



УДК 576.32/36

Б. В. Сорочинский, А. И. Прохневский

## D<sub>2</sub>O ИНГИБИРУЕТ СБОРКУ МИКРОТРУБОЧЕК IN VITRO

*Изучено влияние различных концентраций дейтериевой воды (25—75 %) на полимеризацию микротрубочек, выделенных из мозга крупного рогатого скота. Показано, что D<sub>2</sub>O ингибирует сборку микротрубочек в экспериментах in vitro.*

**Введение.** Биологическая активность дейтериевой воды хорошо известна [1]. Обработка дейтериевой водой приводит к существенным модификациям многих биологических процессов, оказывая влияние, в частности, на развитие эмбрионов лягушки и морского ежа [2, 3], созревание нейтрофилов [4], выработку лейкотриенов С<sub>4</sub> эритроцитами [5], изменяет функции мембран и нарушает синтез белков [6].

Большой интерес вызывает способность D<sub>2</sub>O ингибировать процессы клеточного деления. Этот эффект был зарегистрирован для многих линий клеток животных и на растительных клетках [1]. Обработка пролиферирующих клеток растворами дейтериевой воды приводит к задержке митозов на стадии перехода интерфаза/профаза; эффекты, индуцируемые тяжелой водой, зависимы от дозы. Увеличение концентрации D<sub>2</sub>O до 75—80 % полностью ингибирует прохождение клеток по циклу [7]. Однако механизмы антимитотической активности D<sub>2</sub>O не изучены.

Методами иммунофлюоресценции и электронной микроскопии обнаружено, что обработка клеток тяжелой водой вызывает нарушения в механизмах образования веретена деления и формирования в цитоплазме характерных пучков и агрегатов микротрубочек [1]. На основании таких наблюдений широкое распространение получило представление о том, что система микротрубочек является мишенью для действия D<sub>2</sub>O на клетки, поскольку эффекты, индуцируемые D<sub>2</sub>O, напоминают таковые при действии таксола на систему микротрубочек. В то же время эти результаты не всегда подтверждаются [7].

Открытым также остается вопрос о механизмах взаимодействия D<sub>2</sub>O с системой микротрубочек. Можно предположить, что тяжелая вода оказывает влияние собственно на сборку микротрубочек или (и) на процессы обновления этих структур. В этом сообщении приводятся данные, полученные в отношении действия дейтериевой воды на полимеризацию микротрубочек *in vitro*. Сборка микротрубочек — это ключевой этап в образовании и функционировании этих структур, выполняющих функцию основного интегрирующего звена цитоплазмы [8].

**Материалы и методы.** Микротрубочки выделяли из мозга крупного рогатого скота двумя циклами полимеризации — деполимеризации [9]. В качестве буфера, стабилизирующего микротрубочки, использовали буфер Бершадского [10]. Белок определяли по методу, описанному в работе [11].

Сборку микротрубочек индуцировали повышением температуры растворов до 37 °С и добавлением GTP до конечной концентрации

1 мМ. Регистрировали процесс сборки по изменению оптической плотности растворов на спектрофотометре DU-8 Beckman, длина волны 360 нм, интервалы между измерениями 1 мин.

В экспериментах по влиянию таксола на процесс сборки микротрубочек раствор GTP заменяли раствором таксола. Таксол выделяли из тканей Тисса ягодного (*Taxus baccata*) по методу, описанному ранее [12]. D<sub>2</sub>O любезно предоставлена нам Б. А. Королем (ИБФ АН СССР).

**Результаты и обсуждение.** Отличительной особенностью белков, формирующих цитоскелетные структуры, является их способность полимеризоваться *in vitro* при определенных условиях среды. Процесс сборки микротрубочек зависит от многих факторов — температуры, рН,

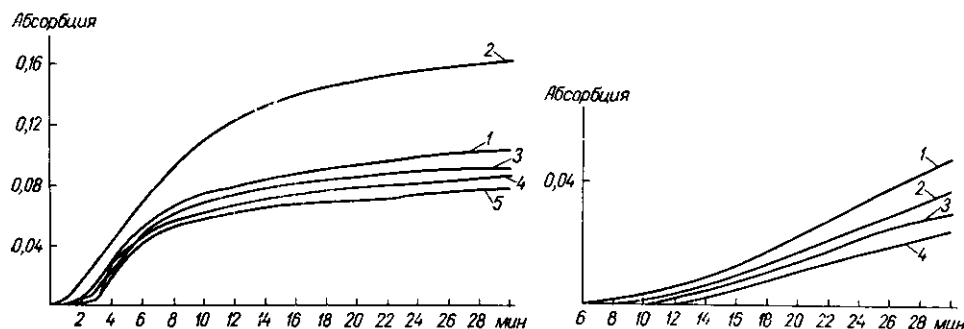


Рис. 1. Изменение оптической плотности растворов микротрубочек в процессе их полимеризации (концентрация белка 1 мг/мл): 1 — контроль; 2 — 10<sup>-5</sup> М таксол; 3, 4, 5 — 25, 50 и 75 %-ная D<sub>2</sub>O соответственно

Рис. 2. Изменение оптической плотности растворов микротрубочек в отсутствие добавок GTP (концентрация белка 1 мг/мл); 1 — контроль; 2, 3, 4 — 25, 50 и 75 %-ная D<sub>2</sub>O соответственно

наличия ионов Mg<sup>++</sup> и отсутствия Ca<sup>++</sup>, наличия в среде GTP. Полимеризация микротрубочек — это сложный кооперативный процесс, который начинается при достижении критической концентрации белка в растворе. Условно его можно разбить на несколько этапов — стадию нуклеации, этап латерального роста и элонгацию микротрубочек [13]. Образование микротрубочек чаще всего регистрируют по изменению оптической плотности растворов (рис. 1, кривая 1). Заканчивается процесс полимеризации примерно через 15—20 мин после его инициации при достижении равновесной концентрации молекул тубулина в растворе и в составе микротрубочек. Предполагается, что разные части кривой могут описывать разные события в процессе полимеризации [13]. Лаг-фаза (1—4 мин), по-видимому, соответствует процессам нуклеации, фаза возрастания оптической плотности (4—12 мин) отражает процессы латерального роста и элонгации микротрубочек, а выход кривых на плато (12—15 мин) отражает достижение равновесия в концентрации димеров тубулина в растворе и в составе собранных структур.

Отличительной особенностью влияния таксола на процесс полимеризации микротрубочек является сдвиг реакции равновесия вправо, что приводит к возрастанию общего числа собранных структур. Этот эффект обусловлен высоким сродством упомянутого алкалоида к молекуле тубулина, основного белка микротрубочек. Процессы образования микротрубочек в присутствии таксола описываются кривыми без лаг-фазы, поскольку одновременно образуется множество центров нуклеации, значительно ускоряются, если судить по наклону кривой, и процессы элонгации микротрубочек (рис. 1, кривая 2). Помимо модификации собственно процессов сборки микротрубочек таксол также стабилизирует и собранные структуры. Обработка таксолом приводит к изменению процессов обновления микротрубочек, сказывается на их

динамических свойствах и существенно влияет на функции этих компонентов клеточного скелета [8].

Кривые 3—5 (рис. 1) описывают процесс полимеризации микротрубочек в присутствии различных концентраций дейтериевой воды. Характер кривых свидетельствует о том, что  $D_2O$  ингибирует сборку микротрубочек *in vitro*. Можно предположить, что активность тяжелой воды в отношении микротрубочек обусловлена изотопным эффектом и изменением лабильности водородных связей. По-видимому, в присутствии  $D_2O$  изменяется конформация молекул тубулина таким образом, что это сказывается на процессах сборки интактных структур.

Изменение конформации белков, формирующих микротрубочки, под влиянием различных агентов весьма существенно отражается на процессах образования этих органелл. При этом может возникать суперпозиция нескольких эффектов — изменения конформации молекул тубулина за счет добавок GTP (что необходимо для инициации полимеризации) и конформационных переходов в белках, формирующих микротрубочки, под воздействием различных неспецифических факторов (ионизирующего излучения, химических добавок в реакционную среду и т. п.). Иногда эти события «маскируются» при их одновременной реализации [14]. Для исключения такой возможности мы изучили также особенности поведения белков, формирующих микротрубочки, в растворах  $D_2O$  без добавления в среду GTP (рис. 2). Форма кривых позволяет предположить, что в присутствии  $D_2O$  (кривые 2—4) белки микротрубочек не полимеризуются, а агрегируют, что происходит с ними также и в контроле (кривая 1).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в отношении сборки микротрубочек дейтериевая вода действует как агент, ингибирующий этот процесс. Однако существует вероятность того, что  $D_2O$  стабилизирует в клетках уже готовые структуры. Подобное воздействие может влиять на многие свойства цитоскелета, в том числе и на образование веретена деления в пролиферирующих клетках. Не исключено также, что действие дейтериевой воды опосредованно в отношении системы микротрубочек другими клеточными органеллами [1], поскольку это соединение вряд ли можно отнести к агентам, имеющим в клетке свою мишень и индуцирующим специфическую ответную реакцию.

## Резюме

Вивчено вплив різних концентрацій (25—75 %) дейтерієвої води на полімеризацію микротрубочок, які були виділені із мозку великої рогатої худоби. Показано, що  $D_2O$  інгібує утворення микротрубочок *in vitro*.

## Summary

The influence of the deuterium water different concentrations (25—75 %) on the polymerization of bovine brain microtubules has been investigated. It was shown that  $D_2O$  inhibited microtubules assembly *in vitro*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lamprecht J., Schroeter D., Paweletz N. Mitosis arrested by deuterium oxide. Light microscopic, immunofluorescence and ultrastructural characterization // *Eur. J. Cell Biol.*— 1990.— 51, N 2.— P. 303—312.
2. *Hyperdorsoanterior* embryos from *Xenopus* eggs treated with  $D_2O$  / S. R. Sharf, B. Rowning, M. Wu, J. C. Gerhart // *Develop. Biol.*— 1989.— 134, N 1.— P. 175—188.
3. Sumito S. B., Sato H. The isotopic effects of  $D_2O$  in developing sea urchin eggs // *Cell Struct. Funct.*— 1989.— 14, N 1.— P. 95—111.
4. Zimmermann A., Keller H. U., Cottier H. Heavy water ( $D_2O$ ) induced shape changes, movements and F-actin redistribution in human neutrophil granulocytes // *Eur. J. Cell Biol.*— 1988.— 47, N 2.— P. 320—326.

5. *Effect of deuterium oxide on leukotriene C4 generation in immunologically stimulated human leukocytes* / H. Mita, Y. Yui, H. Yasueda, I. Shida // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*—1988.—85, N 4.—P. 422—427.
6. *Lin P. C., Hepfter K., Ho K. C. Modification of membrane function, protein synthesis and heat killing effect in cultured chinese hamster cells by glycerol and D<sub>2</sub>O* // *Cancer Res.*—1984.—44, N 12, pt 1.—P. 5776—5784.
7. *Leonard P. J., Millins J. M. D<sub>2</sub>O induced alterations of mitosis in PtK1 cells* // *Exp. Cell Res.*—1987.—172, N 1.—P. 204—211.
8. *Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки.*—М.: Мир, 1987.—120 с.
9. *Shelanski M., Gaskin F., Cantor Ch. F. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1973.—70, N 3.—P. 765—768.
10. *Microtubules in mouse embryo fibroblasts extracted with Triton X-100* / A. D. Bershadsky, V. I. Gelfand, T. M. Svitkina, I. S. Tint // *Cell Biol. Int. Rept.*—1978.—2.—P. 425—432.
11. *Greenberg Ch., Graddock Ph. Rapid single-step membrane protein assay* // *Clin. Chem.*—1982.—28, N 7.—P. 1725—1726.
12. *Сорочинский Б. В., Прохневский А. И., Гродзинский Д. М. Простой способ выделения физиологически активных препаратов таксола из тканей *Taxus baccata** // *Химия природ. соединений.*—1990.—№ 5.—С. 702—703.
13. *Voter W. A., Ericson H. P. The kinetics of microtubule assembly* // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 16.—P. 10430—10438.
14. *Прохневский А. И., Сорочинский Б. В. Модификация этанолом сборки микротрубочек мозга* // *Нейрохимия.*—1990.—9, № 1.—С. 96—100.

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

Получено 20.11.90

УДК 577.3:576.5:577.352

А. В. Тимошенко, Л. К. Герасимова, Л. И. Колупаева,  
С. Н. Черенкевич

## МЕЖКЛЕТОЧНАЯ АГРЕГАЦИЯ ТИМОЦИТОВ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

*С использованием спектрофотометрического метода установлено, что бактериальные клетки *E. coli* вызывают агрегацию тимоцитов крыс. Процесс межклеточной агрегации блокируется D-маннозой. Показано, что агрегационная активность бактериальных клеток снижается при их инактивации ультрафиолетовым (УФ) облучением и под действием высокой температуры (80 °С). Обсуждаются механизмы и возможности использования реакции межклеточной агрегации.*

**Введение.** Проблема молекулярного узнавания поверхностных структур клеток микро- и макроорганизмов представляется актуальной для современной клеточной биологии. Бактериальные клетки способны эффективно прикрепляться к клеткам млекопитающих посредством адгезионных пилей (фимбрий), представляющих собой белковые структуры на поверхности микробных клеток [1, 2]. Эта реакция лежит в основе развития большинства бактериальных инфекций. Как правило, эффективность взаимодействия бактериальных клеток с клетками-мишенями оценивается по их адгезии на клеточных монослоях. Такой метод требует применения специальной техники, связанной с культивированием клеток [3]. Межклеточную адгезию можно изучать также с использованием более доступных и оперативных агрегационных методов [4]. В случаях, когда клетки млекопитающих не образуют монослоев, эти способы, по-видимому, являются наиболее адекватными, если не единственно возможными. Такая ситуация имеет место при изучении взаимодействия бактериальных клеток с Т-лимфоцитами, характеризующимися низкой адгезией к большинству подложек [5].

В настоящей работе исследована межклеточная агрегация тимоцитов крыс и бактериальных клеток *E. coli*, определена углеводная специфичность этой реакции и показано, что физико-химическая обра-

© А. В. ТИМОШЕНКО, Л. К. ГЕРАСИМОВА, Л. И. КОЛУПАЕВА, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, 1991