

12. Miller D. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 3, 716—722, 1970.
13. Solless R., Garnier J. Biochim. Biophys. Acta, 554, 102—113, 1979.
14. Suzuki S., Suzuki K., Nakajima M., Terao T., Osawa T. Biochim. Biophys. Acta, 692, 263—270, 1982.
15. Tanner M. J. A., Boxer G. H. Biochem. J., 129, 333—347, 1972.
16. Tanner M. J. A., Gray W. R. Biochem. J., 125, 1109—1117, 1971.
17. Yu J., Fischman D. A., Sick T. L. J. Supramol. Struct., 1, 2, 233—248, 1973.

Поступило 5.11.1989 г.

Биолог. ж. Армения. № 6 (142).1989

УДК 612.744.14

ДВА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯ АКТОМИОЗИНА. УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕНАТУРИРУЮЩИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Б. А. ТИХОНОВ, Л. Э. МАЛОЯН, М. А. КАПФАДЖЯН, А. Т. ОГАНЕСЯН

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

Установлено, что в двух различных состояниях актомиозина из скелетных мышц крысы обладает неодинаковой устойчивостью к денатурирующим действию мочевины и температуры. В I состоянии химическая деградация белка идет с большей степенью кооперативности, а термоденатурация наблюдается при больших температурах, чем во II состоянии. Предполагается, что в двух состояниях между актином и миозином устанавливается разное число контактов, что главным образом связано со структурными перестройками в миозине.

Հաստատված է, որ երեւոյս աւրեր վիճակներում ակտինոգլիկը տեղի ալ միասնական կայունութիւնը և ջերմաստիճանի ազդեցութեամբ ազդեցութեան նկատմամբ I վիճակում ակտինոգլիկը քիմիական ապակայունացումը իրագործում է կոոպերատիվութեան ազդի բարձր մակարդակով, իսկ ջերմութեան դժկազմութեանը կայունութեան է ազդի բարձր ջերմաստիճաններում, քան II վիճակում։ ենթադրվում է, որ ակտինոգլիկը վիճակներում ակտինի և միոգլիկի միջև հաստատվում են տարբեր քանակի կոնտակտներ։ Ինչը գլխաւորապէս որոշվում է միոգլիկի վերակառոցմանը։

The differences in stability of the two various states of actomyosin from the rats skeletal muscles to urea and temperature denaturing action are discovered. Higher cooperativity of protein chemical destruction and higher denaturation temperature describe the I state of actomyosin complex, compared with the II state. It is proposed that in states of protein different number of contacts between actin and myosin may be formed, what mainly depends on the structural reconstructions in myosin.

Скелетные мышцы—актомиозин—денатурация.

Ранее нами было показано, что двухстадийная кинетика комплексообразования миозина с актином (СПП) и АТФазы натурального актомиозина связана с участием в этих реакциях двух типов функционально [2, 5] и структурно [3, 4] неэквивалентных белковых комплексов.

Сокращения: СПП—сулерпренипитация, АТФаза—аденозинтрифосфатаза

Расчет термодинамических параметров, характеризующих взаимодействие двух типов актомиозиновых чаетиц [6], позволил идентифицировать их как комплекс актина с двумя структурными формами миозина (конформерами согласно [1]). Обратимым переходам между двумя типами миозиновых конформеров в настоящее время отводится особая важная роль в процессах генерации или регуляции величины актинового напряжения, развиваемого мышечным волокном [1].

Для выяснения природы различий двух состояний актомиозинов важно знать тип контакта и характер связи между актином и миозином в данном типе комплекса. Согласно имеющимся сведениям, возможно образование сильной и слабой актин-миозиновой связи [10], однако остается неясным, в какой степени это сопряжено с миозиновыми конформерами [1]. С другой стороны, учитывая, например, неодинаковую атакуемость протеазами миозина в разных конформационных состояниях [11], можно предположить, что устойчивость двух типов актомиозиновых комплексов к действию некоторых денатурирующих факторов также будет различаться. Выяснению этого вопроса посвящена настоящая работа.

Материал и методики. Натуральный актомиозин получали из бедренных мышц крыс по методике [12]. Белок подвергали дополнительной очистке ультрацентрифугированием при 35 000 g в 0,1 М КСl и дважды ресуспендировали деионизованной водой (рН 6,8). Миозин получали по методу [13]. Чистоту белков проверяли электрофоретически [13], а концентрацию определяли по связыванию с красителем кумаси G-250 [14].

Оптические измерения производили на спектрофотометре «Спекорд» М-10 (ГДР). Разностные спектры белковой суспензии регистрировали с использованием специального отсека для мутных проб, а термограммы плавления — с применением автоматического температурного сканера TSE-1. Градиент нарастания температуры составлял 0,4 К/мин, точность контроля $\pm 0,1^\circ$. Использовали кварцевые кюветы толщиной 1 см, конечный объем проб — 3 мл. Содержимое проб постоянно перемешивали с помощью встряхивающего и качающего отсека магнитных мешалок.

Концентрации ингредиентов инкубирования среды рассчитывали по стандартным программам [9], модифицированным А. А. Климовым (ИБФ АН СССР, Пушкин). Постоянные компоненты (в мМ): трис HCl—20, (рН 7,35), 2-меркаптоэтанол—1, Na_2EDTA —0,25 и 0,13 мг/мл белка. Варьирование условия отжаривали в каждом конкретном случае.

Результаты и обсуждение. Процесс денатурации натурального актомиозина, тестируемый по увеличению УФ-абсорбции белка, завершается при 2—3,5 М мочевины (рис. 1). Форма кривых титрования сильно различается для двух состояний актомиозина, переход между которыми достигался в данном случае изменением концентрации ионов Mg^{2+} и контролировался по кинетике СПП [2, 3, 5]. Предпочтение Mg^{2+} -зависимому варианту смены двух состояний белка было отдано с целью поддержания постоянной конечной ионной силы раствора, изменение которой могло бы повлиять на эффекты мочевины, обусловленные главным образом ионным фактором.

Низкие концентрации Mg^{2+} обеспечивают одностадийный ход СПП натурального актомиозина [4] по «высокотемпературному» типу, с участием α -конформеров миозина [6]. Для этого (1) состояния белка характерна выраженная сигмоидная форма кривых титрования мочевины.

ной (рис. 1а). Увеличение концентрации Mg^{2+} переводит актомиозин в II состояние [4], при котором миозин находится в β -форме и для которого характерен «низкотемпературный» тип СПП [6]. В этом случае сигмоидный участок кривых титрования мочевиной выпрямляется.

Качественно аналогичные различия в форме кривых титрования мочевиной для двух состояний актомиозина сохраняются и после завершения реакции СПП (рис. 1б). Полную денатурацию при этом вызывают более высокие концентрации мочевины, что, по-видимому, связано со стабилизацией структуры актомиозинового комплекса и ходе СПП.

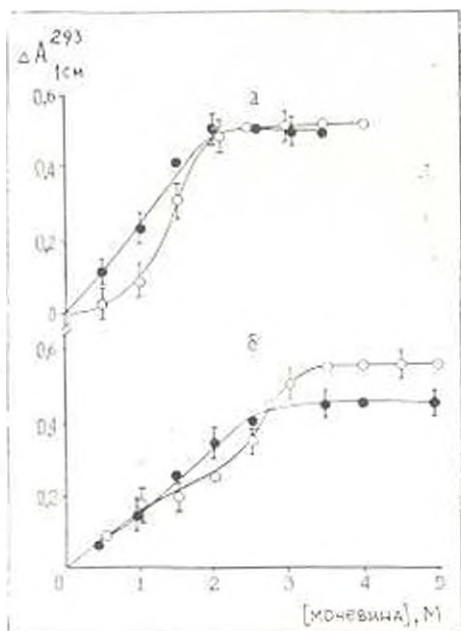


Рис. 1.

Рис. 1. Кривые спектрофотометрического титрования мочевиной натурального актомиозина скелетных мышц крысы до (а) и после (б) взаимодействия с 0.1 мМ АТФ. Светлые кружки—I состояние (0.01 мМ $MgCl_2$), темные кружки—II состояние (0.5 мМ $MgCl_2$) белка. 75 мМ KCl, 0.063 мМ $CaCl_2$, 25° C. ΔA_{293} — величина УФ-абсорбции образца толщиной 1 см, определяемая по разностным спектрам.

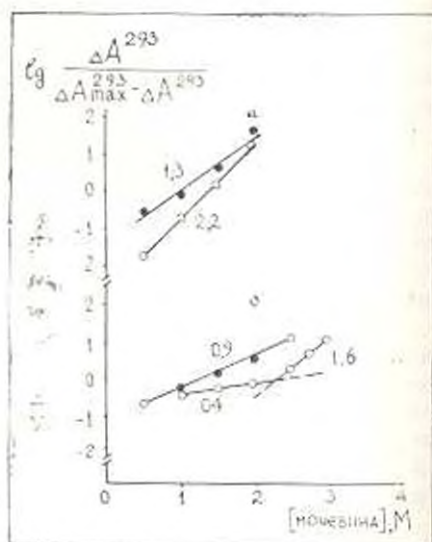


Рис. 2.

Рис. 2. Графики Хилла титрования актомиозина мочевиной (построены по кривым, представленным на рис. 1, обозначения те же) а и б—до и после взаимодействия с АТФ соответственно. Цифры—значения коэффициентов Хилла, рассчитанные по тангенсам углов наклона соответствующих кривых.

Значения коэффициентов Хилла, рассчитанные по кривым титрования мочевиной, для I состояния почти в 1.7 раза превышали таковые для II состояния как до (рис. 2а), так и после (рис. 2б) осуществления СПП. Это говорит о том, что в I состоянии актомиозина химическая деструкция идет с более высокой степенью кооперативности.

Небезынтересно отметить также появление излома на кривых Хилла для I состояния актомиозина после взаимодействия с АТФ.

Следовательно, изучение химической деструкции актомиозина показывает, что структурные характеристики белковых макромолекул могут сильно различаться в зависимости от их состояния. Однако на основании этих данных весьма затруднительно говорить о состоянии отдельных компонентов белкового комплекса. В этой связи нами был изучен характер термоденатурации двух типов актомиозиновых частиц.

При низкой ионной силе, обеспечивающей переход актомиозина в I состояние [2, 3], термограммы плавления характеризуются наличием относительно стабильного участка в диапазоне 20—35°, за которым следует участок обратимой денатурации белка, заканчивающийся при 63° (рис. 3а). Дальнейшее увеличение температуры вызывает коагу-

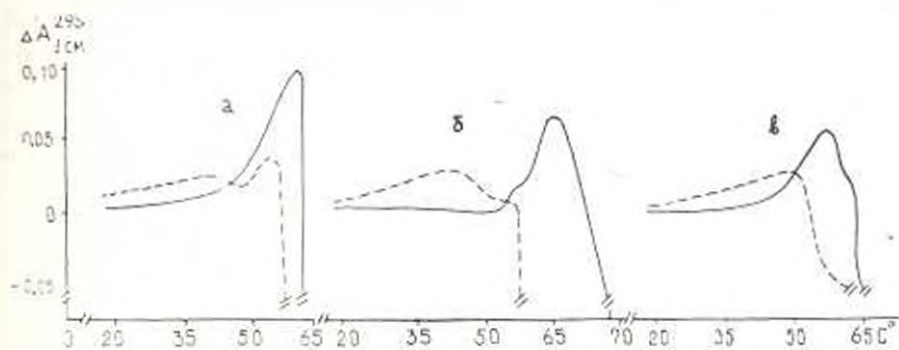


Рис. 3. Термограммы плавления натурального актомиозина (а, б) и миозина (в) скелетных мышц крысы до (а, в) и после (б) взаимодействия с 0,1 мМ АТФ. Условия: I состояние (сплошные линии): 50 мМ KCl (в — 75 мМ); II состояние (пунктир): 150 мМ KCl (в — 175 мМ). Во всех случаях вводились 0,05 мМ $MgCl_2$ и 0,037 мМ $CaCl_2$.

ляцию актомиозина, обусловленную необратимым нарушением структуры макромолекул и сопровождающуюся резким падением оптической плотности раствора. Обращает на себя внимание наличие второго, слабо выраженного пика на участке обратимой денатурации белка в области 55°.

Кривые плавления для II состояния актомиозина, получаемого путем повышения ионной силы раствора до 0,15 [2, 3], резко отличаются от кривых, характеризующих плавление белка в I состоянии. Во II состоянии белок менее устойчив к действию температуры и коагуляция наблюдается уже при 55—56°, т. е. при более низких температурах, чем в I состоянии. С другой стороны, явно отсутствие высокотемпературного пика 63° и более отчетливое проявление второго пика на участке обратимой денатурации в области 55°. Наконец, при температурах 39—40° во II состоянии появляется дополнительный пик, отграниченный от пика при 55° промежуточным минимумом.

После «отработки» на СПП общая картина различий в диаграммах плавления двух типов актомиозиновых комплексов сохраняется (рис. 3б). При этом наблюдается некоторая стабилизация структуры

комплекса в I состоянии, вследствие чего высокотемпературный пик смещается от 63° до 66,5°. Процесс коагуляции при этом развивается менее резко, а пик в области 55° выглядит более отчетливым. Гидролиз АТФ актомиозином во II состоянии усиливает низкотемпературный пик при 38—40° и ослабляет пик в области 55°.

Тонкая структура термограмм плавления, по-видимому, отражает процесс тепловой денатурации главным образом миозинового компонента натурального актомиозинового комплекса, который, по данным сканирующей микрокалориметрии и собственной триптофановой флуоресценции, раскладывается по меньшей мере на четыре составляющие [8]. Более того, методами флуоресценции и светорассеяния [7] показано, что развертывание структуры миозиновых головок, наблюдаемое при температурах выше 43°, зависит от их состояния.

Сходство термограмм плавления препаратов миозина при полных силах, обеспечивающих переход актомиозинового комплекса в два различных состояния, с термограммами, полученными для одних и тех же состояний актомиозина (рис. 3в), также указывает на то, что температурно-индуцированные перестройки последнего ограничиваются главным образом миозиновым компонентом. Более того, в области 70—75° актомиозиновые препараты обнаруживают еще один пик плавления, отсутствующий на миозине (данные не приводятся). Это позволяет связать его появление с тепловой деградацией структуры белковых компонентов тонких нитей — актина и тропомиозина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что устойчивость актомиозинового комплекса к денатурирующим воздействиям зависит от его структурно-функционального состояния. Исследование СММ и АТФазной активности актомиозина позволило нам сделать заключение о том, что два состояния белка различаются по тому, какой тип миозиновых конформеров [1] в данных условиях комплексуется с актином [6]. В отличие от предыдущих исследований, в которых не удалось выявить существенных различий в характере распределения поверхностного заряда и величине УФ-абсорбции двух типов актомиозиновых комплексов [3], в настоящей работе показано, что I состояние актомиозина более стабильно, чем II. Это может быть обусловлено не только различиями в структурно-зависимых характеристиках (в частности, температурной устойчивости) двух разных миозиновых конформеров, но и типом образуемой ими связи с актином. Возможно, этим вызвана неодинаковая степень кооперативности процесса химической деструкции актомиозина в двух состояниях. Не исключено, что более высокая кооперативность процесса, свойственная I состоянию белка обусловлена большим, чем во II состоянии, числом контактов, обеспечивающих формирование актин-миозинового комплекса. В этой связи весьма заманчиво предположить, что в образовании комплексов I типа принимают участие обе головки миозина, и то время как структура комплексов II типа стабилизируется с помощью одной из них. По крайней мере, смещение фазы обратимой денатурации актомиозина в область более низких температур при переходе от I состояния к II в свете имеющихся литературных данных [7] можно рассматривать как

результат усиления взаимодействия между миозиновыми головками. Более строгое доказательство этого положения позволило бы лучше разобраться в структурных аспектах работы миозинового мостика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леднев В. В. В сб. Механизмы контроля мышечной деятельности. 101—123, Л., 1985.
2. Тихонов Б. А. Биолог. ж. Армения, 39, 3, 196—200, 1986.
3. Тихонов Б. А. Биолог. ж. Армения, 41, 5, 383—388, 1988.
4. Тихонов Б. А. В сб. Биохимия и биофизика биологической подвижности, 34, Тбилиси, 1987.
5. Тихонов Б. А. Биофизика, 24, 2, 319—321, 1989.
6. Тихонов Б. А. Биофизика, (в печати).
7. Фадеев А. М., Зина В. Л., Трезубов В. С., Омельянюк В. С., Маренич В. А. В сб. Биохимия мышц, 105—106, Телави, 1985.
8. Шиндров Э. Л., Каличенко Л. П., Борисова М. А., Пермяков Е. А. В сб. Биохимия мышц, 118, Телави, 1985.
9. Fabbro D., Fabbro A. J. *Physiol.*, 75, 463—505, 1979.
10. Greene L. E. *Biochem. J.*, 20, 2120—2126, 1981.
11. Fuhrstad A., Hazzard T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 958—962, 1982.
12. Schaub M. C., Harabovitch J., Perry S. V. *Biochem. J.*, 107, 263—269, 1967.
13. Shterick K. T., Thomas L. L., Albert N. R. *Biophys. Biochim. Acta*, 393, 124—133, 1975.
14. Spector T. *Anal. Biochem.*, 85, 142—146, 1978.
15. Weber K., Osborn M. J. *Biol. Chem.*, 244, 4406—4411, 1969.

Поступило 27.III 1989 г.

Биолог. ж. Армения, № 6 (42) 1989

УДК 577.963.3

К ИССЛЕДОВАНИЮ НЕКОТОРЫХ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДНК ЗЛАКОВЫХ

Л. А. МИНАСБЕКЯН, П. О. ВАРДЕВАНЯН, Л. Г. СИМОНЯН, Г. А. НАПОСЯН

ИЭБ АН АрмССР, Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Методом термической денатурации ДНК, изолированных из сухих эмбрионов семян злаков пшеницы сортов Безостая-1, Воскесек и Армянка-60, а также из полбы сорта Аршалуйс и тритикале сорта СиС 1, было показано, что имеются как межвидовые, так и внутривидовые различия между исследуемыми сортами пшеницы и других злаков. Они различаются по температурам плавления, профилям дифференциальных кривых плавления и содержанию ГЦ-пар.

Յորենագրիների՝ Բեզոստայա -1, Վոսկեսեկ և Արմյանկա -60 սորտերի ջորեններին, ինչպես նաև Արշալույս սորտի հունարի և Սիս -1 տեխնիկ տրիտիկալերի սերմերի շար ապրանքից ստացված ԴՆԹ-ների թերմիկ դենատուրացիայի մեթոդի միջոցով ցույց է տրվում, որ ուսումնասիրվող ջորենի տեսակների և այլ ջորենագրիների միջև գոյություն ունեն ինչպես ներտեսակային, այնպես էլ միջտեսակային տարբերություններ։ Նրանք տարբերվում են չափան ջերմաստիճանով, չափան գիֆերենցիալ կորերի պրոֆիլներով և ԴՅ-զույգերի պարունակությամբ։