

БИОФИЗИКА

А. А. Чилингарян, С. С. Оганесян, Ж. Г. Саруханян и В. А. Тимошенко

Сравнительная характеристика сократительных белков
 скелетных мышц уток и их гибридов

(Представлено академиком АН Армянской ССР М. А. Тер-Карапетяном 4/1 1966)

Морфология, физиология и особенно гисто-цитологическая характеристика гибридов, полученных при отдаленных скрещиваниях, показывают, что последние не всегда являются промежуточной формой между родительскими видами, а в ряде случаев представляют собой качественно новые формы (¹). Нужно думать, что особенности дифференциации и метаболизма гибридов, первично обусловленные генетическими факторами, объясняются, в частности, изменениями структуры и функции многокомпонентных макромолекул. Очевидно, что объективная регистрация ряда физических параметров и химических свойств комплексных белковых частиц может лучше выявить механизмы генетически обусловленных изменений на уровне отдельных молекул и их комплексов, а также степень ограничений возможных изменений в структуре, адаптированной к специфической деятельности. В этом отношении привлекают внимание сократительно-белковые комплексы мышц, молекулярный состав и свойства которых достаточно изучены.

В настоящем сообщении приведены результаты предварительных исследований ряда физических параметров и кинетики АТФ-азной (АТФ-фосфогидролаза) активности сократительных белков двух видов — пекинской и мускусной уток и их гибридов. Миозин и актомиозин выделяли из бедренных мышц принятыми методами Губа-Штрауба и Бейли. Производилась очистка экстрактов миозина от актина и актомиозина. Количество белка определяли после высушивания в вакууме и контролировали по Кьельдалю. АТФ-азную активность определяли в инкубационной смеси, состоящей из белка, буфера (трис + HCL), натриевой соли АТФ и хлористого кальция (0,005M), pH смеси определяли потенциометрически.

Абсорбционный спектр растворов белка снимали на СФ-4 в ультрафиолетовой области (230—320 мкм).

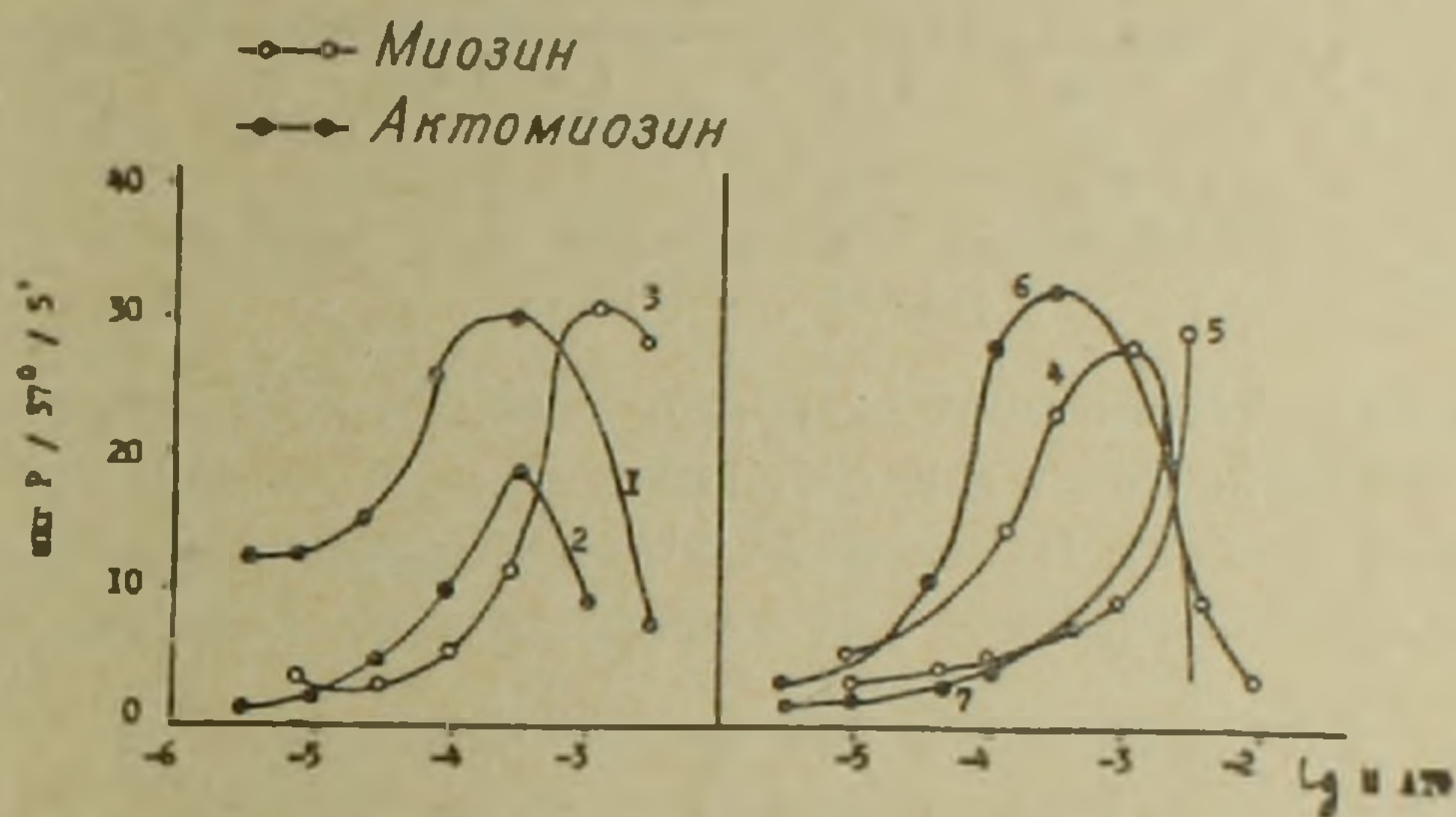
Лимитирующее вязкостное число $\left| \frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_0} \right|$ определяли раз-

бавлением растворов белка при $C \rightarrow 0$ (C — концентрация белка), где $\frac{\eta}{\eta_0}$ — относительная вязкость.

Опыты были поставлены на 9 утках по 3 головы в каждой группе. Кривые, представленные в работе, характеризуют усредненные данные из 3—5 повторных измерений.

Исследование субстратного торможения, рН оптимума и влияния концентрации белка показало, что межвидовая гибридизация приводит к изменению некоторых свойств АТФ-азы актомиозина.

Субстратное торможение для АТФ-азы двух изученных видов уток имеет место при достаточно близких концентрациях АТФ (фиг. 1). Максимальный гидролиз АТФ наблюдается, когда его концентрация в инкубационной смеси достигает 5×10^{-3} М (миозин и актомиозин). Ход кривой ферментативной активности миозина пекинской утки несколько круче, ее торможение менее выражено.



Фиг. 1. Субстратное торможение АТФ-азы миозина и актомиозина.

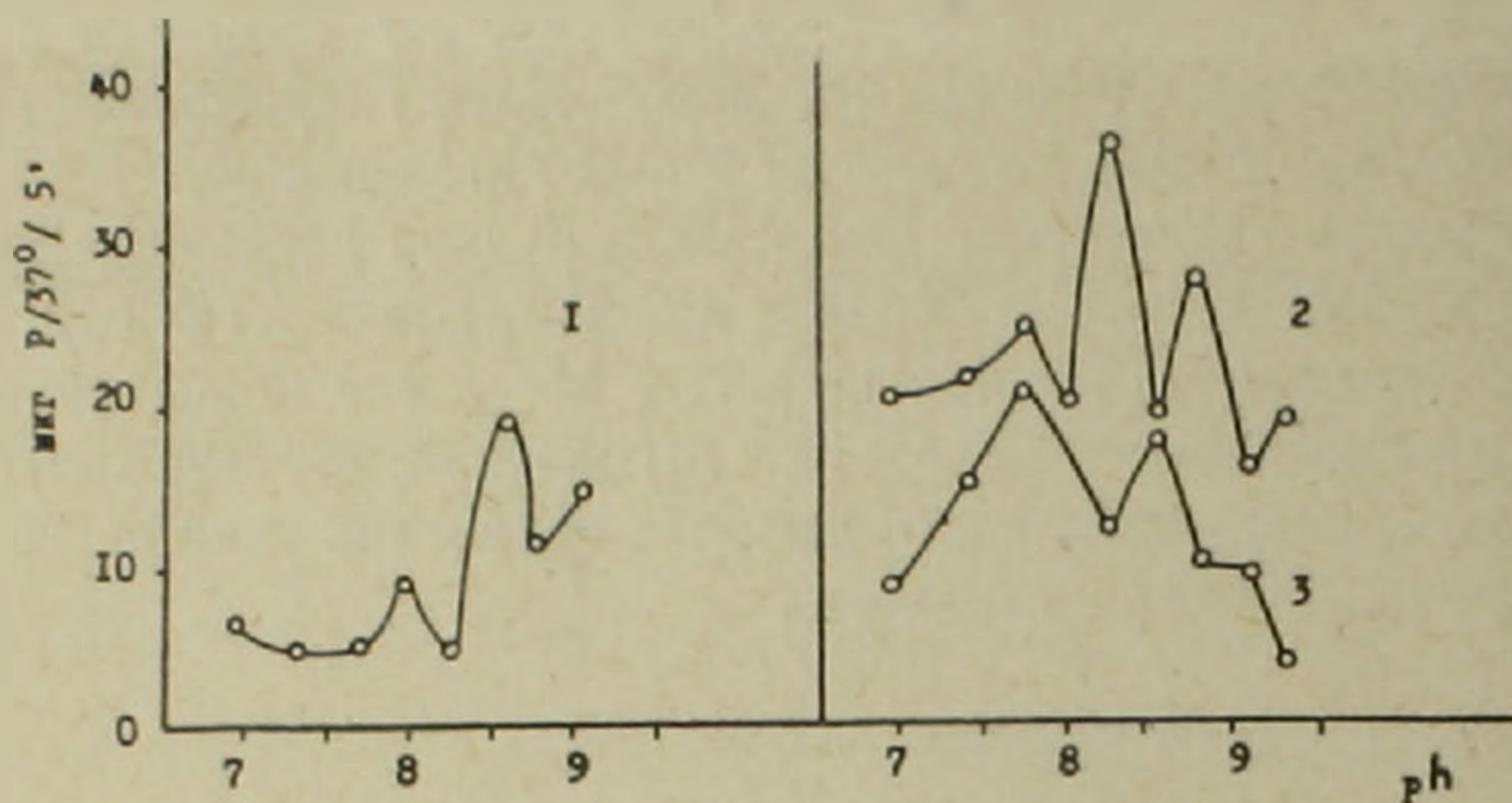
1 — мускусная (♂); 2,3 — пекинская утки (♂, ♀); 4,6 — гибрид прямой (♀); 5,7 — гибрид реципрокный (♀).

АТФ-азная активность актомиозина прямых гибридов (♀ пекинская $\times$ ♂ мускусная) в зависимости от концентрации АТФ имеет тот же тип кривой, что и у родительских пар. Значительно отличается кривая субстратного торможения у реципрокных гибридов (♀ мускусная $\times$ ♂ пекинская). В пределах тех же концентраций АТФ торможение АТФ-азной активности не наблюдается. Имеет место устойчивое повышение активности фермента. То же наблюдается на растворах миозина.

АТФ-аза миозина и актомиозина скелетных мышц пекинской утки характеризуется обычно наблюдаемым двухпиковым рН-оптимумом, соответственно рН 7,96 и рН—8,6 для миозина; 7,6 и 8,45 для актомиозина (фиг. 2). У прямых и реципрокных гибридов, помимо смещения пиков активности, изменяется их количество. Кривая рН оптимума характеризуется тремя пиками, причем третий пик соответствует у гибридов

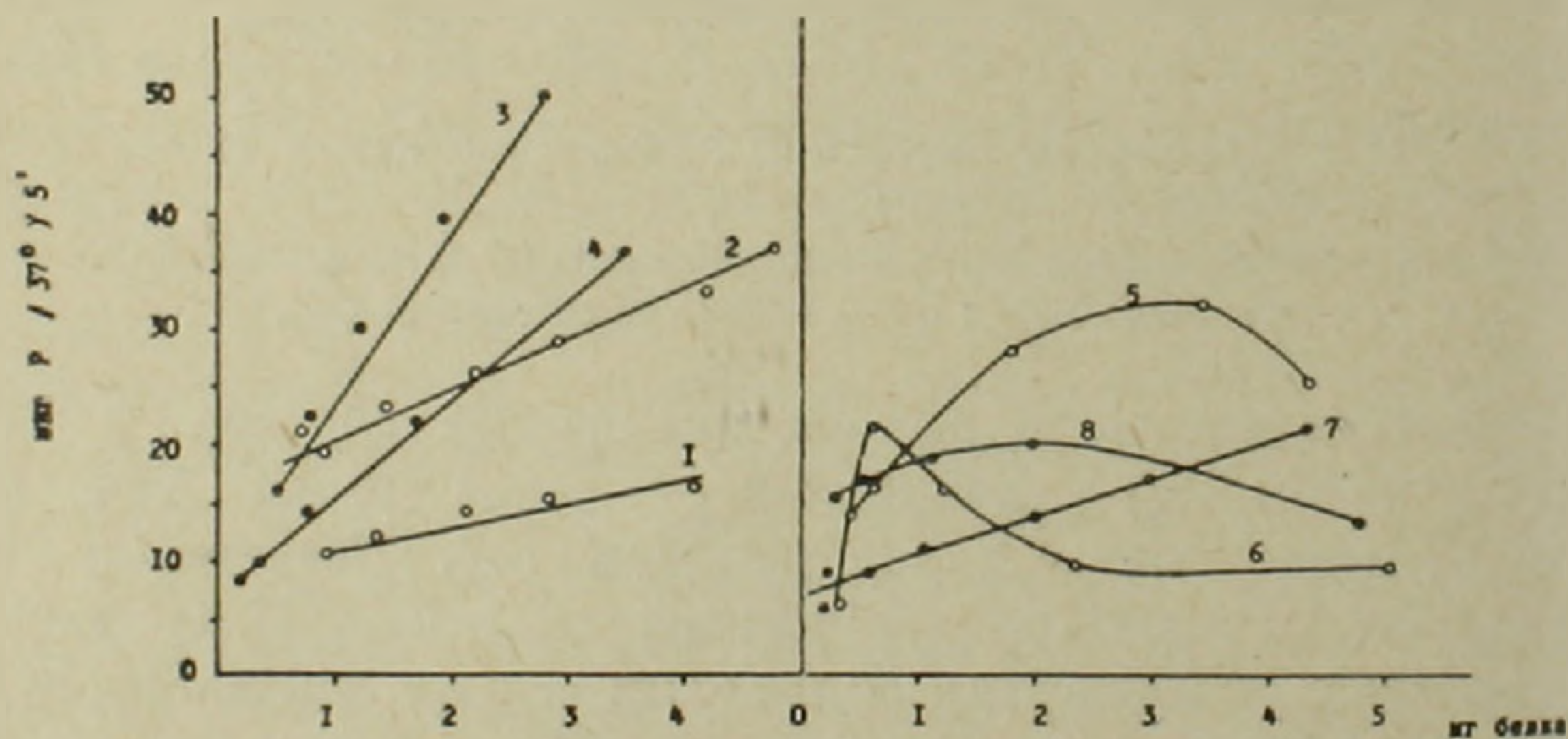
pH 9,2 и pH—6,8. Таким образом, хотя и сохраняется основной пик активности (pH 8,5), появляется дополнительный подъем активности в более щелочной полосе.

Увеличение концентрации актомиозина пекинской и мускусной уток в инкубационной смеси от 0,3 мг до 4 мг приводит к почти экспоненциальному повышению гидролиза АТФ. Скорость роста активности фер-



Фиг. 2. pH-оптимум АТФ-азы миозина.
1 — пекинская утка; 2 — гибрид прямой и 3 — гибрид реципрокный (все самцы).

мента выше для актомиозина мускусной утки. Гидролиз АТФ миозином по мере увеличения белка в инкубационной смеси усиливается несколько медленнее (фиг. 3). Изучение АТФ-азы сократительных белков гибридов выявило значительное изменение хода кривой активности. Если



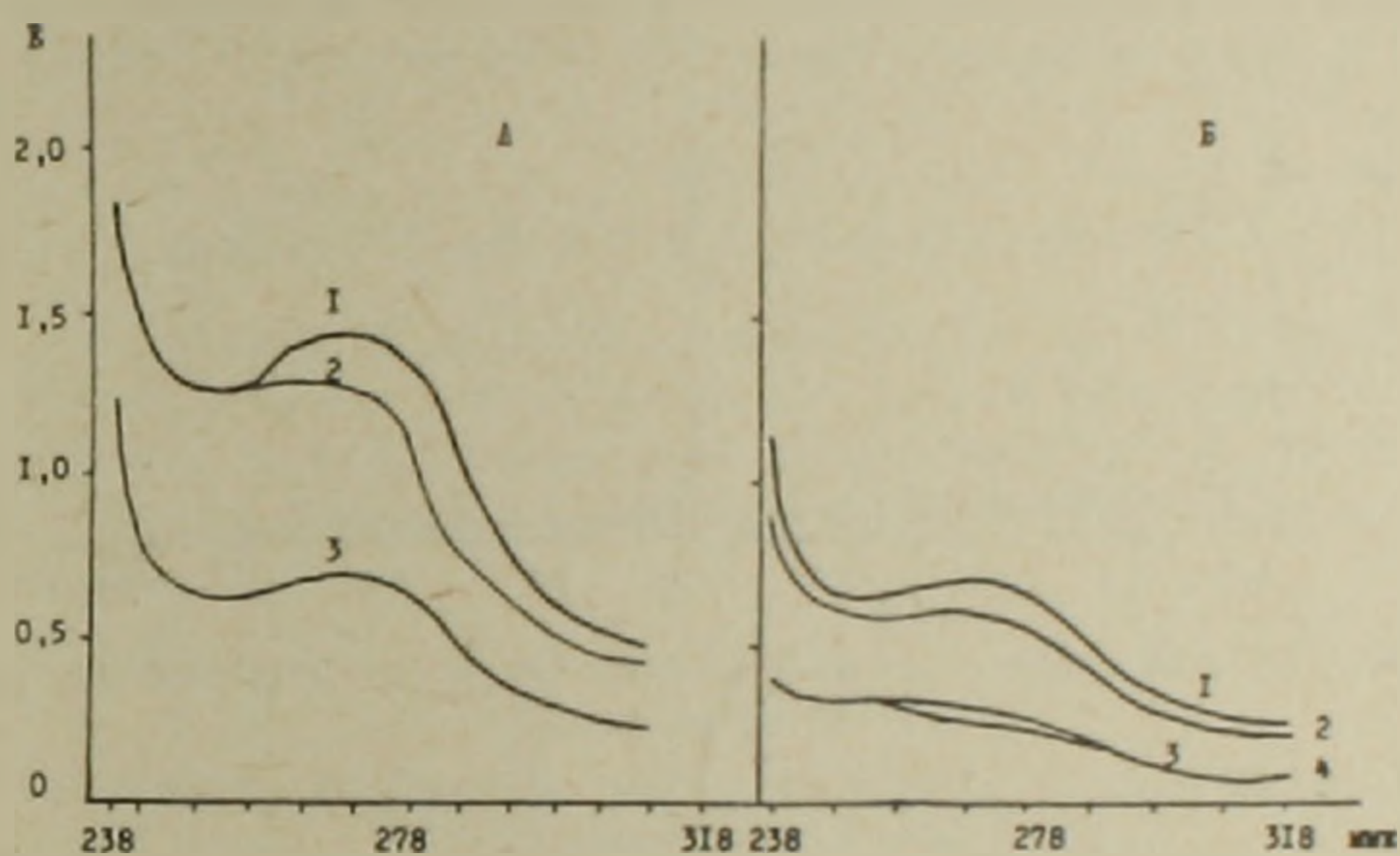
Фиг. 3. Влияние концентрации миозина и актомиозина на АТФ-азную активность.

1,4 — пекинская (♂); 2,3 — мускусная утка (♂); 5,7 — гибрид прямой (♀) и 6,8 — гибрид реципрокный (♂).

у прямых гибридов повышение концентрации миозина и, особенно, актомиозина, в основном, характеризуется увеличением ферментативной активности, то у реципрокных гибридов кривая имеет две фазы: фазу быстрого подъема активности и фазу спада (фиг. 3). Четкое разделение обеих фаз наблюдается при исследовании миозина.

В настоящее время установлено, что регуляция ферментативной активности в значительной степени обуславливается общей конформацией белковой молекулы. Исследования пространственной конфигурации и компактности в структуре сократительных белков, приводят к допущению определенных сдвигов при межвидовом скрещивании.

Исследование абсорбционного спектра миозина показало, что максимум поглощения при pH 7,0 находится в области 266—282 мк, что характерно для обеих видов уток и их гибридов. Таким образом, существенных видовых различий в спектре поглощения миозина не отмечаются. В основном, область поглощения совпадает с описанной для миозина разных видов животных и обусловлена ароматическими аминокислотами (²⁻⁴). Существенная разница отмечается в экстинкции растворов миозина родительских и гибридных форм. Из кривой (фиг. 4 б) видно, что экстинкция растворов миозина прямых и реципрокных гибридов значительно меньше.



Фиг. 4. А — абсорбционный спектр миозина при хранении (+4°). Пекинская утка, pH 7,0.

1 — первый; 2 — четвертый и 3 — десятый дни.

Б — спектр поглощения миозина в ультрафиолетовой области.

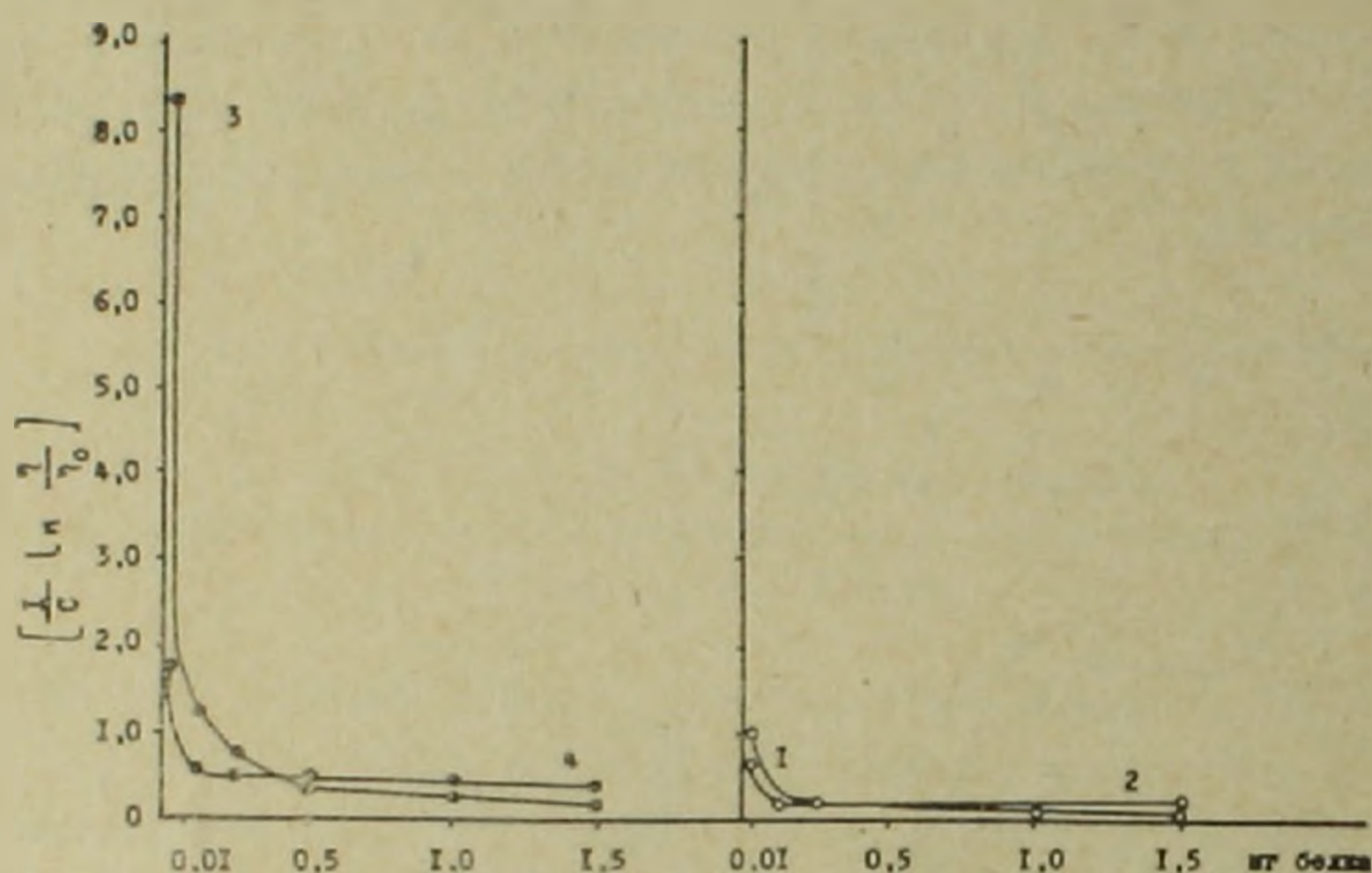
1 — пекинская; 2 — мускусная утки; 3 — прямой гибрид и 4 — реципрокный гибрид.

Объяснение этого факта, вероятно, надо искать в изменении регулярности структуры белковой частицы. Об этом свидетельствует уменьшение экстинкции растворов миозина пекинской утки при длительном хранении (фиг. 4 а).

Возможные нарушения в общей молекулярной структуре миозина гибридных форм обнаруживаются при измерении лимитирующего вязкостного числа. Разбавление растворов миозина ($C \rightarrow 0$), как известно, приводит к денатурации белка, в данном случае это выражается увеличением лимитирующего вязкостного числа (фиг. 5). Величина, характеризующая денатурацию миозина прямого гибрида, как видно из фиг. 5, в несколько раз больше, чем у пекинской. У реципрокных гибридов вяз-

костное число выше в полтора раза. Учитывая, что определением этих двух параметров нельзя выявить основные изменения в структуре миозина, в общем приближении можно предполагать, что гибридизация приводит к изменению пространственной конфигурации и компактности структуры, и это выражается повышением денатурируемости миозина.

Несмотря на большое количество исследований видовой специфичности сократительных белков и многих ферментов, совершенно не затронуты вопросы специфичности белков у гибридов позвоночных. Данные, полученные нами, позволяют думать, что при гибридизации имеет место избирательное изменение различных физико-химических параметров



Фиг. 5. Лимитирующее вязкостное число при разбавлении растворов миозина.

1 — пекинская; 2 — мускусная утки; 3 — гибрид прямой и 4 — гибрид реципрокный, pH 7,0.

комплексных белков. Пока трудно сказать, наблюдаемые изменения носят случайный или закономерный характер. Однако, допустимо, что в процессе дифференциации гибридного организма и образования сложных многокомпонентных белковых структур могут иметь место отклонения, обусловленные взаимодействием субъединиц, без существенных изменений последних. Весьма характерной чертой сократительных белков гибридов является отсутствие полного сходства с одним из родителей или промежуточных свойств. АТФ-азная активность миозина и актомиозина характеризуется у гибридов новыми качествами. Сюда можно отнести, например, появление максимума активности в щелочной зоне pH. двухфазный характер кривой активности по концентрации фермента и, наконец, отсутствие торможения избытком субстрата.

Для более полной характеристики изменений в молекулярной структуре сократительных белков исходных и гибридных форм ведутся дальнейшие исследования.

Зоологический институт
Академии наук Армянской ССР

Մկանային կծկիչ սպիտակուցների համեմատական բնութագիրը
տառերեւ տեսակի բաղերի և նրանց հիբրիդների մոտ

Հեռավոր հիբրիդիզացիայի դեպքում միշտ չէ, որ ստացված սերունդը օժտված է լինում միջանկյալ ժառանգականությամբ: Որոշ դեպքերում հիբրիդները իրենց մորֆո-ֆիզիոլոգիական կառուցվածքով և այլ հատկություններով այնքան են տարբերվում նախնական տեսակներից, որ երանց կարելի է դրսևորել որպես նոր ձևեր: Ակներև է, որ այդ փոփոխությունները առաջին հերթին արդյունք են այն տեղաշարժերին, որոնք կապված են բիոքիմիական պրոցեսների հետ: Բացի դրանից բարձր ողնաշարավորների հիբրիդների սպիտակուցների ուսումնասիրությունները ինքնուրույն հետաքրքրություն են ներկայացնում, քանի որ այդպիսիները բացակայում են դրականության մեջ:

Անալիզի է ենթարկված կծկիչ սպիտակուցների (միոզին և ակտոմիոզին) ԱՏՖ-աղայի կենսիկան և մի շարք ֆիզիկո-քիմիական պարամետրերը (աբսորբցիոն սպեկտրը, դենատուրացիան, рН օպտիմումը): Հստ այդ պարամետրերի նկատմամբ է հիբրիդային ձևերի սպիտակուցային բարդ կոմպլեքսների փոփոխություն: Վերջիններիս մոտ առաջ են գալիս նոր որակ, որը բնորոշ չէ ոչ ծնողական տեսակներին, ոչ էլ հանդիսանում են նրանց միջինը:

Կարելի է ենթադրել, որ հիբրիդիզացիայի ազդեցության տակ առաջացած այդ նոր հատկությունները կապված են սպիտակուցների չորրորդական կառուցվածքի փոփոխությունների հետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

1 А. А. Чилингарян, Зоологический сборник, т. 14, 5—77. Изд. АН Армянской ССР, 1966. 2. И. А. Аниина и В. П. Вендт, «Украинский биохимический журнал», т. 26, № 1, 21—30, 1954. 3. Х. М. Равикович, О. Н. Сеткина, К. Д. Леонтьева, ДАН СССР, т. X, № 6, 985—992, 1948. 4. Е. Б. Кофман и М. Б. Каламкарлова, «Биофизика», т. II, вып. 4, 403—412, 1958.