Справочная информация к лекции

1. Слова, приведенные в глоссарии, в тексте лекции показаны **полужирным** шрифтовым выделением.
2. Ссылки на определенный номер слайда презентации выделены цветом.

«Силачи наномира»

«Межконтинентальный перелет птиц
и перемещение везикулы внутри живой клетки
всего на несколько нанометров имеют одну природу:
они основаны на направленном движении белков,
называемых молекулярными моторами»

Gunther Woehlke,
германский биохимик

«Все простое сделано до нас»

А.Н.Бах,
академик, основатель
российской школы биохимии

В нашем понимании слова «мотор» или «двигатель» обозначают весьма сложный механизм, преобразующий какой-либо вид энергии в механическую работу, в энергию движения. Оба этих термина взаимозаменяемы и широко используются с конца XIX в. В XX веке, о моторах также принято было говорить преимущественно с технической точки зрения, имея в виду придуманные и сконструированные человеком механизмы. Еще 50 лет назад сложно было представить себе мотор, функционирующий внутри клетки на уровне биологических молекул. А между тем такие биомолекулярные моторы существуют. С развитием экспериментальной науки человек получил возможность проникнуть в глубины живой клетки, изучая и видоизменяя структуры, существующие в наномире, в области значений порядка 10^{-9}. И современная биология знает уже много примеров природных нанодвигателей, встречающихся практически во всех живых организмах. Эти моторы отличаются друг от друга локализацией в клетке, функциями, структурой, «мощностью», типом «топлива» и их классификация на сегодняшний день весьма обширна.

Предметом данного разговора будет группа так называемых **моторных белков**, выполняющих в клетке функцию «грузчиков», причем размер грузов, которые белки-«силачи» могут переносить на себе, по сравнению с их собственным размером, поистине колоссален (Слайд 3). Двигаются эти белки по клеточным **микротрубочкам**, элементам клеточного скелета (**цитоскелета**). Микротрубочки построены из глобулярных белков двух типов: α- и β-тубулина (Слайд 4). Из этих субъединиц образуются линейные полимеры (протофиламенты), в которых глобулы

α- и β-тубулина чередуются. Из 13 протофиламентов, расположенных по кругу, получаются микротрубочки диаметром около 30 нм, с которыми непосредственно взаимодействуют молекулы моторных белков. Если провести аналогию с макромиром, то микротрубочки играют роль рельсов, по которым перемещаются молекулы белков (вагоны), неся на себе полезный груз. Один конец этой молекулы-«силача» прикрепляется к **везикуле** (транспортному пузырьку), которую необходимо транспортировать, а другой – к микротрубочке, которая направляет движение.

Группу моторных белков, осуществляющих перемещение везикул по микротрубочкам, называют белками-транслокаторами (Слайд 5). Эти белки извлекают энергию для своей работы в процессе расщепления (гидролиза) **АТФ**, являясь таким образом механохимическими **АТФаза**ми. Транслокаторы способны преобразовывать энергию АТФ в механическое усилие, позволяющее им перемещать внутри клетки частицы значительных размеров. В этом им помогает белок микротрубочек – тубулин, стимулирующий АТФ-зависимое перемещение. Транслокаторы в клетке находятся в основном в свободном состоянии или ассоциированы с мембранными компонентами. К микротрубочкам они присоединяются в основном в момент транспортирования «груза».

Белки-транслокаторы делятся на две группы: кинезины и динеины. Главным функциональным отличием этих групп является способность перемещать частицы по микротрубочкам в противоположных направлениях. Динеин перемещает грузы от клеточной мембраны к ядру, а кинезин – наоборот, от ядра к мембране. При этом обе молекулы как бы «шагают» по микротрубочкам. Взаимодействием динеина и тубулина микротрубочек обеспечивает также движение жгутиков и ресничек бактерий и простейших.

При описании транспорта с участием кинезина и динеина обычно рассматривают транспорт внутри **аксона** нервной клетки – ее длинного отростка, соединяющего тело клетки (сому) и синапс (Слайд 6). Аксоплазматический транспорт, также называемый аксональным, необходим **нейрону** для перемещения митохондрий, синаптических пузырьков, белков, липидов и т.д. между телом нервной клетки и периферией аксона через его цитоплазму (аксоплазму). Аксоны, которые могут быть в 10 000 раз длиннее самого тела клетки, не имеют своих структур для синтеза белка. В связи с этим, получать белки аксон может только посредством аксоплазматического транспорта. С другой стороны, через аксоплазму в

противоположном направлении необходимо перемещать различные молекулы с целью их деградации (разрушения). Аксональный транспорт в направлении от тела к синапсу называют ортоградным. Он обеспечивается кинезинами, переносящими на себе более двухсот различных белков со скоростью до 6 мм в день. Ретроградный транспорт, обеспечиваемый динеином и направленный к соме, значительно более быстрый (до 200 мм в день).

Кинезин был впервые обнаружен в 1984 году в гигантском аксоне кальмара. Сегодня найдено большое количество кинезиноподобных белков в разных источниках. Они очень сходны между собой по иммунологическим свойствам и по структуре молекулы. В клетках дрожжей найдено шесть белков, похожих на кинезин. В клетках млекопитающих обнаружено более 20-ти подобных белков (Слайд 7).

Молекула кинезина имеет форму стержня диаметром 2-4 нанометра (нм) и длиной 50-100 нм с двумя глобулярными головками на одном конце и веерообразным расширением на другом имеет удлиненную форму с двумя глобулярными головками на одном конце и вееровидным расширением на другом. Она состоит из двух тяжелых (110-130 кД) и двух легких (58-70 кД) цепей. Кинезин является АТФазой, активность которой сильно стимулируется тубулином микротрубочек. Места (сайты) связывания АТФ и микротрубочек расположены на глобулярной головке тяжелой цепи. Линейные размеры головки сравнительно невелики, они составляют 7,5 х 4,5 х 4,5 нм. Хвосты двух мономерных цепей сплетены вместе, а наклоненные в разные стороны головки образуют своеобразные «ножки», непосредственно взаимодействующие с тубулином микротрубочки, вдоль которой перемещается кинезин.

Молекула кинезина «шагает» вдоль микротрубочки, делая шаги длиной 8 нанометров. Для того чтобы так шагнуть, молекула использует в качестве топлива одну молекулу АТФ. При этом сила, развиваемая одной молекулой кинезина, составляет величину 6 пН. Если бы такой мощностью в расчете на единицу массы обладали автомобильные моторы, то они могли бы легко разгонять машины до сверхзвуковых скоростей.

В процессе «ходьбы» молекула кинезина может расщепить за одну секунду до 100 молекул АТФ, переместившись на 800 нанометров. Работая в качестве молекулярного грузчика, кинезин, неся на себе **лизосому** или митохондрию, может

совершать перемещения на очень большие по клеточным меркам расстояния (до 1 мм).

Сегодня наиболее популярной моделью, объясняющей механизм перемещения кинезина по микротрубочке, является так называемая«hand over hand»-модель (рука за рукой) (Слайд 8). Каждая из двух головок кинезина обладает АТФазной активностью. Связывание и гидролиз молекулы АТФ в **активном центре** кинезина, а также последующие события, вызванные диссоциацией АДФ и $Ф_н$, сопровождаются изменением положения головок относительно тубулиновых мономеров, в результате чего кинезин перемещается вдоль микротрубочки. Работа головок кинезина хорошо скоординирована: связывание и гидролиз молекулы АТФ одной головкой димерного комплекса способствует освобождению молекулы АДФ из активного центра другой головки. Головки кинезина попеременно связываются с мономерными звеньями микротрубочки. В ходе структурных перестроек моторных участков кинезина угол наклона головок относительно микротрубочки изменяется, вследствие чего кинезиновый димер смещается вдоль микротрубочки. Это движение по своему характеру напоминает перемещение двуногого существа – головки кинезинового димера попеременно опираются на тубулиновые глобулы микротрубочки. Весьма вероятно, что на определенной стадии происходит поворот рычагов относительно хвоста кинезинового димера. Таким образом, кинезиновый димер перемещается вдоль микротрубочки, совершая с каждым «шагом» периодические повороты на 180 градусов вокруг «ноги», опирающейся на микротрубочку. После каждого такого поворота кинезин «переступает» на другую «ногу», совершая тем самым поступательное движение в пространстве.

На рисунке показана схема перемещения молекулы кинезина вдоль микротрубочки, состоящей из мономеров α- и β-тубулина. Буквами T и D обозначены головки кинезина, с которыми связаны соответственно АТФ или АДФ. В исходном положении (состояние 1) головка кинезина, не связанная с микротрубочкой, содержит молекулу АДФ, вторая головка, которая в это время контактирует с микротрубочкой, свободна от **нуклеотидов**. После связывания АТФ второй головкой изменяется конформация молекулы кинезина, в результате чего первая головка, содержащая АДФ, смещается вправо (переход 1→2). После диссоциации АДФ свободная головка связывается с микротрубочкой (переход 2→3). Затем происходят гидролиз АТФ и диссоциация неорганического фосфата ($Ф_н$), в результате чего головка, с которой

связана молекула АДФ, отходит от микротрубочки (переход 3→4). В конечном положении (состояние 4) углы наклона головок кинезина относительно микротрубочки такие же, как в исходном состоянии 1, но при этом молекула кинезина оказывается смещенной вдоль микротрубочки на расстояние, соответствующее двум мономерным звеньям тубулина.

Другие распространенные белки-транслокаторы – динеины. Их можно разделить на две группы: цитоплазматический динеин и аксонемный (или флагеллярный) динеин.

Флагеллярный динеин был открыт в 1963 году как белок, отвечающий за движение ресничек и жгутиков (Слайд 9). Он вызывает скольжение микротрубочек **аксонемы** ресничек и жгутиков и найден только у клеток, имеющих такие структуры. Ресничка представляет собой тонкий цилиндрический вырост цитоплазмы с постоянным диаметром 300 нм. Этот вырост от основания до самой его верхушки покрыт плазматической мембраной. Внутри выроста расположена аксонема, сложная структура, состоящая в основном из микротрубочек. Нижняя часть реснички, базальное тельце, погружена в цитоплазму. Диаметры аксонемы и базального тельца одинаковы (около 200 нм). Аксонема в своем составе имеет девять дублетов микротрубочек, образующих внешнюю стенку цилиндра. Дублеты микротрубочек слегка повернуты по отношению к радиусу аксонемы. Кроме периферических дублетов микротрубочек в центре аксонемы располагается пара центральных микротрубочек. В целом систему микротрубочек реснички описывают как (9x2)+2. В дублетах микротрубочек также различают А-микротрубочку, состоящую из 13 субъединиц, и В-микротрубочку, неполную, содержащую 11 субъединиц. А-микротрубочка несет на себе ручки, которые направлены к В-микротрубочке соседнего дуплета. От А-микротрубочки к центру аксонемы отходит радиальная связка, или спица, оканчивающаяся головкой, присоединяющейся к центральной муфте, имеющей диаметр около 70 нм, окружающей две центральные микротрубочки. Последние лежат отдельно друг от друга на расстоянии около 25 нм. Таким образом, в аксонеме располагается 20 продольных микротрубочек, в то время как в базальном тельце их 27. Базальное тельце состоит из 9 триплетов микротрубочек, имеет ручки, втулку и спицы, расположенные в проксимальной (нижней) его части. Базальное тельце и аксонема структурно связаны друг с другом и составляют единое целое: А- и В-микротрубочки триплетов базального тельца

продолжаются в А- и В-микротрубочках дуплетов аксонемы. При движении ресничек не происходит изменения их длины, они не «сокращаются», а изгибаются, бьются. Оказалось, что механически выделенные реснички способны к биению в присутствии АТФ. При отделении ресничек базальные тельца остаются в теле клетки. Это означает, что для механической работы ресничек базальное тело не нужно, а только аксонема участвует в генерации движения. Удалось показать, что за движение ресничек отвечают «ручки», сидящие на А-микротрубочках. При экстракции компонентов ручек реснички перестают биться в присутствии АТФ.

Было найдено, что «ручки» представляют собой динеин (Слайд 10). Они состоят из 9-12 полипептидных цепей, содержащих 2-3 глобулярные головки, связанные в общий корешок гибкими хвостами. Каждая головка динеина обладает АТФ-азной активностью, которая возрастает примерно в 6 раз при ассоциации с микротрубочками. В состав каждой ручки входит один белковый комплекс, одна молекула динеина. Так как экстракция ручек прекращает биение ресничек, то ученые предположили, что именно динеин ответственен за это движение, то есть динеин является мотором или двигателем при биении ресничек. Но каков механизм этого движения?

Этот вопрос был решен при использовании выделенных ресничек, лишенных плазматической мембраны, радиальных спиц и связок после частичной обработки аксонем **протеазами** (ферментами, разрушающими белок). Оказалось, что такие аксонемы, содержащие динеиновые ручки, при добавлении к ним АТФ начинают увеличиваться в длину почти до девяти раз и одновременно утончаются. В электронный микроскоп видно, что такая аксонема увеличивалась в длину за счет смещения пар микротрубочек – происходит продольное скольжение дуплетов один относительно другого. В случае динеина повторные циклы ассоциации с субъединицами тубулина, изменения конформации при связывании АТФ и его гидролизе, вызывают перемещение головок вдоль микротрубочки. При этом соседний дуплет двигается к верхушке реснички. Когда ресничка содержит все компоненты, и дуплеты микротрубочек связаны друг с другом и с центральной парой микротрубочек, такие кооперативные смещения дуплетов микротрубочек приводят не к удлинению реснички, а к ее изгибу. Таким образом, смещение головок динеина относительно тубулиновых микротрубочек ресничек обеспечивает их волнообразные движения.

Существование цитоплазматического динеина также было теоретически предсказано, однако, выделить и охарактеризовать его удалось только в середине 80-х годов XX века (Слайд 11). Цитоплазматический динеин имеет массу около 1500 кДа и состоит приблизительно из двенадцати субъединиц: 2-х одинаковых тяжелых цепей (520 кДа), шести промежуточных цепей (двух цепей массой 74 кДа и четырех цепей массой 53-59 кДа) и нескольких легких цепей, которые на сегодня слабо изучены. Тяжелые цепи имеют АТФазную активность и отвечают за обеспечение энергией процесса перемещения динеина по микротрубочке.

Цитоплазматический динеин найден во всех клетках животных. Он также найден и у растений: одноклеточных и колониальных форм многих классов зеленых водорослей, зооспор и гамет, зооспор бурых водорослей, а также сперматозоидов мхов, плаунов, хвощей и папоротников. Цитоплазматический динеин необходим для транспорта органелл и участвует в процессе сборки **центросомы** (клеточного центра). Функциональное отличие динеинов от кинезинов состоит в том, что динеин ассоциирован с микротрубочкой и может, после продолжительного «путешествия», не отделиться от нее сразу. Цитоплазматический динеин, кроме описанного выше аксонального транспорта, вероятно, помогает размещению и распределению **комплекса Гольджи** и некоторых других органелл внутри клетки, а также участвует в движении хромосом и позиционировании **веретена деления** в процессе **митоза**.

Цитоплазматический динеин может активироваться после связывания с другим белком – динактином, также состоящим из нескольких субъединиц. Динактин, как предполагают, регулирует активность динеина и облегчает его связывание с переносимой частицей.

Сравнение молекулы динеина с другими моторными белками показывает, что он устроен гораздо более сложным образом. Недавно была предложена любопытная гипотеза, объясняющая такое различие. Оказалось, что без нагрузки динеин может двигаться с шагом от 24 до 32 нм. Под нагрузкой длина шага уменьшается до 8 нм с пропорциональным увеличением силы. Обнаруженная корреляция позволила авторам высказать предположение, что работа динеинового мотора похожа на работу механического мотора, в котором имеется коробка передач: меньше шаг – больше тяга, больше шаг – меньше тяга.

Кроме кинезина и динеина существует не так давно открытая группа специализированных транслокаторов, способных индуцировать скольжение

микротрубочек в пучке относительно друг друга. Известные транслокаторы этой группы мало изучены и не имеют сходства в структуре. Не до конца ясны и их функции в клетке.

Одним из обнаруженных сравнительно недавно белков, относящихся к группе транслокаторов является динамин – эукариотическая клеточная ГТФаза, участвующая в **эндоцитозе** (Слайд 12).

Динамин был открыт в 1989 г. Было показано, что в препарате микротрубочек из мозга, выделенных без нуклеотидов, кроме кинезина и динеина присутствует еще один минорный компонент с молекулярной массой порядка 100 кДа. Этот компонент в процессе экспериментов выделяется с микротрубочек вместе с другими транслокаторами. Однако при дальнейших исследованиях оказалось, что его можно селективно экстрагировать из микротрубочек в присутствии ГТФ. Белок был назван динамином. Динамин обладает ГТФазной активностью, которая стимулируется при добавлении микротрубочек. При добавлении динамина к микротрубочкам происходит образование гексагонально упакованных пучков, в которых можно различить мостики, расположенные с периодичностью 13 нм. Интересно, что при добавлении АТФ пучки «расползаются».

Динамин способен образовывать пучки микротрубочек в отсутствие свободного нуклеотида и индуцировать скольжение микротрубочек в пучке в присутствии ГТФ. Полярность опосредуемого динамином движения пока не изучена. Динамин принципиально важен в процессе отделения сформировавшейся везикулы от клеточной мембраны или другой клеточной мембранной органеллы, её доставки к месту назначения и слияния с другой мембраной (поверхность клетки или аппарат Гольджи). Динамин – крупная ГТФаза с молекулярным весом 96000. У млекопитающих существует 3 типа этого **фермент**а. Установлено, что на поверхности липидов клеточной мембраны динамин самоорганизуется в спиральные комплексы, локализующиеся вокруг **клатриновых ямок**. При гидролизе ГТФ спиральные комплексы динамина сокращаются и способствуют отрыву образованной везикулы от клеточной мембраны. Таким образом, динамин является уникальной механохимической ГТФазой.

Интересно, что способность динамина, отшнуровывать клатриновый пузырек от мембраны, «научились» использовать в своих коварных целях бактерии и вирусы. Эту способность открыли исследователи медицинского колледжа штата Джорджия.

Они установили, что микроорганизмы способны проникать внутрь клетки с помощью естественных процессов клеточной мембраны. Известно, что в ответ на различные сигналы рецепторы клеточной мембраны периодически самоустраняются с ее поверхности. Сначала содержащий рецептор участок мембраны как бы вдавливается внутрь клетки и формирует везикулу (пузырек). Потом фермент (динамин) перетягивает «шейку», соединяющую пузырек с внеклеточной средой, и отрезает его от мембраны. Активация динамина при этом происходит под влиянием молекул оксида азота. На примере патогенного штамма бактерий *Escherichia coli* исследователям удалось продемонстрировать прием, который некоторые бактерии и вирусы используют для проникновения внутрь клеток. Они локально повышают уровень оксида азота в организме и, таким образом, заставляют динамин работать на них. Прикрепившись к рецепторам, патогенные микроорганизмы вместе с ними погружаются внутрь клетки, где вирусы начинают заниматься репликацией своего генома, а бактерии – пользоваться питательными веществами клетки-хозяина и отравлять ее продуктами своей жизнедеятельности. Кроме того, этот механизм обеспечивает вирусам и бактериям надежную защиту от иммунной системы и антибиотиков.

К белкам, способным индуцировать скольжение микротрубочек в пучке, относится также высокомолекулярный транслокатор из гигантской амебы Reticulomyxa . Этот белок обладает уникальным для транслокаторов свойством – он способен индуцировать движение по микротрубочкам в двух направлениях

Гигантская амеба Reticulomyxa является хорошей модельной системой для изучения внутриклеточного транспорта. Она обладает выраженным и динамичным цитоскелетом, и транспорт органелл в цитоплазме амебы происходит очень активно. Кроме того, в ее цитоплазме присутствуют крупные пучки микротрубочек, которые легко наблюдать в интактных клетках в системе in vitro. В экспериментах было показано, что эти пучки при наблюдении in vitro способны «расползаться» под действием АТФ за счет активного скольжения микротрубочек друг относительно друга. Возможно, такое скольжение обуславливалось присутствием белка-транслокатора, отличного от кинезина и динеина. Поиски подобного транслокатора привели исследователей к обнаружению высокомолекулярного белка (молекулярная масса около 440 кДа). Этот транслокатор обладал чувствительностью к облучению и **ингибиторам**, характерной для динеина. Однако существенным отличием данного

белка от динеина, как мы уже отмечали, являлась способность перемещать частицы латекса по микротрубочкам, адсорбированным на стекле, в двух направлениях. Скорость вызванного транслокатором из амебы перемещения латекса была выше, чем для других известных транслокаторов. Возможно, этот транслокатор является одним из вариантов цитоплазматического динеина. Другая возможность состоит в том, что несмотря на свою специализацию такой белок является представителем новой группы моторных белков.

Процесс изучения белков-транслокаторов не стоит на месте. Так, например, ученые из института им. Макса Планка попытались «приручить» кинезин вне клетки. Для этого они покрыли молекулами кинезина гладкую стеклянную поверхность, создав что-то вроде ковра, ворсинки которого представляли собой молекулы кинезина. Потом исследователи разместили на этой поверхности ряд микротрубок и микросфер. Исследователи добавили к среде раствор АТФ – и получился огромный «трубочный» конвейер. Если в клетке кинезин шагает вдоль микротрубки сам, то в искусственной системе молекула была жестко закреплена, и свободные концы молекул «шагали» по микротрубкам, передвигая их. В дальнейшем команда ученых планирует создать микрочипы со встроенными конвейерами, работающими в разных направлениях.

Другой группой ученых недавно была открыта способность динеина и кинезина в процессе двигательного акта вступать в кооперативное взаимодействие (Слайд 13). Руководитель этих исследований Поль Селвин, профессор Иллинойского университета, так комментирует это открытие: «Благодаря исследованиям мы смогли узнать, что моторы клетки по отдельности неуправляемы, а движение груза (везикул и органелл) происходит при совместном участии нескольких молекул динеина и кинезина. Что самое интересное – скорость перемещения груза несколькими моторами вдесятеро больше, как будто молекулы соединяются в ансамбль и вместе двигают груз внутри клетки. Органеллы двигаются по микротрубкам-«рельсам» крайне быстро: их скорость составляет 12 микрон в секунду, в то время как скорость движения молекулы кинезина вне клетки составляет всего 0,5 микрон. Скорее всего, этот эффект достигается совокупным действием нескольких моторов, несущих на себе органеллу. Похоже, что моторы переносят органеллу не хаотично, а довольно организованно.

Если нам удастся изучить и понять точный механизм работы молекулярных моторов кинезина и динеина, а также проникнуть в суть их кооперативного взаимодействия, это позволит нам в ближайшем будущем построить удивительные наномашины для использования их в конвейерах молекулярной сборки».

Благодарю за внимание. Пожалуйста, Ваши вопросы.