

Новосибирский государственный университет
Физический факультет
Кафедра Биомедицинской физики

Исследование динамических свойств веретена деления дрозофилы с помощью метода FRAP

Мунзарова Алина Фирдинантовна

1 курс аспирантуры

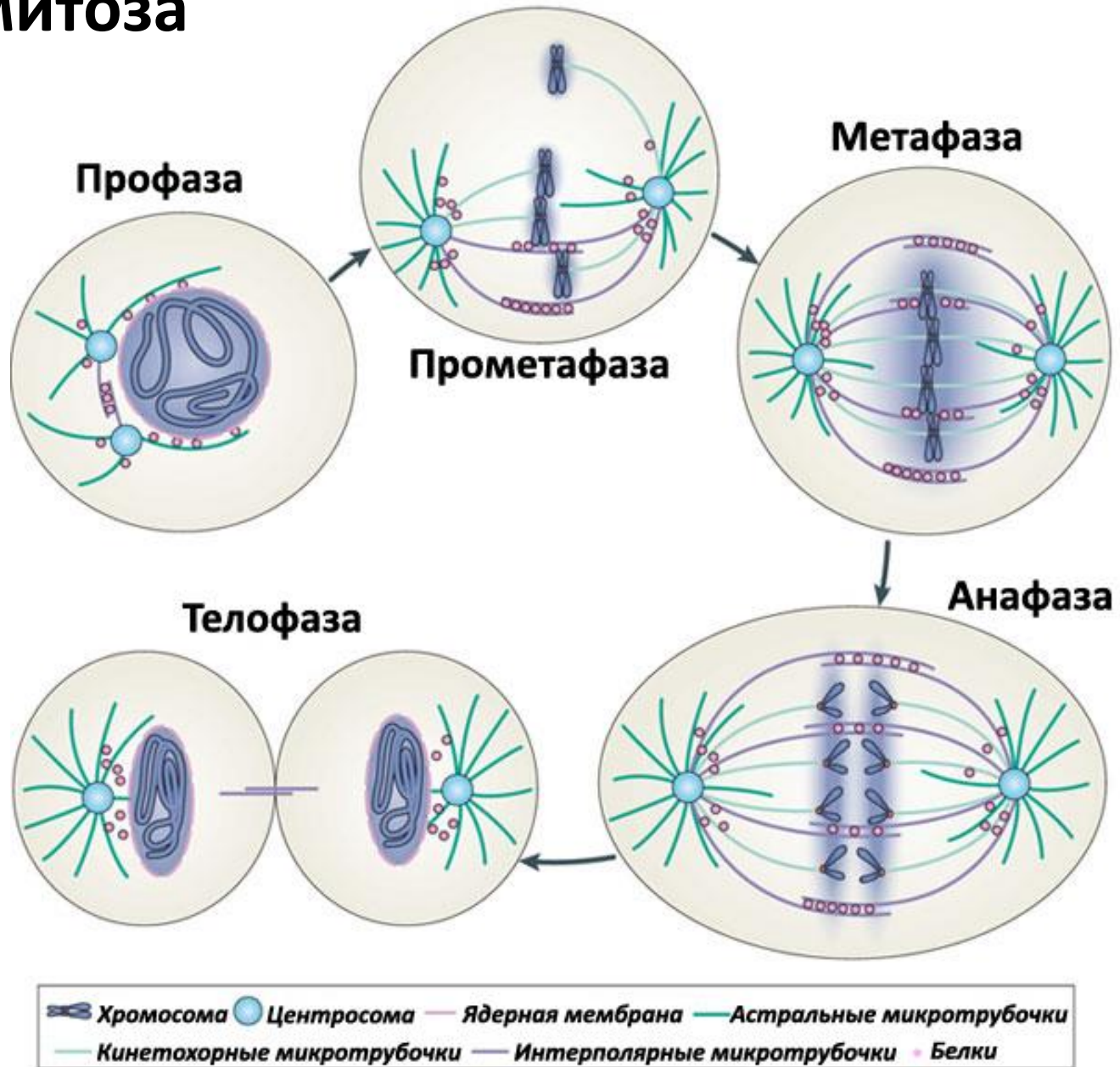
Лаборатория клеточного деления

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

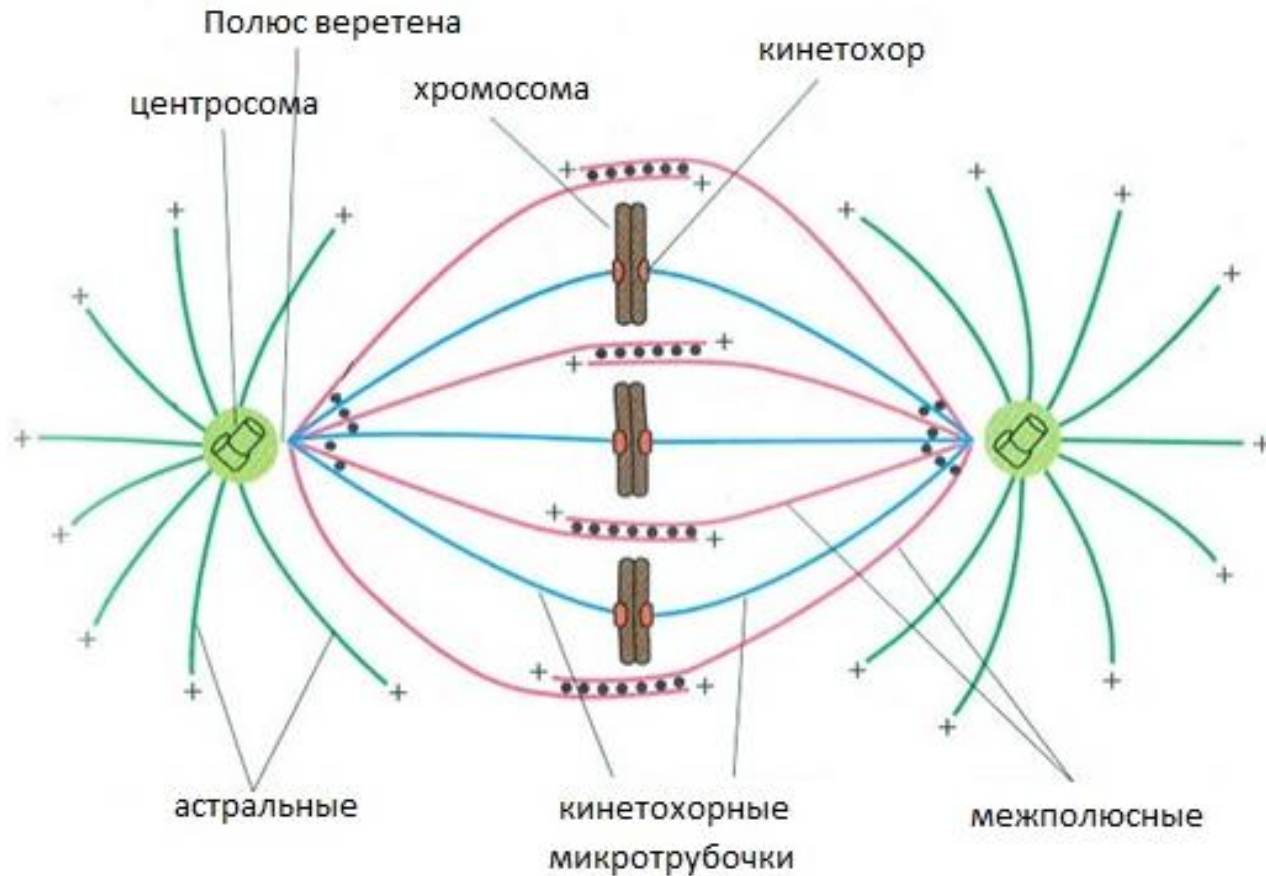
Научный руководитель: д. б. н., Омелянчук Леонид Владимирович



Схема митоза

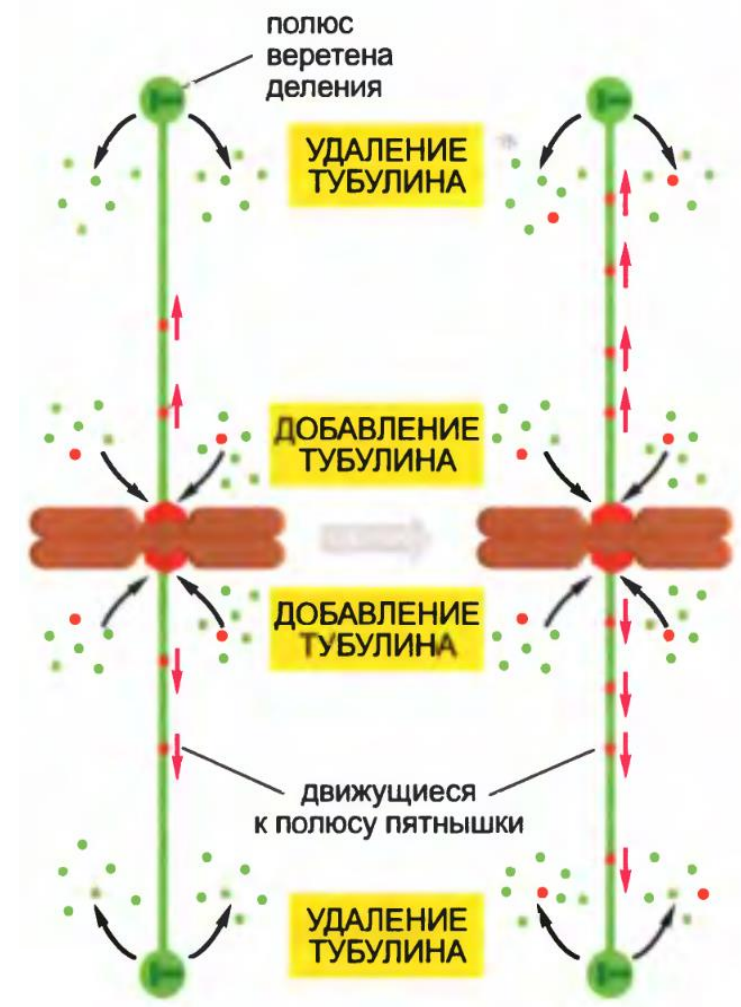
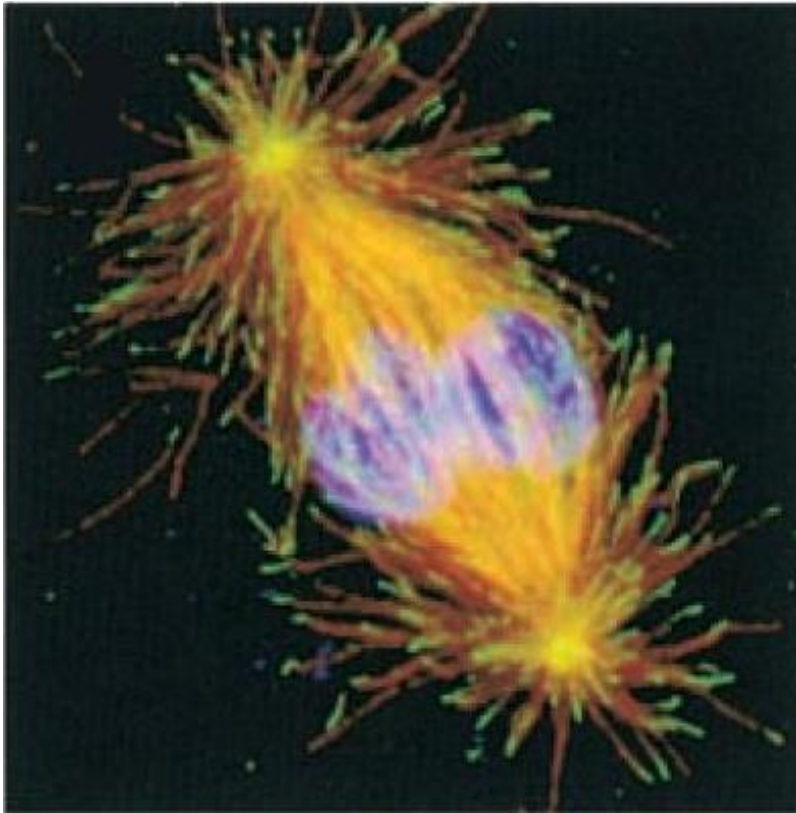


Микротрубочки, образующие веретено



Два типа движения в веретене деления

Растущие астральные МТ быстро движутся от centrosom в различных направлениях



Микротрубочковый ток в метафазном веретене деления

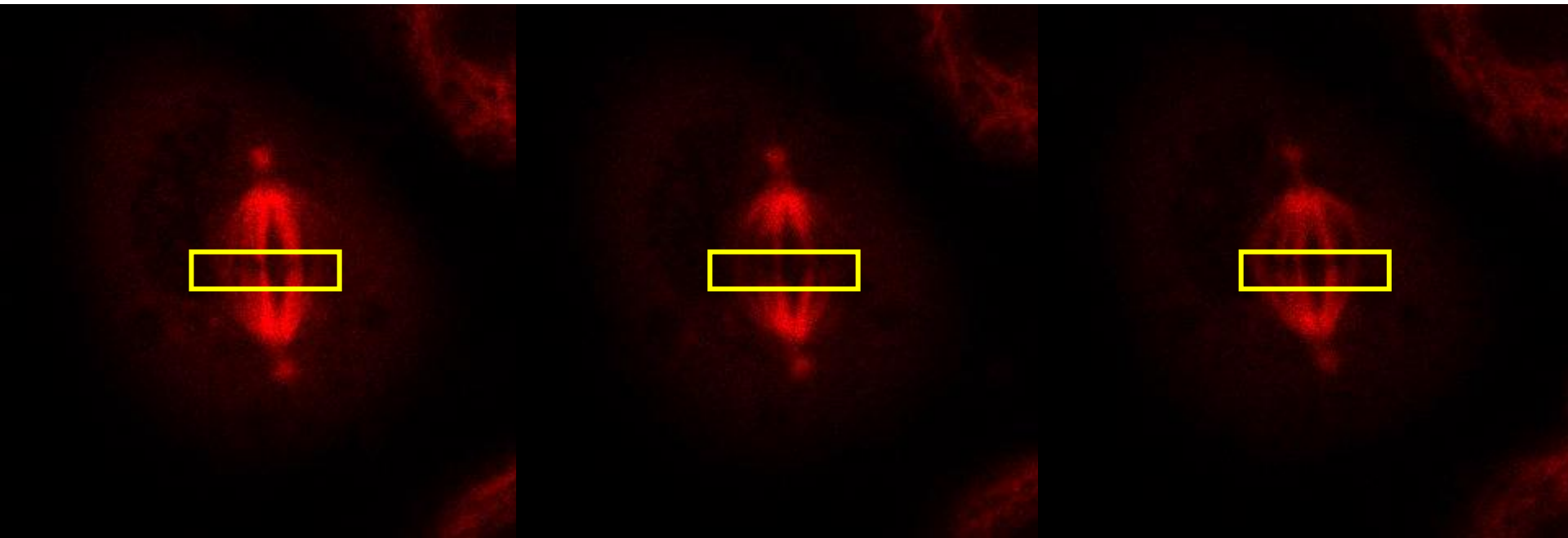
Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания

(FRAP - *fluorescence recovery after photobleaching*)

Перед облучением

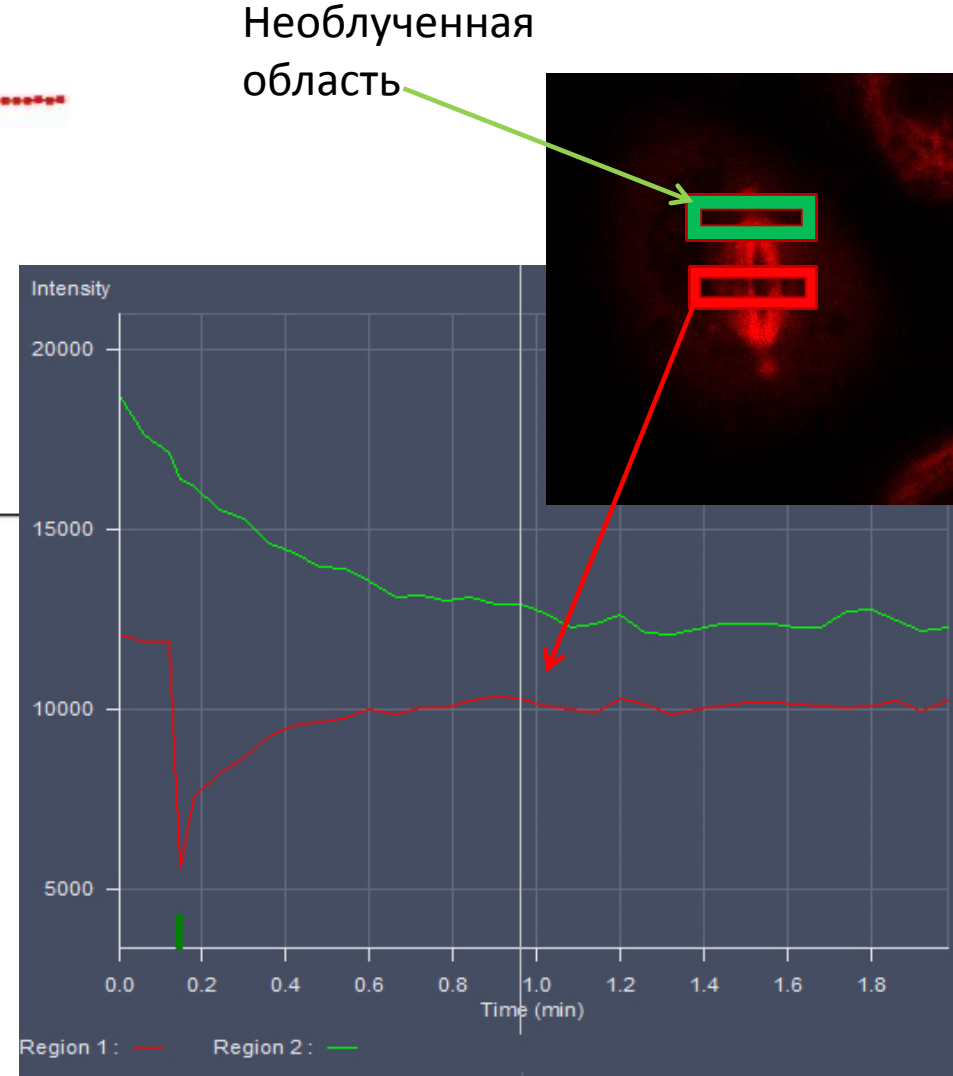
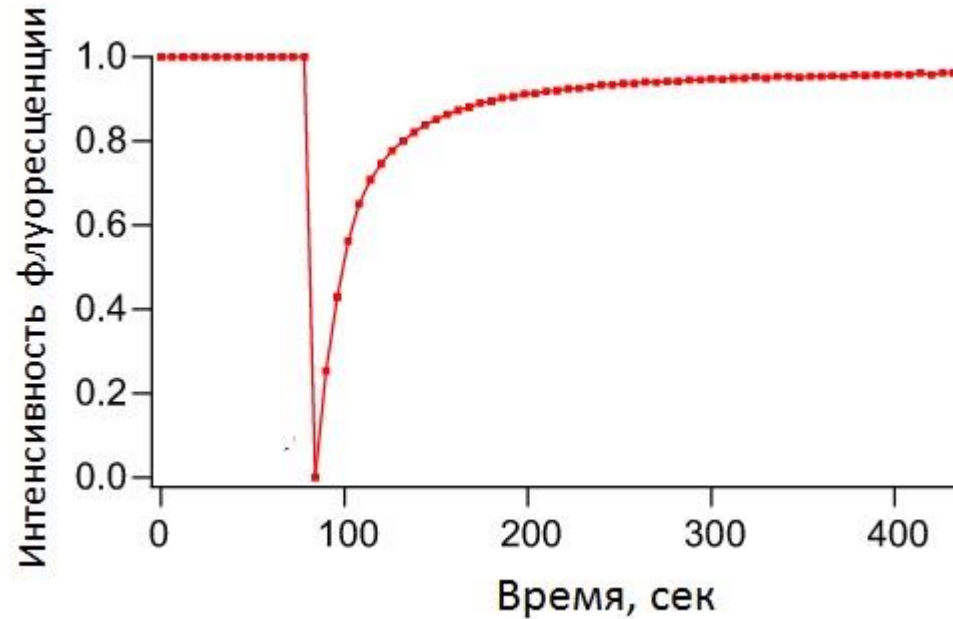
Облучение

Восстановление
флуоресценции



Красный: тубулин в микротрубочках веретена деления
Желтый: облучаемая область в центре веретена

Кривая восстановления флуоресценции



Гипотеза: Существует неподвижная часть микротрубочек, не обменивающихся молекулами тубулина.

Кривая красного цвета описывает восстановление флуоресценции в области экватора веретена деления. Кривая зеленого цвета описывает удаление меченных молекул тубулина из необлученной области около полюса.

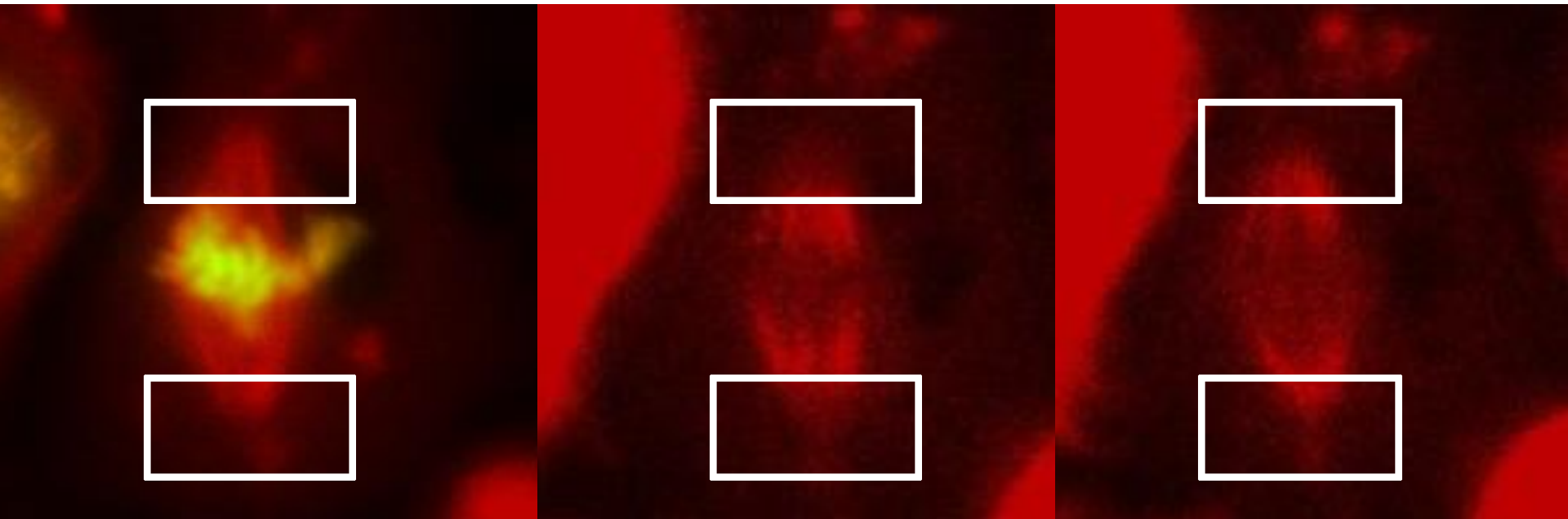
Обратный FRAP для обесцвечивания подвижных микротрубочек

Длительное облучение позволяет видеть остальную часть веретена (межполюсные и кинетохорные микротрубочки)

Перед облучением,
Съемка двух каналов

Облучение,
Один канал

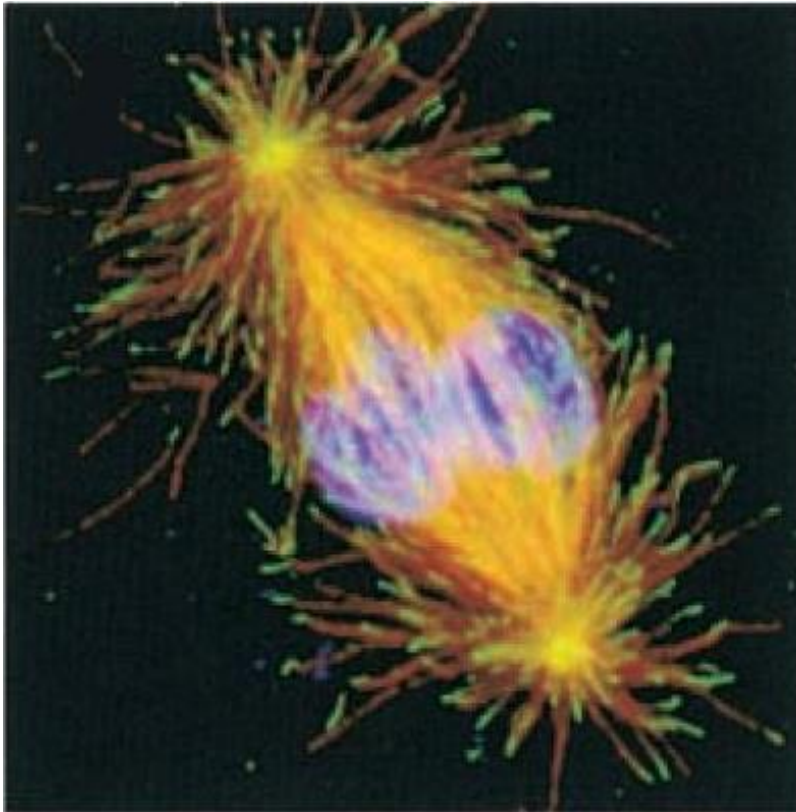
Восстановление
флуоресценции,
Один канал



Красный: тубулин в микротрубочках веретена деления
Желтый: хромосомы

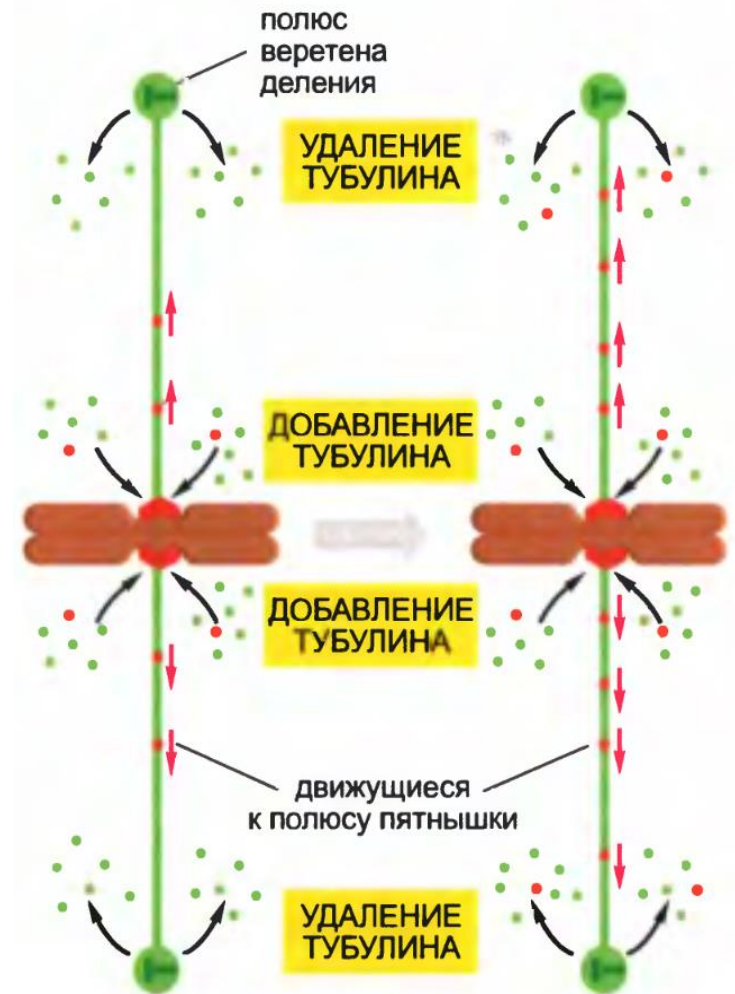
Предполагалось, что кинетохорные и межполюсные микротрубочки составляют неподвижную фракцию. Оказалось, что это не так, в них можно видеть внутреннее движение

Два типа движения в веретене деления



Растущие астральные МТ быстро движутся от centrosом в различных направлениях

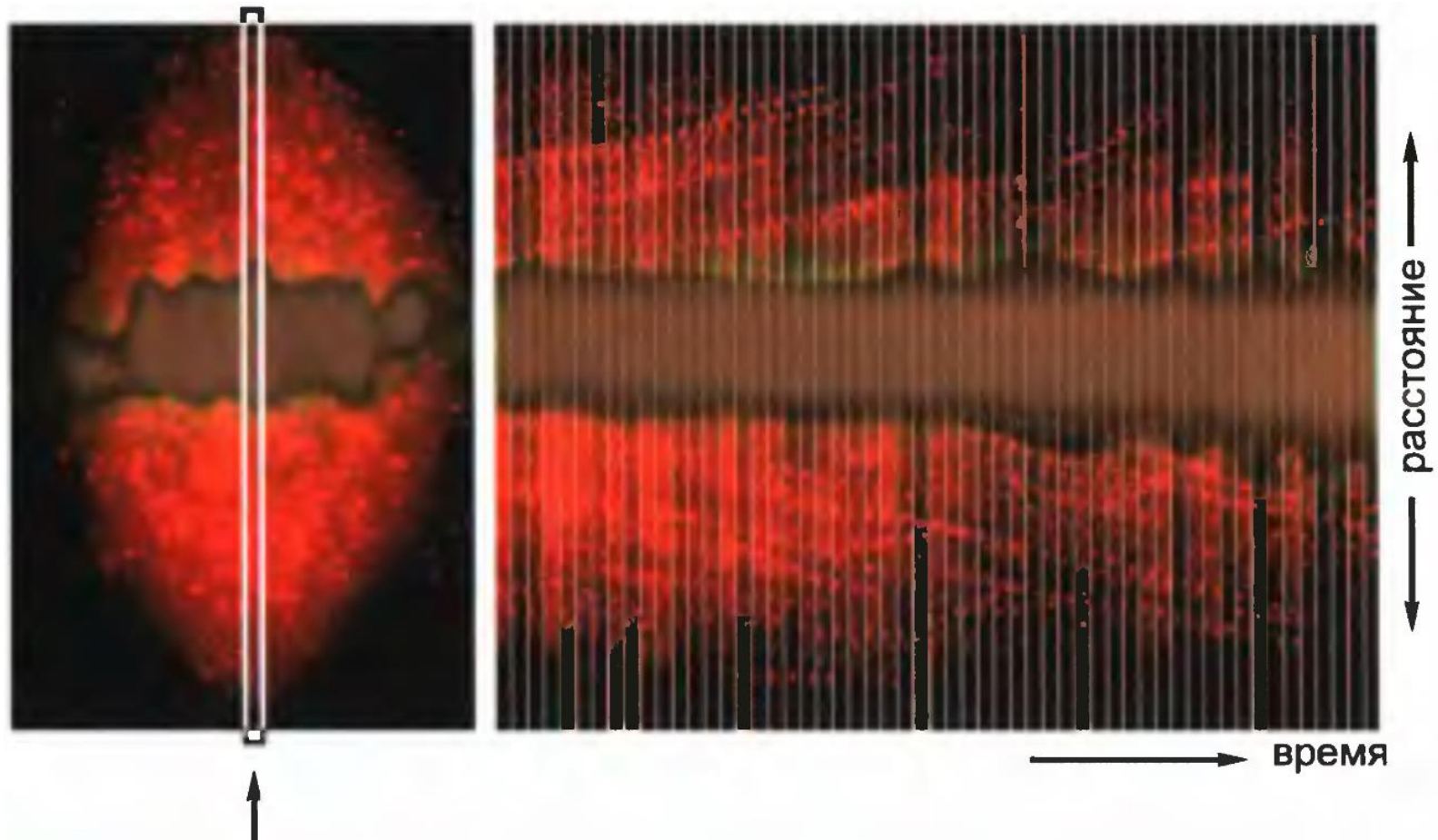
Внутреннее движение



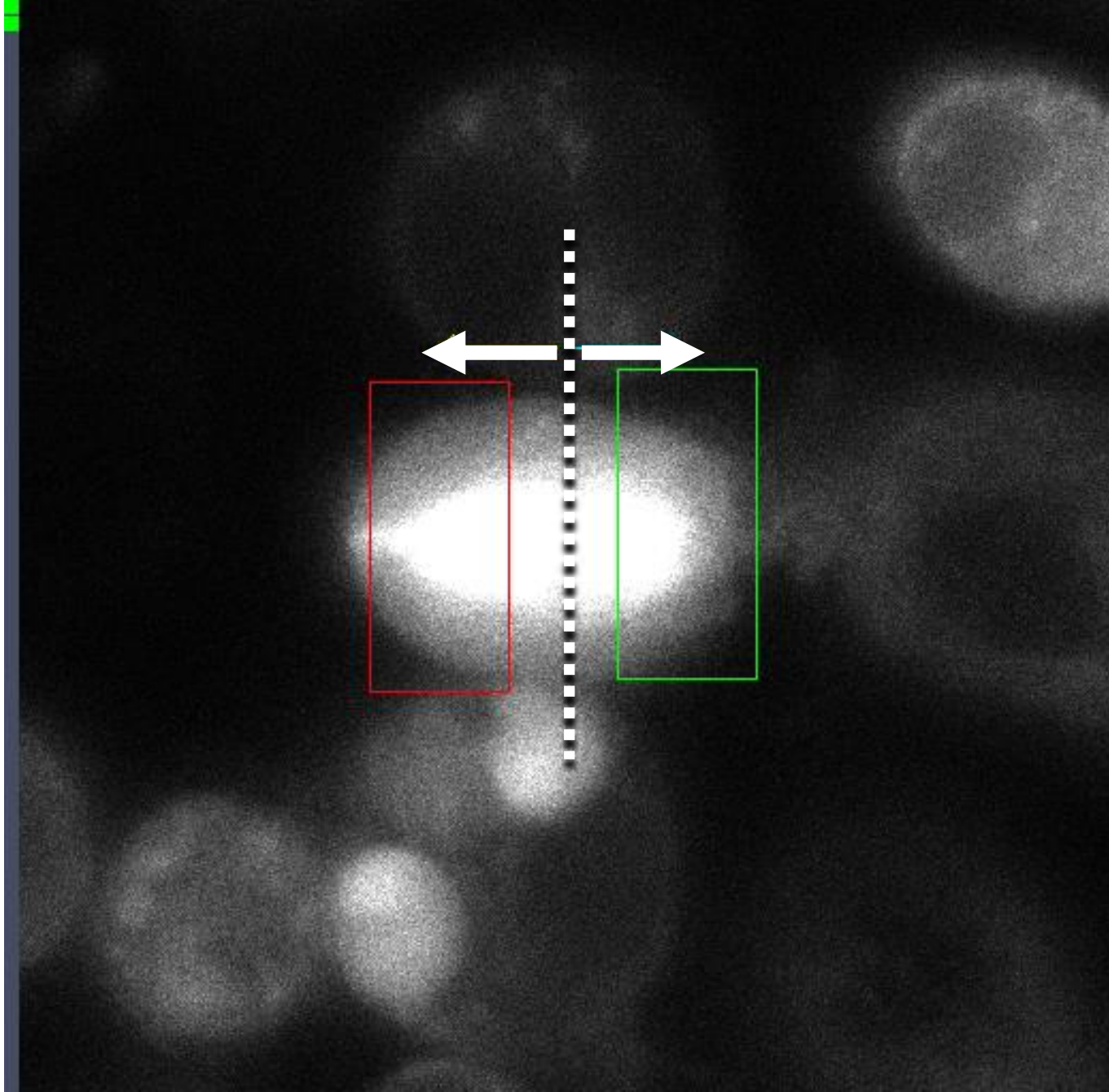
Микротрубочковый ток в метафазном веретене деления

Внутреннее движение в МТ

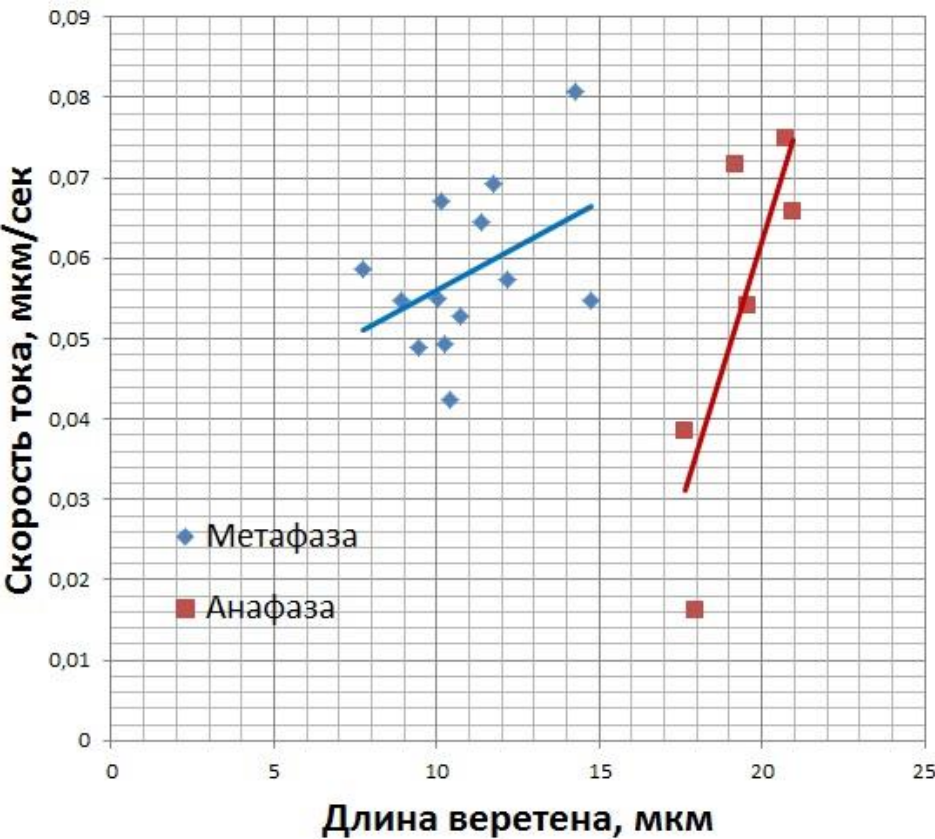
Существование тока в веретене ранее было показано методом «пятнышек»



Хромосомы окрашены коричневым, пятнышки тубулина – красным.

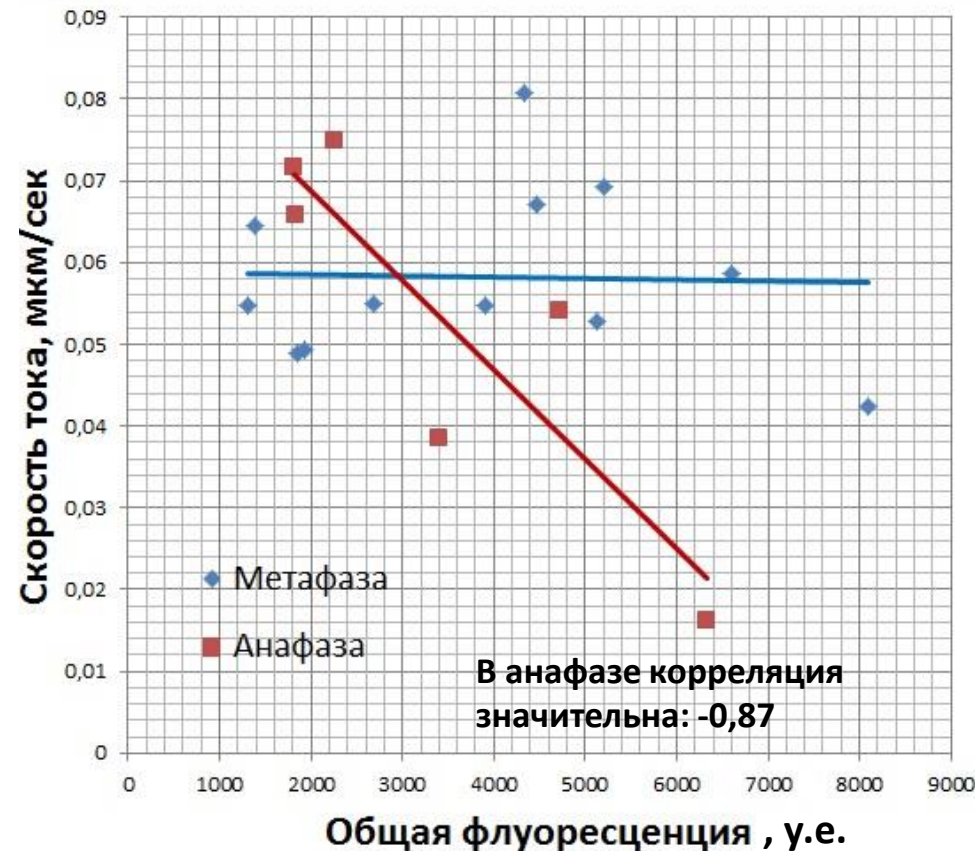


Зависимость скорости внутреннего движения от параметров веретена



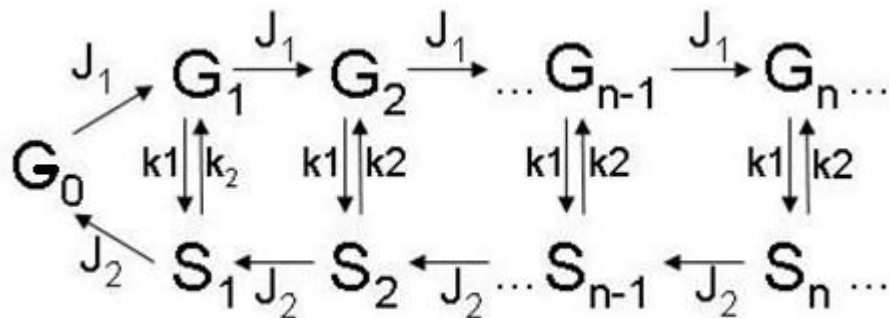
Метафаза: 0,058 мкм/сек
Анафаза: 0,053 мкм/сек
Монополярная метафаза: 0,22 мкм/сек

Корреляция скорости тока с длиной веретена в метафазе незначительна: 0,43, тогда как в анафазе: 0,8



В анафазе корреляция значительна: -0,87

Теоретическая модель



G_n – растущие концы микротрубочек с n димерами тубулина.

J_1, J_2 – кинетические константы роста и деполимеризации.

k_1, k_2 – кинетические константы перехода от роста к распаду и обратно.

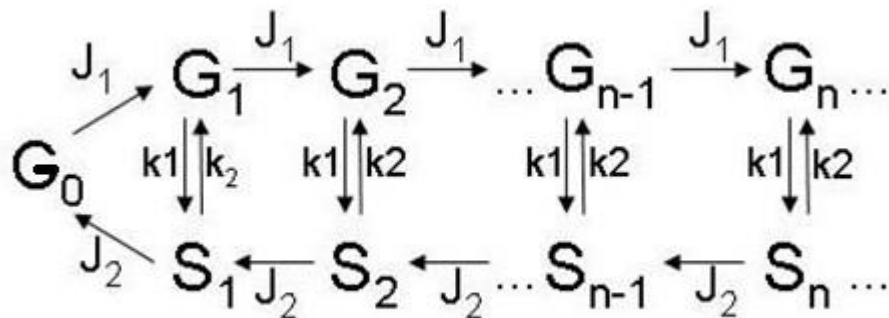
Кинетическая схема

$$[A] + [B] = [AB]$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[AB]$$

$$[A] = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Теоретическая модель



G_n – растущие концы микротрубочек с n димерами тубулина.

J_1, J_2 – кинетические константы роста и деполимеризации.

k_1, k_2 – кинетические константы перехода от роста к распаду и обратно.

Переход от дискретного случая к
непрерывному

Замечание:

$$\left[\frac{d}{dt} [G(x, t)] \right] + vg \cdot \left[\frac{d}{dx} [G(x, t)] \right] = 0$$

Это известное телеграфное уравнение, описывающее фронт, движущийся со скоростью vg .

Микротрубочки растут так же с постоянной скоростью

Решение для стационарного режима

$$G(x) = G_0 \cdot e^{-\alpha \cdot x}$$

$$S(x) = \frac{vg}{vs} \cdot \left(G_0 \cdot e^{-\alpha \cdot x} \right),$$

$$\text{где } \alpha = \frac{-(vs \cdot k_1 - vg \cdot k_2)}{vg \cdot vs}$$

Ранее этот режим был использован для описания роста микротрубочек в *in vitro* экспериментах Verde et al., 1992.

Что мы можем сказать о кривой восстановления флуоресценции?

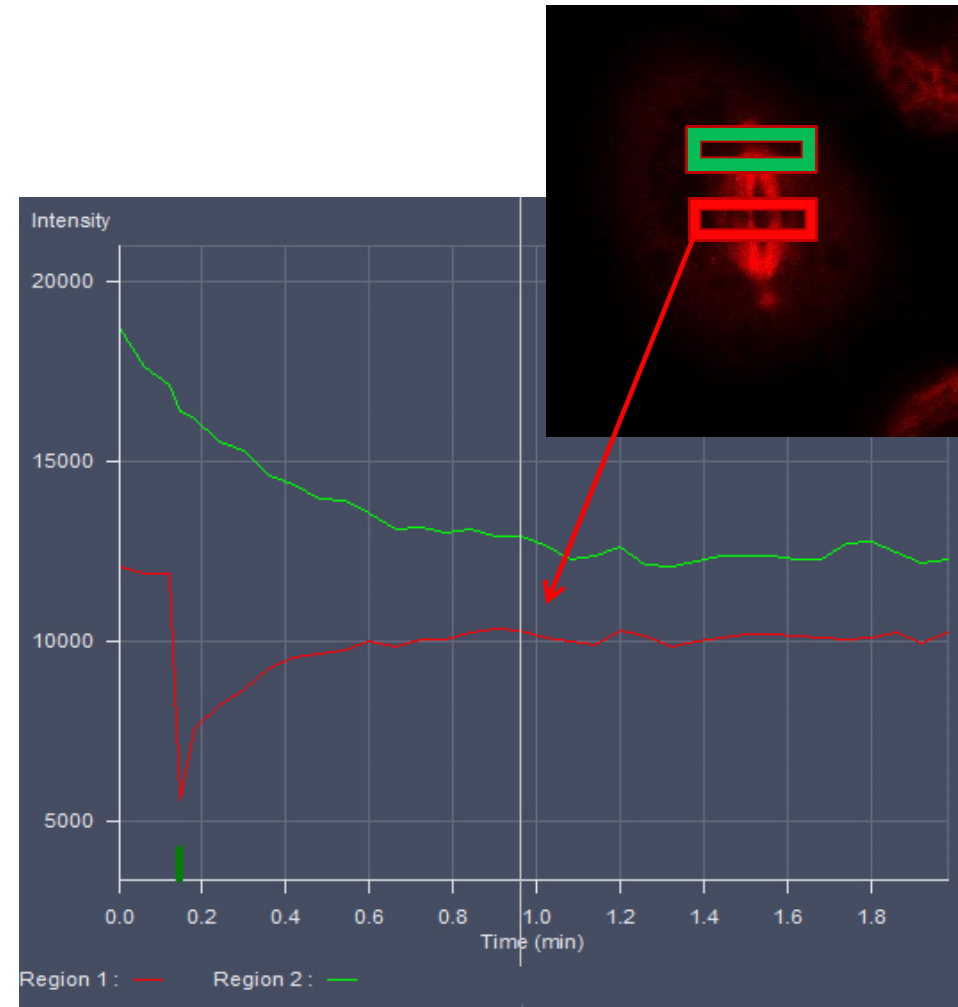
За начальный наклон кривой отвечает произведение коэффициентов G_0 и J_1

$$G_0 * J_1 = 0,08 \text{ [sec}^{-1}\text{]}$$

G_0 - доля растущих плюс-концов микротрубочек.

По оценкам в облучаемой зоне находится примерно 7-15 плюс-концов микротрубочек

J_1 –кинетическая константа полимеризации (значение вычисляется из экспериментальных параметров)



Заключение

- Найден метод измерения тока в микротрубочках, который зависит от таких параметров веретена, как длина и начальная флуоресценция
- Проведен предельный переход от дискретной модели, описывающей процесс роста микротрубочек веретена, к непрерывной модели, которая оказалась родственной телеграфным уравнениям, имеющим решение в виде бегущих фронтов.

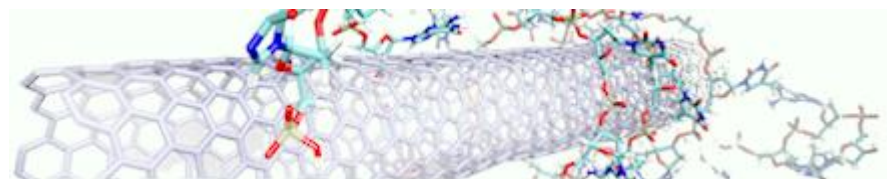
Благодарности



Работа поддержана грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских научных учреждениях (договор № 14.Z50.31.0005 <https://www.mcb.nsc.ru/laboratory/gatti/megagrant>; <http://www.p220.ru/>), "Механизмы кинетохор-зависимого образования микротрубочек у *Drosophila*", возглавляемым профессором Римского Университета *Sapienza* М. Gatti.

Авторы также выражают благодарность соруководителю проекта А. Пиндюрину.

Выражается глубокая признательность F. Renda и Е. Андреевой за помощь в подборе оптимальных параметров для проведения экспериментов.



Спасибо за внимание!



Исследование динамических свойств веретена деления дрозифилы с помощью метода FRAP

Мунзарова Алина Фирдинантовна
1 курс аспирантуры

Лаборатория клеточного деления

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Научный руководитель: д. б. н., Омелянчук Леонид Владимирович

Кафедра Биомедицинской Физики ФФ НГУ

