

Аксиров Аслан Мухаметханович

**АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ДИФФУЗИИ КАЛИЯ
В ЗИГОТЕ МЫШИ**

03.00.02 - Биофизика

Автореферат

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук**

Пуццоно - 2005

Работа выполнена в лаборатории термодинамики и энергетики биологических систем
Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Научные руководители:

доктор биологических наук

Погорелов Александр Григорьевич

кандидат физико-математических наук

Гольдштейн Дмитрий Вадимович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук профессор

Нестеров Виктор Павлович

доктор физико-математических наук

Гольдштейн Борис Наумович

Ведущая организация

**Институт общей и неорганической
химии им. Н.С. Курнакова РАН**

Защита состоится " 18 " мая 2005 г в 13 часов 30 мин на заседании диссертационного
совета Д-002.093.01 при Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН по
адресу

142290 г Пушкино Московской обл ул Институтская 3, большой конференц-зал

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института теоретической и
экспериментальной биофизики РАН

Автореферат разослан " _____ " _____ 2005 г

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат физико-математических наук

Ланьна Н.Ф.

Общая характеристика работы

Актуальность темы Из феноменологической теории следует что митотическое деление клетки сопряжено с рядом условий повышение внутриклеточной концентрации натрия уменьшение по абсолютной величине мембранного потенциала приобретение клеткой сферической формы Одновременно было показано что подготовка к митозу проходит на фоне трансформации калиевого гомеостаза клетки Этот процесс вызывает изменение концентрации калия во всей цитоплазме и поэтому протекает относительно медленно растягиваясь во времени на все фазы клеточного деления

Первый клеточный цикл эмбриональной клетки (зиготы) качественно отличается от митоза специализированной клетки

Уникальность зиготы млекопитающих во многом определяют условия окружающей ее среды Развитие зародыша млекопитающих протекает при гипоксии Однако для зиготы гипоксические условия представляют составляющую нормального развития в то время как для специализированной клетки - экстремальную ситуацию Возможно это является причиной того что на начальной стадии доимплантационного развития у раннего зародыша редцировано окислительное фосфорилирование - эффективная система синтеза АТФ При этом в полном объеме еще не сложился и комплекс ферментов поддерживающий гликолиз

Трансформация системы транспорта ионов в раннего эмбриона продолжается весь преимплантационный период развития эмбриона Например в зиготе не показан механизм Na^+/H^+ обмена который обязательно присутствует на мембране дифференцированной клетки Вплоть до стадии ранней бластоцисты прогнозируется наличие внутриклеточного дефицита калия обусловленного низким уровнем Na/K -АТФазы Пока не ясно на стадии транскрипции трансляции или модификации белков встроенных в мембрану клетки осуществляется комплектование ионотранспортирующей системы в течение первого клеточного цикла

Особенность в обеспечении зиготы энергией отсутствие в нее системы транспорта ионов характерной для специализированной клетки наличие специфических ионотранспортирующих систем предполагает формирование особого калиевого гомеостаза Конкретикой в прогнозе об изменении содержания калия в одноклеточном эмбрионе вносит 240 pS K^+ канал Эффективность и длительность активной фазы этого канала позволяют предположить колебания концентрации цитоплазматического калия в течение первого клеточного цикла Учитывая свойства 240 pS K^+ канала колебания должны быть синхронизированы с фазами развития зиготы и иметь амплитуду достаточную для того чтобы индуцировать молекулярно-генетические изменения в эмбрионе Изложенное выше определяет актуальность анализа распределения цитоплазматического калия в зиготе млекопитающих

Цель и основные задачи исследований Цель настоящей работы заключалась в оценке параметров диффузии иона K^+ в условиях цитоплазмы зиготы мыши на основе результатов электронно-зондового микроанализа и создании математической модели распределения цитоплазматического калия в течение первого клеточного цикла. В соответствии с этим решались следующие основные задачи:

- разработка метода цифровой регистрации кривой распределения характеристического рентгеновского излучения K Ka вдоль линии сканирования по клетке,
- расчет локальной концентрации калия по кривым распределения интенсивности характеристического рентгеновского излучения K Ka,
- получение кривых распределения концентрации калия для цитоплазмы зиготы мыши на разных фазах развития эмбриона,
- создание математического алгоритма анализа диффузии калия в условиях цитоплазмы зиготы

Научная новизна. Получены кривые распределения концентрации калия в цитоплазме зиготы мыши на разных фазах развития эмбриона. Выявлено гетерогенное распределение цитоплазматического калия в зиготе мыши. Впервые обнаружено, что пространственное распределение депо калия в одноклеточном эмбрионе мыши имеет радиальную симметрию и меняется со временем. Определен порядок величины коэффициента диффузии калия в цитоплазме зиготы мыши. Разработана математическая модель K^+ обусловленной полимеризации актина в зиготе мыши.

Практическая значимость. Разработан метод цифровой регистрации кривых распределения интенсивности рентгеновского излучения для кристалл-дифракционных спектрометров сканирующего электронного микроскопа JSM-U3 (JEOL Япония). Разработан метод перевода в цифровой вид кривых распределения интенсивности рентгеновского излучения, записанных в аналоговой форме на фотоматериале. Предложен алгоритм количественной обработки кривых распределения интенсивности рентгеновского излучения. Предложен алгоритм оценки коэффициента диффузии калия в клетке по данным электронно-зондового микроанализа.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на совместном заседании секций Ученого совета ИТЭБ РАН «биосинергетика» и «биологическая подвижность», XIV Российском симпозиуме по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел (Черноголовка 2005) и V Сибирском физиологическом съезде (Томск, 2005).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 2-х глав собственных исследований, заключения, выводов и указателя литературы. Работа изложена на 122 страницах, включает 7 таблиц и 22 рисунка. В списке цитируемой литературы указано 234 источника.

Результаты исследования и их обсуждение

Изменение концентрации калия в зиготе мыши на фазах первого клеточного цикла (анализ цикличности изменения калия в цитоплазме зиготы)

Для ооцита и зиготы мыши характерна низкая внутриклеточная концентрация калия. Причиной этого может быть интенсивный пассивный транспорт иона K^+ из эмбриональной клетки. Например, показано, что первый клеточный цикл мыши синхронизирован с работой калиевого канала ($240 \text{ pS } K^+$) на мембране эмбриональной клетки. При этом активность $240 \text{ pS } K^+$ канала не зависит от хромосомального цикла. Предполагается, что канал регулируется цитоплазматическим осциллятором, опосредовано взаимодействующим с ядерным циклом через циклин зависимую киназу- cdk1. В качестве посредника между cdk1 и $240 \text{ pS } K^+$ каналом рассматривается митогенактивируемая протеинкиназа, которая активна у ооцита на метафазе II мейоза и в митозе первого клеточного цикла. Ингибирование канала в начале S фазы и на S/G2 переходе, по-видимому, обусловлено активацией тирозинкиназы.

$240 \text{ pS } K^+$ канал относится к типу "макси", совмещая высокую ионную избирательность и высокую проводимость. Эффективность канала и длительность его активного состояния позволяют предположить, что в течение подготовки зиготы к первому делению дробления $240 \text{ pS } K^+$ канал индуцирует циклические изменения концентрации калия во всей клетке. Данная гипотеза вполне обоснована, если учесть, что быстрая компенсация потерь калия невозможна, так как заметная активность Na/K-АТФазы проявляется только на стадии бластоцисты.

Действительно, анализ литературных данных показывает, что концентрации калия в зиготе мыши на G₁/S фазе увеличивается почти в 2.5 раза относительно ооцита и затем, уменьшается более чем в три раза на профазе митоза. В таблице 1 суммированы результаты электронно-зондового микроанализа цитоплазматической концентрации калия в одноклеточном эмбрионе мыши.

Таблица 1. Концентрация (мМ) калия в цитоплазме ооцита и зиготы на фазах начальной стадии развития эмбриона мыши линии Swiss, определенная методом электронно-зондового микроанализа *

Фаза развития	КАЛИЙ (мМ)
Ооцит на метафазе II мейоза	60±4
Зигота в начале фазы G ₁	67±7
Зигота на фазе G ₁ /S	117±5
Зигота на фазе S	148122
Зигота на фазе G ₂	109±16
Зигота на профазе митоза (M ₁ ,p)	44±7

(* данные представлены как среднее и среднеквадратичное отклонение (Гольдштейн. Аксинов и др, 2005)

Из сравнения данных видно, что уже в начале G₁ фазы концентрация калия в зиготе не значительно, но отличается от таковой в ооците (табл 1) В течение первого клеточного цикла цитоплазматическая концентрация калия претерпевает существенные изменения При блокировании 240 pS K⁺ канала на G₁/S переходе содержание элемента меняется от 66 мМ (начало d фазы) до 148 мМ (S фаза) Этот факт свидетельствует о высокой активности Na/K-АТФазы в этот период развития зиготы, достаточной чтобы поддерживать концентрацию калия в эмбриональной клетке на уровне -150 мМ Указанная величина значительно выше цитоплазматической концентрации калия, регистрируемой в дифференцированной клетке ткани

Следует отметить низкий уровень внутриклеточного калия в начале G₁ фазы зиготы (табл 1) Близкая по величине концентрация калия также наблюдается при переходе из G₂ фазы в профазу митоза (-44 мМ) Для обеих ситуаций характерным является начало деконденсации ДНК сперматозоида или ядра зиготы, соответственно То, в какой степени уменьшение цитоплазматического калия представляет собой необходимый атрибут подготовки ДНК к репликации, требует дополнительных исследований Однако известно, что присутствие катиона K⁺ в физиологических концентрациях стабилизирует молекулу ДНК, предотвращая ее деградацию и рекомбинацию

Временные характеристики колебаний внутриклеточного калия зиготы мыши (табл 1) отличаются от параметров известного кальциевого осциллятора Последний активен в первые часы после оплодотворения, когда формируется мужской пронуклеус Изменение же калия в зиготе мыши совпадает с фазами 240 pS K⁺ канала, который активен в M/G₁ фазе и блокируется в начале S фазы или на S/G₂ переходе

Анализ литературных данных позволяет прийти к заключению, что фазы первого клеточного цикла мыши синхронизированы с изменением внутриклеточной концентрации калия Причиной этого может быть, например, цикличность в работе 240 pS K⁺ канала "Калиевые" колебания способны оказывать самое разнообразное влияние на зиготу, участвуя в регуляции физиологического состояния клетки Изменение концентрации иона K⁺ индуцирует ключевые молекулярно-генетические трансформации экспрессию генов, рекомбинацию/деградацию ДНК, (де)полимеризацию актина - основного стрз ктурного элемента цитоскелета

Расчет коэффициента диффузии калия в зиготе мыши.

[неоднородное распределение калия в зиготе- модель простой диффузии K⁺ в эмбрионе мыши)

Принято считать что скорость движения иона K⁺ в цитоплазме соизмерима с его скоростью в водном растворе с коэффициентом диффузии — $2 \cdot 10^{10} \text{ м}^2/\text{с}$ При размерах зиготы

~60 мкм это означает отсутствие заметного градиента концентрации калия между периферией и центральной областью клетки, так как различие между зонами цитоплазмы нивелируется за доли секунды. Если высказанное предположение верно, то в течение первого клеточного цикла, который длится почти сутки, следует ожидать плавное изменение уровня внутриклеточного калия с гомогенным распределением элемента по цитоплазме. Однако предположение об однородном распределении калия в цитоплазме зиготы достаточно гипотетично, так как известно, что калий депонируется клеточными структурами. Анализ концентрации элемента по зиготе также не подтверждает наличие однородного распределения калия в одноклеточном эмбрионе мыши (табл 2).

Таблица 2. Концентрация (мМ) калия в кортикальной и центральной зонах цитоплазмы зиготы мыши линии Swiss на фазах ранней стадии развития эмбриона, определенная методом электронно-зондового микроанализа*.

Фаза развития клетки	Периферическая цитоплазма	Центральная зона цитоплазмы
Ооцит на метафазе II	61±4	60±4
G ₁ фаза зиготы	70±8	66±8
G ₁ /S фаза зиготы	254±18	117±6
S фаза зиготы	145±20	148±22

(* данные представлены как среднее и среднеквадратичное отклонение (Погорелов Аксириков, и др., 2005)

Видно (табл 2), что на G₁/S и G₁/M переходе наблюдается значимое различие между периферической цитоплазмой эмбриона и его центральной частью. Эти данные свидетельствуют о том, что параметры диффузии иона K⁺ в условиях зиготы не соответствуют таковым для водного раствора. При расчете коэффициента диффузии калия в зиготе с учетом формы клетки, использовали трехмерную модель диффузии в однородном шаре. Задача решалась в среде MatLab с применением приложения Tool Box Partial Equation.

Анализ пространственно-временных особенностей распределения цитоплазматического калия в зиготе (табл 2) позволил сформулировать граничные и начальные условия для расчета коэффициента диффузии. В начальный момент времени калий в цитоплазме распределен равномерно с концентрацией как у ооцита на метафазе II мейоза. В примембранной области поддерживается высокий уровень элемента, соответствующий его содержанию в периферической области на G₁/S фазе. На указанном интервале первого клеточного цикла 240 pS K^{*} канал инактивирован, и, в результате, формируется поток калия, направленный от мембраны зиготы к ее центру. По завершении S фазы концентрация в центральной части зиготы увеличивается до ~120-150 мМ.

По нашей оценке коэффициент диффузии для калия в цитоплазме зиготы оказался на 4-5 порядков меньше величины, которая приводится для иона K^+ в водном растворе ($\sim 2 \cdot 10^9 \text{ м}^2/\text{с}$) Таким образом скорость распространения калия в эмбрионе во много раз медленнее, чем в воде Чем может быть обусловлено данное явление? Около 30% калия в клетке может находиться в связанном виде, что предполагает наличие систем аккумуляции этого элемента Одним из таких механизмов является полимеризация актина, индуцированная увеличением концентрации иона K^+

Модель калий обусловленной полимеризации актина в цитоплазме зиготы мыши

Для объяснения феномена торможения диффузии калия в зиготе мыши нами предложена модель калий обусловленной полимеризации актина Предпосылкой для создания модели была система экспериментальных данных, описывающих физико-химические особенности полимеризации актина и роль этого белка в формировании морфо-функциональных свойств клетки Например, G актин, как правило, локализован в кортикальной цитоплазме, которая претерпевает обратимые изменения характерные для водных растворов полимеров Подобными вязкоупругими свойствами обладает раствор актиновых филаментов

Ряд бактерий для перемещения по цитоплазме используют клеточный актин Этот факт свидетельствует о том, что в клетке запасено актина достаточно, чтобы связать заметное количество основного цитоплазматического катиона K^+ В физиологических условиях фактором, определяющим скорость и полноту полимеризации белка, является ион K^+ При переходе в F форму актин связывает катион, после чего этот пул калия диффундирует в составе молекулы полимера На рисунке 1 схематично представлена последовательность событий, происходящих в процессе полимеризации актина

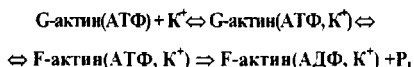


Рис. 1. Последовательность событий, реализующихся при полимеризации актина

В результате полимеризации образуется структура подобная гелю, которую формируют актиновые филаменты Упругие характеристики таких структур объясняют наличием взаимодействия между нитями F актина Однако очень медленная диффузия полимера, наряду с высокой концентрацией иона K^+ , также рассматривается, как причина стабильности актинового геля В последнем случае взаимодействием между молекулами белка пренебрегают

Таким образом, основным положением предложенной модели калий обусловленной полимеризации актина в зиготе является вывод о том, что ион K^+ инициирует создание геле

подобных актиновых структур. Стабильность этих компартментов обусловлена низкой скоростью диффузии F актина, полимерная форма которого поддерживается локально высокой концентрацией калия. Следует отметить, что коэффициент диффузии, рассчитанный нами для калия в условиях зиготы близок по значению к величине параметра, определенного для F актина. Это совпадение подтверждает адекватность предложенной модели калий обусловленной полимеризации актина в зиготе.

**Модель гетерогенного распределения калия в зиготе мыши
(Формирование в клетке структуры, депонирующей калий)**

Особенностью развития одноклеточного эмбриона мыши является $240 \text{ pS } K^+$ канал, который циклически меняет свою активность. После оплодотворения канал инактивируется, что вызывает увеличение потока иона K^+ , направленного в клетку. В соответствии с предложенной нами моделью, такая ситуация инициирует процесс полимеризации актина в примембранной области зиготы, в результате чего возникает градиент мономерной формы белка. С учетом быстрой диффузии G актина, это приводит к концентрации актина у цитоплазматической мембраны в виде F актин (K) комплекса. Схематично описанный процесс представлен на рисунке 2.

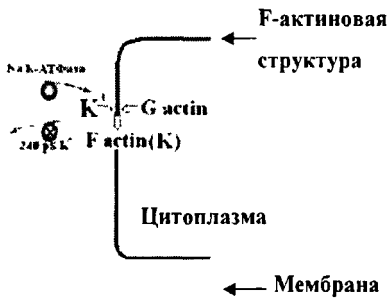
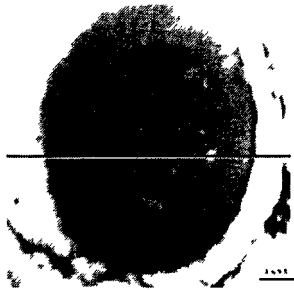


Рис. 2. Механизм образования в зиготе структуры, состоящей из F актин (K) комплекса. Формирование структуры обусловлено полимеризацией актина, инициированной локальным увеличением концентрации иона K^+ при инактивации $240 \text{ pS } K^+$ канала на G_I/S переходе.

Высокие скорости деполимеризации F актина и диффузии G актина способны обеспечить разборку полимерной структуры в одном месте клетки и быструю доставку мономера в компартмент, где формируются условия для локальной полимеризации. При этом в клетке одновременно возможны два потока актина. Первый обусловлен перемещением мономера белка. Гораздо более медленный поток актина поддерживается диффузией его полимерной формы.



А

Рис 3 (А) Изображение интактной зиготы мышцы в самом начале G_i фазы полученное на 2 мкм срезе в режиме прошедших электронов Шкала нанесенная на рисунке соответствует 4 мкм (Б) кривая распределения калия вдоль линии сканирования регистрации отмеченной на рисунке (А)



Б

Используемая для зиготы сферическая симметрия соответствует форме клетки но не вполне согласуется с функциональными характеристиками мембраны эмбриона На поверхности зародыша расположено редуцированное тельце и область оплодотворения Указанные участки отличаются по своим свойствам от поверхности остальной мембраны что модифицирует картину сферической симметрии принятой нами для диффузии калия в зиготе С учетом этого замечания профиль распределения калия по клетке на срезе плоскость которого проходит произвольным образом может быть асимметричным

Модель диффузии ионов К в активном геле

В предыдущем разделе было показано что повышение концентрации иона K^+ в мембране зиготы индуцированное ингибированием 240 pS K^+ канала инициирует образование плотной структуры Этот вновь образованный клеточный компартмент формируется при полимеризации актина и способен накапливать калий что задерживает распространение элемента по направлению к центру клетки Однако лишь небольшая часть иона K^+ связывается F актином Основной ПУТ остается в форме катиона предотвращая деполимеризацию полимера (рис 4) При этом калий в составе F актин (К) комплекса распространяется по клетке в процессе медленной диффузии полимера

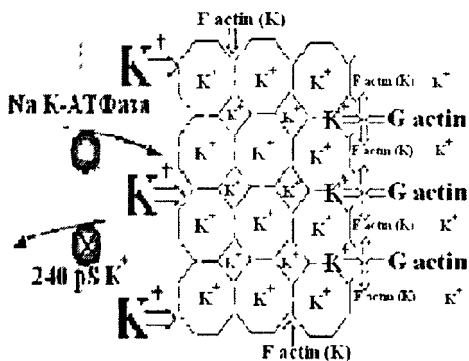


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая механизм формирования у мембраны зиготы структуры, образованной F актин (K) комплексом. Увеличение размеров структуры на G/S переходе обусловлено диффузией иона K^+ к центру клетки, инициированной накоплением калия в области цитоплазматической мембраны эмбриона в результате инактивации 240 pS K^+ канала и работы Na/K-АТФазы.

Движение основного пула калия, депонированного структурой в виде свободного иона K^+ тормозится ячеистым строением актинового геля. Диффузия катиона на G/S переходе приводит к полимеризации актина на границе геля от центра клетки, что сопровождается дополнительной концентрацией актина (рис 4). Этот процесс ограничен количеством в клетке G актина который изначально относительно гомогенно распределен по цитоплазме. Фактор диффузии F актина и иона K^+ со временем приводит к увеличению размеров актинового геля и «размыванию» пика калия, аккумулированного данной структурой.

По завершении полимеризации практически весь актин концентрируется в геле и в результате содержание мономера белка в остальной цитоплазме понижается до критического уровня при котором невозможно образование F актина. Критическая концентрация определяется величиной в несколько микромолей мономера белка.

Характерное распределение калия в зиготе на конечном отрезке Gj/S перехода представлено на рисунке 5. Интересно что уровень калия регистрируемый в периферийной зоне зиготы на Gi/S фазе (табл 2) близок по величине к концентрации K^+ оптимальной для полимеризации G актина in vitro.

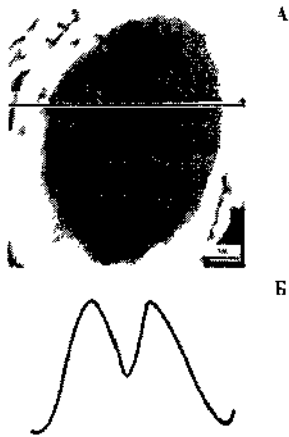


Рис 5 (А) Изображение интактной зиготы мыши на G1/S переходе полученное на 2 мкм срезе в режим прошедших электронов Шкала нанесенная на рисунке соответствует 5 мкм (Б) кривая распределения калия вдоль линии регистрации отмеченной на рисунке (А)

Предложенная модель калий индуцированной полимеризации актина рассматривает инактивацию 240 pS K^+ канала как причину формирования структуры (геля) у мембраны зиготы. Данная структура концентрирует в себе клеточный актин в виде F актин(K) комплекса и способна препятствовать диффузии иона K^+ к центру эмбриона. Последующее повышение концентрации цитоплазматического калия уже практически не приводит к образованию F актина вне области актинового геля.

Динамическая модель актинового геля

Развитие первого клеточного цикла млекопитающих для которого не характерна быстрая трансформация морфологии и функции эмбриона носит непрерывный характер. Другими словами 240 pS K^+ канал может быть частично активен уже на S фазе что инициирует уменьшение потока иона K^+ в зиготу. На S/G2 переходе по мере дальнейшей активизации канала развивается ситуация которая характеризуется локальным дефицитом калия в периферической цитоплазме (табл 3).

Таблица 3 Концентрация (мМ) калия в кортикальной и центральной зонах цитоплазмы зиготы мыши линии Swiss на фазах заключительной стадии развития эмбриона определенная методом электронно зондового микроанализа*

Фаза развития зиготы	Кортикальная цитоплазма	Центральная зона цитоплазмы
S фаза	145±20 (n=7)	148±22 (n=12)
S/G переход	108±5 (n=3)	109±16 (n=9)
G2 фаза	43±8 (n=4)	44±7 (n=9)

(* данные представлены как среднее и среднеквадратичное отклонение (Погорелов Аксиоров и др 2003)

На рисунке 6 приведено распределение калия по линии проведенной через зиготу мыши на S/G2 переходе

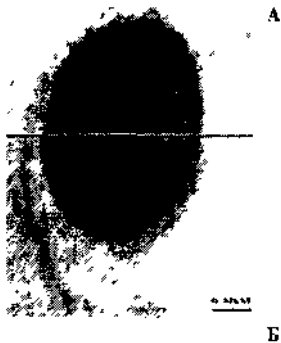


Рис. 6. (А) Изображение интактной зиготы мышцы на S/G2 переходе зиготы, полученное на 2 мкм срезе в режим прошедших электронов. Шкала, нанесенная на рисунке, соответствует 4 мкм. (Б) кривая распределения калия вдоль линии регистрации, отмеченной на рисунке (А).

Видно (табл 2-3 рис 6), что на заключительной стадии первого клеточного цикла в распределении калия наблюдается картина обратная периоду сразу после оплодотворения, когда поток калия направлен в зиготу. Для S/G2 перехода у мембраны клетки регистрируется дефицит калия, обусловленный активизацией $240 \text{ pS } K^+$ канала. В этой ситуации тенденции в поведении актиновой структуры будут определяться деполимеризацией F актина на ее границе со стороны мембраны. В результате образуется поток G актина к центру клетки в направлении высокой концентрации калия и низкой G актина. Последующая реполимеризация актина на внутренней стороне структуры приводит к перемещению зоны F актина к центру зиготы. В рассматриваемой ситуации перемещение границы структуры обусловлено скоростью диффузии встроенного F актина и/или G актина. При этом изменение механических свойств цитоплазмы на границе актиновой структуры, например вязкости или упругости, может способствовать плавному сближению и, в конечном счете, слиянию пронуклеусов на G2 фазе.

Моделирование диффузии калия в зиготе мышцы в условиях калий обусловленной полимеризации актина.

Система приведенная в данной работе, на основе уравнения реакции калийобусловленной полимеризации актина



имеет вид

$$\frac{dK}{dt} = \nabla(D_1(F)\nabla K) - k1 * K * G + k2 * G_k + k3 * F \quad (2)$$

$$\frac{dG}{dt} = \nabla(D_2(F)\nabla G) - k1 * K * G + k2 * G_k + k3 * F \quad (3)$$

$$\frac{dG_k}{dt} = \nabla(D_3(F)\nabla G_k) + k1 * K * G - k2 * G_k - k4 * G_k + k5 * F - k6 * G * F \quad (4)$$

$$\frac{dF}{dt} = \nabla(D_4(F)\nabla F) + k4 * G_k - k3 * F - k5 * F + k6 * G * F \quad (5)$$

Переменные K, G, G_k, F - концентрации калия, G-актина, G-актин-калиевого комплекса и F-актина соответственно

В левой части первого уравнение системы (2-5) скорость изменения концентрации калия (переменная K) В правой части 1 член отражает диффузию калия, второй - образование G-актин-калиевого комплекса, третий - распад G-актин-калиевого комплекса, четвертый - распад F-актина

В левой части второго уравнения системы скорость изменения концентрации G-актина (переменная G) Первый член правой части отражает диффузию G-актина. второй образование G-актин-калиевого комплекса, третий - распад G-актин-калиевого комплекса, четвертый связан с распадом F-актина

Левая часть третьего уравнения записана для скорости изменения концентрации G-актин-калиевого комплекса (переменная G_k) В правой части первый член отражает диффузию G-актин-калиевого комплекса, второй - образование G-актин-калиевого комплекса из калия и актина, третий связан с распадом G-актин-калиевого комплекса, четвертый отражает процесс образования филаментов F-актина в результате нуклеации, пятый приток в результате деполимеризации F-актина, шестой член связан с образованием F-актина в процессе элонгации

Левая часть четвертого уравнения записана для скорости изменения концентрации F-актина В правой части первый член отражает диффузию F-актина, второй- образование F-актина, как результат нуклеации, третий распад F-актина, четвертый - образование F-актина в результате элонгации

Все входящие в систему (2-5) параметры задаются исходя из следующих допущений

- 1 Зигота мыши имеет шарообразную форму и, поэтому, не нарушая общности, можно рассматривать зиготу как область, ограниченную сферой радиуса R, где $R \approx 25$ мкм
- 2 В начальный момент времени мономеры G-актина равномерно распределены в области при концентрации $G_0 \approx 10$ мг/мл что соответствует физиологической концентрации актина и актинподобных веществ
- 3 F-актин концентрации $F_0 \approx 1$ мг/мл равномерно распределен вдоль границы области

$$4 \quad k1 \approx 0,023(\text{моль}^{-1}\text{с}^{-1}) \quad)$$

$$k2 = \frac{1}{8 \times 60}(\text{с}^{-1}) \approx 0,0021(\text{с}^{-1}) \quad (7)$$

5 В экспериментах in vitro показано, что константа скорости диссоциации F-актина (0,21 сек⁻¹) остается постоянной величиной, как при полимеризации, так и при деполимеризации филаментов

6 Константа скорости сборки F-актина равна $5 \times 10^3 \cdot 10^7$ (моль⁻¹ сек⁻¹)

7 Константа диффузии калия и мономера G-актина в водном растворе $D_{\text{о}'} \cdot 2 \times 10^9$ м²/с (Кикоин, Таблицы физических величин, 1976) и $D_{\text{г}} \cdot 5,3 \times 10^{10}$ м²/с соответственно

8 Поток калия через границу области определяется из величины количества калия в зиготе при $t=|T|=8$ ч установленной экспериментально $|K_{\text{о}}| = 0,65 \times 10^{-10}$

Решение системы (2) - (5) ищется при следующих начальных и граничных \ словиях

$$\bar{n} \frac{d}{d\bar{r}} K |_{\bar{r}} = K_{\text{о}}, \quad (8)$$

$$\bar{n} \frac{d}{d\bar{r}} G |_{\bar{r}} = 0, \quad (9)$$

при $t \in [0, T_1]$

$$\bar{n} \frac{d}{d\bar{r}} G_{\text{к}} |_{\bar{r}} = 0, \quad (10)$$

$$\bar{n} \frac{d}{d\bar{r}} F |_{\bar{r}} = 0: \quad (11)$$

$$K |_{\text{гн}} = 0, \quad (12)$$

$$G |_{\text{гн}} = G_{\text{г}}, \quad (13)$$

при $t \in L$

$$G_{\text{к}} |_{\text{гн}} = 0 \quad (14)$$

$$F |_{\text{гн}} = 0, \quad (15)$$

$$F |_{\text{гн}} = F_{\text{г}}, \quad (16)$$

Соотношения для коэффициентов диффузии имеют вид

$$D(F < F_{\text{г}}) = D \left(1 - \left(\frac{F}{F_{\text{г}} - F + \nu} \right)^{\nu} \right), \quad (17)$$

$$\nu = \frac{F_{\text{г}}}{\left(1 - \frac{D_{\text{г}}}{D_{\text{о}'}} \right)^{1/\nu}}, \quad (18)$$

$$D_i(F > F'_i) = D'_i, i=1, 3,$$

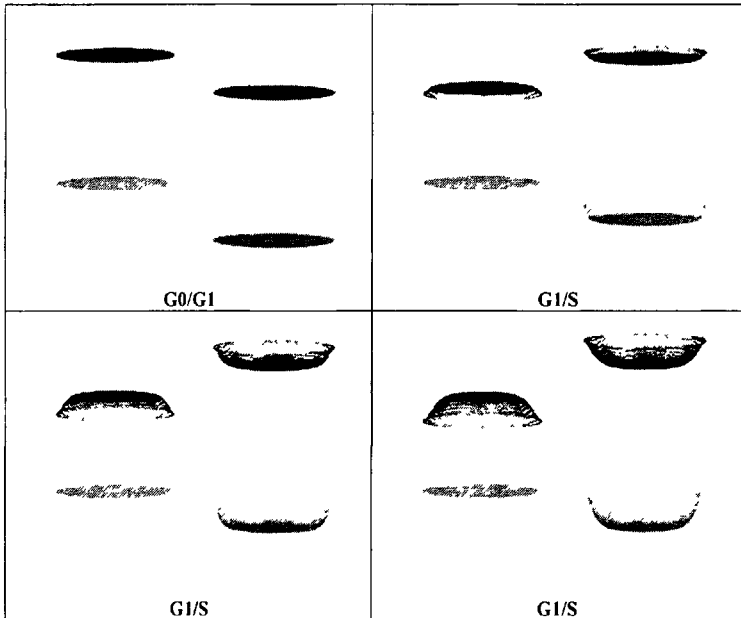
где D'_i - коэффициенты диффузии в водном растворе частиц, α_i - константа, F'_i , D'_i - минимальное значение концентрации и соответствующий ей коэффициент диффузии, при которых диффузия осуществляется в составе сети F-актина. D'_i по величине совпадает с коэффициентом диффузии F-актина

$$D_i = \frac{k_B T_\alpha}{6\pi\eta((k \times F + d)/2)} (\ln 2\nu_i + (1 - \ln 2)(\nu_i)^{-\alpha_i}) \quad (19)$$

$$\nu_i = (k \times F + d) / d, \quad (20)$$

где k - коэффициент пропорциональности связывающий концентрацию F-актина в точке с максимальной длиной филамента в этой точке. L_{\max} - максимальная длина филамента, допустимая при концентрации F , k_B - постоянная Больцмана, T_α - абсолютная температура, η - вязкость раствора, d - диаметр диффундирующего стержня, α_i - константа

На рисунке 7 приведены нормированные данные, рассчитанные на основе модели (2)-(5), (8)-(20) и соответствующие различным фазам развития зиготы мыши. Расчет модели производился в среде MatLab с использованием приложения Tool Box Partial Equation



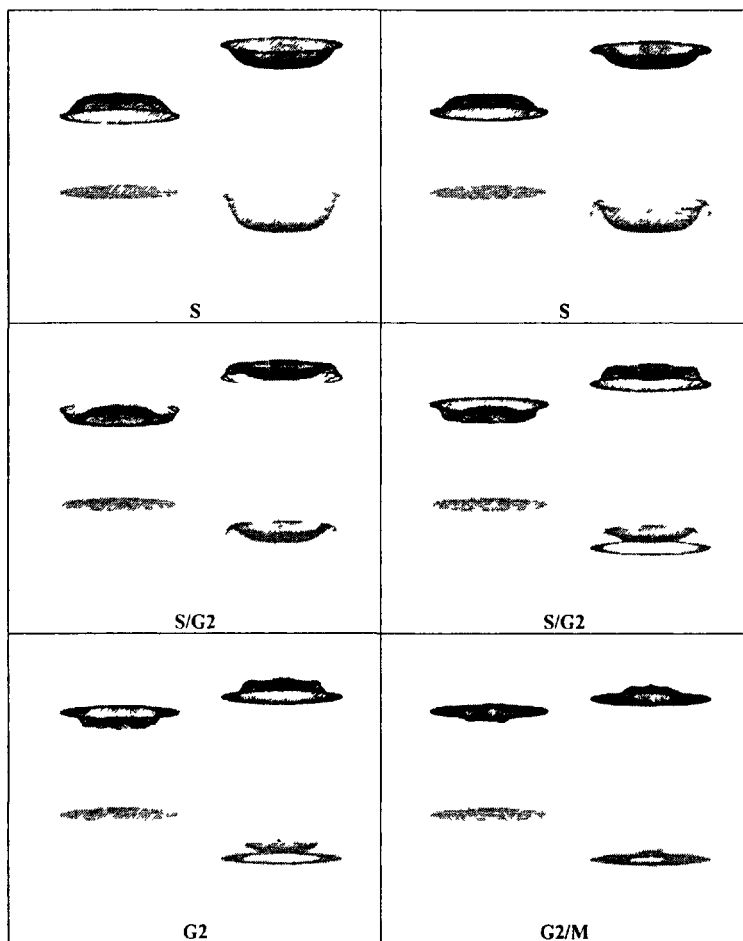


Рис 7 В каждой ячейке представлены профили концентрации G-актина (верхний слева) G-актин калиевого комплекса (нижний слева) F актина (верхний справа) калия (нижний справа) соответствующие различным фазам развития зиготы мышцы рассчитанные на основе модели *Горизонтальные координаты отражают пространство зиготы По вертикали оппозены нормированные концентрации*

Данные полученные на основе расчета модели (рис 7) предполагают что одновременно с неоднородным распределением калия в раннем эмбрионе мышцы должно наблюдаться гетерогенное распределение F-актина Анализ результатов конфокальной микроскопии показывает что действительно по мере развития зародыша мышцы наблюдается неоднородность F-актина по цитоплазме которая видоизменяется со временем РИСУНКИ 8 9

иллюстрируют вышеуказанные особенности поведения F-актина в зиготе мыши

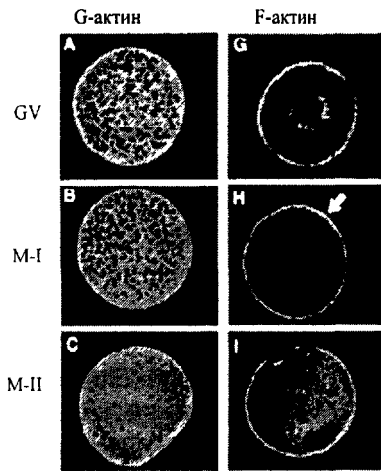


Рис. 8. Распределение G-актина (А-С) и F-актина (G-I) в ооците свиньи на разных стадиях развития

(по WangW-Hetal 2000)

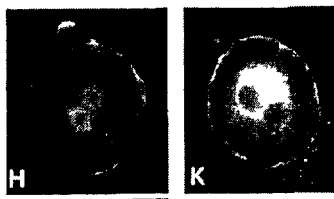


Рис. 9. Проявленность актина убывает по мере сближения прон\кле\сов к центру зиготы (H)

NBD-phalloidin проявляет полимеризованный актин на внешней стороне поверхности пронукле\сов (K)

(по MaroB, 1984)

Заключение

В данном исследовании электронно-зондовый микроанализ применен для изучения распределения калия в зиготе мыши. В результате, было показано наличие гетерогенного распределения калия в кортикальной и центральной цитоплазме эмбриона. Содержание элемента в этих цитоплазматических компартментах меняется на фазах развития зиготы мыши и синхронизировано с цикличностью 240 pS K^+ канала. Анализ пространственно-временных особенностей изменения концентрации калия в клетке позволил оценить его коэффициент диффузии в условиях зародыша, который оказался на 4-5 порядков меньше величины данного параметра в водном растворе. Для объяснения этого факта нами предложена математическая модель обусловленной полимеризации актина в зиготе. В основу модели положены физико-химические свойства белка, полученные из анализа большого объема фактического материала, которые характеризуют поведение актина в условиях *in vitro*. Модель хорошо согласуется с данными биохимических экспериментов по изучению процесса (де)полимеризации актина и F-актин(K) комплекса и морфологическими наблюдениями проведенными методом конфокальной микроскопии.

Выводы

- 1 Предложена модель калий обусловленной полимеризации актина в зиготе мышцы в основе которой лежит изменение во времени потока калия в клетке, обусловленное циклической активностью 240 pS K^+ канала
- 2 Методом электронно-зондового микроанализа получены кривые распределения концентрации калия в цитоплазме зиготы мышцы на разных фазах развития эмбриона Впервые показано, что цитоплазматический калий распределен в зиготе мышцы гетерогенно и его пространственное распределение меняется во времени,
- 3 Предложен алгоритм оценки коэффициента диффузии калия в цитоплазме зиготы мышцы по данным электронно-зондового микроанализа Порядок этого параметра на стадии G1/S перехода оказался на 4-5 порядков выше величины характерной для водного раствора
- 4 Разработан метод цифровой регистрации кривых распределения интенсивности рентгеновского излучения для кристалл-дифракционных спектрометров сканирующего электронного микроскопа JSM-U3 (JEOL Япония)

Основные результаты диссертации опубликованы в работах

- 1 Погорелов А Г , Аксиров А М , Гольдштейн Д В Кантор Г М , Иваницкий Г Р Анализ диффузии и накопления калия в шготе мышцы, обусловленных циклической активностью 240 pS K^+ канала \ \ 2005 Доклады Академии Наук, 400(5) 74-76
- 2 Погорелов А Г Погорелова В Н Хренова Е В , Кантор Г М , Гольдштейн Д В Аксиров А М Количественный рентгеноспектральный микроанализ биоорганических пленок с помощью кристалл-дифракционного спектрометра W2005 Поверхность Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2 49-54
- 3 Погорелов А Г . Г М Кантор Н Ю Сахарова. А А Смирнов А М Аксиров Л М Чайлахян «3-D реконструкция эмбриона мышцы на ранних стадиях предимплантационного развития» \ \ 2005 Цитология 47 (8)
- 4 Aksirov AM V S Gerasimov, V I Kondratyev, V N Korneev, G N Kulipanov N F Lanina, VP Let) agin NA Mezentsev PM Sergienko BP Tolochko VA Trouno\а А А Vazina "Biological and medical application of SR from the storage rings of VEPP-3 and "Sibena-2" The origin of specific changes of small-angle X-ray diffraction pattern of hair and their correlation with the elemental content" \ \ 2001 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 470 380-387
- 5 Гольдштейн Д В , А М Аксиров Г М Кантор, Е И Смольянинова, А Г Погорелов «Роль 240 pS K^+ канала в регуляции цитоплазматической концентрации калия зиготы мышцы» \ \ 2005 Биологические мембраны 22(4)
- 6 Гольдштейн Д В А М Аксиров Г М Кантор, А Г Погорелов Анализ концентрации цитоплазматического калия в одноклеточном эмбрионе мышцы \ \ 2005 Материалы V- Сибирского физиологического съезда (Томск)
- 7 Гольдштейн Д В Аксиров А М Кантор Г М . Погорелов А Г Электронно-зондовый микроанализ концентрации калия в цитоплазме одноклеточного эмбриона мышцы \ \ 2005 XIV Российский симпозиум по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел (Черноголовка)

01.04

842

19 МАР 2005