

Таблица 2. Скорость оседания необработанных и обработанных ультразвуком эритроцитов групп крови А (II) и В (III)

СОЭ		СОЭ	
титр 1:32	титр 1:6	титр 1:64	титр 1:16
4	8	7	8
6	13	5	7
3	5	5	6
4	7	13	16
10	15	5	7
10	12	6	9
8	10	7	9
6.5 ± 2.78		10.375 ± 3.24	
6.86 ± 2.61		8.9 ± 3.09	

При ультразвуковой обработке эритроцитов донорской крови изменяется показатель экспрессии антигенов, что приводит к достаточно выраженным изменениям морфологии, СОЭ эритроцитов, однако ЭФП, эффективный объем, проницаемость ионов K^+ и сродство к кислороду практически не меняются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пирюзян Л. А., Маме Р. Г., Нисенвич М. М., Койфман М. М., Корнеев З. Н. Биофизика, 31, 2, 269—273, 1986.
2. Palade G. E. J. Exp. Med., 155, 245—268, 1982.
3. Pinamonti S., Gallenga P. E. and Mazzeo M. Ultrasonid in Med. & Biol., 8, 6, 1982.
4. Sabatini D. D., Bash K., Barnett R. J. J. Cell Biol., 17, 19—58, 1963.

Поступило 18.XII 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988

УДК 612.714.14

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СОСТОЯНИЯ АКТОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РЕАКЦИИ СУПЕРПРЕЦИПИТАЦИИ

Б. А. ТИКУНОВ

Институт кардиологии им. Л. А. Оганесяна МЗ АрмССР, Ереван

Показано, что двухстадийность СПП и АТФазы скелетномышечного натурального актомиозина является результатом синхронного вовлечения и последовательного «срабатывания» в этих реакциях двух типов функционально неэквивалентных белковых комплексов. Варьируя ионной силой раствора, можно сдвигать равновесие в сторону одного либо другого типа актомиозиновых макромолекул, каждому из которых соответствует определенное структурное состояние как до начала, так и после окончания указанных реакций. Предполагается, что эти структурно-функциональные состояния актомиозина являются отражением наличия в растворе комплекса актина с двумя типами миозиновых конформеров.

Сокращения: СПП—суперпреципитация, НАМ—натуральный актомионин, АО—актиновый-органеллярный.

Յուլյո է տրված, որ կմտնային մկանների բնական ակտոմիոզինի ՍՊ և ԱՏՖ-
 դայի երկուսի փոփոխությունը այդ ուսկցիաներում ֆունկցիոնալ տեսակետից
 ոչ էկվիվալենտ ակտոմիոզինի երկու տիպի կոմպլեքսների օրինարուն ներդրավման
 և հարաբերակա՞ն բժիաղմանն հետևանց է: Լուծույթի իոնական ուժի փոփոխումով
 կարելի է հավասարակշռությունը տեղափոխել երկու սպիտակուցային կոմպլեքս-
 ների առա՛կամ ալն տիպի կողմը, որանցից յուրաքանչյուրին համապատասխանում
 է որոշակի կառուցվածքային վիճակ ինչպես Նշված ուսկցիաների սկզբում. այն-
 պես էլ դրանց ավարտից հետո: Ենթադրվում է, որ ակտոմիոզինի այդ կառուց-
 վածքային-ֆունկցիոնալ վիճակները արտահայտում են յուծույթում երկու տիպի
 միոզինային կոնֆորմերների հետ ակտինի կոմպլեքսի ներկայությունը:

It has been shown that simultaneous drawing in SPP and ATPase and
 consecutive works of two types of actomyosin complex is caused by the
 two stages proceeding in both reactions. The differences in the confor-
 mations (or configurations) and in surface charge distribution for this
 two types of actomyosin complex has been established. It is proposed
 that the two states of actomyosin indicate the (actin—two difference
 myosins conformere) complex presence in solution.

Скелетные мышцы—актомиозин—синергическая—АТФаза—ионная сила

Предположения о том, что многостадийное протекание СПП может быть
 обусловлено неоднородностью актомиозиновых растворов [5, 13] ли-
 бо продолжением фермент-субстратным комплексом ряда промежуточ-
 ных состояний [6, 10, 11], до последнего времени остаются недоказан-
 ными.

Нами ранее было показано, что, варьируя ионной силой раствора,
 можно вызывать противоположные изменения в кинетике отдельных ста-
 дий СПП и АТФазы натурального актомиозина [2]. Было высказано
 предположение о том, что на разных стадиях и эти реакции наступают
 два типа актин-миозиновых комплексов с различными механизмами
 функционирования.

В настоящей работе предпринята попытка обосновать эту точку
 зрения путем составления некоторых структурных параметров акто-
 миозиновых макромолекул в условиях, обуславливающих их различное
 функциональное поведение.

Материал и методики. НАМ получали по описанному методу [8] из бедренных
 мышц беспородных белых крыс. Чистоту препаратов белка проверяли электрофоре-
 тически [12], а концентрацию определяли по A_{280} с помощью калибровочных кривых.

Кинетические кривые СПП и АТФазы НАМ регистрировали на установке, собран-
 ной по схеме [1], в графический расчет характеристических параметров на разных
 стадиях реакций производили согласно описанному ранее методу [2].

Измерения проводили в сантиметровых кюветах при суммарном объеме пробы
 7 мл. В состав реакционной среды входили следующие компоненты: 20 мМ трис-НСІ
 (рН 7.35), 4 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,5 мМ АТФ, 0,05 мМ $MgCl_2$, 1 мг/мл НАМ. Спек-
 тры УФ-абсорбции НАМ и светопоглощения катионного красителя АО записывали
 при 25° на спектрофотометре Specord M-40 (ГДР). Инкубационная среда содержала:
 20 мМ трис-НСІ (рН 7.35), 4 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мг/мл НАМ. АО применялся
 в конечной концентрации 10 μ /мл.

Результаты и обсуждение. Снижая либо повышая ионную силу
 раствора относительно значений, близких к физиологическим, можно
 добиться одностадийности СПП и АТФазной реакции НАМ (рис. 1).
 Вследствие большей продолжительности второй, более медленной ста-

для этих реакций она разграничивается по времени наступления с первой, благодаря чему становится возможным проследить их поочередное появление при совместном протекании.

Более того, при условии двухстадийности СПП увеличение оптической плотности белковой суспензии в ходе второй стадии происходит после завершения первой, т. е. на фоне более высокой плотности раствора. Это обеспечивает «наседание» второй стадии СПП на первую и разделяет их по шкале оптической плотности (рис. 1, а). Аналогичные рассуждения справедливы и в отношении кинетики высвобождения неорганического фосфата в ходе АТФазной реакции (рис. 1, б).

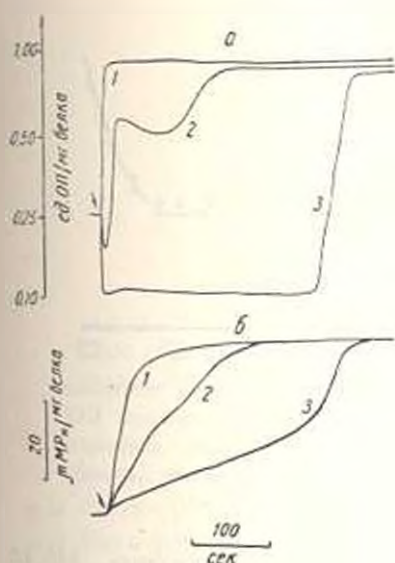


Рис. 1. Кинетические кривые СПП (а) и АТФазы (б) скелетных мышц крыс. 1—0,075 М КСl, 2—0,13 М КСl, 3—0,175 М КСl. Стрелками обозначен момент добавления АТФ.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании двух типов актомиозиновых комплексов, сильно различающихся по функциональным характеристикам. Их синхронное вовлечение в реакции СПП и АТФазы обуславливает по рассмотренному выше механизму двухстадийность кинетики этих процессов.

Следует отметить, что при ионной силе 0,13 степень каждой из отдельных стадий СПП составляет ровно половину максимальных значений этого параметра, характерных для соответствующих однофазных кинетических кривых. Поскольку степень СПП пропорциональна количеству вступивших в реакцию актомиозиновых макромолекул, на основании полученных соотношений можно рассчитать, что при указанной ионной силе раствора примерно половина белковых единиц находится в одном, а половина—в другом функциональном состоянии.

Для ответа на вопрос, что представляют из себя эти функциональные состояния и различаются ли структуры соответствующих им белковых комплексов, нами были изучены оптические характеристики препаратов НАМ до и после взаимодействия с АТФ при различных ионных условиях.

Как следует из рис. 2 а, изменение ионной силы сопровождается появлением двух максимумов УФ-абсорбции НАМ. Первый находится

при значениях ионной силы, близких к 0,075, а второй—в области 0,2, т. е. их положение совпадает с положением соответствующих максимумов степеней одноименных стадий СПП, а также АТФазной реакции препаратов НАМ [2]. На основании этих данных можно предположить, что два структурных состояния белка соответствуют рассмотренным выше двум типам функционально неэквивалентных актомиозиновых комплексов. В таком случае мы вправе также говорить о том, что функциональные характеристики этих типов белковых комплексов определяются исходя из их структурным состоянием.

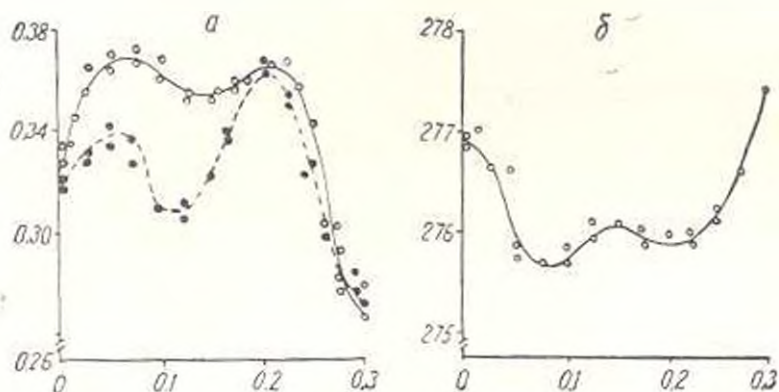


Рис. 2. Зависимость величины УФ-абсорбции (а) и положения спектрального максимума (б) НАМ скелетных мышц крысы от концентрации КСІ. Сплошные и пунктирные кривые—соответственно до и после гидролиза АТФ. По оси абсцисс—концентрация КСІ (М). По осям ординат а—максимум УФ-абсорбции белка, б—длина волны (нм).

Обращает на себя внимание равенство двух максимумов УФ-абсорбции белка. Это может показаться странным, поскольку функциональные характеристики соответствующих им актомиозиновых комплексов существенно различаются. По-видимому, методом УФ-спектроскопии не представляется возможным уловить те тонкие структурные различия, которые обуславливают функциональные особенности актомиозиновых макромолекул. Не исключено также, что в основе увеличения поглощения белка в ультрафиолете при низких и высоких ионных силах лежат различные структурные перестройки, приводящие к одинаковому конечному оптическому эффекту.

Рост УФ-абсорбции по мере перехода актомиозиновых макромолекул преимущественно в одно или другое структурно-функциональное состояние сопровождается также коротковолновым (на 1—1,5 нм) сдвигом спектрального максимума (рис. 2б). Это может послужить указанием на то, что в этих состояниях белковому комплексу отвечает более развернутая конформация либо меньшая степень агрегации актомиозиновых макромолекул.

О справедливости такого предположения свидетельствует также увеличение светопоглощения связанного с актомиозином АО при ионных силах, близких к 0,075 и 0,2 (рис. 3). Это происходит в основном за счет увеличения относительного вклада (а значит, и числа) мономер-

ров красителя* которые главным образом сорбируются рассредоточенными на поверхности белковых макромолекул анионными группировками (в отличие от мономеров, полимерные формы АО сильнее взаимодействуют с блочно расположенными группами, несущими электростатический заряд [3]). Следовательно, при переходе в любое из двух функциональных состояний актомиозиновый комплекс претерпевает такие структурные изменения, которые обуславливают более диффузное распределение заряда на поверхности его белковых компонентов.

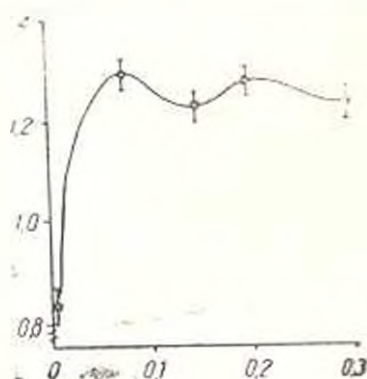


Рис. 3. Изменение отношения максимумов светопоглощения связанных с НАМ скелетных мышц крыс мономерных и полимерных форм АО при различных концентрациях KCl. По оси абсцисс—концентрация KCl (М); по оси ординат— A_{456}/A_{465} .

После «отработки» на СПП максимум УФ-абсорбции НАМ в первом структурном состоянии значительно снижается (рис. 2, а). Это может быть результатом маскировки поверхностных хромофоров белковых компонентов комплекса вследствие его уплотнения в ходе первой стадии СПП. Вторая стадия реакции, очевидно, не сопровождается столь значительными конформационными перестройками, поскольку величина УФ-абсорбции в области высоких значений ионных сил одинакова в препаратах НАМ как до, так и после гидролиза АТФ.

Полученные результаты представляется целесообразным рассмотреть в свете современных представлений о существовании двух структурных форм миозина [7], также способных переходить друг в друга, в частности, при изменении ионной силы [9]. В таком случае можно предположить, что обнаруженные структурно-функциональные состояния актомиозина представляют собой комплексы актина с двумя формами миозиновых макромолекул (конформеров—по [4]). Доказательство этого предположения позволило бы в новом качестве рассмотреть вопросы, связанные с молекулярными механизмами реакции СПП, а также степенью адекватности ее процессу мышечного сокращения.

* В растворе АО находится в мономерной и полимерной формах, спектральные максимумы которых расположены в области 426 и 465 нм соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заатцивили М. М. Физико-химические основы мышечной деятельности. 123—125. Тбилиси, 1971.
2. Тикучов Б. А. Биолог. ж. Армении, 39, 3, 193, 1986.
3. Филагоча Л. Г., Штраккфельд И. Г., Есипова И. Г., Мокшалева И. Е. В сб. Биохимические основы и регуляция процесса мышечного сокращения. 113—119. Ереван, 1972.
4. Леднев В. В. В сб. Механизмы контроля мышечной деятельности. 121—136, Л. 1985.
5. Komins D. R. Biochemistry, 9, 1702, 1970.
6. Matsunaga T., Noda H. J. Biochem., 56, 67, 1915.
7. Morita F. J. Biochem. M., 313—320, 1971.
8. Snash M. C., Perry S. V. Biochem. J., 107, 263—269, 1967.
9. Skriver L. W., Sykes J. D. Biochemistry, 21, 3022—3028, 1982.
10. Szor A., Konya L., Gashin S., Konyas L. Kiserleier Orvostudomány, 31, 303—307, 1982.
11. Szor A., Konya L., Gashin S. Kiserleier Orvostudomány, 35, 56—61, 1983.
12. Weber K., Osborn M. Ibid., 244, 4406—4412, 1969.
13. Yasui T., Watanabe S. J. Biol. Chem., 94, 210, 1965.

Поступило 10.IV 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 5, 1988

УДК 577.21

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ В КЛЕТКАХ *E. coli* ПОЛУЧЕННОЙ ПЛАЗМИДЫ pJZA-GH

Г. К. ШАХБАЗЯН, К. Ш. БАБАЯН, Н. С. АМБАРЦУМЯН, Ж. И. АКОПЯН

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван.
Бурастанская экспериментальная совхоз-лаборатория, АрмССР

Получена рекомбинантная плазмида pJZA-GH, содержащая длинные концевые повторы вируса саркомы Рауса и структурную часть гена гормона роста быка. Анализ РНК, выделенной из *E. coli*, несущей плазмиду pJZA-GH, показал наличие последовательности, гибридизующейся с геном гормона роста быка.

Ստացվել է ռեկոմբինանտ պլազմիդ pJZA-GH, որը պարունակում է Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի վերջնային երկար կրկնություններ և ցուլի աճի հորմոնի գենի ստրուկտուրային մասը: pJZA-GH պլազմիդ կրող *E. coli*-ից անջատված ՌՆԻ-ի անալիզը ցույց է տվել ցուլի աճի հորմոնի գենի հետ հիբրիդիզացվող համադրական առկայություն:

A recombinant plasmid pJZA-GH, containing long terminal repeat of Rous sarcoma virus and bovine growth hormone gene sequences is constructed. RNA molecules, isolated from *E. coli* cells, bearing pJZA-GH plasmid, contain sequences homologous to bovine growth hormone gene.