

На правах рукописи

Прохневский Алексей Ильич

**РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА В ТЕРМОАДАПТАЦИИ
МИКОМИЦЕТА RHYSARIUM POLYSERIALUM**

03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Минск - 1992

Работа выполнена в отделе биофизики и радиобиологии
Института клеточной биологии и генетической инженерии
Академии наук Украины

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00816464 (Т)

научный руководитель: доктор биологических наук,
академик АН Украины, профессор,
ГРОДЗИНСКИЙ Д.М.

официальные оппоненты: доктор биологических наук,
член корреспондент АН Беларуси,
профессор, КОНЕВ С.В.

доктор биологических наук,
профессор, МУСИЕНКО Н.Н.

ведущая организация: Институт физиологии растений
и генетики АН Украины

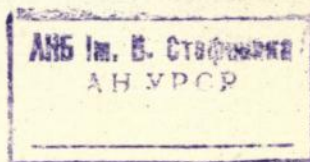
Защита состоится 17 ноября 1992 г. в 14⁰⁰ часов
на заседании специализированного совета К 006.04.01.
по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата
биологических наук при Институте экспериментальной ботаники
им. В.Ф.Купревича АН Беларуси (220072, г.Минск, ул.Ф.Скорины 27)

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной
библиотеке им. Я.Колоса АН Беларуси.

Автореферат разослан 14 октября 1992 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
кандидат биологических наук

И.В.Рогульченко



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Температурное воздействие вызывает в организме ряд нарушений как на организменном, так и на молекулярном уровне (Neuman et al.1989). До настоящего времени окончательно не исследована зависимость между физиологическими проявлениями и биохимическими механизмами, регламентирующими ответ организма на тепловое воздействие.

Промежуточным звеном в реализации температурных эффектов между молекулярным и организменным уровнями могут служить изменения в системе клеточного скелета, ключевую роль в которой играют микротрубочки и микрофиламенты. Система клеточного скелета занимает ключевое положение в регуляции многих внутриклеточных процессов: поддержании формы клеток, кеппинге рецепторов, в транспорте и позиционировании органелл, в реализации клеточной подвижности, а также в формировании веретена деления (Фултон,1987). Определенную роль система клеточного скелета играет в организмах, биологической особенностью которых является способность перемещаться в поисках питательной среды. К данной группе организмов относятся миксомицет *Physarum polycephalum*.

Известно, что повышение температуры сказывается на выживаемости миксомицета *Physarum polycephalum* в зависимости от температуры и продолжительности термического воздействия. При температурной обработке нарушается цитов - ритмичное движение цитоплазмы, происходят существенные изменения в структуре ядрышек и митохондрий (Lomagin,1978), подавляется синтез общего белка и синтезируются белки теплового шока (Wright et al.1982).

Изучение возникновения и развития молекулярных нарушений и выяснение механизмов изменений, происходящих в системе клеточного скелета при гипертермии, является актуальной и важной задачей современной биохимии.

Центральную роль в функционировании системы микротрубочек и микрофиламентов играют белки: актин - основной белок микрофиламентов и тубулин - основной белок микротрубочек, которые являются ключевыми в формировании данных структур.

Многие факторы физической природы, в том числе и температура, значительно влияют на процессы, происходящие в клет-

ке. Затрагивают они и формирование цитоскелетных структур, в частности, при действии повышенных температур последние вероятно претерпевают ряд значительных изменений. В литературе имеются единичные работы о влиянии температуры на цитоскелетные структуры и их функционирование *in vitro* и практически отсутствуют данные о молекулярно-клеточных механизмах функционирования данных структур при гипертермии. Изучение изменений, происходящих с элементами клеточного скелета как на организменном, так и на молекулярном уровне при гипертермии, может сыграть важную роль в выяснении причин и механизмов, приводящих к функциональным изменениям в клетках и их гибели.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было выяснение влияния повышенных температур на системы микротрубочек и микрофиламентов клеточного скелета на примере миксомицета *Physarum polycephalum*. Для достижения поставленной цели в задачи работы входило:

1. Изучить зависимость подвижности миксомицета *Physarum polycephalum* от состояния системы микротрубочек и микрофиламентов при температурной обработке 29° С, 33° С, 37° С и 41° С при продолжительности термического воздействия одна, две, пять и десять минут.
2. Определить, как сказывается тепловая обработка на количественных изменениях основного белка микротрубочек - тубулина и основного белка микрофиламентов - актина.
3. Определить характер зависимости между нарушениями в подвижности миксомицета и вызванными температурой количественными изменениями в содержании актина и тубулина в миксомиците.
4. Изучить зависимость процесса полимеризации и особенности молекулярной структуры микротрубочек *in vitro* от температурного воздействия.
5. Изучить индукцию синтеза белков теплового шока после кратковременной температурной обработки плазмодия миксомицета.

Научная новизна работы. Установлена зависимость подвижности миксомицета от состояния элементов клеточного скелета - микрофиламентов и микротрубочек. Показаны закономерные изменения зависимости подвижности миксомицета *Physarum poly-*

serphalum от температурной обработки. Определены количественные изменения в содержании актина (основного белка микрофиламентов) и тубулина (основного белка микротрубочек) в клетках миксомицета после кратковременного воздействия (1-10 мин) температур 29°, 33°, 37° и 41° С. Исследовано влияние температуры на процесс полимеризации микротрубочек *in vitro* и их организацию. Определена возможность избирательной индукции синтеза белков теплового шока кратковременным температурным воздействием. Впервые доказано значение систем клеточного скелета (микротрубочек и микрофиламентов) при адаптивном ответе организма на действие повышенных температур.

Теоретическая значимость работы. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию функционирования систем микротрубочек и микрофиламентов миксомицета *Physarum polycephalum* в условиях температурного стресса. Анализ экспериментальных данных дополняет существующие представления о механизмах клеточных реакций на температурное воздействие, выделяя особый вклад элементов клеточного скелета в формирование адаптивных реакций организма.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на Пятом Украинском биохимическом съезде (Ивано-Франковск, 1987), Шестой конференции молодых ученых Ужгородского государственного университета (Ужгород, 1989), Шестом Украинском биохимическом съезде (Черновцы, 1992).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 248 наименований, из которых 230 иностранных. Работы изложена на 167 страницах машинописного текста.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Работу проводили на миксомиците *Physarum polycephalum*. Он относится к слизевикам, которые характеризуются признаками как грибов, так и животных организмов. Соматической стадией миксомицетов является свободноживущий многоядерный подвижный плазмодий (Evans et al. 1972).

Для иницирования культуры переживающую форму *P. polycephalum* (склероции) переносили в чашки Петри на агаризованную непитательную среду - 1,5 % агар на дистиллированной воде (голодный агар) и инкубировали при 25° С. После прорастания макроплазмодий переносили на овсяные хлопья, которые наносили на покрытую фильтровальной бумагой перевернутую чашку Петри. В дальнейшем чашку Петри помещали в ювету с кипяченой водопроводной водой таким образом, чтобы уровень жидкости был ниже уровня поверхности чашки Петри. Фронтальную часть плазмодия, сползшего на воду, отбирали для экспериментов. Пассажи осуществляли каждые два дня (Daniel et al. 1964).

Подвижность плазмодия определяли с помощью специальной установки, представляющей собой плексиглазовый столик со стационарными либо съёмными дорожками, образованными плексиглазовыми планками с наклеенной сверху миллиметровой бумагой, что позволяло определять скорость движения плазмодия как при постоянной температуре, так и после температурной обработки. В данные дорожки наслаивали 1.5 % агар и наносили по 50 мг фронтальной части культуры плазмодия. Через три часа после адаптации миксомицета к агару, что выражалось в начале движения последнего по агару, его использовали для дальнейших экспериментов.

Для изучения зависимости движения плазмодия от элементов клеточного скелета (микротрубочек и микрофиламентов) - в агар вносили, соответственно, специфические ингибиторы данных структур - колхицин (в концентрациях 10^{-2} М, 10^{-3} М и 10^{-4} М) и фаллоидин (10^{-3} М, 10^{-4} М, 10^{-5} М).

Для изучения температурной зависимости подвижности *P. polycephalum* его подвергали температурной обработке при 29° С, 33° С, 37° С и 41° С с временами экспозиции одна, две, пять и десять минут. В дальнейшем проводили наблюдение в течение шести часов при температуре 25° С.

Относительную подвижность определяли по методу Мусиенко и др. (1984).

Для изучения синтеза белков теплового шока в плазмодияльной форме *P. polycephalum* нами была использована стандартная методика (Wright et al. 1982) с модификациями. В среду инкубации вносили смесь 14 С-аминокислот до конечной активности 0.02 МБк/мл. Спустя час плазмодий подвергали об-

работке соответствующими температурами. После температурной обработки отбирали (в течение четырех часов) часть плазмодия миксомицета для выделения суммарного белка.

Концентрацию белка в пробах определяли по методу Greenberg et al. (1982).

Электрофоретический анализ белков проводили по Laemli (1970) с некоторыми модификациями.

Иммуноблоттинг проводили по методу Vjeggum et al. (1986) с полусухим горизонтальным переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану при температуре 20° С и силе тока 0.8 мА/см² в буфере, содержащем 48 мМ триса, 39 мМ глицина, 1.3 мМ ДСН и 20 % метанола (Kyhse-Andersen et al. 1984). Иммунодетекцию осуществляли по методу Towbin (1979) с использованием мышиных моноклональных антител против актина и мышиных моноклональных антител против тубулина. Реакцию визуализации осуществляли с помощью антител против иммуноглобулинов мыши. Ферментом детекции служила пероксидаза из хрена. В качестве субстрата использовали 4-хлоро-1-нафтол по методу, описанному Nakane (1968). Детекцию белковых зон с иммуоферментным окрашиванием осуществляли на денситометре "Camag" (Швейцария).

Микротрубочки выделяли из мозга крупного рогатого скота двумя циклами полимеризация - деполимеризация (Shelansky et al. 1973) В качестве буфера, стабилизирующего микротрубочки, использовали буфер Bershadsky et al. (1978). Сборку микротрубочек индуцировали добавлением ГТФ до конечной концентрации 1 мМ. Полимеризацию проводили при температурах 37° (контроль), 41° и 45° С, регистрируя её по изменению оптической плотности раствора (длина волны 350 нм) на спектрофотометре "Beckman DU-8" (Австрия).

Образцы для микроскопии готовили следующим образом. На подложки, покрытые формваром, наносили 20 мкл суспензии микротрубочек, которые отбирали из среды полимеризации спустя двадцать минут после индукции процесса сборки, через 5 - 10 секунд избыток раствора отбирали фильтровальной бумагой. Препараты оттеняли 1 % уранил-ацетатом в течение 5-10 секунд. В дальнейшем препараты изучали и фотографировали на электронном микроскопе "JEM - 1200" (Япония).

Экспериментальные данные обрабатывались общепринятыми

методами вариационной статистики (Шмидт, 1984). Расчеты проводились на ПЭВМ "Асег - 915V" (Малайзия) с использованием прикладных программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Участие микротрубочек и микрофиламентов в реализации подвижности у миксомицета *Physarum polycephalum*.

Целью нашего исследования было выяснение роли цитоскелетных структур в термоадаптации у *Physarum polycephalum*. Однако, кроме исследований на молекулярном уровне нами был предложен также тест, позволяющий оценить состояние данных структур *in vivo*. Реализация данного теста требовала доказательств зависимости подвижности миксомицета от систем как микротрубочек, так и микрофиламентов.

Для доказательства данного предположения нами были использованы специфические ингибиторы как системы микротрубочек, так и системы микрофиламентов. В качестве ингибитора системы микротрубочек мы использовали алкалоид - колхицин в концентрациях 1×10^{-2} М, 1×10^{-3} М и 1×10^{-4} М. Специфическим ингибитором системы микрофиламентов служил фаллоидин в концентрациях 1×10^{-3} М, 1×10^{-4} М, 1×10^{-5} М. Данные ингибиторы вносились в голодный агар, который наслаивался на дорожки, по которым двигался миксомицет.

Из рисунка 1,а видно, что при всех концентрациях колхицина относительная подвижность миксомицета к пятому часу наблюдения полностью ингибировалась. Такое ингибирующее действие обусловлено высоким сродством молекулы тубулина, основного белка микротрубочек, к колхицину, константа связывания которого равна 1×10^6 М⁻¹ (Sherline, 1975). При этом колхицин связывается как с "плюс", так и с "минус" концом микротрубочки и полностью ингибирует процесс полимеризации (Bergen, 1986), что в свою очередь приводит к полной остановке миксомицета.

Доказательство участия системы микрофиламентов в подвижности миксомицета были получены с помощью фаллоидина - соединения, стабилизирующего систему микрофиламентов. На рисунке 1,б показана зависимость относительной подвижности миксомицета от концентрации фаллоидина. Нам не удалось заре-

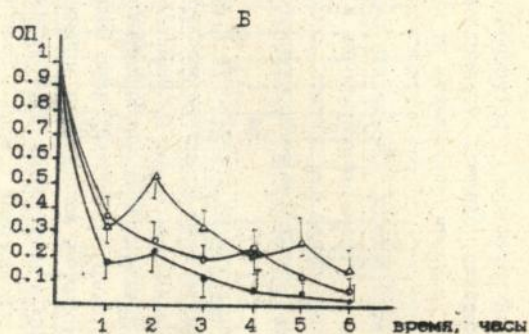
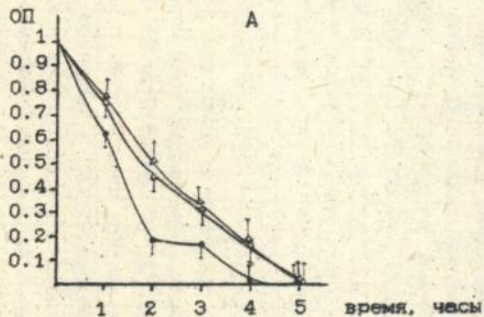


Рис. 1. Относительная подвижность миксосоцета *P. polycerhalum* от концентраций колхицина (А) /● - 10^{-2} М, ○ - 10^{-3} М, △ - 10^{-4} М/ и фаллоидина (Б) /● - 10^{-3} М, ○ - 10^{-4} М, △ - 10^{-5} М/.

гистрировать полной остановки *P. polycephalum* на протяжении шести часов наблюдения, однако, установлено, значительное снижение скорости движения миксомицета от концентрации фаллоидина.

Таким образом, удалось определить зависимость подвижности миксомицета от систем микротрубочек и микрофиламентов, что в дальнейшем позволило нам судить о состоянии данных систем в клетке при наложении температурного фактора.

Влияние температуры на подвижность *P. polycephalum* и количество актина и тубулина в клетках миксомицета.

Для выяснения вклада систем микрофиламентов и микротрубочек в реализацию подвижности миксомицета после кратковременного температурного воздействия нами были проведены эксперименты, в которых мы сопоставили подвижность миксомицета на протяжении четырех часов после температурной обработки с количественными изменениями основных белков микрофиламентов - актина и микротрубочек - тубулина (табл.1). Температурное воздействие в течение 10 минут температурами 29°, 33° и 37° С значительно ингибировало скорость движения миксомицета, а при температуре 41° С миксомицет погибал. Температурная обработка выше упомянутыми температурами в течение 5 минут также вызывала снижение скорости движения.

При температурных воздействиях в режиме 1 и 2 минут были получены следующие результаты (см.табл.1). При двухминутном температурном воздействии 29°, 33° и 37° С скорость движения миксомицета по дорожкам голодного агара была незначительно меньше контрольной. В то же время после 2 минутного (41°С) и 1 минутного (29°, 33°, 37° и 41° С) режимов обработки наблюдалось увеличение скорости движения миксомицета по дорожкам агара по сравнению с контролем. Максимальная скорость движения была зарегистрирована через час после 1 минутного воздействия 41° С. Примечательно, что количество актина и тубулина в клетках миксомицета, в данный момент, превышало контрольные показатели. С падением скорости движения миксомицета снижалось также содержание данных белков в клетках *P. polycephalum*. Аналогичная зависимость прослеживается при одноминутном воздействии температурами 29°, 33° и 37° С.

Временные режимы (2, 5 и 10 минут) температурного воз-

Таблица 1.

Зависимость относительной подвижности (ОП) и относительного содержания актина и тубулина в клетках миксоциета *P. polyserphalum* от режимов температурной обработки

Часы	29° С, 10 минут			33° С, 10 минут			37° С, 10 минут			41° С, 10 минут		
	ОП	Актин	Тубулин	ОП	Актин	Тубулин	ОП	Актин	Тубулин	ОП	Актин	Тубулин
1	0.37	125	117	0.39	121	77	0.06	148	119	-	-	-
2	0.38	70	90	0.28	71	60	0.15	75	102	-	-	-
3	0.42	91	53	0.29	83	47	0.1	99	74	-	-	-
4	0.37	151	59	0.23	122	126	0.07	136	80	-	-	-
	29° С, 5 минут			33° С, 5 минут			37° С, 5 минут			41° С, 5 минут		
1	0.36	101	117	0.39	129	63	0.42	132	124	0.26	163	119
2	0.41	81	84	0.25	70	54	0.23	59	118	0.31	81	92
3	0.43	97	67	0.21	99	51	0.24	88	112	0.27	102	59
4	0.45	120	98	0.45	138	71	0.38	96	126	0.26	129	102
	29° С, 2 минуты			33° С, 2 минуты			37° С, 2 минуты			41° С, 2 минуты		
1	0.98	108	70	0.9	116	83	0.83	104	119	0.91	128	130
2	0.84	62	108	0.89	57	118	0.78	60	106	1.05	68	104
3	0.73	104	112	0.77	67	93	0.96	87	93	1.02	90	90
4	0.79	89	63	0.61	91	83	0.71	119	134	0.77	125	126
	29° С, 1 минута			33° С, 1 минута			37° С, 1 минута			41° С, 1 минута		
1	1.62	119	68	1.39	125	95	1.12	114	124	1.81	119	132
2	1.54	56	108	1.25	75	102	1.28	53	108	1.16	71	108
3	1.19	86	59	1.12	109	55	1.28	48	65	1.1	85	95
4	1.02	109	75	1.04	169	131	1.06	58	90	0.97	126	122

действия вызывали, как правило, снижение уровня основных цитоскелетных белков в клетках миксомицета. Снижение уровня синтеза общего белка, как реакция клеток на гипертермию, хорошо известно в литературе (Neuman, 1989). По данным Toyе et al. (1989) температурный прогрев значительно угнетал синтез α - и β -тубулинов у *Leishmania major*. Findly et al. (1981) показали, что температурный прогрев может также снижать скорость транскрипции актинового гена.

Однако, относительное содержание основных цитоскелетных белков при общем замедлении движения миксомицета, в некоторых случаях превышало контрольный уровень. Наиболее часто данное явление наблюдалось в первый час после наложения температурного фактора. Так, по данным Kerr и Carter (1990) стрессовые условия могут стимулировать синтез некоторых цитоскелетных белков. По нашему мнению, температурное воздействие может не только влиять на синтез основных цитоскелетных белков в клетке, но и на позиционирование и ориентацию данных органелл, когда количественные показатели не являются определяющими. Аналогичные результаты для микротрубочек были описаны Golinska (1988) и для микрофиламентов Klopska (1989).

Влияние повышенной температуры на полимеризацию микротрубочек in vitro.

Способность молекул к самосборке и последующему образованию надмолекулярных систем и субклеточных органелл является одним из наиболее интересных биологических феноменов. Как и любой динамический процесс, самосборка молекул зависит от многих физических факторов, в том числе и от температуры. Одним из наиболее ярких проявлений процесса самосборки является образование микротрубочек в растворе.

Для оценки данного процесса in vitro мы провели модельные эксперименты, в которых были использованы микротрубочки из мозга крупного рогатого скота, очистку которых осуществляли двумя циклами полимеризация - деполимеризация (Shelansky et al. 1973) Полимеризацию микротрубочек инициировали при температурах 37°, 41°, 45° С добавкой ГТФ до 1 мМ. Температура 37° С, которая является физиологической, была взята нами в качестве контроля. На рисунке 2 изображены кривые,

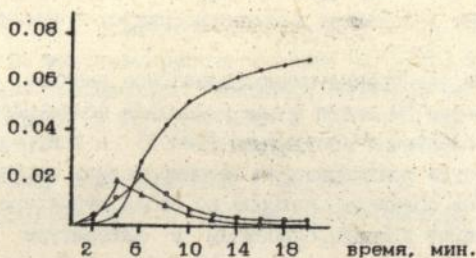


Рис. 2. Зависимость полимеризации микротрубочек от температуры (● - контроль, ○ - 41° С, Δ - 45° С)

описывающие процесс полимеризации микротрубочек при различных температурах. Кривая, описывающая полимеризацию микротрубочек в контроле, проходит три фазы. Первая - 1-4 минута лагфаза, которая характеризуется процессами нуклеации и латерального роста микротрубочек. Вторая - 4-12 минута фаза элонгации, то есть увеличение линейных размеров микротрубочек. Третья - 12-20 минута - стадия динамического равновесия. При полимеризации, которая проходила при температурах 41° и 45° С полностью отсутствовала лагфаза и максимум скорости полимеризации наблюдался на 4 минуте при температуре 45° С и на 6 минуте при температуре 41° С. В дальнейшем оптическая плотность раствора снижалась, что означало нарушение нормального процесса сборки микротрубочек. Особое внимание необходимо уделить природе пиков, характерных для процесса полимеризации микротрубочек, который проходил при повышенных температурах. Вероятнее всего, в первые минуты после инициации полимеризации при температурах 41° С и 45° С не происходит денатурации белковых молекул тубулина. В этот промежуток времени могут формироваться нормальные тубулярные структуры, скорость образования которых детерминируется состоянием белковых молекул, входящих в состав микротрубочек. В дальнейшем под действием температуры микротрубочки разрушаются. Причиной нарушения структуры микротрубочек, подвергшихся температурной обработке, являются, вероятнее всего, конформа-

ционные изменения, происшедшие в молекуле тубулина. На это указывают дальнейшие электронно-микроскопические исследования.

При электронно-микроскопическом анализе, который проводился через 20 минут после инициации полимеризации, были получены следующие результаты (рис.3). в контрольном варианте к 20 минуте полимеризации сформировались нормальные линейные трубчатые полимеры, которые по своей структуре полностью соответствуют таковым, описанным в литературе (Lloyd, 1982) (рис.3,а). При температуре 41°C (рис.3,б), наряду с отдельными немногочисленными микротрубочками, присутствуют белковые агрегаты неправильной формы. Эти структуры в основном локализованы на "нормальных" микротрубочках в виде незамкнутых колец и обрывков трубчатых структур. Появление этих белковых агрегатов вызвано действием повышенной температуры, которая нарушает конформацию белков, формирующих микротрубочки. На рисунке 3,в приведены фотографии тех структур, полимеризация которых проходила при температуре 45°C .

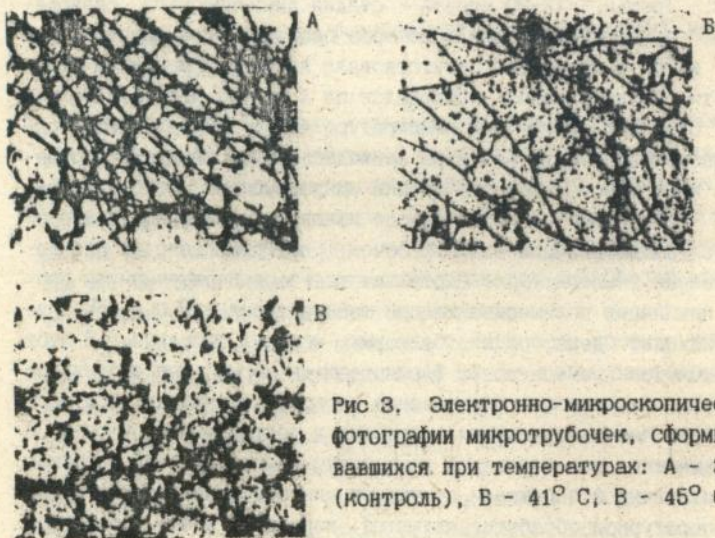


Рис 3. Электронно-микроскопические фотографии микротрубочек, сформировавшихся при температурах: А - 37°C (контроль), В - 41°C , В - 45°C .

Тубулярные структуры полностью отсутствуют, а все образования представлены молекулярными агрегатами неправильной формы. Аналогичные образования наблюдал Сорочинский и др. (1990) после облучения микротрубочек в дозе 1000 Гр.

Синтез белков теплового шока у миксомицета *P. polycephalum* после кратковременной температурной обработки

Большой интерес представлял вопрос об индукции синтеза белков теплового шока у миксомицета после кратковременной температурной обработки, так как последние связаны с элементами клеточного скелета (Clark et al. 1984, Koyasu et al. 1986).

Нами были выбраны следующие режимы температурной обработки, после которых проводилась детекция синтеза хитшоковых белков: 1) температурная обработка 29° С в течение 1 и 10 минут. 2) температурная обработка 37° С в течение 1, 5, 10 минут. Для сравнения полученных нами результатов по кратковременному действию температуры на синтез белков теплового шока индуцировали синтез белков теплового шока у миксомицета температурным воздействием 33° С в течение часа.

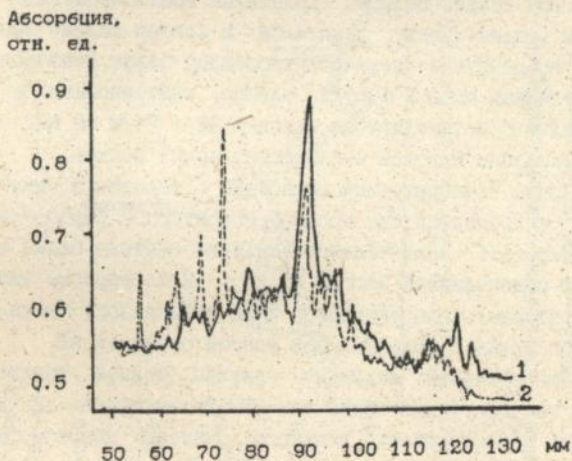


Рис. 4. Зависимость синтеза суммарного белка миксомицета *P. polycephalum* от температуры. 1 - контроль (25° С) 2 - после температурной обработки (33° С, 1 час).

При обработке 33° С в течение часа культуры клеток миксомицета нами был зафиксирован синтез четырех белков теплового шока с молекулярными массами 105, 82, 74 и 69 кД (см. рис. 4). Эти результаты полностью согласуются с данными, описанными Wright et al. (1982).

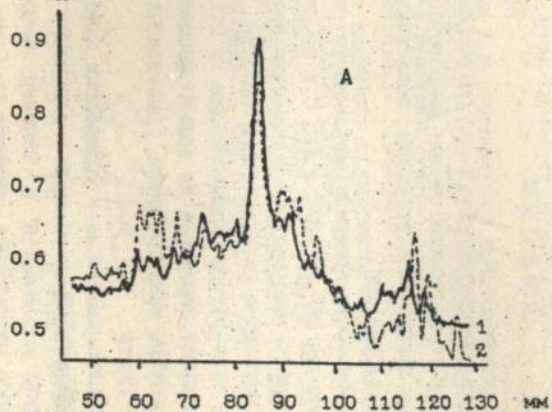
После температурной обработки в течение одной минуты нам не удалось обнаружить индукцию синтеза белков теплового шока у миксомицета *Physarum polycephalum*.

При температурной обработке 29° С в течение 10 минут в первый час после обработки удалось зафиксировать усиление синтеза ряда высокомолекулярных белков с молекулярными массами в пределах от 82 до 69 кД (рис. 5, а). Однако, необходимо отметить, что характер пиков и, соответственно, белковый спектр отличались от спектра белков теплового шока *P. polycephalum*, полученных нами при тепловой обработке в течение часа (рис. 4). Вероятно, кратковременная тепловая обработка усиливала не только синтез уже известных белков теплового шока, но и некоторых других высокомолекулярных белков. Необходимо отметить, что усиливался также синтез низкомолекулярных белков с молекулярными массами 14-25 кД. К четвертому часу после температурной обработки 29° С в течение 10 минут (рис. 5, б) синтез белков, вызванный кратковременным температурным воздействием, изменялся. В данном режиме температурного воздействия не детектировался белок теплового шока с молекулярной массой 105 кД, однако, синтезировались хитинозные белки с молекулярными массами 82, 74 и 69 кД. Наблюдалось усиление синтеза низкомолекулярных белков.

После температурной обработки в течение 5 минут 37° С в первый и четвертый час после температурной обработки удалось зафиксировать значительное усиление синтеза белка теплового шока с молекулярной массой 74 кД. К четвертому часу после температурного воздействия, нами наблюдалось также усиление синтеза белка с молекулярной массой около 14 кД.

При изучении индукции синтеза белков теплового шока после температурной обработки 37° С в течение 10 минут не удалось зафиксировать индукцию синтеза высокомолекулярных белков теплового шока. Однако, как в первый, так и в четвертый час после температурного воздействия удалось обнаружить индукцию синтеза белка с молекулярной массой 14 кД.

Абсорбция,
отн. ед.



Абсорбция,
отн. ед.

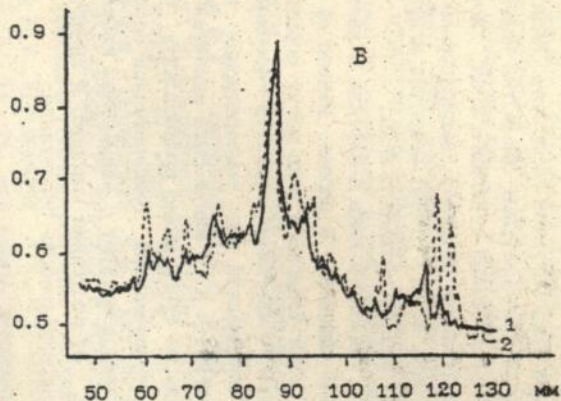


Рис.5. Зависимость синтеза суммарного белка миксомицета *P. polyserphalum* от температурной обработки 29° С, 10 минут. А - в первый час после обработки. Б - в четвертый час после обработки. 1 - контроль (25° С). 2 - после температурного воздействия.

По нашему мнению, различия в индукции синтеза белков зависит от режимов температурной обработки. Нами обнаружено, что кратковременная температурная обработка индуцирует синтез низкомолекулярных белков теплового шока, которые не индуцируются при длительных временах температурной обработки. В литературе (Neuman et al. 1989) известна индукция синтеза низкомолекулярных белков теплового шока.

Роль белков теплового шока в клетках к настоящему времени не достаточно выяснена. В работе Minton et al. (1982) отмечается, что белки теплового шока могут играть роль стабилизаторов лабильных клеточных структур. Необходимо учесть, что подвижность миксомицета при температурных воздействиях 29° и 37° С в течение 5 и 10 минут была значительно ниже чем в контроле. Исходя из этого можно предположить, что синтезируемые после кратковременной температурной обработки белки теплового шока взаимодействуют с элементами клеточного скелета миксомицета, от состояния которого в значительной степени зависит жизнедеятельность последнего.

ВЫВОДЫ

1. Подвижность миксомицета *Physarum polycephalum* зависит от функционального состояния систем микротрубочек и микрофиламентов. При нарушениях структуры последних подвижность миксомицета нарушается.

2. Изменения скорости движения миксомицета после воздействия температурами 29°, 33°, 37° и 41° С в течение 1, 2, 5 и 10 минут обусловлены температурой и временем экспозиции и детерминируются состоянием цитоскелетных структур.

3. Повышение температуры полимеризации *in vitro* с 37° до 41° и 45° С вызывает нарушения не только процесса полимеризации, но и структуры микротрубочек, выделенных из мозга крупного рогатого скота.

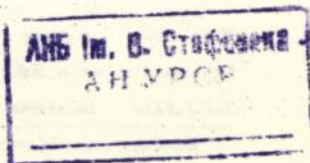
4. Количественные изменения в содержании актина - основного белка микрофиламентов и тубулина - основного белка микротрубочек в клетках миксомицета в течение четырех часов после температурного воздействия зависят от режима температурной обработки.

Б. Установлено, что синтез белков т плового шока индуцируется у миксомицета *P. polyserphalum* после кратковременной температурной обработки при 29° С (10 минут) и 37° С (5 и 10 минут).

Б. Показано, что изменение функционального состояния цитоскелетных структур при действии температурного стресса является одним из возможных путей реакции клеток на гипертермию.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Прохневський О. І., Сорочинський Б. В. Деякі особливості полімеризації мікротрубочок *in vitro*. //Тез. доповід. 5 Укр. біохім. з'їзду. -К. -1987. -Част. 2, -С.172-173.
2. Прохневський А. И., Сорочинский Б. В. Цитоскелет и реакция клетки на гипертермию. // Тез. докл. 6 конференции молодых учёных Ужгородского госуниверситета. -Ужгород. -1989. -С.110.
3. Sorochinsky B. V., Prochnevsky A. I., Grodzinsky D. M. Cell Cytoskeleton - is it one more messenger system //In: Abstr. Int. Symp. "Molec. Organ. Biol. Syst.". -Moscow. -1989. -Pt. 2. -P. 186.
4. Прохневський А. И., Сорочинский Б. В. Особенности сборки микрогубочек *in vitro* при действии повышенных температур. // Цитол. и генетика. -1991. - Т. 25, N 6 : -С. 8-11.
5. Прохневський А. И., Гродзинский Д. М. Роль цитоскелетных структур в нарушении подвижности миксомицета при гипертермии. // Доклады АН Украины. -1992. N 3. -С. 118-121.
6. Прохневський О. І. Вплив температури на синтез цитоскелетних білків та рухливість миксомицету *Physarum polyserphalum*. // Тез. доповід. 6 Укр. біохім. з'їзду. -К. -1992. -Част. 1, -С. 20.



АВ 25.893

Подл. к печ. 1. 11. 92

Формат 60x84/16 Бумага *ман*

Печ. офс. Усл. печ. л. 0,93

Уч.-изд. л. 0,66 Тираж 100

Зак. 2-3335 : Бесплатно.

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Решина, 4.