

Б. В. Сорочинский

**ПРИЛОЖЕНИЕ ТЕОРИИ МИШЕНИ  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ МИКРОТРУБОЧЕК**

С помощью аппарата теории мишени был определен размер промежуточных структур, которые возникают в процессе сборки микротрубочек. Их величина соответствует 69—77 димерам тубулина.

**Введение.** Система микротрубочек является центральным звеном в клеточной организации [1]. Обеспечение процессов внутриклеточной подвижности, кеппинг рецепторов, участие в образовании эндомембранной системы, компарментализация биохимических процессов, регуляция синтеза белков и нуклеиновых кислот, формирование веретена деления и участие в межклеточных взаимодействиях — вот далеко не полный перечень тех функций, которые реализуются благодаря цитоскелетным структурам.

Классические представления о цитоскелете заключались в том, что это статическая опорная структура клеток. Современные исследования характеризуют клеточный скелет как высокодинамичную структуру, которая постоянно обновляется и перестраивается в процессе прохождения клеток по циклу [2]. Особенности системы микротрубочек как динамических структур во многом определяют выполнение свойственных им функций и зависят от способности к самосборке белков, формирующих микротрубочки. Белки микротрубочек полимеризуются *in vitro* при определенных условиях среды (температура, pH, наличие  $Mg^{2+}$  и GTP, отсутствие  $Ca^{2+}$ ). Условия реакционной среды сильно влияют на образование микротрубочек и морфологию собранных структур [3].

Наиболее распространенные методы в изучении процессов полимеризации микротрубочек — электронная микроскопия, седиментационный анализ, методы структурной химии. В этом сообщении приводятся результаты, демонстрирующие возможность использования теории мишени для изучения процесса сборки микротрубочек. Теорию мишени можно рассматривать как часть теории попадания, описывающей взаимодействие ионизирующего излучения с веществом. Основная идея теории мишени заключается в попытке на основе физических факторов определить число попаданий с тем, чтобы вычислить объем мишени. Теорию мишени ранее широко использовали для расчета молекулярной массы различных ферментов и, несмотря на определенные сложности, эти результаты дали удивительно хорошее совпадение с величинами, определяемыми физико-химическими методами [4].

**Материалы и методы.** Микротрубочки выделяли из мозга крупного рогатого скота двумя циклами полимеризации — деполимеризации, как это описано ранее [5]. Сборку микротрубочек индуцировали повышением температуры растворов до 37 °С и добавлением GTP до концентрации 1 мМ. Регистрировали процесс сборки по изменению оптической плотности растворов, измерения проводили на спектрофотометре DU-8 «Beckman» (США), длина волны 360 нм, интервалы между измерениями 1 мин.

Растворы микротрубочек облучали гамма-лучами  $^{60}Co$  при мощности экспозиционной дозы 0,20 Гр/с и температурах 0 и 20 °С.

**Результаты и обсуждение.** Полимеризация микротрубочек в растворе начинается с образования центров нуклеации, размер которых оценивается в несколько димеров тубулина [6]. Механизмы роста микротрубочек на дальнейших стадиях их образования не совсем ясны. Среди нерешенных остается вопрос о том, как происходит присоединение тубулина из раствора к центрам нуклеации, что, собственно, и является

полимеризацией микротрубочек. По-видимому, на начальных этапах сборки микротрубочек образуются сначала двухмерные ленточные структуры, замыкающиеся впоследствии в трубчатые образования [7]. Однако размер таких ленточных структур точно не определен. Мы попытались рассчитать их молекулярную массу, используя формальный аппарат теории мишени.

Процедура расчетов заключалась в следующем. Было изучено влияние ионизирующего излучения на процесс полимеризации микротрубочек, построены дозовые кривые и определено значение  $D_{37}$ , что необходимо для расчета объема мишени [4].

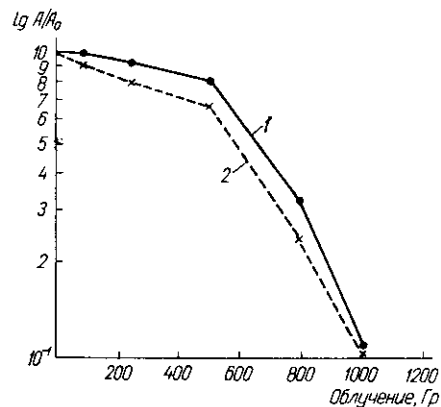
Образование микротрубочек в растворе сопровождается изменением их оптической плотности [8]. Кривые изменения оптической плотности микротрубочек в процессе полимеризации можно разбить на несколько участков — лаг-фаза (0—4 мин), фаза резкого возрастания оптической плотности (4—12 мин) и выход кривых на плато (12—15 мин). По-видимому, эти части кривой описывают соответственно нуклеацию и латеральный рост микротрубочек, их элонгацию и прекращение полимеризации, которое достигается при равновесной концентрации молекул тубулина в растворе и в составе собранных структур. Ионизирующее излучение ингибирует процесс сборки микротрубочек и это явление имеет дозовую зависимость [8]. Ингибирование сборки микротрубочек после облучения может быть обусловлено радиационно-химическими процессами в белках, формирующих эти структуры [9].

На рисунке приведены дозовые кривые, описывающие в полулогарифмических координатах относительную абсорбцию контрольных и облученных микротрубочек (1, 2 — облучение при 0 и 20 °С соответственно). Графики построены по значениям абсорбции растворов на 5 мин после начала полимеризации, поскольку задача исследования заключалась в определении размера промежуточных структур, характерных для процесса образования микротрубочек. Для дальнейших расчетов допускали, что кривые отражают одноударные процессы. С практической точки зрения это не очень существенное ограничение [4]. Экстраполяция кривых позволяет определить значение  $D_{37}$  примерно в 700 Гр для образцов, облученных при температуре 20 °С, и в 780 Гр для образцов, облученных при 0 °С. Допуская, что средняя величина энергии на первичную ионизацию равняется 60 Эв, можно после некоторых преобразований получить формулу для расчета молекулярной массы (ММ) мишени [4]:

$$MM = 5,8 \cdot 10^{11} / D_{37}.$$

Подставляя в формулу значения  $D_{37}$ , которые определены из графиков, можно получить значения, соответствующие молекулярной массе агрегатов, состоящих из 69 (облучение при 0 °С) и 77 димеров тубулина (20 °С). Известно, что микротрубочки состоят из 13 протофиламентов [6]. Если предположить, что и ленточные образования формируются таким же числом протофиламентов, то их линейный размер будет соответствовать 5—6 димерам тубулина.

Таким образом, теория мишени позволяет получить вполне разумные значения для размеров тех промежуточных структур, которые образуются в процессе полимеризации микротрубочек.



## Резюме

За допомогою апарату теорії мішені був визначений розмір проміжних структур, які виникають в процесі утворення мікротрубочок. Їх величина відповідає 69—77 димерам тубуліну.

## Summary

It was determined with target theory the size of intermediate structures which arized during the microtubules assembly. Their size correspond to 69—77 tubuline dimers.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Brabander M. Microtubules, central elements of cellular organization // *Endeavour*.— 1982.— 6, N 3.— P. 124—134.
2. Kirschner M., Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis // *Cell*.— 1986.— 45, N 2.— P. 329—342.
3. Karecla P., Hirst E., Bayley P. Polymorphism of tubulin assembly *in vitro* // *J. Cell Sci.*— 1989.— 94, N 1.— P. 479—488.
4. Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология.— М.: Атомиздат, 1973.— 248 с.
5. Прохневский А. И., Сорочинский Б. В. Модификация этанолом сборки микротрубочек мозга // *Нейрохимия*.— 1990.— 9, № 1.— С. 96—100.
6. Bayley P. M., Butler F. M. M., Manser E. J. Control of nucleation in microtubules self-assembly // *FEBS Let.*— 1986.— 205, N 2.— P. 230—234.
7. Voter W. A., Erickson H. The kinetics of microtubules assembly // *J. Biol. Chem.*— 1984.— 259, N 16.— P. 10430—10438.
8. Сорочинский Б. В., Прохневский А. И., Гродзинский Д. М. Модификация таксолом процесса сборки облученных микротрубочек // *Докл. АН СССР*.— 1990.— 310, № 3.— С. 735—737.
9. Coss R. D., Bamberg J. R., Dewry W. O. The affects of X irradiation on microtubules assembly *in vitro* // *Rad. Res.*— 1981.— 85, N 1.— P. 99—115.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,  
Киев

Получено 14.01.91

УДК 575.127

Я. И. Ратушняк, Н. М. Пивень, С. А. Латыпов, А. М. Самойлов,  
А. В. Завгородняя, Ю. Ю. Глеба

## ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ РАСТЕНИЙ ТОМАТА МЕТОДОМ «ГАММА-СЛИЯНИЯ» ПРОТОПЛАСТОВ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. И *L. PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM* DUN.

Асимметричные соматические гибриды получены между *L. esculentum* Mill. (пластомный хлорофиллдефектный мутант Pl-alb 1) и *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. (линии 3767, 3772) в результате слияния мезофильных протопластов культурного томата с мезофильными протопластами дикого вида, облученными гамма-радиацией в дозе 100, 200 Гр. Эти дозы радиации были суперлетальными для протопластов *L. peruvianum* var. *dentatum*. Гибридные колонии были отобраны по их способности к позеленению; восстановление у них фотосинтетической активности осуществлялось за счет переноса хлоропластов от *L. peruvianum* var. *dentatum*, в то время как протопласты *L. esculentum* образовывали белые колонии. Эффективность гибридизации зависела от дозы облучения протопластов дикого партнера и не превышала 6%. Полученные гибриды по уровню плоидности, морфологическим (форма и размер куста, опушенность стебля, форма листа, число цветков, расположение пестика, окраска и размеры плодов) и биохимическим (изозимные спектры эстеразы, аспаратаминотрансферазы и кислой фосфатазы, рестриктивные спектры хлоропластной и митохондриальной ДНК) признакам разделены на шесть фенотипических групп. Формообразование этих групп зависело от дозы облучения и используемой линии *L. peruvianum* var. *dentatum*.

© Я. И. Ратушняк, Н. М. Пивень, С. А. Латыпов, А. М. Самойлов, А. В. Завгородняя,  
Ю. Ю. Глеба, 1991.