

30. Нейфах С. А. Роль митохондрий в клеточной наследственности // Молекуляр. генетика митохондрий.—Л.: Наука, 1977.—С. 8—18.
31. Asano K., Amagase S., Matsuura E. T. et al. Changes in the rat liver mitochondrial DNA upon aging // Mech. Ageing and Develop.—1991.—60, N 3.—P. 275—284.
32. Asano K., Nakamura M., Asano A. et al. Quantitation of changes in mitochondrial DNA during aging and regeneration of the rat liver using non-radioactive DNA probes // Ibid.—1992.—62, N 1, 2.—P. 85—98.
33. Saul R. L., Gee P., Ames B. N. Free radical, DNA damage, and aging // Modern Biol. Theor. of Aging.—New York: Raven press, 1987.—P. 113—129.

Ин-т геронтологии АМН Украины, Киев
НИЦ «Сонар» АН Украины, Киев

Получено 26.03.93

УДК 547.163.4

С. В. Коношенко

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНОВ ДВУХ ВИДОВ ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ: ЧЕРЕПАХИ TESTUDO HORESFIELDI И УЖА ВОДЯНОГО NATRIX TESSELATA

Методом ЯМР-релаксации изучена внутримолекулярная подвижность электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов водяного ужа и черепахи. Установлены различия и взаимосвязь уровня внутримолекулярной подвижности со средством фракций гемоглобинов к кислороду.

Введение. Развитие физико-химических методов исследования и теории биополимеров, а также накопление экспериментальных данных по этой проблеме показали, что для выяснения механизма функционирования гемоглобина недостаточно знания его статистической структуры. Методом РСА доказано [1], что функционирование гемоглобина сопровождается изменением его конформации. Очевидно, что конформационные перестройки происходят за счет внутримолекулярных движений атомов и атомных группировок, и от динамических характеристик равновесных и неравновесных процессов зависит функциональная активность белка. Однако вышеуказанные изменения происходят очень быстро и изучать динамику столь быстрых перемещений полипептидных цепей и отдельных групп белка в пространстве очень сложно. Проще исследовать внутримолекулярную динамику одной из форм гемоглобина в состоянии равновесия, допуская, что интенсивности как равновесной, так и неравновесной динамики должны находиться в коррелятивных соотношениях.

В настоящей работе методом ЯМР-релаксации проведен сравнительный анализ внутримолекулярной подвижности электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов двух представителей класса пресмыкающихся и связи динамической структуры белка с его функциональной активностью.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили гемоглобины двух представителей класса пресмыкающихся — черепахи (*T. horesfieldi*) и водяного ужа (*N. tessellata*). Кровь брали от пяти и семи особей каждого вида соответственно. Гемоглобин выделяли изпод стромы по [2], гемолизируя эритроциты в присутствии дистиллированной воды и толуола. Фракционный состав гемоглобина изучали с помощью диск-электрофореза в 7 %-м ПААГ [3]. Фракции гемоглобина выделяли препаративным электрофорезом в блоках 7 %-го ПААГ [4]. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (рН 8,3) при напряжении 50 В и силе тока 10—20 мА на белок геля.

© С. В. Коношенко, 1993

Сродство электрофоретически гомогенных фракций гемоглобина к кислороду анализировали с помощью построения кривых кислородной диссоциации [5]. Содержание метгемоглобина в растворах определяли по [6]; во всех исследуемых пробах уровень его не превышал 3 %.

Релаксационные кривые снимали на ЯМР-релаксметре «Minispec-120» («Bruker», ФРГ) при температуре 25 °С [7, 8]. В качестве исследуемых образцов использовали 5,0 %-е растворы гемоглобина в D₂O. Спад свободной индукции регистрировали в режиме диодного

Таблица 1

Значения времен релаксации БРК ССИ и САСЭ для двух фракций гемоглобинов

Показатель	Водяной уж		Черепаша	
	Hb-1*	Hb-2	Hb-1*	Hb-2
Т-БРК (ССИ), 10 ⁻³ мс	4,8±0,004	4,49±0,005	4,55±0,006	4,3±0,065
Т-БРК (САСЭ), мс	14,0±0,01	11,8±0,012	12,8±0,009	11,1±0,011

* Фракции с наиболее высоким содержанием белка.

детектирования. Время между 90 °-ми импульсами составляло 1 с, каждая точка спада накапливалась 40—35 раз. Для регистрации спада амплитуды спинового эха (САСЭ) использовали импульсную последовательность Карра — Парселла — Мейбума — Гилла. Время между последовательностями составляло 0,1 с. Релаксметр работал в режиме фазового детектирования.

Особенностью релаксационных кривых всех измеренных образцов являлось наличие как минимум двух различных экспоненциальных участков: быстро- и медленно релаксирующих компонент (БРК и МРК). Время релаксации отдельных компонент определяли при помощи программного обеспечения фирмы «Bruker».

Таблица 2

Показатели полунасыщения кислородом электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов

Объект исследования	P ₅₀ , мм рт. ст. (M±m)	
	Hb-1	Hb-2
Водяной уж	27±1,0	23±0,9
Черепаша	25±0,8	22±1,1

Результаты и обсуждение. Методом диск-электрофореза в 7 %-м ПААГ гемоглобины черепахи и ужа разделяются на две электрофоретически гомогенные фракции: главную (Hb-1) и минорную (Hb-2), соотношение которых составляет 60 : 40 для гемоглобина ужа и 80 : 20 — для гемоглобина черепахи.

В табл. 1 представлены значения времен релаксации (БРК) спада свободной индукции (ССИ) и САСЭ, полу-

лученные методом ЯМР-релаксации для электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов ужа и черепахи.

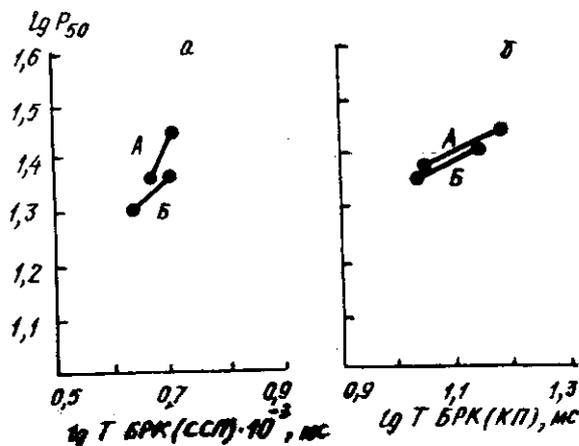
Анализ времен релаксации свидетельствует о том, что БРК ССИ соответствует, основываясь на данных литературы [9, 10], релаксации протонов наиболее плотноупакованных и малоподвижных участков глобулы. В связи с этим время релаксации БРК ССИ может быть использовано как параметр внутримолекулярной подвижности в белке, несущий информацию о динамической структуре наименее лабильных участков в макромолекуле гемоглобина. Анализ времен релаксации компонент САСЭ позволяет отнести БРК к релаксации наиболее подвижных участков глобулы белка, тогда как МРК — к релаксации протонов воды, вышедшей в растворитель (D₂O) в результате водородного обмена и протонов лабильно связанной белком воды. Поэтому в качестве показателя интенсивности внутримолекулярной подвижности в наиболее лабильных участках глобулы гемоглобина может быть использовано время релаксации БРК.

Сравнительный анализ времен релаксации дает возможность установить, что в исследуемых гетерогенных системах гемоглобина есть фракции с большей и меньшей внутримолекулярной подвижностью. Так, Нв-1 характеризуются большей внутримолекулярной подвижностью в отличие от минорных фракций (требуется большее время для возвращения спиновой системы молекул белка к больцмановскому равновесию).

Методом построения кривых кислородной диссоциации были определены показатели полунасыщения кислородом (P_{50}) электрофоретически гомогенных фракций гемоглобинов (табл. 2).

Согласно полученным данным, достоверно более высокое сродство к кислороду проявляют минорные фракции ($P_{50} = 22-23$ мм рт. ст.).

Распределение величин P_{50} в соответствии с временем релаксации БРК спада свободной индукции (а) и спада амплитуды спинового эха (КП) (б) для электрофоретически гомогенных фракций гемоглобина ужа (А) и черепахи (Б)



Имеются видовые различия в сродстве к кислороду и в уровнях внутримолекулярной подвижности между главными фракциями гемоглобинов.

Сравнение результатов ЯМР-релаксации с данными по сродству фракций гемоглобинов к кислороду обнаруживает определенную корреляцию между состоянием динамической структуры белка и его функциональной активностью: чем меньше внутримолекулярная подвижность гемоглобина, тем выше его сродство к кислороду (рис. 1, а, б).

Таким образом, одной из причин различной функциональной активности фракций гемоглобинов черепахи и водяного ужа может быть различная интенсивность внутримолекулярной подвижности. Вероятно, чем она ниже, тем больших энергетических затрат требует $R \rightarrow T$ -конформационный переход при дезоксигенации. Соответственно гемоглобины с более ограниченной внутримолекулярной динамикой будут иметь более высокое сродство к кислороду.

Резюме. Методом ЯМР-релаксациі вивчено внутрішньомолекулярну рухливість електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів водяного вужа та черепахи. Встановлено розбіжності і взаємозв'язок рівня внутрішньомолекулярної рухливості із спорідненістю фракцій гемоглобінів до кисню.

Summary. Intramolecular movement of electrophoretically homogeneous fractions of hemoglobins in two reptiles species: *Testudo horsfieldi* and *Natrix tessellata* has been studied by NMR-relaxation.

Species differences of these hemoglobins and the connection of intramolecular movement with affinity to oxygen of hemoglobins fractions has been determined.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perutz M. F., Fermi G., Fogg J., Rahbar S. Indirect allosteric effects of a neutral mutation. Structure of deoxyhaemoglobin North Chicago (ProC2(36) β →Ser) // *E. Biol. Chem.*—1988.—201, N 2.— P. 459—461.

2. *Drabkin D.* The crystallographic and optical properties of the haemoglobin of man in the comparison with those of other species // *Ibid.*—1946.—164.— P. 703—706.
3. *Davis B.* Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Annu. N. Y. Acad. Sci.*—1964.—121, N 11.— P. 404—406.
4. *Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н.* Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // *Лаб. дело.*—1985.— № 12.— С. 712—714.
5. *Шорохов Ю. А.* Спектрофотометрический метод определения кривой диссоциации оксигемоглобина в кювете десатураторов // *Физиол. журн.*—1974.—9, № 4.— С. 654—657.
6. *Benesch R. E., Benesch R., Yung S.* Egnations for the spectrophotometric analysis for haemoglobin mixtures // *Anal. Biochem.*—1973.—55, N 3.— P. 245—248
7. *Аксенов С. И.* Исследование динамической структуры глобулярных белков импульсными методами ядерного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология.*—1983.—17, № 3.— С. 475—483.
8. *Вацман А. А., Пронин И. С.* Ядерная магнитная релаксационная спектроскопия.— М.: Энергоатомиздат, 1986.—232 с.
9. *Иванников А. И., Абрамов В. М., Волков В. П., Завьялов В. П.* Сравнительное исследование динамических конформационных свойств миеломных иммуноглобулинов G человека разных подклассов импульсным методом ЯМР // *Молекуляр. биология.*—1983.—17, № 4.— С. 734—740.
10. *Федотов В. Д.* Ядерный магнитный резонанс и внутримолекулярная подвижность белков // Там же.— № 3.— С. 493—504.

Симферопольский гос. ун-т

Получено 09.10.92

УДК 575.113/577.21

В. Т. Соловьян, И. О. Андреев

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ДНК ЭУКАРИОТ В ПУЛЬСИРУЮЩЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ. ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА В ПРЕПАРАТАХ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР

*Изучены свойства ДНК-топоизомеразного комплекса в препаратах изолированных ядер. Показано, что комплекс ядерная ДНК—топоизомераза II функционирует одинаково как в Mg^{2+} , так и в Ca^{2+} -содержащей среде. В отличие от комплекса в условиях *in vivo*, ядерный ДНК-топоизомеразный комплекс, обработанный ЭДТА, способствует не лигированию, а возрастанию расщепления ядерной ДНК. Зависимое от ЭДТА усиленное расщепление ДНК наблюдается в случае, если ядра, инкубируемые в $Mg^{2+}(Ca^{2+})$ -содержащей среде, были обработаны ЭДТА или при инкубации $MgЭ(CaЭ)$ -ядер в присутствии ионов Mg^{2+} . Показано, что ядерный комплекс, обработанный $DS-Na$, приобретает свойство $DS-Na$ -независимо расщеплять ядерную ДНК.*

*Особенности поведения комплекса топоизомераза II — ядерная ДНК могут быть связаны с участием фермента в поддержании высших уровней структурной организации хроматина, что приводит к модификации комплекса в условиях *in vivo*. Высказано предположение о наличии в клетках различных вариантов ДНК-топоизомеразного комплекса, имеющих физиологическое значение.*

Введение. В предыдущем сообщении [1] мы привели данные, показывающие, что ДНК в клеточном ядре является составной частью ДНК-топоизомеразного комплекса. Свойства его сходны с таковыми модельного комплекса, описанными для системы *in vitro*, главное из которых заключается в способности внутриядерной топоизомеразы II осуществлять равновесную реакцию разрыва — воссоединения ядерной ДНК [1].

В настоящей работе мы приводим данные, касающиеся особенностей функционирования ядерного ДНК-топоизомеразного комплекса.

Материалы и методы. Препараты интактных ядер 5-дневных проростков кукурузы получали, как описано ранее [3], в буфере для выделения, содержащем 5 мМ $MgCl_2$ (Mg -ядра) или 5 мМ $CaCl_2$ (Ca -

© В. Т. Соловьян, И. О. Андреев, 1993