

8. Mathlouthi M., Seuvre A. M., Koenig J. L. F. T.-I. R. and laser-Raman spectra of cytosine and cytidine // Carbohydr. Res.— 1986.— 146, N 1.— P. 1—13.
9. ИК спектроскопия молекулярных кристаллов с водородными связями / Л. М. Бабков, Г. А. Пучковская, С. П. Макаренко, Т. А. Гаврилко.— Киев: Наук. думка, 1989.— 160 с.
10. Low-frequency vibrational Raman and i. r. spectrum of crystalline cytosine monohydrate / G. E. Kugel, X. Gerbaux, C. Carabatos et al. // Spectrochim. acta.— 1979.— 35A, N 10.— P. 1155—1163.
11. Jeffrey G. A., Kinoshita Y. The crystalline structure of cytosine monohydrate // Acta cryst.— 1963.— 16, N 1.— P. 20—28.
12. Stewart R. F., Jensen L. H. Redetermination of the crystal structure of uracil // Ibid.— 1967.— 23, N 10.— P. 1102—1105.
13. Gerdil R. The crystal structure of thymine monohydrate // Ibid.— 1961.— 14, N 4.— P. 333—345.
14. Susi H., Ard J. S. Vibrational spectra of nucleic acid constituents. I. Planar vibrations of uracil // Spectrochim. acta.— 1971.— 27A, N 9.— P. 1549—1562.
15. Bandekar L., Zundel G. Normal coordinate analysis treatment on uracil in solid state // Ibid.— 1983.— 39A, N 4.— P. 343—355.
16. Wojcik M. J. Low-frequency vibrational spectra of crystalline uracil, thymine and their 1-methyl derivatives // J. Mol. Struct.— 1988.— 189, N 1/2.— P. 239—242.
17. Shimanouchi T., Harada I. Far-infrared spectra of cyanuric acid, uracil and diketopiperazine // J. Chem. Phys.— 1964.— 41, N 9.— P. 2651—2655.
18. Lewis T. P., Miles H. T., Becker E. D. Infrared and Raman spectra and vibrational assignments for 1-methyluracil and isotopic derivatives // J. Phys. Chem.— 1984.— 88, N 15.— P. 3253—3260.
19. Colombo L., Kirin D. Prednost upotrebe monokristaliničnih uzoraka u ramanskoj spektroskopiji. Primjer 1-metil-uracila // Vestn. Sloven. Kem. drus.— 1986.— 33, dod.— P. 31—36.
20. Colombo L., Kirin D. Raman spectrum of 1-methyl-uracil single crystal. Interpretation of internal and external spectra // Spectrochim. acta.— 1986.— 42A, N 4.— P. 557—565.
21. Kirin D., Colombo L., Furic K. Low-frequency vibrational spectrum of the 1-methyl-thymine single crystal // Ibid.— 1975.— 31A, N 11.— P. 1721—1727.
22. Hoosten K. The crystalline structure of 1-methyl-thymine // Acta cryst.— 1963.— 16, N 1.— P. 28—38.
23. Harada I., Lord R. C. Low-frequency infrared and Raman spectra of some adenine and uracil crystals // Spectrochim. acta.— 1970.— 26A, N 12.— P. 2305—2318.
24. Kyogaku Y., Higuchi S., Tsuboi M. Infra-red absorption spectra of the single crystals of 1-methylthymine, 9-methyladenine and their 1:1 complex // Ibid.— 1967.— 23A, N 4.— P. 969—983.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 21.08.89

УДК 577.322

© А. М. Филенко, В. Л. Зима, В. М. Данилова, В. С. Омелянюк,
Э. Б. Бабийчук, В. С. Трегубов, 1990

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СУБФРАГМЕНТА 1 МИОЗИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Исследования нативные температурозависимые перестройки субфрагмента 1 (С1) миозина скелетных мышц, процесс его плавления и особенности трипсинолиза при различных температурах. Методами спектрофлуориметрии и светорассеяния показано, что тяжелая цепь С1 состоит, по крайней мере, из трех структурных единиц. На основании полученных экспериментальных результатов в совокупности с литературными данными предложена модель трехмерной организации С1.

Введение. Основные функции миозина — расщепление АТФ и взаимодействие с тонкой актиновой нитью в процессе элементарного акта сокращения — связаны с головкой молекулы миозина, называемой в изолированном виде субфрагментом 1 (С1). С1 получают, расщепляя миозиновую молекулу в месте соединения головки со стержневой частью [1]. За АТФазную активность С1 и его взаимодействие с активом практически полностью отвечает тяжелая цепь С1 [2], а легкие цепи играют, по-видимому, вспомогательную роль. При ограниченном воздействии протеаз нативная структура тяжелой цепи С1 расщеп-

ляется в двух участках [3, 4]. Используя трипсин, можно получить активный С1 (триптический или фрагментированный), тяжелая цепь которого состоит из трех фрагментов с молекулярными массами 23 000, 50 000 и 20 000 [3, 5]. Во многих работах эти фрагменты рассматриваются в качестве отдельных структурных доменов, что находит подтверждение в проявлении родства к актину изолированных ренатурированных фрагментов 20 000 и 50 000 [3, 6].

С помощью методов сшивки и ограниченного протеолиза показано, что фрагменты 20 000 и 50 000 содержат контактные площадки для актлина [3, 4, 6]; 23 000 и 50 000 — участвуют в связывании нуклеотидов [7]. Все три фрагмента близки друг к другу [3, 8]. Это согласуется с многочисленными данными о том, что в мультидоменных белках активные центры, как правило, размещены на границах контактирующих структурных доменов [9].

Цель настоящей работы состояла в получении дополнительных сведений, подтверждающих трехдоменную организацию тяжелой цепи С1, с помощью методов трипсинолиза, флюоресценции и светорассеяния. На основании проведенных экспериментов и литературных данных предложена модель трехмерной организации головки миозина.

Материалы и методы. Миозин выделяли из скелетных мышц кролика по методике Перри [10]. С1 миозина получали согласно методике Маргосян и Лоун [1] с небольшими модификациями. Чистоту препаратов проверяли с помощью электрофореза и оптических методов. Концентрацию белков определяли из выражений $C_M = (D_{280} - 1,5D_{320}) / 0,533$ и $C_{C1} = D_{280} / 0,75$ [11], где C_M и C_{C1} — концентрации миозина и С1, а D_{280} и D_{320} — поглощение при 280 и 320 нм. Об АТРазной активности миозина и его фрагментов судили по количеству отщепленного неорганического фосфата или определяли с помощью флюоресцентного метода каталитическую константу $k_{кат} = [АТР] / C \cdot T_{1/2}$, где [АТР] и C — концентрации АТР и белка, $T_{1/2}$ — время уменьшения прироста интенсивности флюоресценции вдвое [12]. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Spесord M40 (ГДР).

Для исследования нативных структурных перестроек белков в интервале температур 0—37 °С использовали разработанный нами двухволновой флюоресцентный метод, позволяющий регистрировать в синхронном режиме отношение интенсивностей излучения I_1/I_2 (параметр B) на склонах спектра флюоресценции белка при двух фиксированных длинах волн λ_1 и λ_2 [13]. С помощью такого подхода можно обнаружить небольшие спектральные сдвиги (0,05—0,1 нм), практически незаметные на спектрах флюоресценции. За разворачиванием белка в процессе термической денатурации следили по изменению двух величин: параметра B и светорассеяния под углом 90°.

Растворы С1 выдерживали на протяжении длительного времени при фиксированных температурах и наблюдали за агрегатобразованием по увеличению светорассеяния. Через определенные интервалы времени пробы белка отбирали и охлаждали до комнатной температуры (20 °С). Одну серию проб при этой температуре использовали для определения АТРазной активности, другую — подвергали трипсинолизу при отношении С1 к трипсину 50:1 и последующему анализу с помощью DS-Na-ПААГ-электрофореза.

Для работы использовали бидистиллированную воду, чистоту которой проверяли в области поглощения и флюоресценции белков. Квалификация использованных реактивов не ниже «хч».

Результаты и обсуждение. На рис. 1 (кривая 1) приведена температурная зависимость параметра B для миозина $B = I_{320} / I_{370}$. Как видно из рисунка, в интервалах 10—13, 19—22 и 29—33 °С параметр B ступенчато изменяется на 0,015—0,02, что соответствует сдвигу спектра триптофановой флюоресценции белка на 0,15—0,2 нм. Указанные температурные интервалы в зависимости от препарата, сроков его хранения, а также различных факторов среды могут сдвигаться на 1—3 °С в ту или другую сторону. Зарегистрированные переходы связаны только с областью головки миозина. В стержневой части миозина никаких переходов в области нативных температур нами не обнаружено. На изолированном химотриптическом С1 эти переходы об-

наруживаются практически в тех же интервалах, что и для миозина. Следует отметить, что на кривой зависимости АТРазной активности от температуры имеет место изгиб, приходящийся на второй температурный интервал (19—22 °С) изменения параметра B . Этот изгиб четко проявляется на графике Аррениуса (зависимость $\ln k_{\text{кат}}$ от $1/T$, где T — абсолютная температура). После структурного перехода в интервале

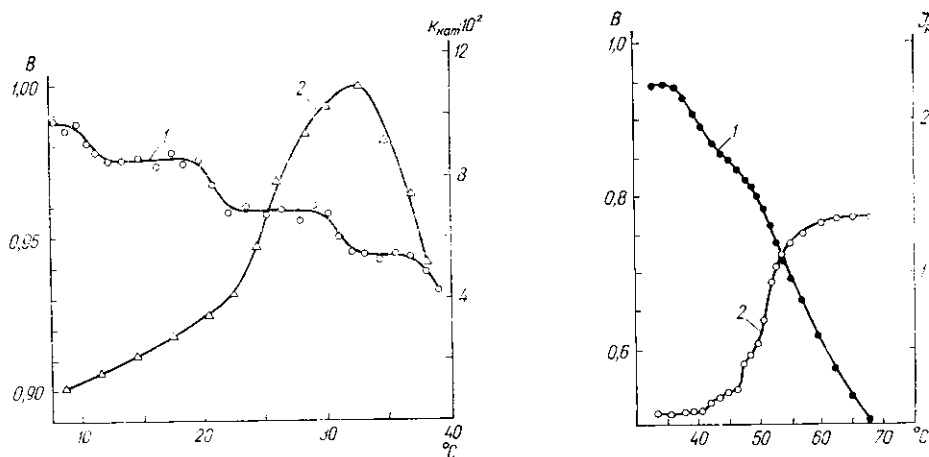


Рис. 1. Температурная зависимость флуоресцентного параметра B (1) и Mg-АТРазной активности (каталитическая константа $k_{\text{кат}} = [\text{АТР}]/C \cdot T_{1/2}$, кривая 2) для миозина скелетных мышц. Условия опыта: концентрация белка 0,8 мкМ; 5 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,5 М КСl. При измерении АТРазной активности в раствор вводили 1 мМ MgCl₂, 20 мкМ АТР и регистрировали время $T_{1/2}$, в течение которого прирост интенсивности флуоресценции белка уменьшается в два раза

Fig. 1. Temperature influence on fluorescence parameter B (curve 1) and Mg-ATPase activity (catalytic constant $k_{\text{cat}} = [\text{АТР}]/C \cdot T_{1/2}$, curve 2) for preparation of skeletal myosin. Conditions of the experiment: protein concentration $C = 0.8 \text{ mmol/l}$; 5 mmol/l Tris-HCl; pH 7.5; 0.5 mol/l KCl. When measuring ATPase activity 1 mmol/l MgCl₂ and 20 mmol/l ATP were added to incubation mixture and time $T_{1/2}$ was registered during which the increase of protein fluorescence intensity twice lowers

Рис. 2. Температурная зависимость параметра B (1) и светорассеяния I_p (2) для С1 миозина. Условия опыта: концентрация белка 1,3 мкМ, 70 мМ фосфатный буфер, рН 7,4, 1 М КСl. Возбуждение флуоресценции — 297 нм. Отношение интенсивностей на склонах спектра флуоресценции (параметр B) регистрировали при 320 и 370 нм, а светорассеяние — при 297 нм

Fig. 2. Temperature influence on parameter B (curve 1) and light scattering I_p (curve 2) for myosin subfragment 1. Conditions of the experiment: 1.3 $\mu\text{mol/l}$ of protein; 70 $\mu\text{mol/l}$ of phosphate buffer; pH 7.4; 1 mol/l KCl. Fluorescence excitation wave — 297 nm. The ratio of the intensities (parameter B) on the slopes of fluorescence spectra was registered at 320 and 370 nm, light scattering — at 297 nm

29—33 °С дальнейший нагрев или даже выдерживание белка при фиксированной температуре приводит к постепенному уменьшению АТРазной активности, что свидетельствует о необратимых изменениях в структуре С1.

На рис. 2 представлены результаты исследования плавления С1. Уменьшение параметра B с увеличением температуры соответствует длинноволновому сдвигу триптофановой флуоресценции, указывающему на увеличение доступности индольных хромофоров по мере разворачивания третичной структуры белка [13]. На графике зависимости $B = B(t^\circ\text{C})$ (кривая 1) имеются два характерных участка плавления 36—50 и 50—60 °С. Синхронно регистрируемое светорассеяние I_p (кривая 2) дает информацию о степени агрегатообразования, которое происходит по разворачивающимся участкам белковой молекулы. На кривой 2 имеются три характерных интервала 40—46, 46—50 и 50—60 °С, соответствующих агрегатообразованию по трем разворачивающимся структурным единицам молекулы С1. Уменьшение параметра B при плавлении первого участка сопровождается увеличением све-

торассеяния, что указывает на агрегатобразование по мере развертывания белка. Выход интенсивности светорассеяния на постоянный уровень при 44—46 °С свидетельствует о том, что все центры агрегатобразования, открывающиеся при плавлении этого участка молекулы, полностью использованы. На кривой *I* в промежутке 44—46 °С также прослеживается тенденция к выходу на постоянный уровень. При дальнейшем нагреве в интервале 46—50 °С происходит развертывание следующей структурной единицы, на что указывает увеличение и выход на постоянный уровень интенсивности светорассеяния. Параметр *B* при этом изменяется незначительно. При нагреве

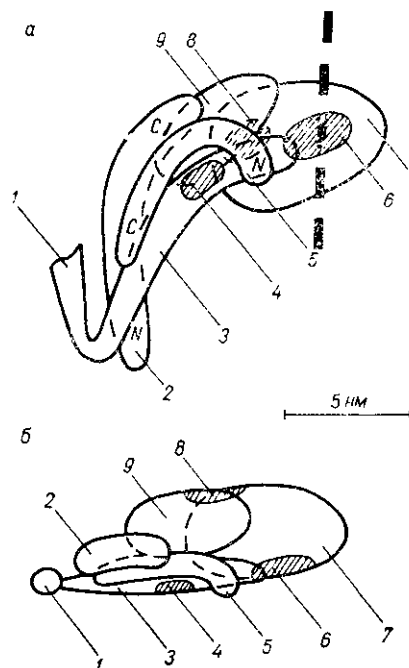
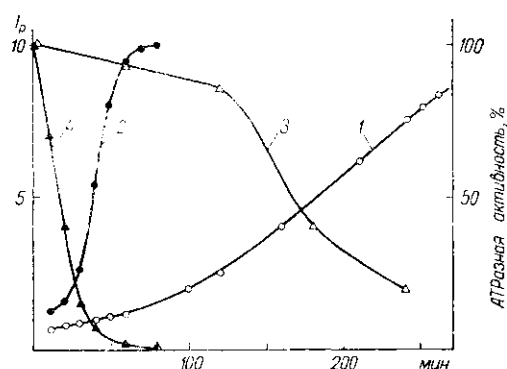


Рис. 3. Зависимость светорассеяния I_p (1, 2) и Ca^{2+} -АТФазной активности (3, 4) от времени прогрева препаратов С1 при 36 (1, 3) и 40 °С (2, 4). Светорассеяние регистрировали при 297 нм. АТФазная активность препаратов, которые не прогревались, принята за 100 %

Fig. 3. Effect of heat treatment time of subfragment 1 preparation at 36 °C (curves 1,3) and 40 °C (curves 2,4) on light scattering I_p (curves 1,2) and Ca^{2+} -ATPase activity (curves 3,4). Light scattering was registered at 297 nm. ATPase activity of unheated preparations was assumed to be 100 %

Рис. 4. Схематическое представление трехмерной организации С1 миозина: *a* — вид сбоку; *b* — вид сверху (1 — С2; 2 — ДТНБ-легкая цепь; 3 — домен размером 20 000; 4 — локализация группы SH_1 ; 5 — щелочная легкая цепь (А2); 6 — центр связывания актина; 7 — домен 50 000; 8 — АТФазный центр; 9 — домен 23 000). Вертикальной пунктирной линией обозначено размещение оси тонкой нити. Указаны N- и С-концы легких цепей

Fig. 4. Schematic outline of three-dimensional structure of myosin subfragment 1: *a* — side-view, *b* — view from above (1 — subfragment 2, 2 — DTNB-light chain, 3 — 20 kDa domain, 4 — localization of SH_1 group, 5 — alkali light chain (A2), 6 — actin binding site, 7 — 50 kDa domain, 8 — ATPase activity site, 9 — 23 kDa domain. Vertical dotted line shows the position of the thin filament axis, N- and C-terminals of the light chains are shown

выше 50 °С происходит плавление третьей структурной единицы, сопровождающееся сильным уменьшением параметра *B* и увеличением светорассеяния.

На рис. 3 приведены данные по воздействию фиксированных температур 36 и 40 °С на агрегационные характеристики и АТФазную активность С1. Растворы белка выдерживали при этих температурах, наблюдая за агрегатобразованием. Через определенные интервалы времени отбирали пробы белка и охлаждали их до 20 °С. Одну серию проб при этой температуре использовали для определения АТФазной активности, а другую подвергали трипсинолизу и последующему анализу с помощью гель-электрофореза. За 30 мин при 36 °С светорассеяние препарата увеличивалось в ~1,2 раза, а при 40 °С — почти в

2,5 раза (рис. 3, кривые 1, 2). Увеличение светорассеяния, пропорциональное степени агрегатообразования, коррелирует с понижением АТРазной активности препарата (рис. 3, кривые 3, 4) и с уменьшением плотности полосы фрагмента 50 000 на электрофореграмме. Плотности полос фрагментов 23 000 и 20 000 при этом остаются практически неизменными.

Три структурные единицы, выделенные нами при плавлении С1 (рис. 2), можно идентифицировать как три структурных домена, соответствующих трем фрагментам тяжелой цепи С1. Из полученных нами (рис. 3) и литературных данных [14] следует, что фрагмент (домен) 50 000 характеризуется термолабильной структурой, необратимое изменение которой начинается при достаточно длительном выдерживании уже при физиологической температуре. Вероятнее всего, в интервале 36—40 °С идет «разрыхление» этого домена, сопровождающееся уменьшением параметра *B*, а в интервале 40—46 °С — разворачивание (плавление) его структуры. Уменьшение АТРазной активности С1 в процессе выдерживания при фиксированных температурах 36 и 40 °С (рис. 3), сопровождающееся нарушением целостности структуры домена 50 000 (по данным трипсинолиза), указывает на его участие в формировании АТРазного центра С1.

С интервалом температур 46—50 °С следует соотнести плавление домена 20 000, в котором, по данным аминокислотного анализа, нет остатков триптофана [5]. При температуре выше 50 °С происходит разворачивание домена 23 000. Следует отметить, что в состав хмотриптического С1 входит еще щелочная легкая цепь. Она не содержит триптофанов [15], поэтому ее плавление не должно сказываться на температурной зависимости параметра *B* (рис. 2, кривая 1), однако оно может существенно повлиять на агрегацию. Этим можно объяснить недостаточно четко выраженный перегиб между вторым (46—50 °С) и третьим (50—68 °С) участками кривой светорассеяния (рис. 2, кривая 2).

Из литературы известно, что изолированные, ренатурированные, фрагменты 50 000 и 20 000 характеризуются большой склонностью к агрегатообразованию [4, 6]. Это свидетельствует о наличии достаточно протяженных контактных площадок на отдельных доменах тяжелой цепи С1. Нативную структуру тяжелой цепи С1 можно представить состоящей из трех доменов, упорядоченно взаимодействующих между собой по пологим друг к другу контактным площадкам. Взаимодействие между доменами значительно ослабляется с увеличением ионной силы (до 1 М КС1). При таких условиях мы наблюдали хорошо выраженное плавление трех отдельных структур, что указывает на существенную роль зарядов во взаимодействии между контактными площадками.

Некоторые хромофоры мультидоменного белка могут находиться на контактных площадках или вблизи от них. Микроокружение и, следовательно, флуоресцентные характеристики именно этих хромофоров будут изменяться при изменении взаимного расположения доменов. Температурозависимые обратимые конформационные перестройки миозина и С1 (рис. 1, кривая 1), характеризующиеся небольшими изменениями параметра *B* (0,015—0,02), по-видимому, как раз и представляют собой изменения взаимного расположения доменов в нативной структуре белка. Эти перестройки происходят в узких температурных интервалах и имеют характер обычных переходов между двумя состояниями.

Нативному переходу в интервале температур 19—22 °С (рис. 1, кривая 1) соответствует изгиб на кривой температурной зависимости АТРазной активности (рис. 1, кривая 2), что отражает, видимо, изменения в структуре АТРазного центра С1. Этот переход, скорее всего, представляет собой изменение взаимного расположения доменов 23 000 и 50 000, между которыми, как следует из литературных данных [7] и наших результатов, по-видимому, и расположен АТРазный

центр. Переход в интервале 29—33 °С тесно связан с нарушением структурной стабильности домена 50 000, в котором при дальнейшем увеличении температуры происходят необратимые структурные изменения, приводящие к агрегации и уменьшению АТРазной активности С1. Первый нативный переход (в температурном интервале 10—13 °С) соответствует сильному возрастанию прироста интенсивности флуоресценции при работе АТРазного центра [16], что свидетельствует об изменении окружения одного или нескольких триптофанилов в структуре С1.

Некоторые авторы полагают, что химотриптический С1 состоит только из двух доменов. Данные, полученные нами методами флуоресценции и светорассеяния при плавлении С1 (рис. 2), служат доказательством наличия в нем не менее трех структурных единиц. Легкую щелочную цепь следует считать отдельным доменом С1. Более того, нам кажется вполне оправданным предположение, что фрагмент 50 000 представляет собой функциональный домен, состоящий из двух тесно взаимодействующих между собой структурных доменов. В пользу такого предположения говорит повышенная структурная лабильность этого домена и его «стратегическое» положение в головке миозина: он участвует в формировании как АТРазного, так и актин-связывающего центров, играя, таким образом, роль связывающего звена между ними [8]. Возможно, что структура и жесткость домена 50 000 преобразуются в процессе механохимической трансформации энергии макроэрга АТФ и упругий элемент, который некоторые авторы связывают с субфрагментом 2 миозина, локализован как раз в этом домене.

Недавно группе японских авторов [17] с помощью трехмерной реконструкции электронно-микроскопических изображений удалось локализовать активные центры на головке миозина. Используя эти и данные других авторов (см. «Введение»), а также наши результаты, мы приводим на рис. 4 схематическое представление трехмерной организации С1 миозина. Вся головку миозина можно разделить на две области: главная область — от верхушки домена 50 000 до места изгиба (приблизительно 7 нм) и область «шейки» — от места изгиба до шарнира (около 9 нм). В формировании АТРазного центра участвуют домены 23 000 и 50 000 [18]. Актин-связывающий центр находится на доменах 50 000 и 20 000. Расстояние между центрами, размещенными с противоположных сторон головки миозина, равно 4 нм [17]. SH₁-группа, находящаяся на расстоянии 5 нм от обоих активных центров, размещена на домене 20 000 с той же стороны головки, что и актин-связывающий центр. Длина щелочной легкой цепи составляет около 17 нм для А1 и 10 нм для А2 [19], а ее N-концевая часть размещается приблизительно посередине между группой SH₁ и актин-связывающим центром [20]. Эта цепь взаимодействует, по-видимому, по комплементарным контактным площадкам со всеми доменами, стабилизируя нативную структуру С1. Место связывания щелочной легкой цепи на домене 20 000 обнаружено вблизи от его N-конца [2]. N-конец ДТНБ-легкой цепи размещен на шарнире между головкой и стержнем миозина [21], длинная ось ее равна 13 нм [22]. Эта цепь создает дополнительную жесткость в области «шейки» и, возможно, играет определенную роль в регуляции мышечного сокращения. В области «шейки» ДТНБ-легкая цепь находится рядом со щелочной легкой цепью, существенно влияя на ее взаимодействие с тяжелой цепью [23]. Для того чтобы выполнить это условие, мы расположили ДТНБ-легкую цепь С-концом вдоль домена 23 000, а щелочную легкую цепь, согнув вокруг группы SH₁, направили вдоль этого домена и ДТНБ-легкой цепи С-концом в область «шейки». При таком расположении выполняется также условие удаленности С-конца щелочной легкой цепи на ~6 нм от АТРазного центра и на ~4 нм от SH₁-группы [23] и условие близости группы SH₁ к доменам 23 000 и 50 000 [24]. Представленная на рис. 4 структура С1 имеет изогнутую форму, которая при-

обретается после присоединения к актину. Изгиб, приводящий к элементарному акту сокращения, происходит приблизительно в области АТРазного центра вследствие взаимного перемещения отдельных доменов С1. Возможно, что при этом претерпевает значительное изменение структура домена 50 000. Такая организация головки миозина предполагает, что во время элементарного акта сокращения область «шейки» изменяет свою ориентацию по отношению к оси тонкой нити, а ориентация основной области при этом может оставаться неизменной [17].

STRUCTURAL PATTERN OF SUBFRAGMENT F OF SKELETAL MUSCLE MYOSIN

*A. M. Filenko, V. L. Zyma, V. M. Danilova, V. S. Omelyaniuk,
E. B. Babychuk, V. S. Tregubov*

T. G. Shevchenko University, Kiev

Summary

Native temperature-dependent transitions of subfragment 1 (S1) of skeletal muscle myosin, the process of its melting and some features of its proteolytic degradation have been studied. S1 heavy chain is shown to consist of not less than three structural units. As based on data available in literature and the authors' own results a model of S1 three-dimensional organization is suggested.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Margossian S. S., Lowey S. Interaction of myosin subfragments with F-actin // *Biochemistry*.—1978.—17, N 25.—P. 5431—5439.
2. Burke M., Kamalakannan V. Effect of tryptic cleavage on the stability and properties of the several heavy-chain subunit // *Ibid.*—1985.—24, N 4.—P. 846—852.
3. Yamamoto K., Sekine T. Substructure of myosin subfragment-1 as revealed by digestion with proteolytic enzymes // *J. Biochem.*—1980.—87, N 1.—P. 219—226.
4. Muhlrad A., Morales M. F. Isolation and partial renaturation of proteolytic fragments of the myosin head // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—84, N 4.—P. 1003—1007.
5. The primary structure of the myosin head / T. Maita, M. Hayashida, Y. Tanioka et al. // *Ibid.*—1987.—84, N 2.—P. 416—420.
6. Characterization of the isolated 20-kilodalton and 50-kilodalton fragments of the myosin head / A. Muhlrad, A. A. Kasprzak, K. Ue et al. // *Biochim. et biophys. acta.*—1986.—869, N 2.—P. 128—140.
7. Hiratsuka T. Photosensitized direct cross-linking of fluorescent analogs of ATP to the adenine recognition domain in myosin ATPase // *J. Biochem.*—1985.—91, N 1.—P. 71—78.
8. Hiratsuka T. Role of 50-kilodalton tryptic peptide of myosin subfragment 1 as a communicating apparatus between the ATPase and actin binding sites // *Biochemistry*.—1986.—25, N 8.—P. 2101—2109.
9. Shultz G. E., Schirmer R. H. Principles of protein structure.—New York: Springer, 1979.—317 p.
10. Perry S. V., Zydowo M. A. A ribonucleoprotein of skeletal muscle and its relation to the myofibril // *Biochem. J.*—1959.—72, N 4.—P. 682—690.
11. Johnson K. A., Taylor E. W. Intermediate states of subfragment 1 and actosubfragment 1: ATPase: reevaluation of the mechanisms // *Biochemistry*.—1978.—17, N 17.—P. 3432—3442.
12. Werber M. M., Szent-Györgyi A. G., Fasman G. D. Fluorescence studies on heavy meromyosin-substrate interaction // *Ibid.*—1972.—11, N 15.—P. 2872—2883.
13. Филенко А. М., Зима В. Л. Двухволновой метод регистрации малых спектральных сдвигов флуоресценции белков // *Молекуляр. генетика и биофизика.*—1981.—Вып. 6.—С. 126—135.
14. Burke M., Zaenger S., Bliss J. Substructure of skeletal myosin subfragment 1 revealed by thermal denaturation // *Biochemistry*.—1987.—26, N 5.—P. 1492—1496.
15. Matsuda G. The light chains of muscle myosin: its structure, function and evolution // *Adv. Biophys.*—1983.—16.—P. 185—218.
16. Magnesium ion dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin as a function of temperature between +20 and -15 °C / J. J. Béchet, C. Bréda, S. Guinard et al. // *Biochemistry*.—1979.—18, N 19.—P. 4080—4089.
17. Location of the ATPase site of myosin determined by three-dimensional electron microscopy / M. Tokunaga, K. Sutho, C. Toyoshima et al. // *Nature*.—1987.—329, N 6140.—P. 635—638.

18. Hiratsuka T. Nucleotide-induced change of the interaction between the 20- and 26-kilodalton heavy-chain segments of myosin adenosine triphosphatase revealed by chemical cross // *Biochemistry*.— 1987.— 26, N 11.— P. 3168—3173.
19. Alexis M. N., Gratzner W. B. Interaction of skeletal myosin light chains with calcium ions // *Ibid.*— 1978.— 17, N 12.— P. 2319—2325.
20. Trayer J. P., Trayer H. R., Levine B. A. Evidence that the amino terminal region of A1-light chain of myosin interacts directly with the carboxyl-terminal region of actin: A PMR study // *Eur. J. Biochem.*— 1987.— 161, N 1.— P. 259—266.
21. Position of the amino-acide terminus of myosin light chain 1 and light chain 2 determined by electron microscopy with monoclonal antibody / M. Tokunaga, M. Suzuki, K. Sasaki et al. // *J. Mol. Biol.*— 1987.— 194, N 2.— P. 245—256.
22. Minova O., Matsuda S., Yagi K. Calcium-induced conformational change of 20 000 dalton light chain of vertebrate striated muscle myosin // *J. Biochem.*— 1983.— 94, N 1.— P. 25—36.
23. Waller G., Lowey S. Myosin subunit interaction: localization of the alkali light chains // *J. Biol. Chem.*— 1985.— 260, N 26.— P. 14368—14373.
24. Lu R. Ch., Moo L., Wong A. G. Both the 25-kilodalton and 50-kilodalton domains in myosin subfragment-1 are close to the reactive thiols // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— 83, N 17.— P. 6392—6396.

НИИ физиологии Киев. гос. ун-та им. Т. Г. Шевченко

Получено 05.05.89

МДК 176.315.42

© В. А. Сигава, А. В. Гаврюшкин, Ю. А. Ершов, 1990

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЧНО СВЯЗАННЫХ ДНК-МЕМБРАННЫХ КОМПЛЕКСОВ В СОСТАВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО НУКЛЕОИДА

*С помощью электрофореза в свободном потоке (ЭФСП) впервые выделены из бактериальных клеток *Escherichia coli* комплексы ДНК с мембранными белками. Изучены изменения ДНК и белков этих комплексов после УФ-облучения клеток. Показана возможность с помощью метода ЭФСП выявлять повреждения биомолекул в составе ненарушенного нуклеопротеидного комплекса.*

Введение. Комплексы ДНК с белками обеспечивают высокую степень компактности ДНК и осуществление ее важнейших функций [1]. При воздействии на клетки УФ-радиации компоненты ДНК-белкового комплекса претерпевают различные изменения. Имеются данные об увеличении количества белка, прочно связанного с ДНК в УФ-облученных клетках (УФ-сшивание ДНК с белком) [2]. Определение ДНК-белковых сшивок в настоящее время затруднено, длительные процедуры их выделения и очистки сопровождаются повреждением биомолекул и потерей их функциональной активности. При этом исследования ведутся с нуклеопротеидами (нуклеотидопептидами), далекими от своего нативного состояния в клетке, что осложняет интерпретацию этих данных в биологических экспериментах. Поиск методов определения ДНК-белковых сшивок в целой клетке или в макромолекулярном комплексе важен для изучения их биологической роли. Быстро выделить ненарушенный макромолекулярный комплекс из бактериальных клеток позволяет метод ЭФСП [3].

В данной работе впервые с помощью этого метода исследованы ДНК-белковые комплексы *E. coli*, а также изменения состава ДНК и белков этих комплексов после УФ-облучения клеток.

Материалы и методы. В работе использован бактериальный штамм *E. coli* K12 (дикий тип), полученный из коллекции микроорганизмов Ин-та биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Клетки выращивали в жидкой питательной среде М9 в колбах по 250 мл на качалке при 37 °С. Для того чтобы поместить ДНК в культуру через 1 ч после посева вносили ³H-тимидин (18,5 МБк) (удельная радиоактивность 0,66 ТБк/мМ). Клетки в стационарной фазе роста осаждали центрифугированием, промывали 0,02 М триэтанолламинным буфером с удельной электропроводностью