

УДК 577.1:612.73/74

БИОХИМИЯ

Л. Л. АЛИЕВСКАЯ, Е. П. ЧЕТВЕРИКОВА

КРЕАТИНКИНАЗА В МИОФИБРИЛЛАХ СКЕЛЕТНОЙ И СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

(Представлено академиком Г. М. Франком 3 VII 1970)

Ферментативные свойства миофибриллярных белков изучены сравнительно мало. Кроме миеозновой АТФазы в миофибриллах найдены ацетилхолинэстераза⁽¹⁾, глутаминаза⁽²⁾, дезаминаза адениловой кислоты⁽³⁾ и некоторые ферменты гликолиза⁽⁴⁾. Относительно содержания креатинкиназы в миофибриллах нет однозначных данных. По некоторым работам, этот фермент не обнаружен в миофибриллах скелетной⁽⁵⁾ и гладкой⁽⁶⁾ мышц. Другие авторы сообщили о наличии этого фермента в миофибриллах скелетной⁽⁴⁾ и сердечной⁽⁷⁾ мышц; было сделано предположение о тесной связи этого фермента с сократительными белками⁽⁸⁾.

Мы исследовали креатинкиназную активность миофибрилл и характер связи этого фермента с сократительными белками. Сердце крыс перфузировали 0,9% КСI, измельчали дождичками и гомогенизировали в гомогенизаторе типа Поттер — Эльведжема с 5 объемами 20 мМ трис-НСI-буфера рН 7,2, содержащего 2 мМ ЭДТА⁽⁷⁾, в холодной комнате. Гомогенат центрифугировали при 100 г в течение 15 мин., осадок суспендировали при помощи гомогенизатора в трис-НСI-буфере с ЭДТА и вновь центрифугировали в течение 20 мин. при 6000 г. Последнюю процедуру повторяли 5—6 раз для получения минимального значения активности креатинкиназы в промытых водах. Качество миофибрилл в отмытом осадке контролировали на микроскопе МБИ-6 с фазово-контрастным устройством. Скелетные мышцы задних лап крыс гомогенизировали и выделяли миофибриллы, как описано для сердечной мышцы.

Студенистый осадок отмытых миофибрилл делили на две равные части и экстрагировали одну часть 0,02 М фосфатным буфером рН 7,2 для экстракции водорастворимых белков, а другую 0,92 М раствором КСI для экстракции сократительных белков. Экстракцию проводили в течение 18 час. при 4°, затем суспензии центрифугировали 15 мин. при 20 000 г и определяли активность креатинкиназы в супернатантах и осадках.

Активность креатинкиназы определяли двумя способами: а) в прямой реакции АТФ + креатин → АДФ + креатинфосфат по образованию креатинина⁽⁹⁾; б) в обратной реакции — по образованию креатина в инкубационной смеси, содержащей 1 мМ АДФ, 3 мМ креатинфосфата и 10 мМ ацетат магния в трис-ацетатном буфере рН 7,0⁽¹⁰⁾. Содержание белка во фракциях определяли биуретовым методом⁽¹¹⁾ и удельную активность фермента выражали в микромолях креатина или креатинина на 1 мг белка за 2 мин.

Из табл. 1 видно, что около половины креатинкиназной активности мышечной клетки находится в надосадочной жидкости, содержащей митохондрии, микросомы и гиалоплазму. Остальная активность сосредоточена в рыхлом осадке неотмытых миофибрилл, содержащем частично и фермент надосадочной жидкости. Эта примесь удаляется при первом промывании, и последующие промывания экстрагируют креатинкиназу, слабо связанную с сократительными белками. После пятикратного тщательного промывания в миофибриллах сердечной мышцы остается креатинки-

Таблица 1

Креатинкиназная активность миофибрилл сердечной и скелетной мышцы

	Колич. креатина, μ мол., на фракцию		Уд. активность, μ мол/мг за 2 мин.*	
	серд. м.	скел. м.	серд. м.	скел. м.
Реакция образования АТФ и креатина, рН 7,2**				
Гомогенат	4183	16400	3,1	9,4
Надосадочн. жидкость (1000 g)	2168	10808	8,0	35,0
Промывные воды (6000 g)				
I	590	2951	3,6	21,3
II	257	843	3,6	8,4
III	175	256	3,5	2,6
IV	120	145	3,3	3,3
V	155	53	1,9	1,8
Отмытые миофибриллы	544	113	1,0	0,1

Реакция синтеза креатинфосфата***

Гомогенат	1670	4449	1,1	2,0
Надосадочная жидкость (1000 g)	939	2417	2,6	11,0
Промывные воды (6000 g)				
I	305	1041	1,2	5,0
II	55	177	0,6	2,0
III	44	70	0,6	1,5
IV	25	31	0,6	1,5
V	27	—	0,8	—
Отмытые фибриллы	209	51	0,3	0,1

* См. описание методики.

** Средние данные из 4 опытов в пересчете на 5 г ткани.

*** Средние данные из 5 опытов в пересчете на 5 г ткани.

Таблица 2

Креатинкиназная активность экстрактов из миофибрилл
(по реакции образования АТФ и креатина)

	Колич. креатина μ мол. на фракцию		Уд. активность, μ мол/мг за 2 мин.*	
	серд. м.	скел. м.	серд. м.	скел. м.
Отмытые миофибриллы до экстрак- ции	500	110	1,0	0,1
Экстракция (KCl) 0,9 M				
Супернатант	928	151	4,9	0,24
Осадок	199	61	0,8	0,1
Экстракция фосфатным буфером 0,02 M				
Супернатант	109	54	3,5	1,3
Осадок	902	93	1,6	0,09

* См. описание методики.

ная активность, которая составляет 13% исходной активности гомогената и одну треть его удельной активности. В миофибриллах скелетной мышцы остаются лишь следы активности: 0,7% при пересчете на исходную активность гомогената из 5 г ткани.

В табл. 1 показаны также результаты, полученные при определении активности в других условиях — по прямой реакции. Хотя в этом случае абсолютные величины активности ниже, чем в реакции синтеза АТФ, соотношения были получены совершенно те же: 13% активности гомогената обнаруживается в отмытых миофибриллах из сердца и 1% в миофибриллах, полученных из скелетной мышцы.

После экстракции миофибрилл из обоих видов мышц раствором высокой ионной силы (0,9 M KCl) большая часть креатинкиназы переходит в

экстракт вместе с сократительными белками (табл. 2), миофибриллы при этом разрушаются. Противоположная картина наблюдается при экстракции раствором низкой ионной силы. В этом случае большая часть фермента, особенно миофибрилл сердца, остается в осадке, и в раствор переходит немного креатинкиназы вместе с небольшим количеством водорастворимых белков, еще оставшихся после многократного отмывания. Поэтому удельная активность фермента в фосфатном буфере высокая, хотя количество его меньше, чем в осадке миофибрилл.

Следует отметить, что после длительной экстракции сумма активности экстракта и осадка больше исходной активности отмываемых миофибрилл, особенно в сердечной мышце (см. табл. 2). Миофибриллы не имеют наружной мембраны, и субстраты легко проникают между нитями сократительных белков⁽³⁾, поэтому увеличение активности вряд ли связано с лучшей доступностью субстратов для фермента. Более вероятно, что это увеличение свидетельствует о тесной связи креатинкиназы с сократительными белками до экстракции.

Креатинкиназа может быть адсорбирована на поверхности миофибрилл или находится внутри них между нитями актина и миозина. Наши данные показывают, что в миофибриллах сердечной мышцы содержится креатинкиназа, которая не может быть извлечена раствором низкой ионной силы. Она переходит в раствор только вместе с сократительными белками, причем удельная ферментативная активность KCl-экстракта довольно высока (см. табл. 2). Эта связанная креатинкиназа может обеспечить ресинтез АТФ во время сокращения, так как АТФазная активность сердечных миофибрилл (P_i 0,1 $\mu\text{мол}/\text{мг}\cdot\text{мин}$ ^(12, 13)) значительно ниже найденной нами креатинкиназной активности (0,5 и 2,5 $\mu\text{мол}/\text{мг}\cdot\text{мин}$ для отмываемых миофибрилл и KCl-экстракта соответственно).

В скелетной мышце, напротив, креатинкиназа очень слабо связана с сократительными белками. В миофибриллах из этой мышцы тоже остается часть креатинкиназной активности, которая извлекается только вместе с сократительными белками. Однако величина ее ничтожно мала по сравнению с исходной активностью мышцы и меньше АТФазной активности миофибрилл. Последняя величина составляет 0,2—0,6 $\mu\text{мол}$ P_i на 1 мг белка в 1 мин.^(12, 14, 15), что значительно больше найденной нами креатинкиназной активности отмываемых миофибрилл и KCl-экстракта (0,05 и 0,12 $\mu\text{мол}/\text{мг}\cdot\text{мин}$ соответственно). Миофибриллы скелетной мышцы во время промывания теряют активность гораздо быстрее, чем фибриллы сердца (см. табл. 1). Вероятно, выход креатинкиназы из миофибрилл скелетной мышцы происходил с начала их выделения, почему содержание этого фермента в слабосвязанной форме может превышать 8% от исходной активности гомогената (суммарная активность промывных вод II—V по отношению к активности гомогената, табл. 1).

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушчино-на-Оке

Поступило
12 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Л. Фердман, Укр. біохім. журн., 39, 473 (1967). ² Г. Г. Силакова, С. М. Поліщук, там же, 36, 598 (1964). ³ Е. Ю. Нечипоренко, там же, 37, 352 (1965). ⁴ М. П. Дмитриенко, Г. О. Пхакадзе, там же, 40, 196 (1968). ⁵ S. V. Pegg, Symposia Soc. Exp. Biol., 9, 1955. ⁶ Н. Г. Гіммельрейх, Укр. біохім. журн., 36, 784 (1964). ⁷ J. H. Ottway, Nature, 215, № 5100, 521 (1967). ⁸ Э. П. Сорени, Р. Г. Дегтярь, Укр. біохім. журн., 20, 250 (1948). ⁹ Е. П. Четверикова, Л. Л. Алиевская, ДАН, 182, № 6 (1968). ¹⁰ Е. П. Четверикова, А. В. Крипская и др., В сборн. Свойства и функции макромолекулярных систем и макромолекул, 1969. ¹¹ A. G. Gornall, C. J. Bardavill, M. David, J. Biol. Chem., 177, 2, 751 (1949). ¹² Ac. In. Stam, C. R. Honig, Biochim. et biophys. acta, 60, 259 (1962). ¹³ M. Barany, E. Gaetjens et al., Arch. Biochem. and Biophys., 106, 280 (1964). ¹⁴ J. C. Seidel, F. A. Sreter et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 662 (1964). ¹⁵ J. C. Seidel, Federat. Proc., 23, № 5, Part I, 901 (1964).