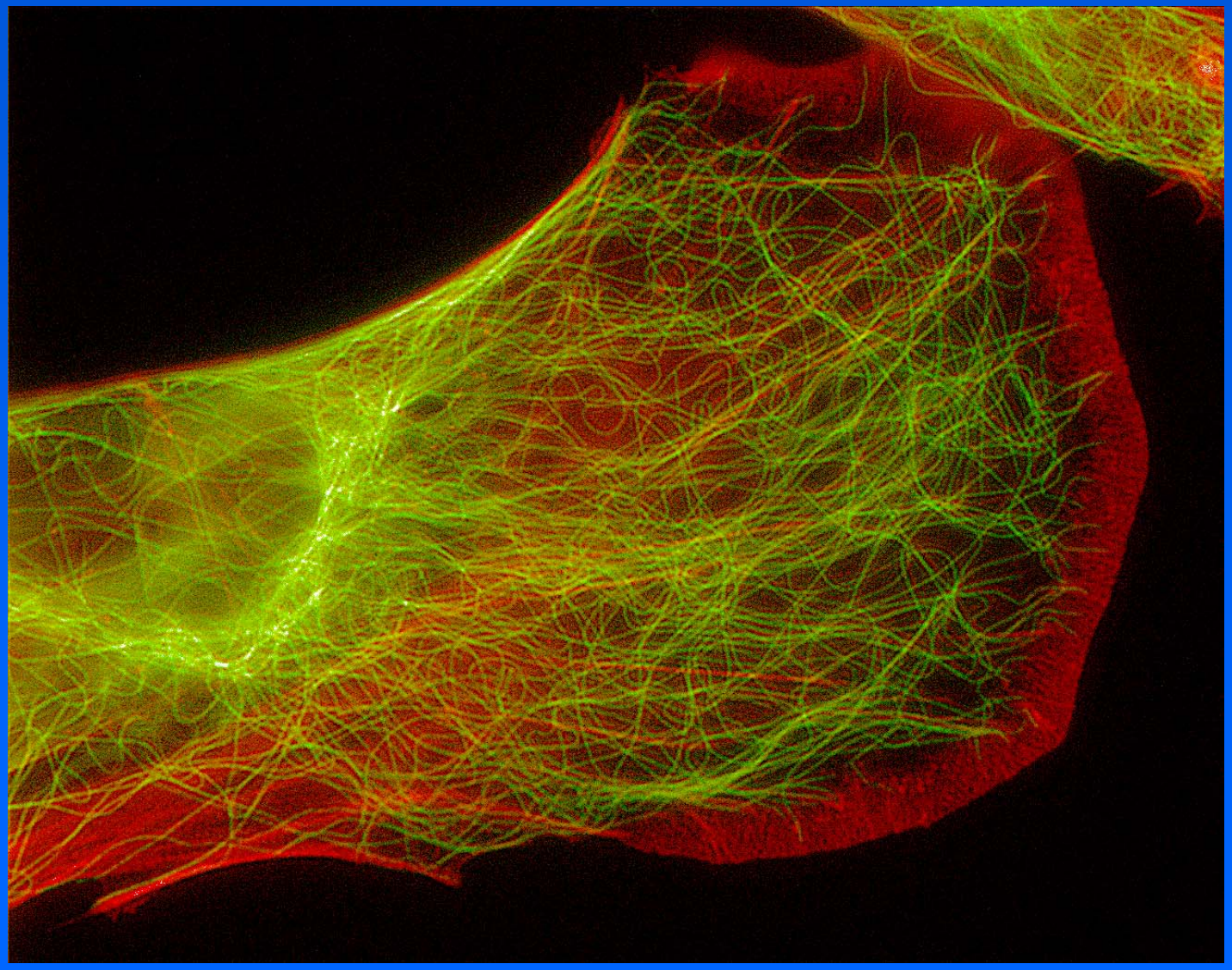
Лекция 12

Микротрубочки

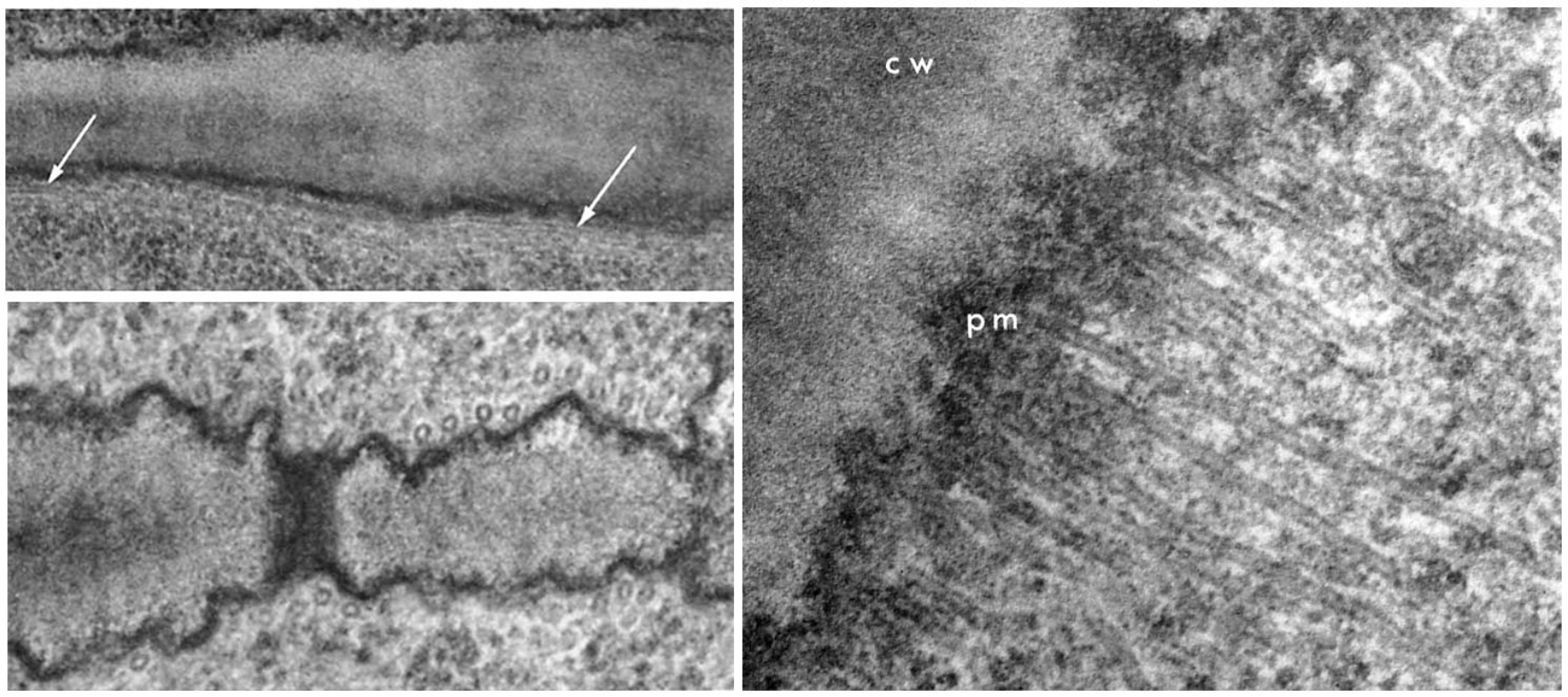
Промежуточные филаменты

Митоз (начало)

Расположение МТ и актина



Микротрубочки в клетке, открытие



Ledbetter and Porter, 1963 – фиксация глютаровым альдегидом, электронная микроскопия

Микротрубочки – основные свойства

α- и β-тубулины (м.в. ~ 55 кД) являются мажорными белками цитоплазмы и эволюционно консервативны. Гетеродимер тубулина (α/β) имеет два ГТФ-связывающих центра.

Гетеродимеры тубулина полимеризуются при 37°С с гидролизом одной молекулы ГТФ. Вторая молекула ГТФ гидролизуется позднее в составе микротрубочки.

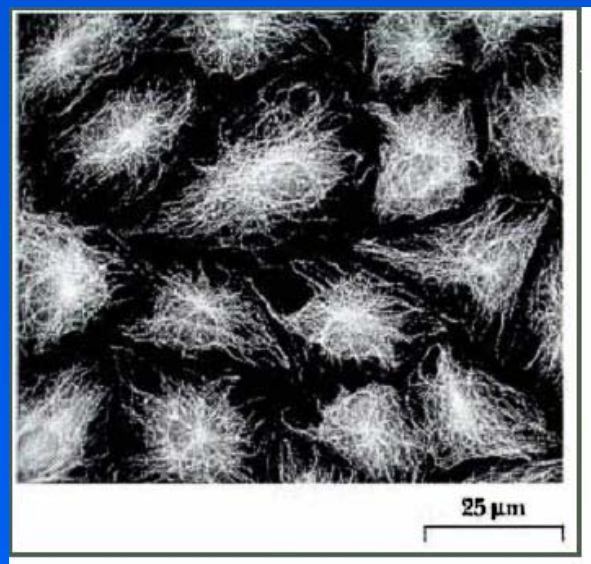
Микротрубочки быстро деполимеризуются при низкой температуре и воздействии специфических ядов (колхицин, нокодазол, винбластин).

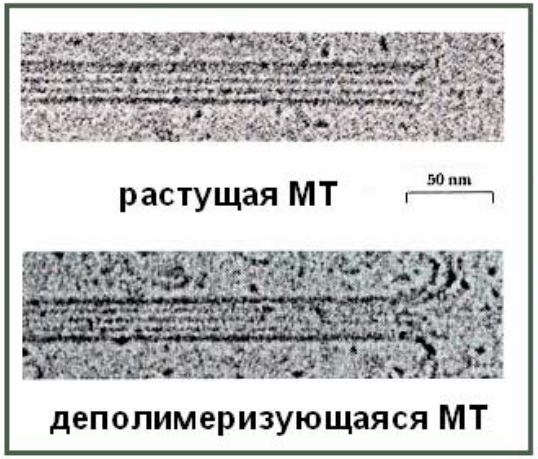
Для роста микротрубочек необходимы затравки.

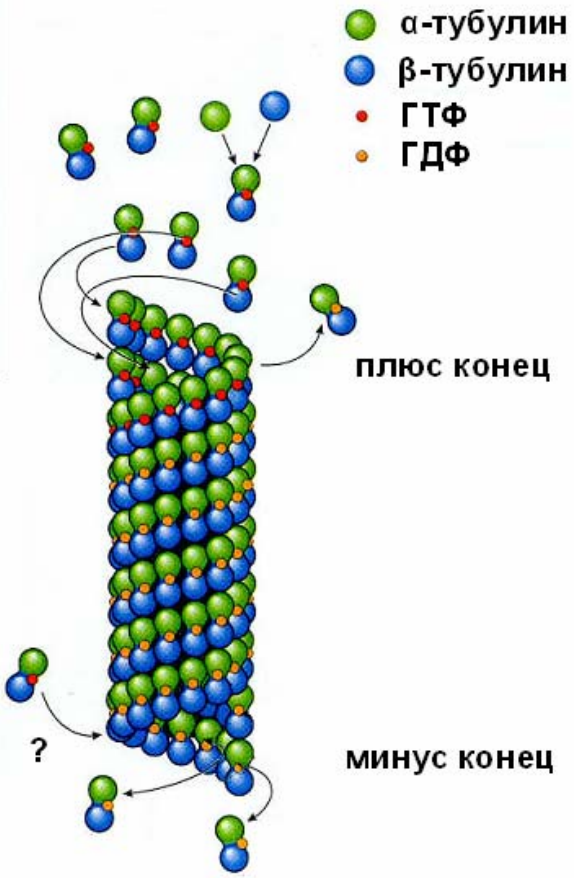
Микротрубочки полярны – рост идет на одном (плюс) конце. Противоположный (минус) конец стабилен или разбирается.

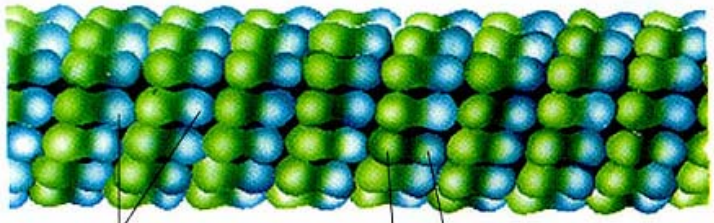
В равновесных условиях в клетке отдельные МТ постоянно растут и укорачиваются с плюс конца; продолжительность фаз составляет секунды, переход между фазами происходит быстро (динамическая нестабильность).

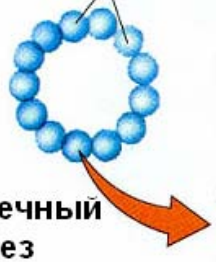
Микротрубочки – структура

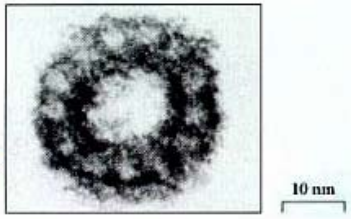




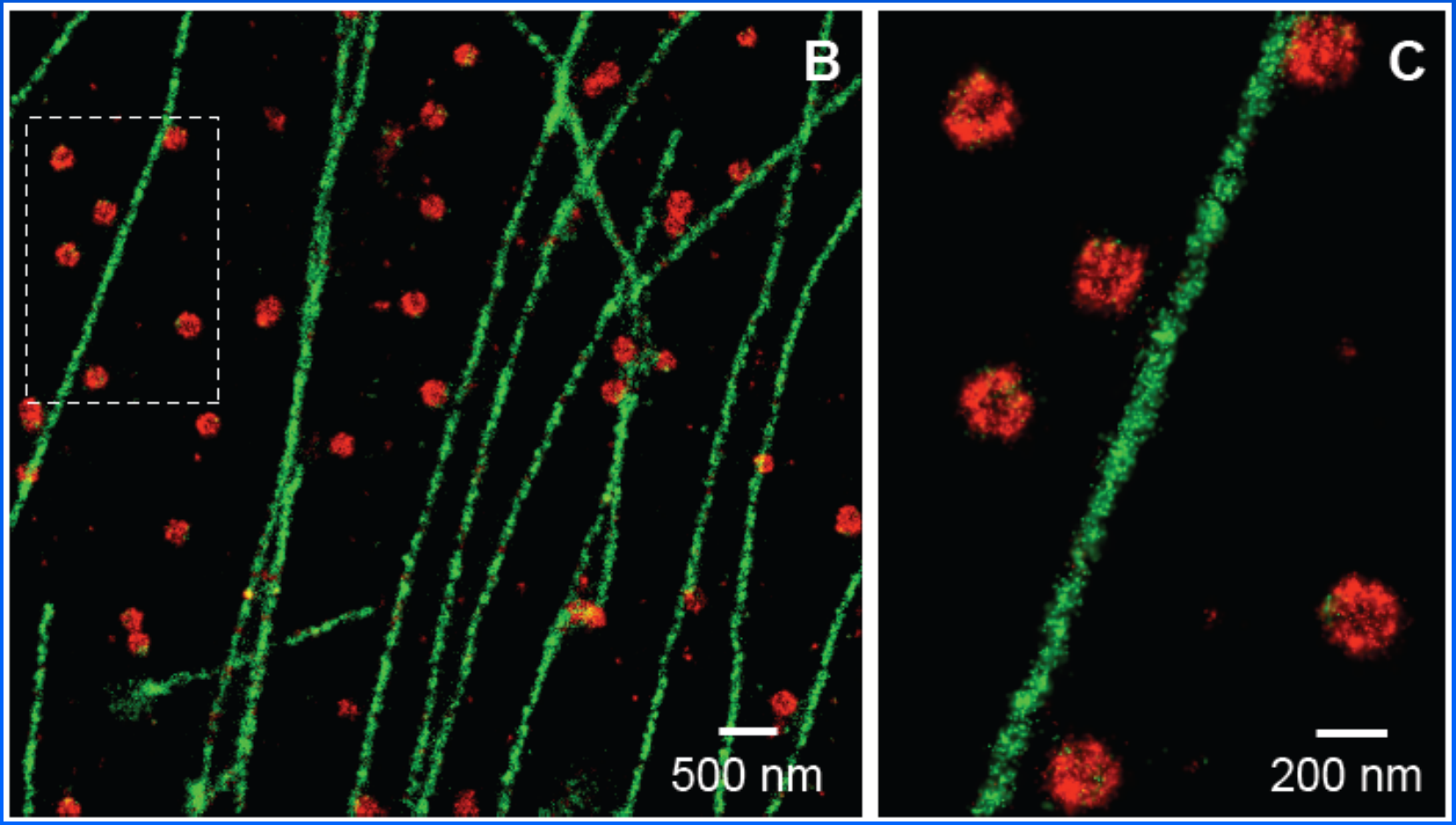








Микротрубочки в клетке



Клатриновые пузырьки и микротрубочки в клетке (флюоресцентная STORM микроскопия)

В интерфазных клетках содержатся длинные микротрубочки

Число микротрубочек определяется числом затравок.

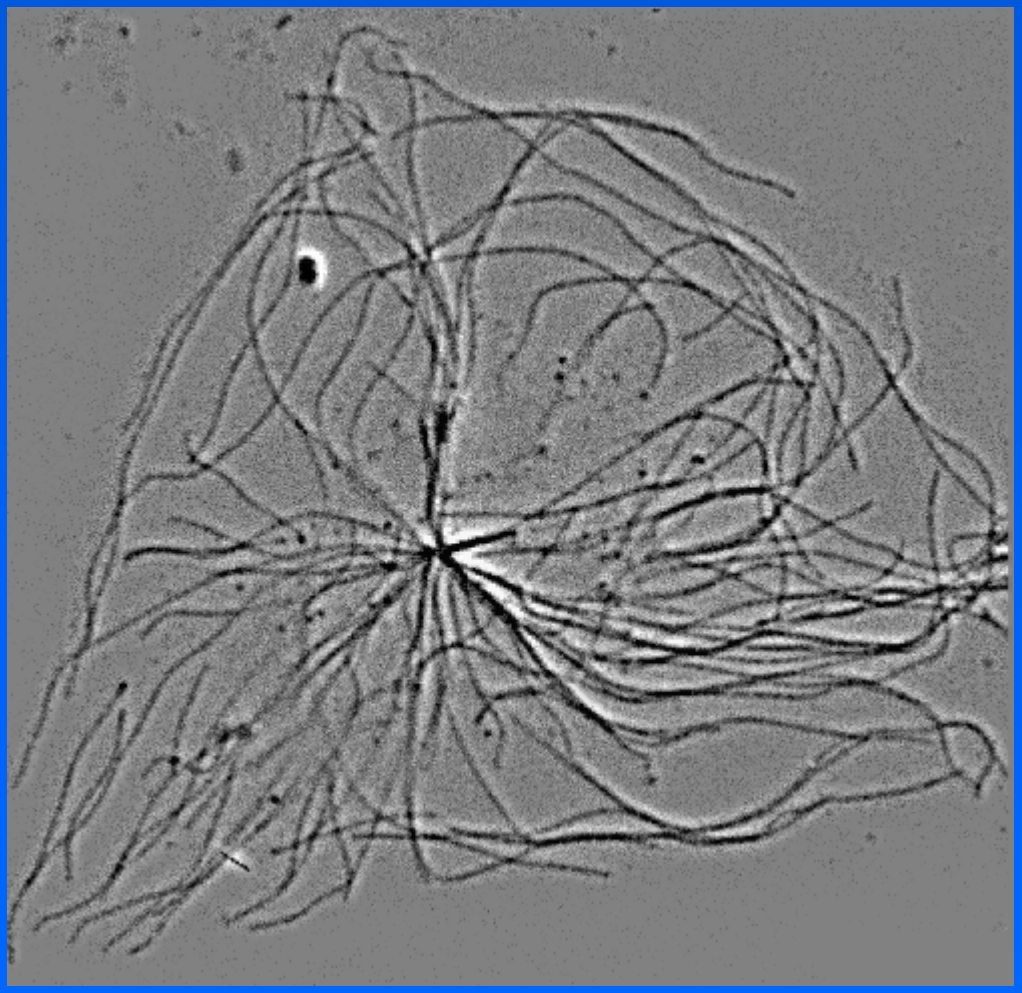
Рост микротрубочек в интерфазной клетке – случайное блуждание плюс-конца в ограниченном пространстве.

Плюс концы микротрубочек могут стабилизироваться вблизи края клетки.

Многие подвижные клетки имеют радиальную систему микротрубочек с одним центром схождения вокруг центросомы. Минус концы свободных микротрубочек в радиальной системе нестабильны.

Эпителиальные клетки, как правило, имеют продольную систему микротрубочек (между апикальной и базальной поверхностями). Минус концы свободных микротрубочек стабильны.

Радиальная система микротрубочек



Белки, ассоциированные с микротрубочками

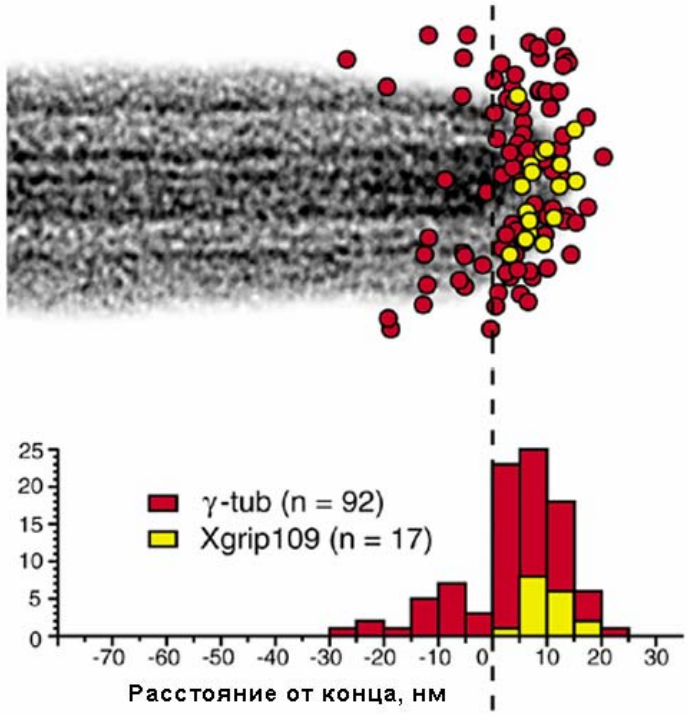
Моторные белки – динеин (dynein) и кинезины (kinesins)

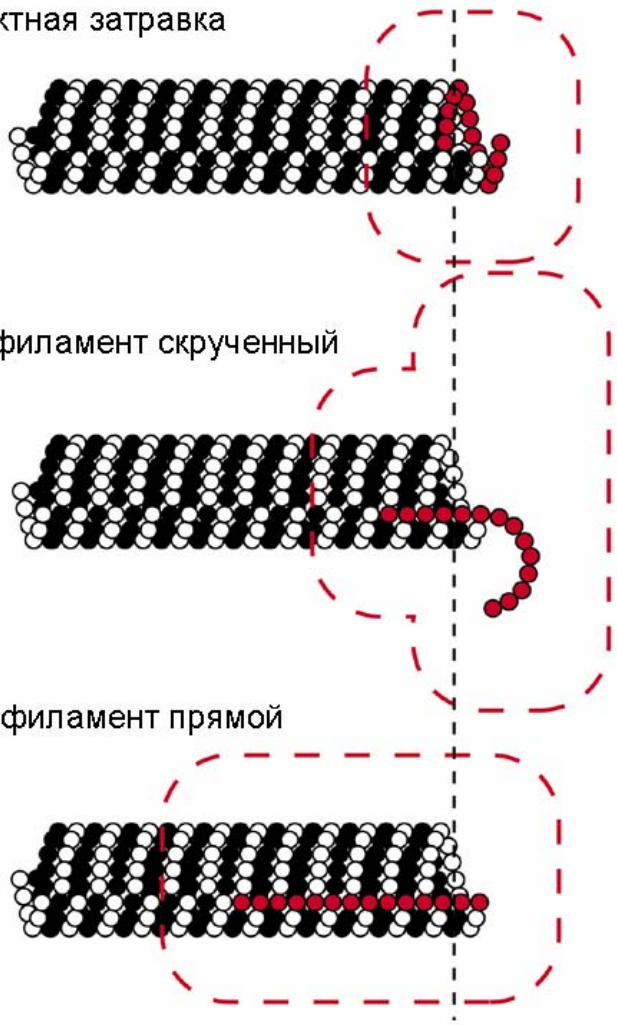
Латерально связанные белки (MAPs)

Белки, связанные с плюс концом растущей микротрубочки (CLIP-170; семейство EB; CLASP)

Затравки для роста микротрубочек – гамма-тубулиновый комплекс (γ-TuRC)

Гамма-тубулин – модель затравки для полимеризации МТ





Микротрубочки в клетке – расположение и динамика

Микротрубочки нестабильны и обмениваются (в основном на плюс конце) с пулом растворенного тубулина. Время полуобмена в митозе составляет около 20 с, в интерфазе – 3-20 мин.

Большинство плюс концов МТ направлены к краю клетки.

Количество микротрубочек в клетке, по-видимому, лимитируется количеством затравок для их полимеризации, так как спонтанная нуклеация – очень медленный процесс.

Многие микротрубочки в клетках животных кажутся радиально растущими от центросомы, но реальная структура сети микротрубочек гораздо сложнее.

Моторные белки, ассоциированные с микротрубочками

Локомоторный цикл идет с гидролизом АТФ.

Шаг – 8-16 нм (димер или два димера тубулина), вдоль протофиламента. Усилие – около 1 пН.

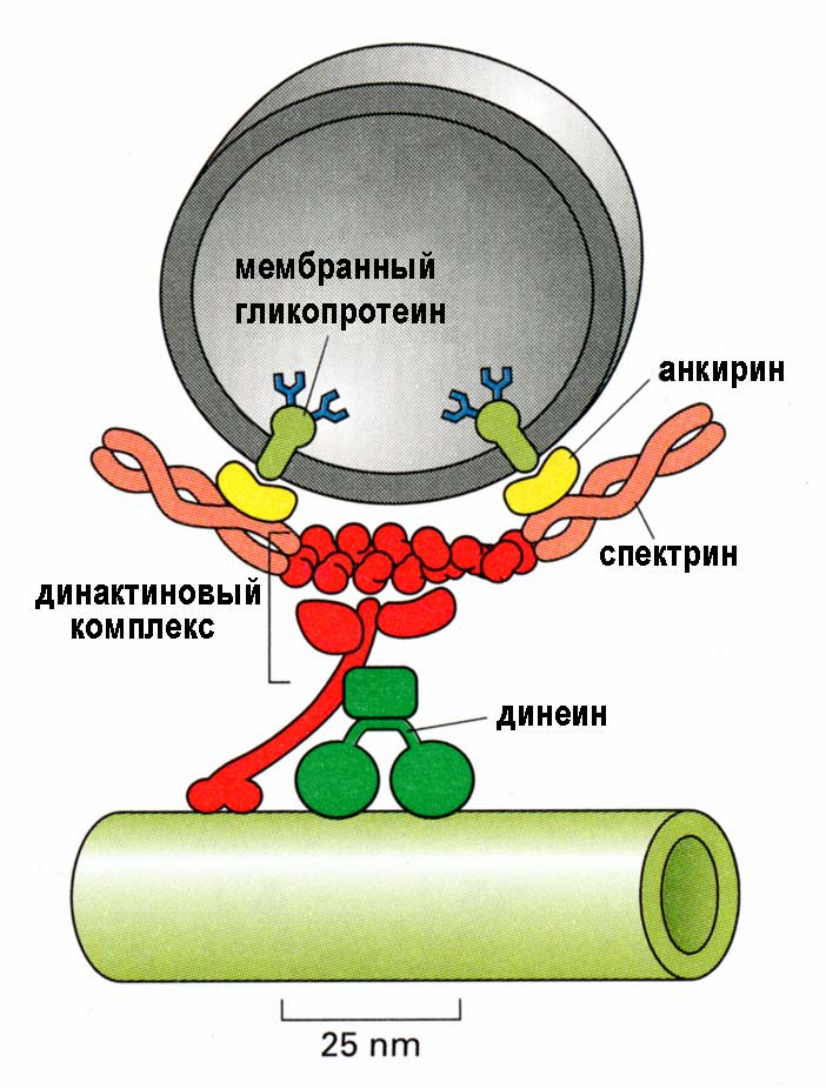
В большинстве случаев мотор – димерный белок с двумя головами.

Движение однонаправленно и процессивно – среднее расстояние переноса составляет 3-10 мкм.

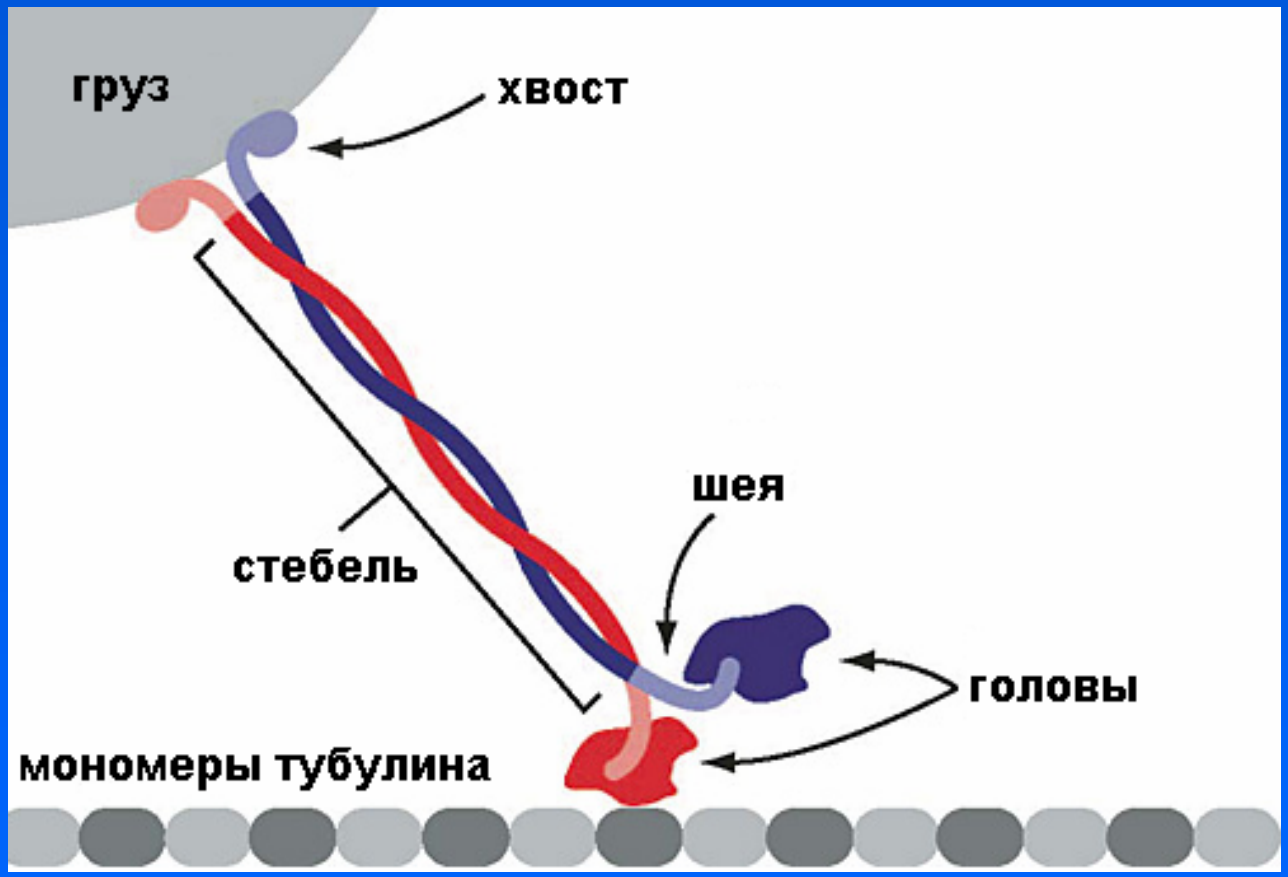
Кинезины (суперсемейство белков) – прямо взаимодействуют с МТ, большинство движутся к плюс концу.

Динеин – цитоплазматический (один) и ресничные (много разных). Для взаимодействия с МТ динеину необходимы дополнительные белки. Молекулы динеина движутся всегда к минус концу МТ.

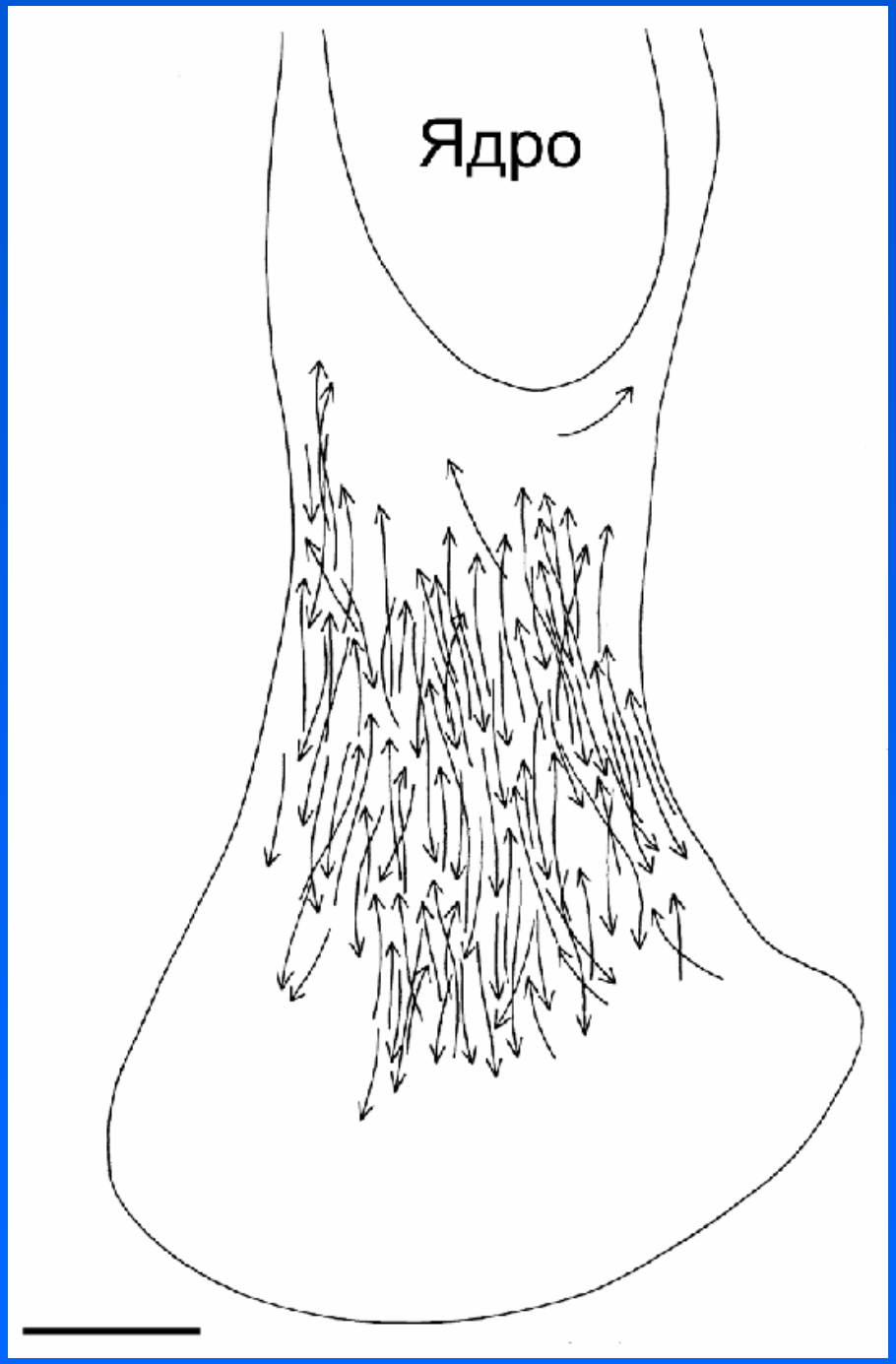
Структура динеинового комплекса



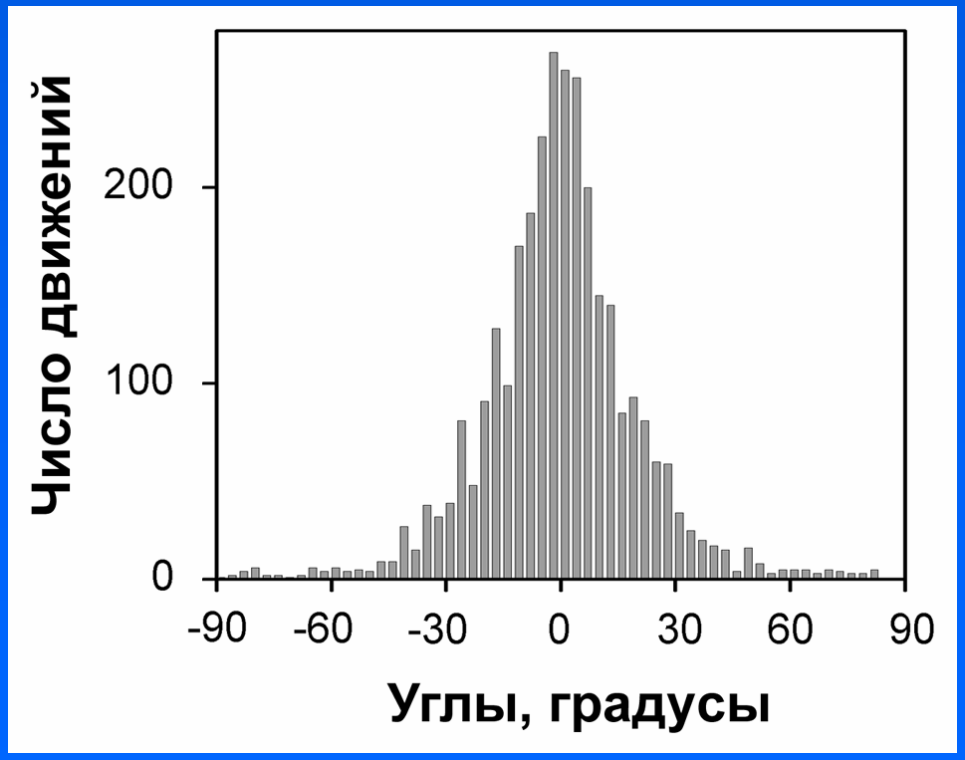
Структура кинезина



В большинстве случаев кинезин – димер, который движется к плюс концу вдоль микротрубочки.



Анизотропия транспорта в цитоплазме



Микротрубочки в нервных клетках

Нейрон: тело, аксон и дендриты.

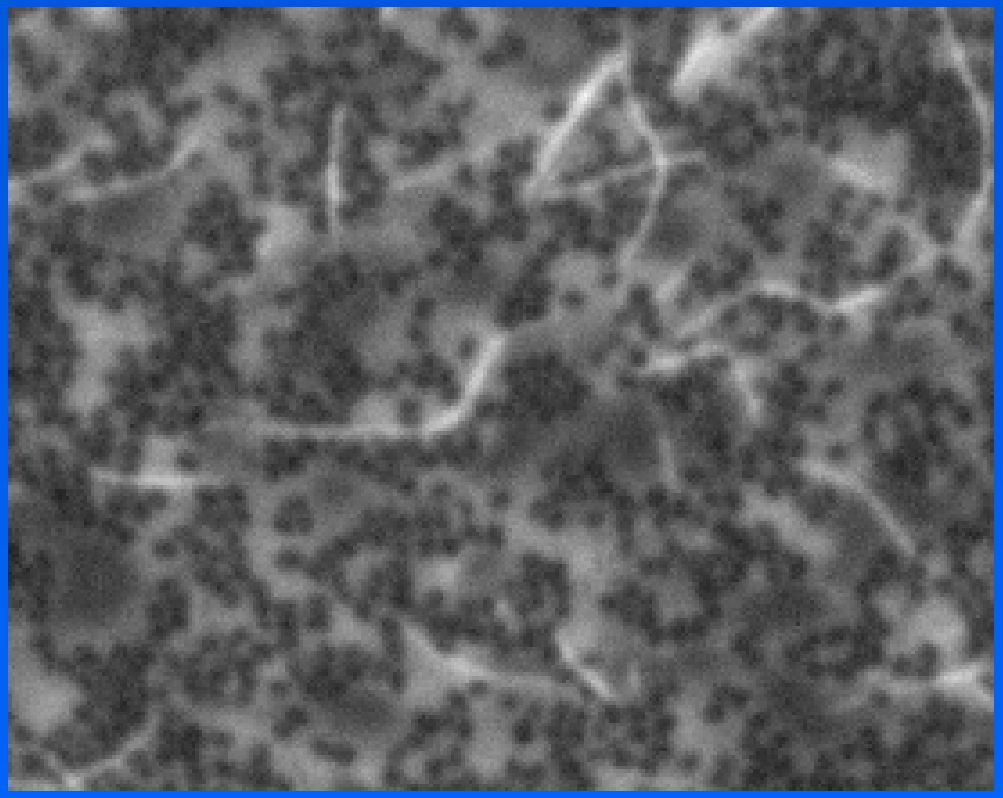
Пучки полярных МТ (минус концы направлены к телу клетки) встречаются только в аксоне. В дендритах МТ имеют различную полярность.

Ассоциированные с МТ белки – различаются в аксоне и в дендритах.

МТ всегда лабильны. Средняя длина МТ составляет порядка 10 мкм.

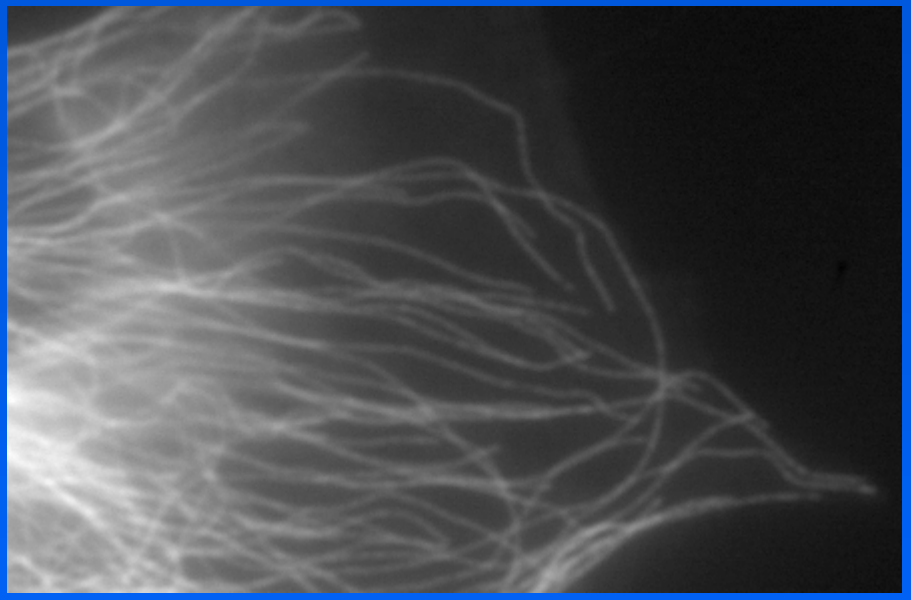
Конус роста аксона – МТ растут и укорачиваются также, как в других клетках.

Транспорт вдоль МТ



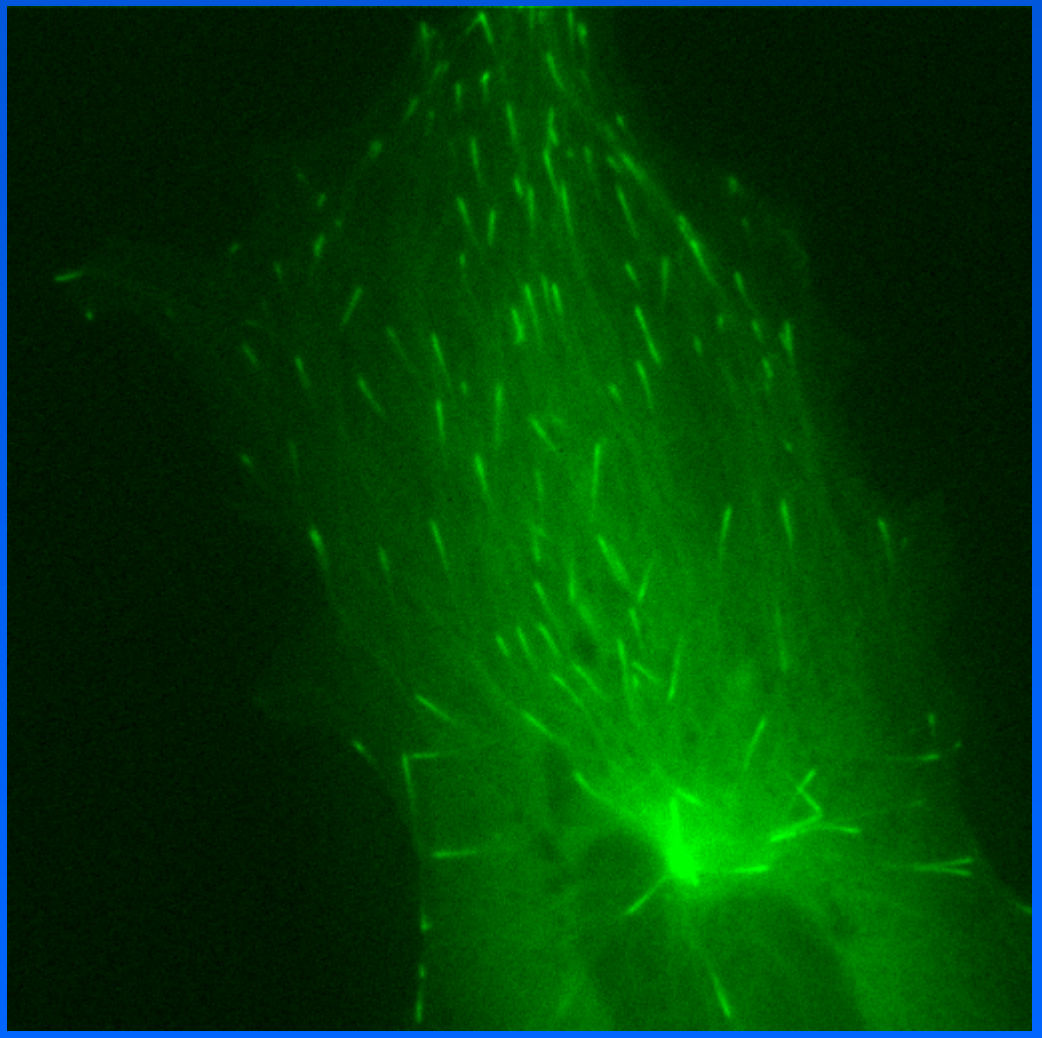
При активации динеина гранулы начинают перемещаться к минус концам микротрубочек

Динамическая нестабильность МТ на краю клетки



Динамическая нестабильность МТ: рост, пауза, укорочение, спасение. Скорость роста – около 10-20 мкм/мин; укорочения – 20-50 мкм/мин. Длина эпизодов – от 1 до нескольких мкм. Продолжительность паузы может быть более 1 мин. Структура плюс конца меняется при переходе от роста к укорочению.

Плюс концевые белки в живой клетке



Плюс-концевые белки, ассоциированные с микротрубочками

Плюс-концевые белки (+tips) связаны с плюс концами микротрубочек толь ко время их роста. Они быстро диссоциируют, когда плюс конец перестает растию

CLIP-170 – стимулирует «спасение».

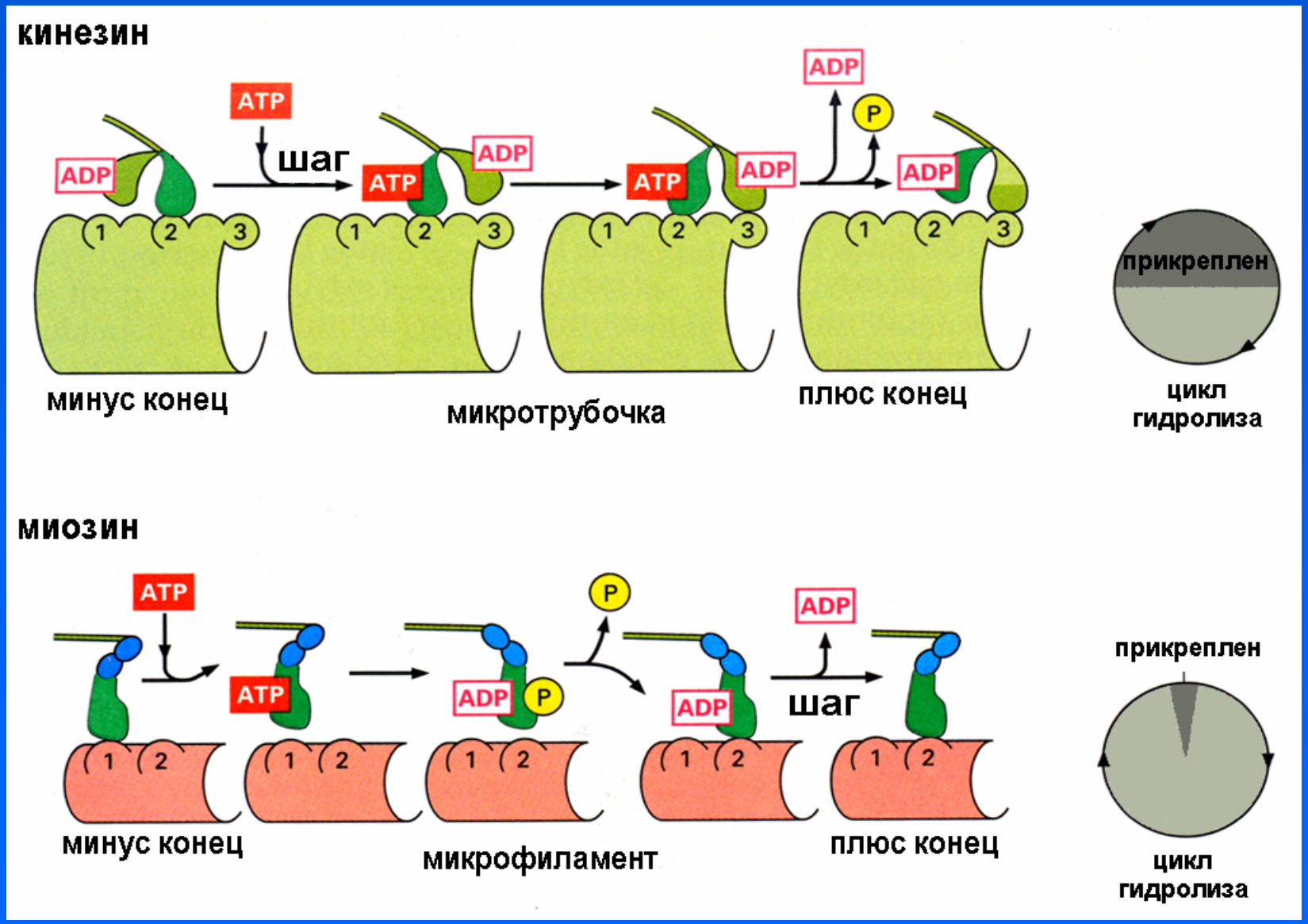
CLASP(s) – взаимодействуют через EB-белки, также стимулируют «спасение».

Семейство EB-белков. Связываются с тубулином и могут стимулировать рост.

SLAIN – взаимодействует через EB-белки.

XMAP215 – стимулирует рост.

Сравнение кинезина и миозина



Внутриклеточная подвижность

Движение по актину (миозин) – короткие (менее 1 мкм) треки у животных, процессивное движение (циклоз) у растений.

Движение по микротрубочкам – процессивное (сальтаторные движения) у животных и непроцессивное у растений.

Во время деления микротрубочки обеспечивают сначала сальтаторные движения хромосом, а потом медленное процессивное расхождение их.

Промежуточные филаменты – основные свойства

Молекулярный вес – как правило, около 60 кД.

Диаметр – 8-11 нм; длина одного филамента около 1 мкм.

Стабильны – время полуобмена составляет часы.

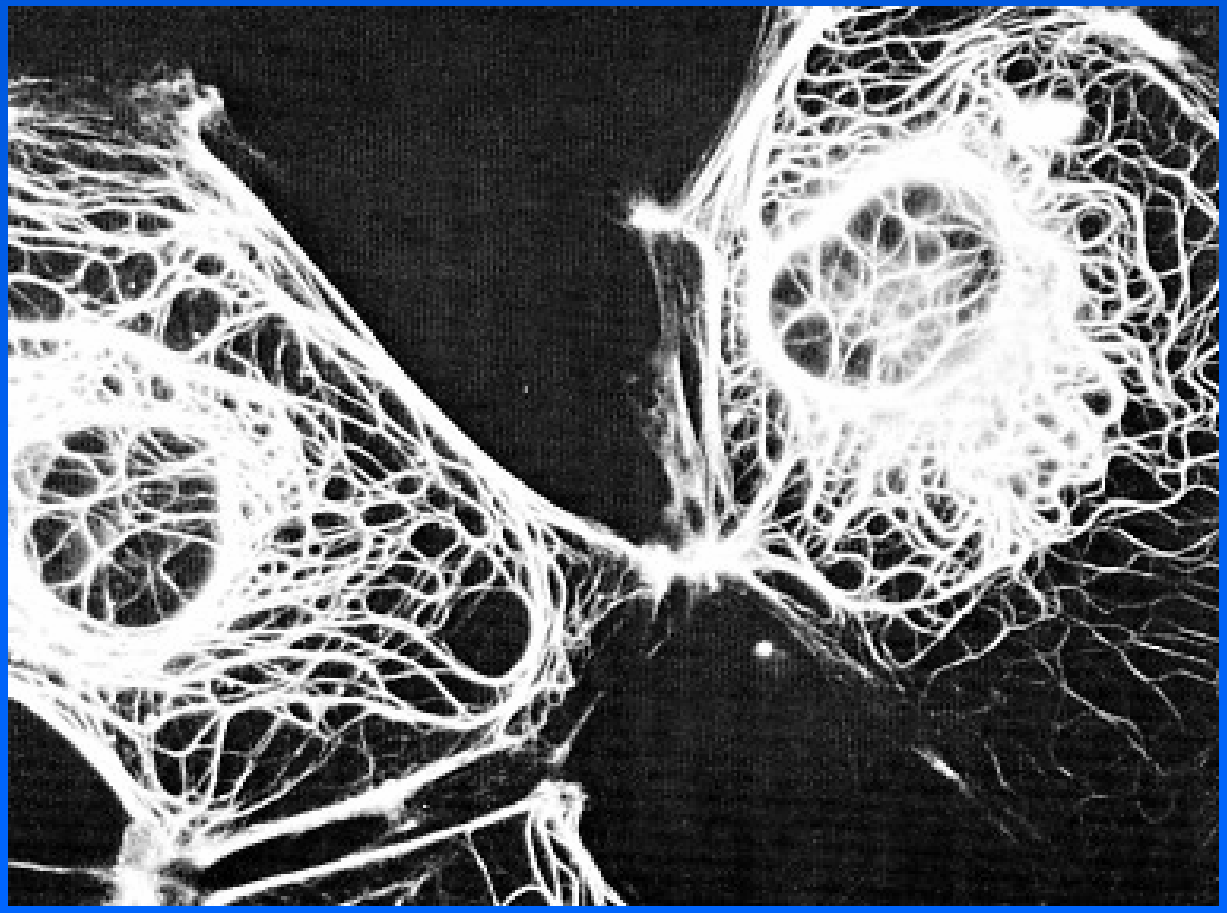
Обмен субъединицами происходит по всей длине.

Как правило, образуют пучки параллельных филаментов.

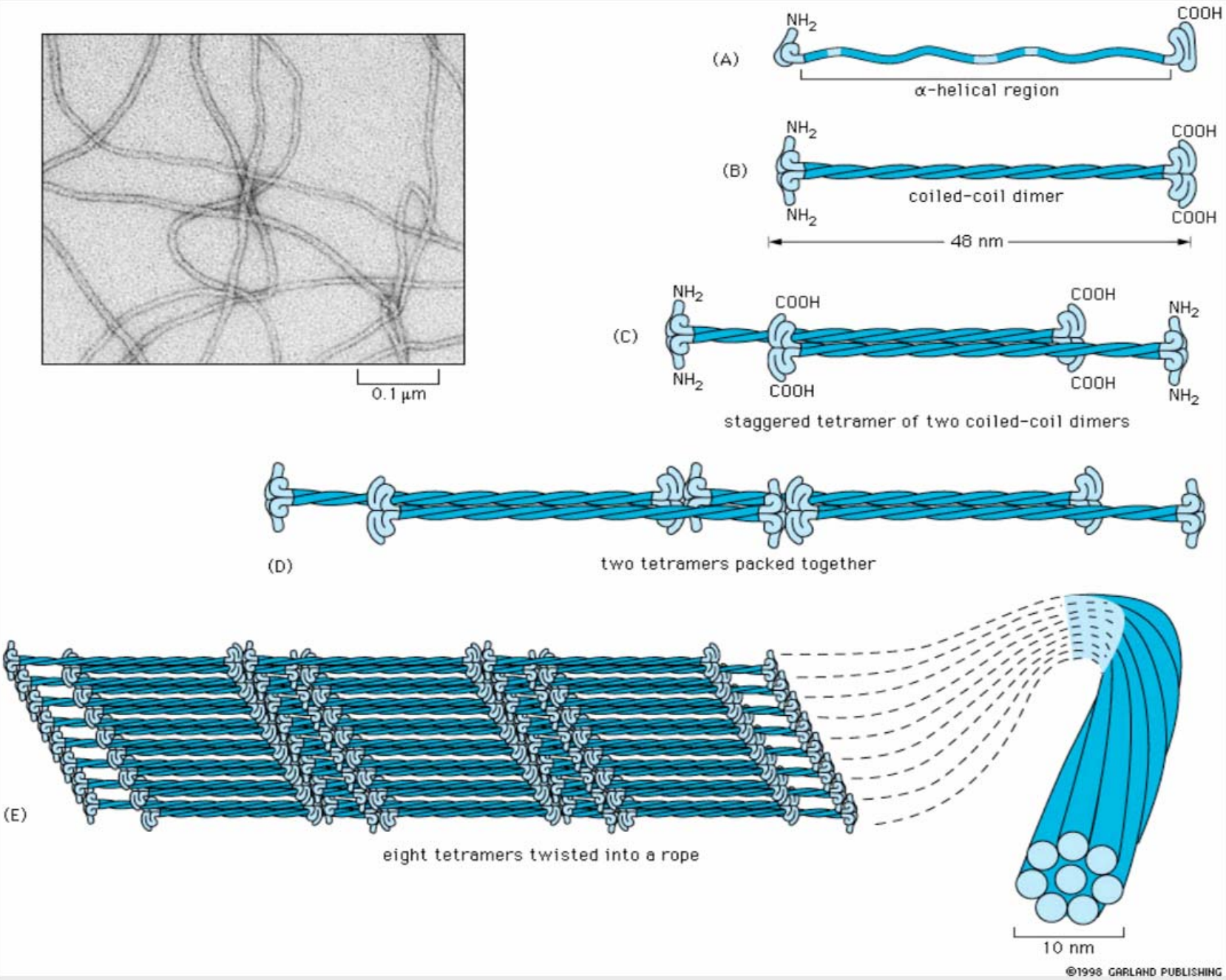
Белки ПФ тканеспецифичны.

Ингибиторы полимеризации неизвестны.

Сеть кератиновых филаментов



0.1 μm


(A)
NH2
COOH
α-helical region
(B)
NH2
COOH
coiled-coil dimer
NH2
COOH
48 nm
(C)
NH2
COOH
COOH
NH2
NH2
COOH
COOH
NH2
staggered tetramer of two coiled-coil dimers
(D)
two tetramers packed together
(E)
eight tetramers twisted into a rope
10 nm
©1998 GARLAND PUBLISHING

Промежуточные филаменты – основные типы

Виментин (ламин В) – содержится во всех клетках млекопитающих

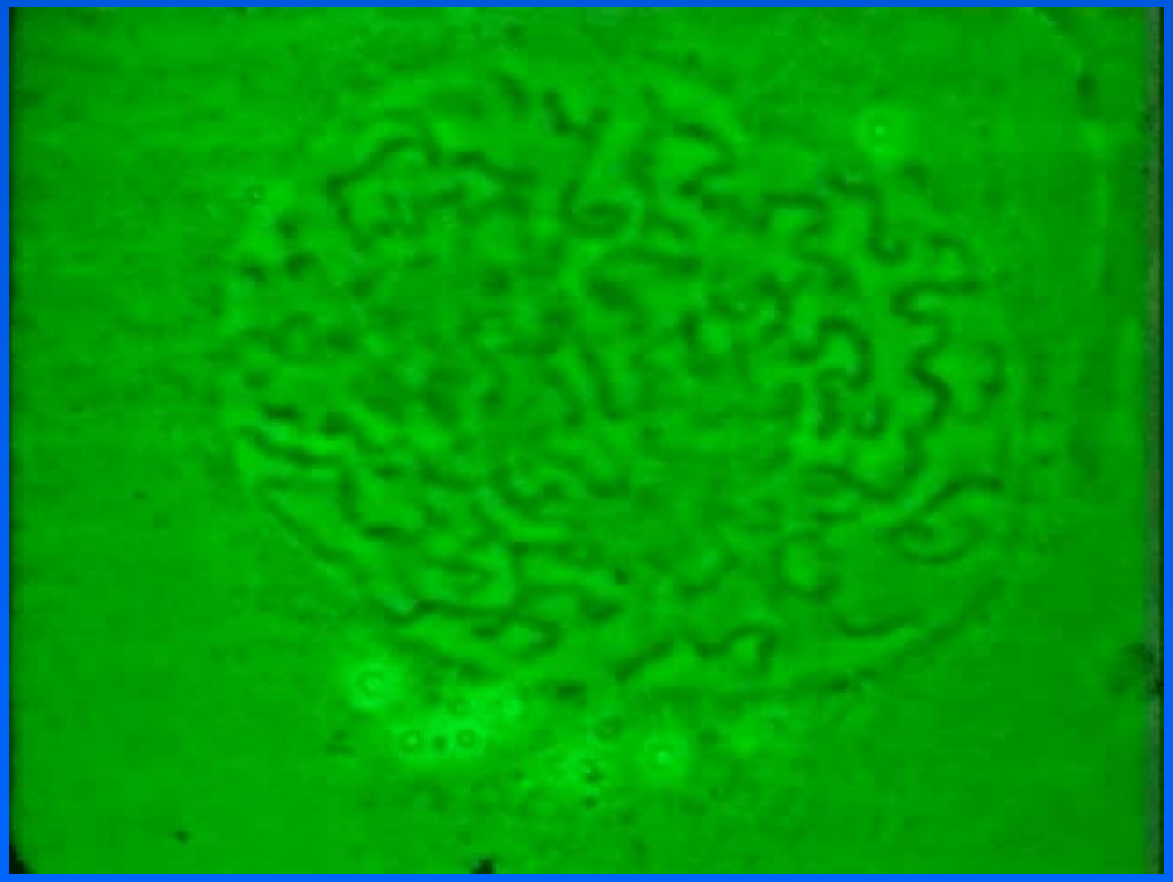
Десмин – мышечные клетки

Кератины – различные виды эпителиев (около 20 белков)

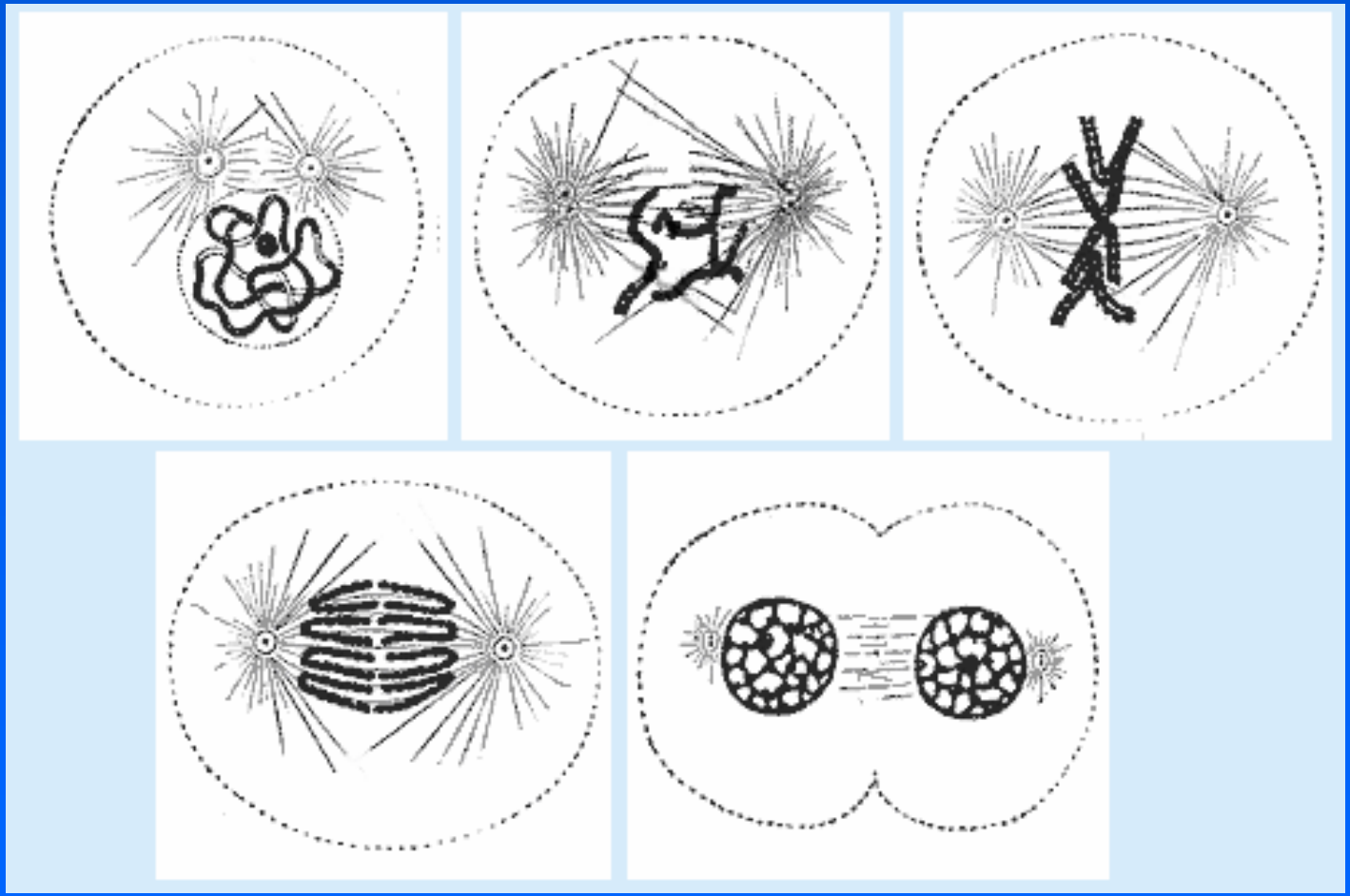
Нейрофиламенты – только нейроны (70, 140 и 210 кД)

Глиальный кислый белок – клетки нейроглии

Митоз в клетке тритона



Фазы митоза – схема



Основные события митоза

Профаза – конденсация хромосом, формирование звезд в цитоплазме.

Прометафаза – разрушение ядерной оболочки, формирование митотического аппарата и движение хромосом

Метафаза – формирование пластинки на экваторе и натяжение кинетохорных пучков МТ

Анафаза – расхождение хромосом и полюсов, формирование перетяжки (фрагмопласта)

Телофаза – деконденсация хромосом, сокращение перетяжки (рост фрагмопласта)

Параметры митоза

Общая продолжительность: 10 мин. – 3 часа.

Относительная продолжительность фаз митоза в животной клетке (общее время 70-90 мин.):

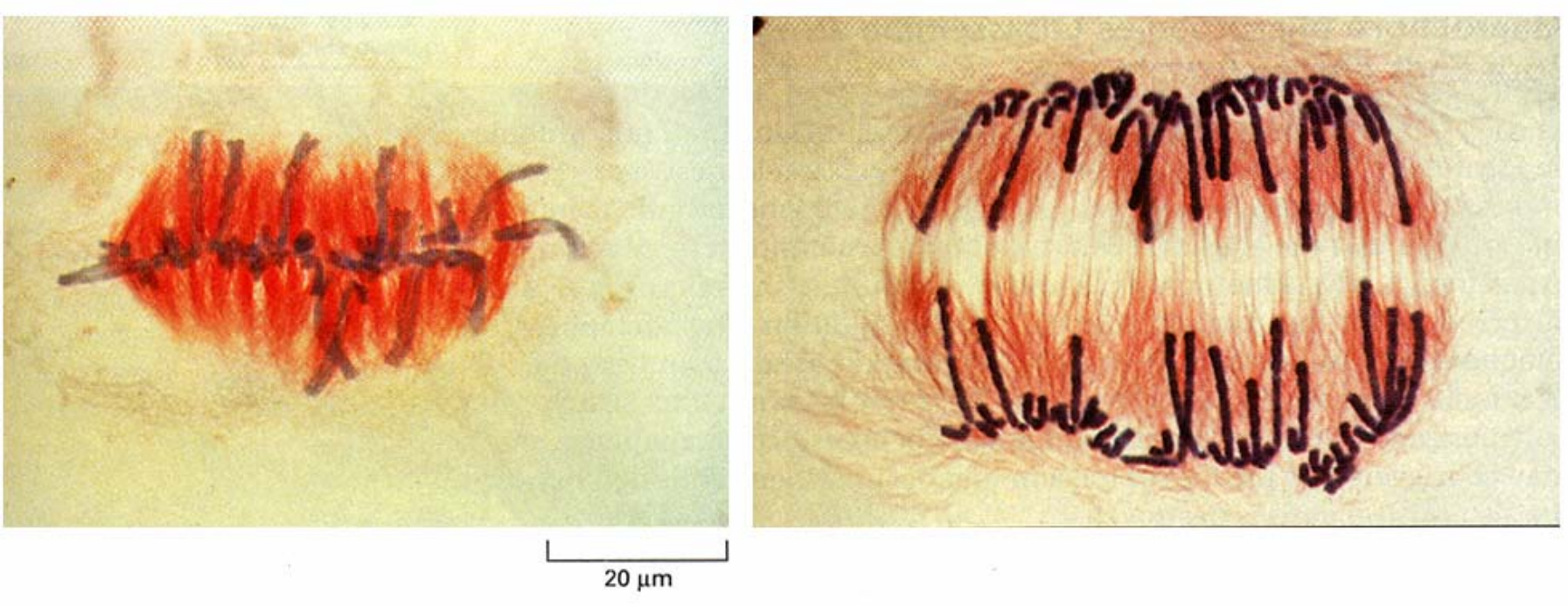
профаза – 15-30 мин., прометафаза – 10-15 мин., метафаза – 20 мин., анафаза – 6-8 мин., телофаза – 15-20 мин.

Скорость расхождения хромосом – около 1 мкм/мин.

Скорость расхождения полюсов – 0,5 мкм/мин.

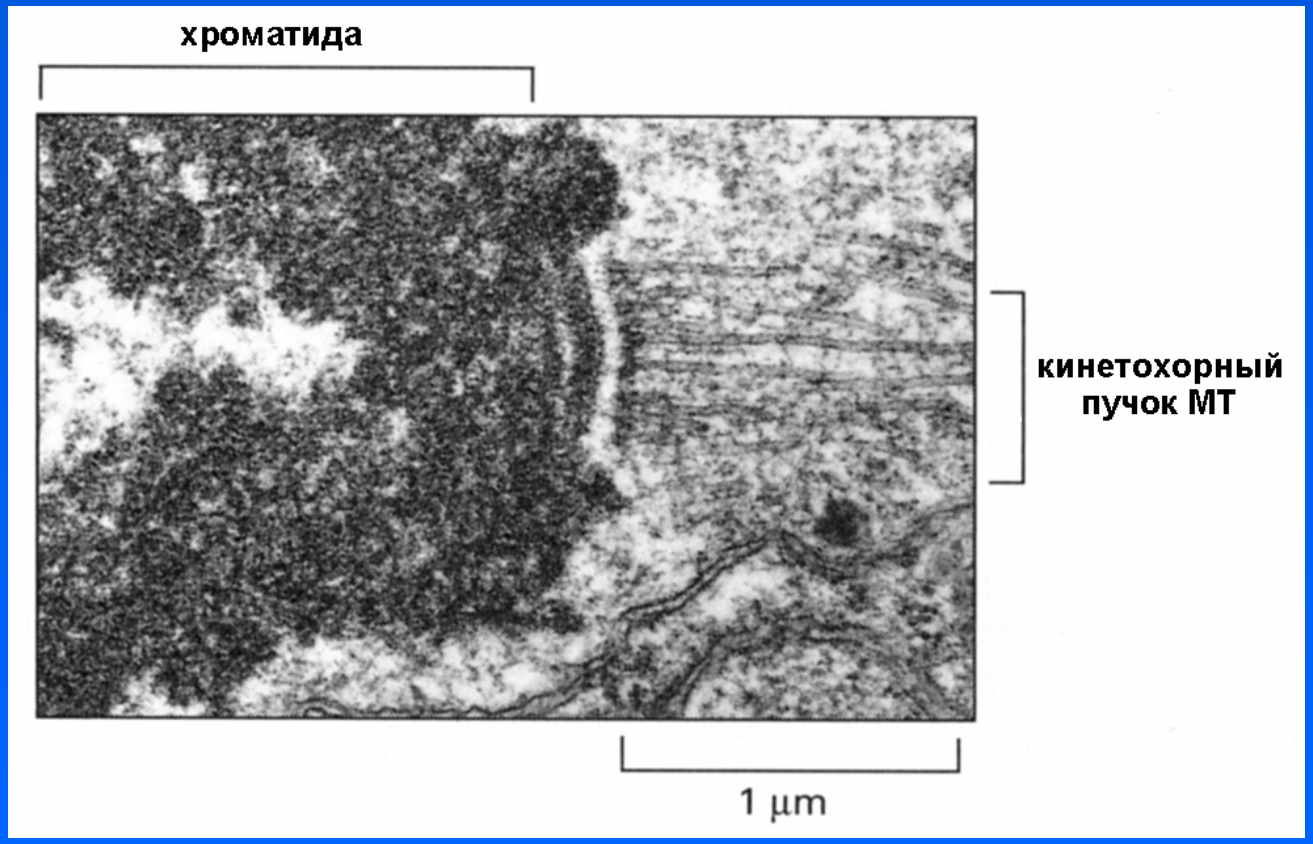
Начало цитокинеза – в анафазе. Завершение цитокинеза – после окончания телофазы.

Митоз в растительной клетке



Полюса не формируются. Веретено представлено набором пучков МТ, ассоциированных с отдельными хромосомами.

Кинетохор хромосомы



Кинетохор

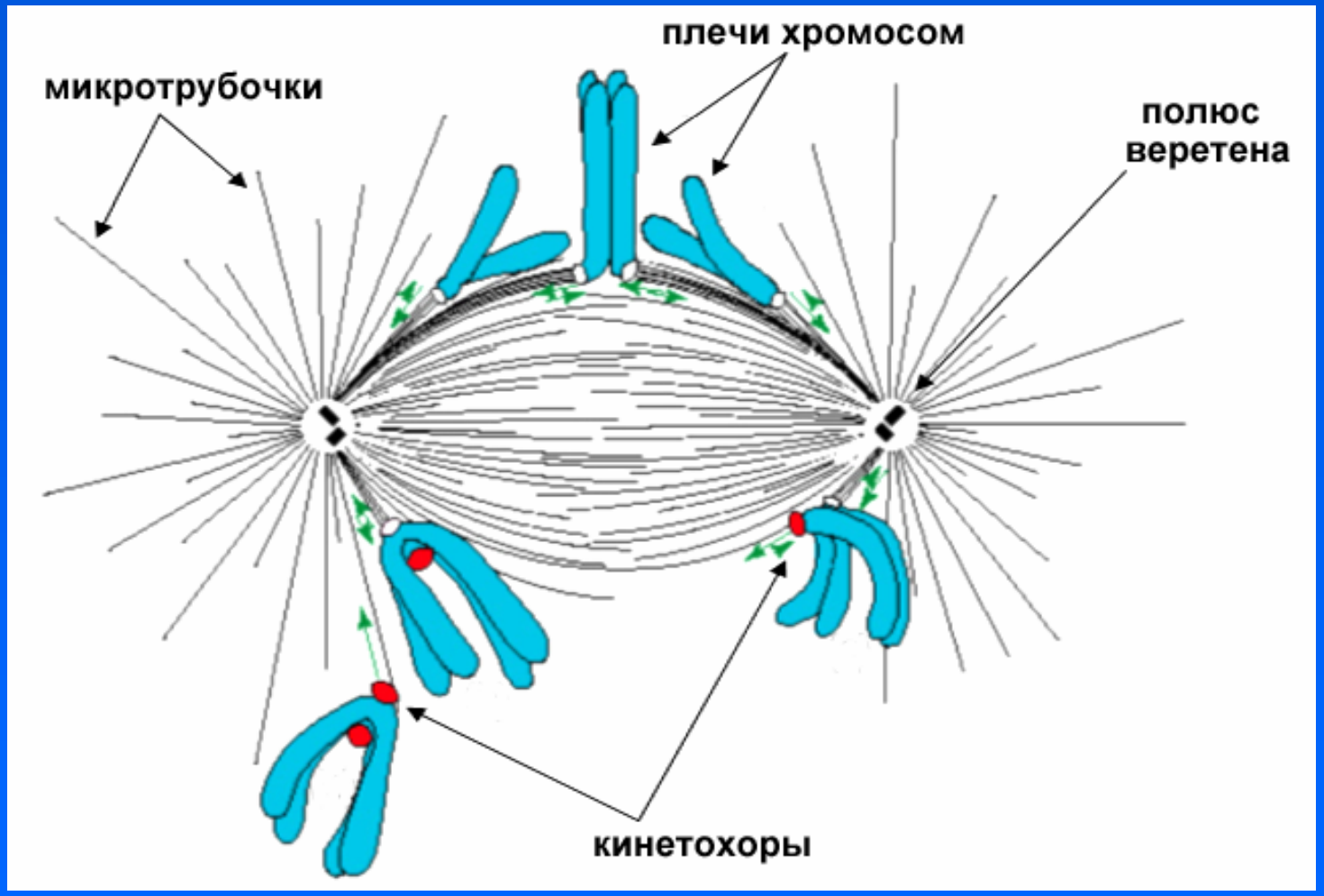
Белки кинетохора – конститутивные (постоянно связанные с кинетохорной ДНК) и митотические.

Центромерная ДНК – от нескольких десятков до нескольких тысяч нуклеотидов. Центромерный хроматин устойчив к деконденсации и ДНК в нем метилирована.

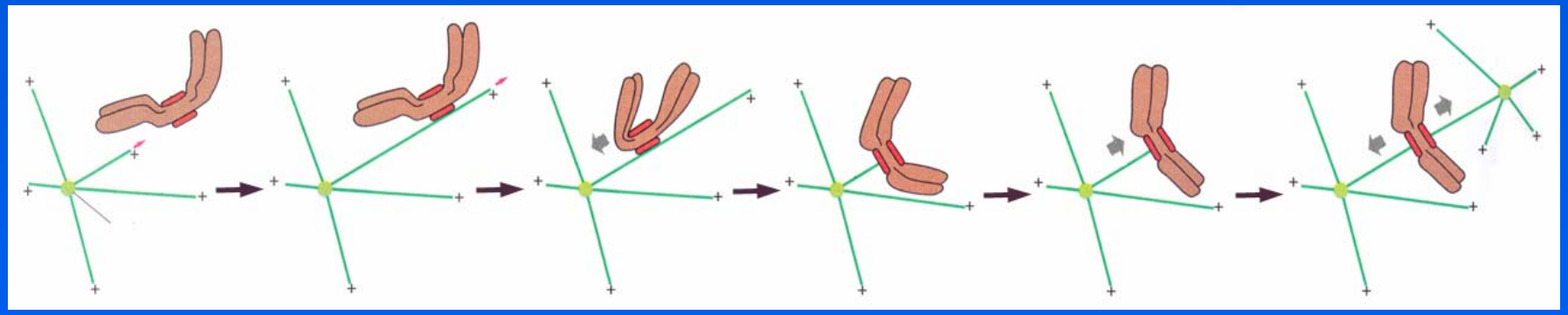
Трехслойная структура кинетохора возникает сначала как полусфера, затем преобразуется диск, диаметром 0.2-1 мкм и толщиной около 0.1 мкм. Число связанных с кинетохором МТ – 1-20.

Перестройка кинетохора происходит в прометафазе.

Способы прикрепления хромосом к веретену



Поведение хромосомы при формировании веретена

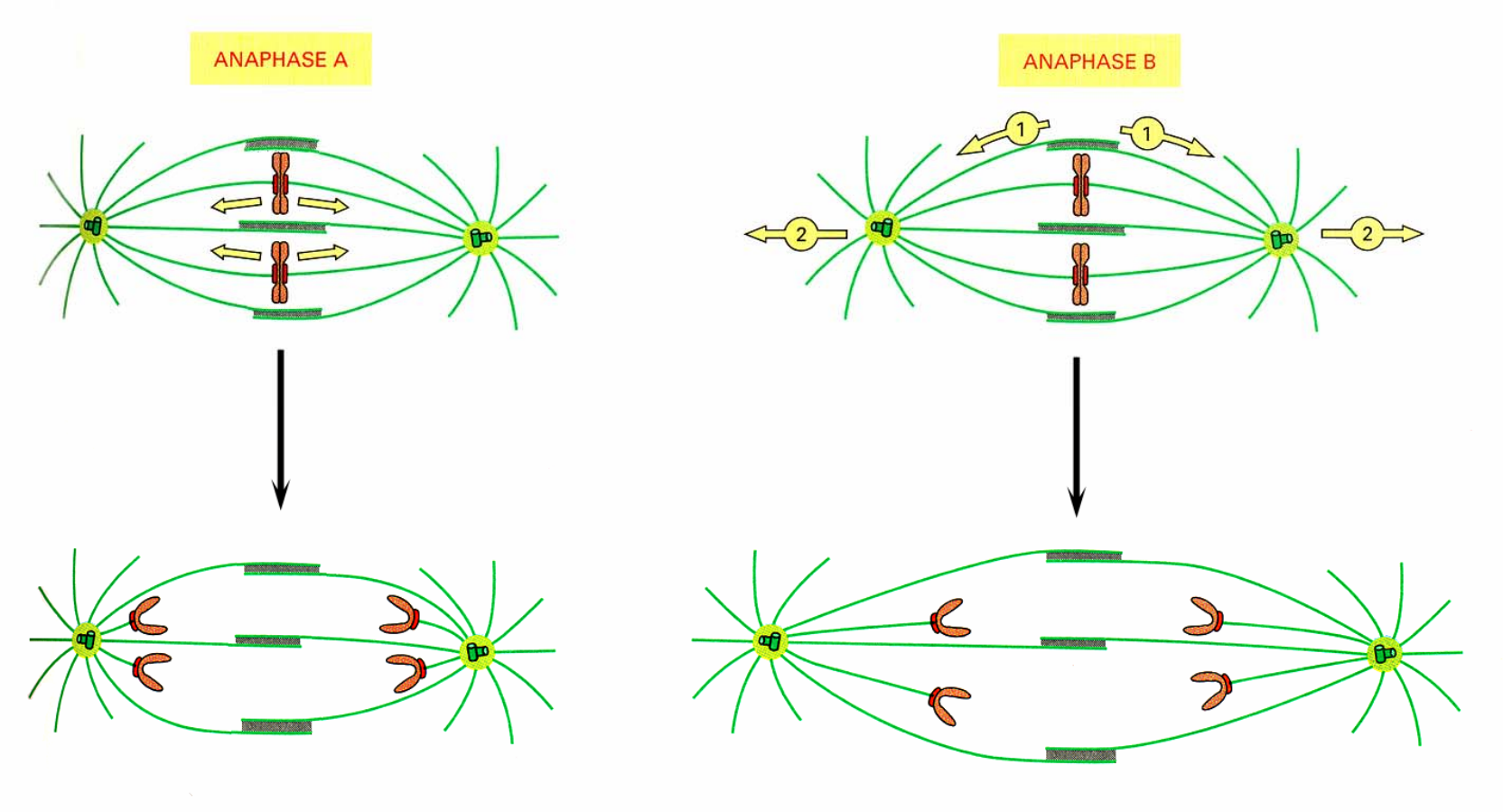


1-3 - Одиночная МТ достигает кинетохора и обеспечивает подтягивание хромосомы к полюсу

4-5 - Формируется пучок кинетохорных МТ, который отталкивает хромосому от полюса

6 - Устанавливается связь противоположных кинетохоров с противоположными полюсами

Анафаза А и анафаза Б



Анафаза А – расхождение хромосом к полюсам (укорочение хромосомных пучков МТ)

Анафаза Б – расхождение полюсов (удлинение полюсных микротрубочек). Анафазы А и Б могут перекрываться по времени.