**. — P. 2077–2083.
51. Mitchison T.J., Kirschner M.W. Some thoughts on the partitioning of tubulin between monomer and polymer under conditions of dynamic instability // *Cell Biophys.* — 1987. — **11**. — P. 35–55.
52. Olkin I., Gleser L.J., Derman C. Probability Models and Applications. — New York, 1980.
53. Komarova Y.A., Vorobjev I.A., Borisy G.G. Life cycle of MTs: persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary // *J. Cell Sci.* — 2000. — In press.
54. Akhmanova A., Hoogenraad C.C., Drabek K., Stepanova T., Dortland B., Verkerk T., Vermeulen W., Burgering B.M., De Zeeuw C.I., Grosveld F., Galjart N. Clasps are CLIP-

- 115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts // *Cell*. — 2001. — **104**. — P. 923–935.
55. McNally F.J. Cytoskeleton: CLASPIing the end to the edge // *Curr. Biol.* — 2001. — **11**. — P. R477–R480
 56. Hoogenraad C.C., Akhmanova A., Grosveld F., De Zeeuw C.I., Galjart N. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules // *J. Cell Sci.* — 2000. — **113**. — P. 2285–2297.
 57. Cassimeris L.U., Wadsworth P., Salmon E.D. Dynamics of microtubule depolymerization in monocytes // *J. Cell Biol.* — 1986. — **102**. — P. 2023–2032.
 58. Воробьев И.А., Григорьев И.С., Бориси Г.Г. Динамика микротрубочек в культивируемых клетках // *Онтогенез*. — 2000. — **31**. — С. 420–428.
 59. Hill T.L. Linear Aggregation Theory in Cell Biology. — New York: Springer-Verlag, 1987.
 60. Dogterom M., Leibler S. Physical aspects of the growth and regulation of microtubule structures // *Phys. Rev. Lett.* — 1993. — **70**. — P. 1347–1350.
 61. Dogterom M., Maggs A.C., Leibler S. Diffusion and formation of microtubule asters: physical processes versus biochemical regulation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1995. — **92**. — P. 6683–6688.
 62. Holy T.E., Dogterom M., Yurke B., Leibler S. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1997. — **94**. — P. 6228–6231.
 63. Dogterom M., Yurke B. Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules // *Science*. — 1997. — **278**. — P. 856–860.
 64. Waterman-Storer C.M., Salmon E.D. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling // *J. Cell Biol.* — 1997. — **139**. — P. 417–434.
 65. Mikhailov A., Gundersen G.G. Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol // *Cell Motil. Cytoskeleton*. — 1998. — **41**. — P. 325–340.
 66. Kirschner M., Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis // *Cell*. — 1986. — **45**. — P. 329–342.
 67. Holy T.E., Leibler S. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1994. — **91**. — P. 5682–5685.
 68. Mandelkow E.M., Mandelkow E. Unstained microtubules studied by cryo-electron microscopy. Substructure, supertwist and disassembly // *J. Mol. Biol.* — 1985. — **181**. — P. 123–135.
 69. Mandelkow E.M., Mandelkow E., Milligan R.A. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study // *J. Cell Biol.* — 1991. — **114**. — P. 977–991.
 70. Tran P.T., Joshi P., Salmon E.D. How tubulin subunits are lost from the shortening ends of microtubules // *J. Struct. Biol.* — 1997. — **118**. — P. 107–118.
 71. Hush J.M., Wadsworth P., Callahan D.A., Hepler P.K. Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching // *J. Cell Sci.* — 1994. — **107**. — P. 775–784.
 72. Moore R.C., Zhang M., Cassimeris L., Cyr R.J. In vitro assembled plant microtubules exhibit a high state of dynamic instability // *Cell Motil. Cytoskeleton*. — 1997. — **38**. — P. 278–286.
 73. Heald R., Nogales E. Microtubule dynamics // *J. Cell Sci.* — 2002. — **115**. — P. 3–4.
 74. Karsenti E., Kobayashi S., Mitchison T., Kirschner M. Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes // *J. Cell Biol.* — 1984. — **98**. — P. 1763–1776.
 75. Maniotis A., Schliwa M. Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriole generation in BSC-1 cells // *Cell*. — 1991. — **67**. — P. 495–504.
 76. Yvon A.M., Wadsworth P. Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells // *J. Cell Sci.* — 1997. — **110**. — P. 2391–2401.
 77. Dye R.B., Flicker P.F., Lien D.Y., Williams R.C. End-stabilized microtubules observed in vitro: stability, subunit interchange, and breakage // *Cell Motil. Cytoskel.* — 1992. — **21**. — P. 171–186.
 78. McNally F.J., Vale R.D. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules // *Cell*. — 1993. — **75**. — P. 419–429.
 79. Vorobiev I.A., Chentsov Yu.S. The dynamics of reconstitution of microtubules around the cell center after cooling // *Eur. J. Cell Biol.* — 1983. — **30**. — P. 149–153.
 80. Henderson C.G., Tucker J.B., Chaplin M.A., Mackie J.B., Maidment S.N., Mogensen M.M., Paton C.C. Reorganization of the centrosome and associated microtubules during the morphogenesis of a mouse cochlear epithelial cell // *J. Cell Sci.* — 1994. — **107**. — P. 589–600.
 81. Ahmad F.J., Baas P.W. Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon // *J. Cell Sci.* — 1995. — **108**. — P. 2761–2769.
 82. Ahmad F.J., Yu W., McNally F.J., Baas P.W. An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron // *J. Cell Biol.* — 1999. — **145**. — P. 305–315.
 83. Salmon E.D., Saxton W.M., Leslie R.J., Karow M.L., McIntosh J.R. Diffusion coefficient of fluorescein-labeled tubulin in the cytoplasm of embryonic cells of a sea urchin: video image analysis of fluorescence redistribution after photobleaching // *J. Cell Biol.* — 1984. — **99**. — P. 2157–2164.
 84. Pepperkok R., Bre M.H., Davoust J., Kreis T.E. Microtubules are stabilized in confluent epithelial cells but not in fibroblasts // *J. Cell Sci.* — 1991. — **111**. — P. 3003–3012.
 85. Rodionov V.I., Lim S.S., Gelfand V.I., Borisy G.G. Microtubule dynamics in fish melanophores // *J. Cell Biol.* — 1994. — **126**. — P. 1455–1464.
 86. Чернобельская О.А., Григорьев И.С., Алиева И.Б., Воробьев И.А. Анализ различных методических подходов к измерению длины микротрубочек в цитоплазме культивируемых клеток // *Онтогенез*. — 2001. — **32**. — P. 58–66.

Поступила 12.01.03