



УДК 547.96:541.64

РАВНОВЕСНАЯ АССОЦИАЦИЯ БЕЛКА МИКРОТРУБОЧЕК

Гельфанд В. И., Розенблат В. А.

*Кафедра молекулярной биологии биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Белок микротрубочек — тубулин, полученный из мозга крупного рогатого скота методом «полимеризации-деполимеризации», присутствует в растворе в двух агрегационных формах. Первая форма — димер с константой седиментации $\sim 6S$, вторая — олигомер с константой седиментации $32S$. Олигомер имеет форму двойного кольца диаметром ~ 40 нм. Так как относительное содержание олигомера в препарате зависит от концентрации белка (при разбавлении препарата олигомер распадается, а при концентрировании собирается), между димером и олигомером существует динамическое равновесие. В условиях образования микротрубочек (удаление Ca^{2+} и присутствие GTP) олигомер полностью исчезает, тогда как часть $6S$ -компонента в препарате остается. Предполагается, что $32S$ -олигомер — промежуточный продукт при образовании микротрубочек из $6S$ -тубулина.

Одним из существенных свойств белка микротрубочек тубулина является способность к полимеризации. Сборка и разборка микротрубочек, очевидно, обеспечивает нормальный ход митоза, а также играет роль в изменении формы клеток в интерфазе. Образование микротрубочек из тубулина наблюдается и в бесклеточной системе [4]. Однако ход процессов сборки и разборки микротрубочек изучен мало.

В этой связи представляет интерес исследование олигомерных форм тубулина и их роли в самосборке микротрубочек. О появлении $30S$ -олигомера тубулина при уменьшении ионной силы раствора сообщалось в одной из первых работ, посвященных этому белку [2]. Некоторые свойства олигомера тубулина описаны в недавно опубликованной работе [3]. Однако систематические исследования олигомеризации тубулина пока не проводились, а имеющиеся данные неполны и иногда противоречивы.

В настоящей работе методами седиментационного анализа показано существование равновесия между тубулином и его олигомером и исследована роль олигомера в процессе образования микротрубочек.

При аналитическом ультрацентрифугировании препарата, полученного после деполимеризации микротрубочек на холоду, было обнаружено, что основная часть материала распределяется между двумя компонентами. На шпирен-диаграмме (рис. 1) хорошо видны «медленный» ($s_{20,w} = 5,7S$) и острый «быстрый» пики. Коэффициент седиментации быстрого компонента сильно зависит от его концентрации и составляет в наших опытах $21-34S$. Константа седиментации ($s_{20,w}^0$) этого компонента равна $32S$.

Помимо двух главных компонентов на седиментационных диаграммах иногда можно заметить ряд небольших пиков с промежуточными коэффициентами седиментации. Чаще всего обнаруживается пик, дающий «плечо» на правом склоне «медленного» пика и отделяющийся от него лишь при продолжительном центрифугировании.

Рис. 1. Шлирен-диаграмма препарата тубулина (6,3 мг/мл). Скорость вращения ротора 56 100 об/мин, температура 20°, угол наклона фазовой пластинки 55° (снимок сделан через 35 мин после достижения полной скорости вращения)

Рис. 2. Электрофорез препарата тубулина в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

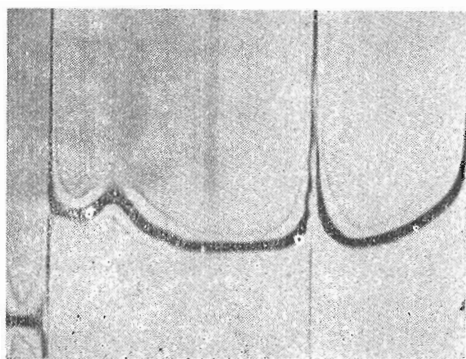


Рис. 1

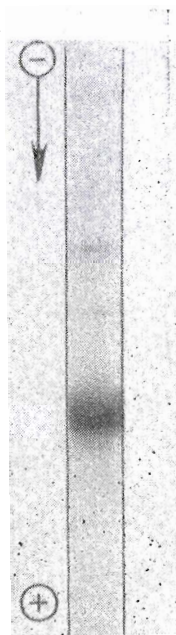


Рис. 2

Анализ использованных нами препаратов белка показал, что их основной компонент — тубулин. Так, при электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (рис. 2), при аналитическом ультрацентрифугировании в присутствии 5 М гуанидингидрохлорида, а также при аналитическом ультрацентрифугировании нативного препарата в условиях, исключающих олигомеризацию, выявляется лишь один основной компонент, свойства которого хорошо согласуются с известными из литературы характеристиками белка микротрубочек [4]. Кроме того, он обладает колхицинсвязывающей активностью и, по данным электронной микроскопии, способен в подходящих условиях образовывать микротрубочки.

Тяжелый и легкий компоненты препарата, выявляющиеся при аналитическом ультрацентрифугировании (рис. 1), могут присутствовать в сравнимых количествах, а также переходить друг в друга (см. ниже). Следовательно, оба они состоят преимущественно из тубулина. Очевидно, легкий компонент представляет собой обычную димерную молекулу тубулина, а быстрый, 32S-компонент — олигомерную. Вопрос о природе минорных компонентов, наблюдающихся на седиментационной диаграмме, остается в настоящее время открытым.

При электронной микроскопии негativamente контрастированных препаратов деполимеризованных микротрубочек * обнаруживаются (кроме отдельных молекул белка) структуры, имеющие вид двойных колец с внешним диаметром ~40 нм и внутренним диаметром 29 нм (рис. 3). Если олигомер тубулина в препарате не содержался (например, при разведении или полимеризации раствора — см. ниже), кольца при электронной микроскопии не выявлялись. Это дает основание полагать, что олигомер тубулина представляет собой двойные кольца.

Известно, что глицерин способствует полимеризации тубулина [5]. Поскольку все наши препараты содержали ~1 М глицерин, интересно было выяснить, не обусловлено ли существование олигомера тубулина

* Электронно-микроскопическое исследование препаратов проведено сотрудниками Института кристаллографии Академии наук СССР В. Я. Стельмашуком и Н. А. Киселевым, которым авторы приносят свою благодарность.

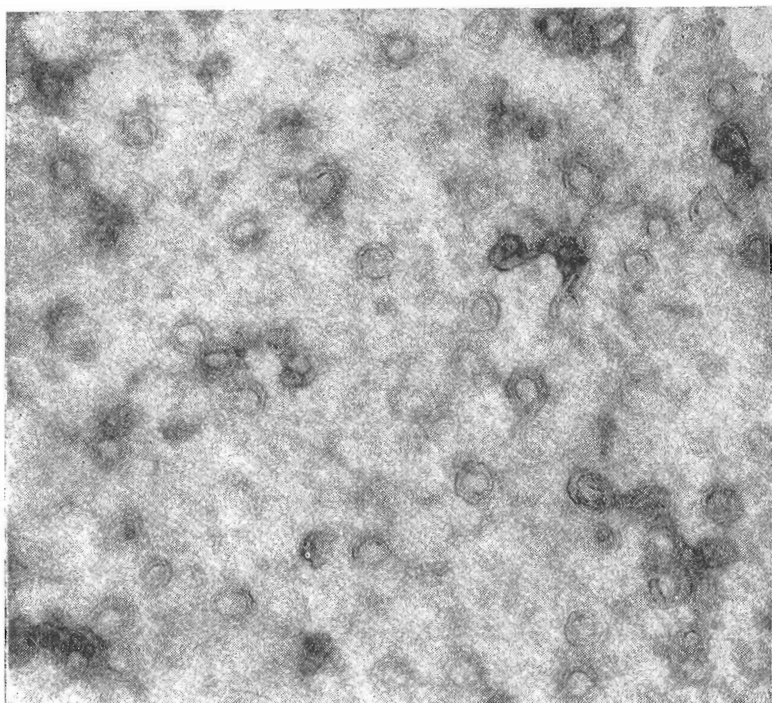


Рис. 3. Электронная микроскопия препарата тубулина. Негативное контрастирование 2%-ным ураниацетатом. Увеличение в 150 000 раз

присутствием глицерина в препарате. С этой целью мы получили ряд препаратов тубулина, не содержащих глицерина, методом, аналогичным стандартному (см. «Экспериментальную часть»), за исключением того, что во всех растворах отсутствовал глицерин, а полимеризация индуцировалась 1 мМ GTP. Оказалось, что в препарате тубулина, не содержащем глицерин, также присутствует олигомер.

Далее мы изучили зависимость относительного содержания олигомеров в препарате от общей концентрации белка (таблица). В препарате с концентрацией белка 6,5 мг/мл содержание тяжелого компонента составляет 77%. Однако при разбавлении препарата буфером содержание олигомера снижается; при концентрации белка в 16 раз меньше исходной олигомер в препарате уже не обнаруживается. При разбавлении препарата уменьшение содержания 32S-олигомера сопровождается увеличением относительного содержания 6S-компонента. Следовательно, при разбавлении раствора олигомер распадается на отдельные молекулы тубулина. Реакция распада олигомера в наших условиях довольно быстрая: за 30 мин от раз-

Влияние разбавления раствора на относительное содержание олигомера тубулина *

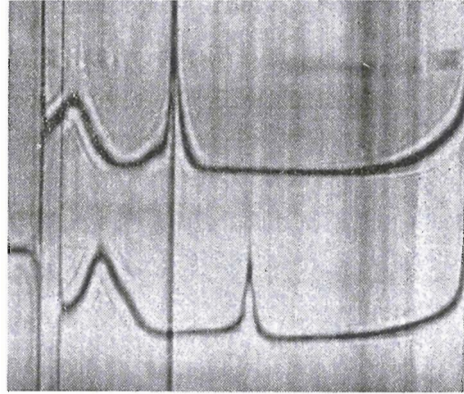
Концентрация белка по отношению к исходному раствору	Относительное содержание компонентов, %		Концентрация белка по отношению к исходному раствору	Относительное содержание компонентов, %	
	димер	олигомер		димер	олигомер
1 (6,5 мг/мл)	23	77	1/8	80	20
1/2	49	51	1/16	100	0
1/4	68	32			

* При аналитическом ультрацентрифугировании растворов использовали двухлучевую абсорбционную ультрафиолетовую оптику. Скорость вращения ротора 48 000 об/мин, температура ротора 20°. В таблице даны результаты одного из опытов.

бавления препарата до достижения при аналитическом ультрацентрифугировании полной скорости вращения ротора олигомер успевает полностью диссоциировать.

Мы проверили обратимость реакции диссоциации олигомера. Для этого разбавленный в 16 раз раствор тубулина, в котором олигомер уже не обнаруживается, был сконцентрирован путем осаждения сульфатом аммония. Аналитическое центрифугирование сконцентрированного препарата показало значительное количество олигомера тубулина (рис. 4). Распад олиго-

Рис. 4. Шлирен-диаграмма разбавленного и вновь сконцентрированного препарата тубулина. Верх — исходный препарат, низ — препарат тубулина, разбавленный в 16 раз, а затем вновь сконцентрированный. Скорость вращения ротора 56 100 об/мин, угол наклона фазовой пластинки 60°, температура 20° (снимок сделан через 20 мин после достижения полной скорости вращения ротора)



мера тубулина при разбавлении раствора и его появление при обратном концентрировании свидетельствуют о существовании динамического равновесия между тубулином и его олигомером.

Если в препарат тубулина, содержащий смесь 6S-компонента и олигомера, добавить СТР и этиленгликоль-бис-(2-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусную кислоту (EGTA) до концентрации 1 мМ [1] и инкубировать его при 25°, то уже через 30—60 мин после начала инкубации в препарате, по данным электронной микроскопии, обнаруживается значительное количество микротрубочек. Результаты аналитического центрифугирования такого препарата представлены на рис. 5. Как и следовало ожидать, при полимеризации в препарате появляется тяжелый компонент, который осаждается в центрифуге уже при разгоне ротора (рис. 5, а), а затем обнаруживается в виде полосы у дна ячейки. Существенно, что при полимеризации олигомер полностью исчезает, тогда как часть 6S-тубулина в препарате микротрубочек всегда остается (рис. 5, б). Таким образом, эти опыты показывают, что олигомер тубулина активен в отношении полимеризации и что он не является продуктом неспецифической агрегации белка.

Итак, раствор деполимеризованных микротрубочек представляет собой равновесную смесь молекул тубулина и их олигомера, способного по-видимому, полимеризоваться с образованием микротрубочек. Общая схема полимеризации тубулина, вероятно, может быть описана следующим образом:



хотя в настоящее время мы не можем исключить и другие варианты.

Выводы о существовании равновесия между тубулином и его олигомером и о роли олигомера в образовании микротрубочек подтверждаются данными литературы. Еще в 1968 г. Вейсенбергом был описан 30S-агрегат тубулина, относительное содержание которого зависело от общей концентрации белка в препарате [2]. Киришер с соавт. [3] сообщил о 36S-ассоциате тубулина, имеющем вид двойного кольца, относительная концентрация которого также несколько уменьшалась при разбавлении раствора. Наконец, Бориси и Олмстед [6] при изучении полимеризации тубулина

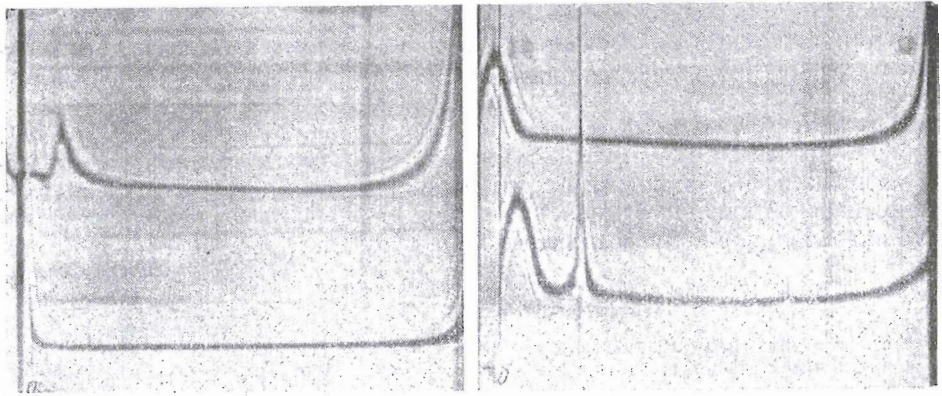


Рис. 5. Шлирен-диаграмма препарата тубулина после полимеризации. Низ — исходный препарат тубулина, верх — препарат тубулина после полимеризации. Концентрация белка — 3,4 мг/мл, скорость вращения ротора 56 100 об/мин, температура 25°, угол наклона фазовой пластинки 60°. Снимки сделаны: *a* — при разгоне ротора (25 000 об/мин); *b* — через 3 мин после достижения полной скорости вращения

В гомогенатах мозга свиней показали, что для образования микротрубочек необходимы структуры с коэффициентом седиментации, большим или равным 30S, имеющие, по-видимому, вид дисков. В свете настоящих данных естественно считать эти «заправки» также олигомерами тубулина, аналогичными 32S-компоненту, изученному нами.

Экспериментальная часть

В работе использовали глицерин («Реахим», ч.д.а.), EGTA («Serva», ФРГ), литиевую соль GTP («Fluka», Швейцария).

Концентрацию тубулина определяли спектрофотометрически (при 275 нм), считая $E_{1\%}^{1\text{см}} = 12$ [8].

Аналитическое центрифугирование проводили в ультрацентрифуге модели E («Beckman», США), оснащенной сканирующей двухлучевой абсорбционной ультрафиолетовой и шлирен-оптикой. Оптическая плотность образцов при 280 нм составляла в зависимости от целей опыта 0,5—10 ОЕ. Поэтому длину волны при использовании абсорбционной оптики подбирали так, чтобы оптическая плотность образца в начале центрифугирования составляла ~ 1 ОЕ.

Тубулин выделяли из мозга крупного рогатого скота по модифицированному нами методу «полимеризации-деполимеризации» [5]. Для этого свежий мозг немедленно после получения помещали в лед. Примерно через 1,5 ч после забоя животных мозг гомогенизировали на холоду. Гомогенат разводили 50 мМ калий-фосфатным буфером (рН 6,7), содержащим 0,5 мМ $MgCl_2$ (из расчета 1 мл буфера на 1 г мозга), и осветляли центрифугированием при 15 000—20 000 *g* в течение 30 мин (температура ротора 2—4°). К супернатанту добавляли GTP до концентрации 0,1 мМ и центрифугировали его еще раз (100 000 *g*, 30 мин, 2—4°). Осветленный гомогенат разбавляли в 2 раза раствором глицерина, EGTA и $MgCl_2$ так, чтобы конечные концентрации этих веществ составляли 4 М, 1 и 0,5 мМ соответственно. Полученный раствор инкубировали 2—4 ч при 37° для полимеризации тубулина, а затем центрифугировали (100 000 *g*, 1 ч, 25—30°) для осаждения микротрубочек, образующихся в результате полимеризации. Осадки суспендировали в калий-фосфатном буфере (25 мМ, рН 6,7), содержащем 0,5 мМ $MgCl_2$, 4 М глицерин и 1 мМ EGTA из расчета 1 мл буфера на осадок из 10 мл взвеси микротрубочек.

Полученный таким образом препарат микротрубочек хранили при 5° не более 2—3 недель. При этом сохранялась колхицинсвязывающая актив-

ность тубулина (тестируемая по связыванию на DEAE-фильтрах [7]) и способность его к полимеризации.

Для получения раствора тубулина микротрубочки непосредственно перед опытом осаждали центрифугированием (160 000 g, 1 ч, 25—30°), суспендировали в половинном объеме 50 мМ калий-фосфатного буфера с 0,5 мМ $MgCl_2$ и добавляли GTP до 0,1 мМ. Затем суспензию микротрубочек деполимеризовали, инкубируя ее при 0° 30 мин, и осветляли центрифугированием (160 000 g, 30 мин, 2—4°). Осветленный раствор тубулина при 280 нм имел оптическую плотность 8—10 ОЕ. Поскольку осадок микротрубочек суспендировали в сравнительно небольшом объеме буфера, в исходном препарате тубулина оставалось некоторое количество глицерина и EGTA (~1 М и 0,25 мМ соответственно).

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле препарат диализовали против 0,1 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,0) с 1%-ным додецилсульфатом натрия и 1%-ным 2-меркаптоэтанолом, прогревали 2 мин при 100° и вносили по 100 мкг в 0,1 мл в трубки диаметром 6 мм с 5%-ным полиакриламидным гелем, содержащим 0,1% додецилсульфата натрия. Электрофорез проводили в течение 5 ч при комнатной температуре и токе 8 мА на трубку. Гели фиксировали 20%-ной сульфосалициловой кислотой и окрашивали кумасси ярко-голубым.

Чтобы выяснить влияние разбавления на относительное содержание олигомера тубулина (таблица), к исходному препарату добавляли 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 6,7), содержащий 0,5 мМ $MgCl_2$, 1 М глицерин, 0,1 мМ GTP и 0,25 мМ EGTA, до требуемой концентрации белка.

Чтобы проверить обратимость реакции диссоциации олигомера (рис. 4), исходный препарат тубулина, разведенный в 16 раз 50 мМ калий-фосфатным буфером с 0,5 мМ $MgCl_2$, концентрировали путем высаливания сульфатом аммония. Для высаливания к раствору белка добавляли сухой сульфат аммония до 50%-ного насыщения; образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (20 000 g, 20 мин, 4°) и суспендировали его в буфере, содержащем 0,1 мМ GTP и 1М глицерин (1 мл на осадок, полученный из 25 мл разбавленного раствора). Сульфат аммония удаляли диализом против того же буфера в течение ночи при 4°.

В эксперименте по изучению полимеризации тубулина (рис. 5) в препарат перед аналитическим центрифугированием добавляли GTP и EGTA до 1 мМ концентрации и инкубировали 30 мин при 25°.

Авторы благодарны А. С. Спирину и В. О. Шликитеру за постоянное внимание и обсуждение настоящей работы.

Авторы признательны также В. Я. Черняку и сотрудникам отдела седиментационного анализа Межфакультетской лаборатории биорганической химии МГУ за проведение опытов на аналитических ультрацентрифугах и Е. Д. Богдановой и Г. А. Кузнецовой за превосходную техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weisenberg R. C. (1972) *Science*, **177**, 1104—1105.
2. Weisenberg R. C., Borisy G. G., Taylor E. W. (1968) *Biochemistry*, **7**, 4466—4479.
3. Kirschner M. W., Williams R. C., Weingarten M., Gerhart J. C. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1159—1167.
4. Borisy G. G., Olmsted J. B. (1973) *Annual Rev. Biochem.*, **42**, 507—540.
5. Shelanski M. L., Gaskin F., Cantor C. R. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 765—768.
6. Borisy G. G., Olmsted J. B. (1972) *Science*, **177**, 1196—1197.
7. Wilson L., Bryan J., Ruby A., Mazia D. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 807—814.
8. Weisenberg R. C., Timasheff S. N. (1970) *Biochemistry*, **9**, 1410—1416.

Поступила в редакцию
4.VIII.1975

EQUILIBRIUM ASSOCIATION OF MICROTUBULE PROTEIN

GELFAND V. I., ROSENBLAT V. A.

Department of Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Microtubule protein (tubulin) obtained from bovine brain by the polymerization method of Shelanski exists in solution as two aggregation forms. The first form is a tubulin dimer with sedimentation coefficient of about 6S, the second one is 32S oligomer. The latter has a double-ring shape with a diameter of approximately 40 nm. The relative concentration of oligomer depends on absolute concentration of protein in solution (dilution leads to dissociation of oligomer, whereas the increase in concentration results in its assembly). This finding provides evidence for the existence of dynamic equilibrium between the dimer and oligomer. Under the conditions of the microtubule self-assembly (i. e. removal of Ca^{2+} and addition of GTP) the oligomer completely disappears but some of 6S dimers is still present. It is suggested that 32S oligomer is an intermediate in the microtubules formation from 6S tubulin.
