

УДК 577.3.591.174

БИОФИЗИКА

Н. В. САМОСУДОВА, М. Б. КАЛАМКАРОВА, М. М. ОГИЕВЦКАЯ,
В. П. НАНКИНА, академик Г. М. ФРАНК

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛЕГКОГО МЕРОМИОЗИНА И ЕГО ФРАКЦИИ МЕТОДОМ АНТИТЕЛ, МЕЧЕННЫХ ФЕРРИТИНОМ

Использование меченых антител является пока единственным методом, позволяющим получить данные о локализации сократительных белков мышцы. Большой интерес представляет молекулярная анатомия миозиновой нити, состоящей из двух самостоятельных фрагментов: тяжелого меромиозина (ТММ) — глобулярной части молекулы (головки) и легкого меромиозина (ЛММ) — стержневой части молекулы, почти полностью состоящей из α -спиралей.

Миозиновая молекула имеет антигенные группы, специфичные как для ТММ, так и для ЛММ. До настоящего времени локализация ЛММ была изучена только на уровне светового микроскопа.

В 1963 г. методом антител, меченных флуоресцеином, авторами было показано распределение легкого меромиозина (ЛММ) в изолированных миофибриллах грудной мышцы цыпленка, фиксированных 10% буферным формалином (¹). Наблюдалась дискретная локализация антител в виде двух центральных полос (*H*-зона) и боковых (на краю *A*-диска) в отличие от результатов, полученных на глицеринизированной мышце, согласно которым только боковые полосы соответствуют локализации ЛММ (²⁻⁴). Однако в одной из последних работ (⁵), выполненной методом флуоресцентных антител, также было обнаружено, что при «окрашивании» миофибрилл анти-ЛММ локализация антител не ограничивается только боковыми зонами *A*-диска, а наблюдается и в *H*-зоне, т. е. зоне, свободной от актиновых нитей.

В настоящей работе на уровне электронного микроскопа представлено сравнительное исследование фрагментов миозина: легкого меромиозина и его первой колоночной фракции — ЛММ-1, полученной методом колоночной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50. Интерес к первой колоночной фракции вызван ее особыми свойствами: она обладает способностью снимать напряжение АТФ-сокращенных глицеринизированных волокон и снижать суперпреципитацию актомиозинового геля.

Материал и методы. Миозин получали из грудной мышцы цыпленка модифицированным методом Сент-Дьердьи (⁶) со специальной очисткой от актомиозина. ЛММ был получен методом Михали и Сент-Дьердьи (⁷). Первая колоночная фракция выделялась на колонке с ДЭАЭ-сефадексом А-50 (⁸).

Схема иммунизации: ЛММ и ЛММ-1 вводили трижды с интервалом 2 недели. Две первые инъекции делались внутримышечно в виде суспензии с адъювантом Фройнда, 3 инъекция — внутримышечно без адъюванта. На каждое введение брали 15—17 мг белка.

Иммунный γ -глобулин получали высаливанием при 40% насыщении сульфатом аммония. Иммуноглобулин выделяли после диализа против физиологического раствора (рН 7,4) на ДЭАЭ-сефадексе А-50 (⁹). Конъюгирование иммуноглобулина с ферритином производили через 2-4-диизотиоцианат толуена в основном по методу, описанному ранее (¹⁰), с изменени-

ем первого этапа реакции, который проводили при 17° в течение 30 мин. В конъюгате определяли содержание общего белка (¹¹), содержание ферритина, а также проводили иммунохимическую реакцию с соответствующим антигеном и реакцию окрашивания линий преципитации берлинской лазурью для обнаружения ферритина, химически связанного с антителом.

Иммунодиффузию проводили в 0,75% агаровом геле, разведенном на фосфатном буфере, 0,01 М, рН 7,4, содержащем 0,5 М КСl и 0,03% ЭДТА. Линии преципитации развивались на 2–3 день при температуре 4°.

Полоски грудной мышцы цыпленка (от 3 до 5 мес.), прикрепленные к палочке, вырезались и фиксировались в 1% глутаральдегиде (рН 7,2) в

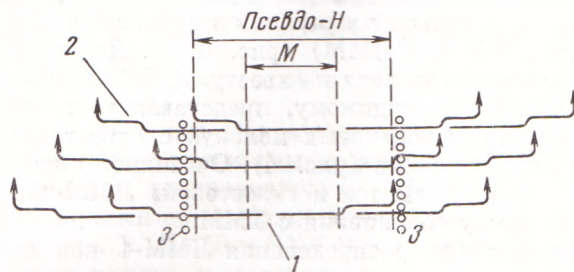


Рис. 4. Схема упаковки миозиновых молекул: 1 — «хвост», 2 — «головка». Распределение зерен ферритина (3)

течение 5–10 мин. После промывания в фосфатном буфере, рН 7,2 (1–2 часа), мышца разбивалась в гомогенизаторе (в том же буфере) на отдельные миофибриллы. Суспензия миофибрилл окрашивалась ферритиновым конъюгатом в отношении 1:1 при 37° в течение 40–45 мин. с последующей промывкой в буфере, рН 7,2 фиксацией в 1% OsO₄ и заливкой в эпоксидную смолу.

Результаты и обсуждение. Рис. 1* демонстрирует миофибриллы, окрашенные анти-ЛММ, виден анизотропный диск из расслабленной миофибриллы. Вся Н-зона, за исключением псевдо-Н-зоны и М-линии, заполнена меткой антител — ферритином. Более слабые скопления ферритина наблюдаются в краевых зонах А-диска. В сокращенных миофибриллах анти-ЛММ сосредоточивается в зонах, пограничных с Z-линией, исчезая из центра А-диска после того, как происходит вдвигание тонких нитей в результате сокращения.

Параллельно с анти-ЛММ миофибриллы «окрашивались» анти-ЛММ-1. Анти-ЛММ-1 локализовалась в виде узких полос вдоль границы псевдо-Н-зоны. Между «окрашенной» полосой и краем Н-зоны остается участок, свободный от ферритиновой метки (рис. 2*).

На рис. 3* представлены картины иммунодиффузии легкого меромиозина и первой колоночной фракции с их антителами, а также иммуновзаимодействие этих субфрагментов миозина с антимиозином. Иммунодиффузия ЛММ с анти-ЛММ дает три полосы преципитации, свидетельствующие о сложном составе ЛММ (рис. 3а). ЛММ-1 образует при встречной диффузии с анти-ЛММ-1 нерезкую полосу преципитации (рис. 3б), что может быть следствием неполной антигенной гомогенности. По-видимому, компоненты, составляющие препарат, мало различаются по длине молекулы и обладают близкими коэффициентами диффузии в агаре. При иммунодиффузии антимиозина (рис. 3в, центр) с миозином и ЛММ наблюдается слияние преципитационных полос, подтверждающих присутствие гомологичных антител с ЛММ в антимиозиновой сыворотке. Иммуновзаимодействие анти-ЛММ и ЛММ-1 дает 2 линии преципитации

* Рис. 1, 2 и 3, см. вклейку к стр. 485.

(рис. 3з), которые обнаруживают гомологичность с двумя линиями, образуемыми диффузией ЛММ и анти-ЛММ. Наблюдаемая нами локализация антител к ЛММ в *H*-зоне подтверждает прежние результаты авторов, полученные с флуоресцентными антителами (¹), а также соответствует локализации антимиозина в *H*-зоне, показанной нами ранее методами флуоресцентных и ферритиновых антител (^{1, 12}).

О присутствии антигенных групп ЛММ в *H*-зоне, доступных для антител, свидетельствуют и результаты, полученные с первой фракцией ЛММ. Она локализуется также в *H*-зоне в строго определенных участках, которые соответствуют границе псевдо-*H*-зоны. Как известно (¹³), так называемая псевдо-*H*-зона — это «гладкая» часть миозиновой нити, которая образуется при первоначальной агрегации миозиновых молекул по типу «хвост» к «хвосту» (ЛММ к ЛММ) (рис. 4, 1). Дальнейшая агрегация происходит уже по типу «головка» к «хвосту» (ТММ к ЛММ) (рис. 4, 2). Граница псевдо-*H*-зоны, по-видимому, представляет линию совмещения «первых» головок одних миозиновых молекул с «хвостовыми» участками других, как это видно на схеме (рис. 4). Очевидно, антигенные группы фракции (ЛММ-1) располагаются в «хвостовой» ЛММ-части миозиновой молекулы ближе к месту соединения с ТММ.

Таким образом, картина распределения ЛММ-1 как составной части миозина и ЛММ полностью соответствует локализации указанных выше белков.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
29 V 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. М. Франк, Н. В. Самосудова и др., Биофизика, 8, 569 (1963). ² J. M. Marshall, H. Holtzer et al., Exp. Cell Res. Suppl., 7, 249 (1959). ³ F. Pere, J. Cell Biol., 28, 505 (1966). ⁴ A. G. Szent-Gyorgyi, H. Holtzer, Biochim. et biophys. acta, 41, 14 (1960). ⁵ S. Lowey, L. A. Steiner, J. Mol. Biol., 65, 111 (1960). ⁶ А. Сент-Дьердьи, О мышечной деятельности, М., 1947. ⁷ E. Mihalyi, A. G. Szent-Georgyi, J. Biol. Chem., 201, 189 (1953). ⁸ H. Mueller, Perry, Biochem. J., 80, 247 (1961). ⁹ J. S. Baumstark, R. J. Laffin, W. A. Bardawil, Arch. Biochem. and Biophys., 108, 514 (1964). ¹⁰ М. М. Огиевская, Н. В. Самосудова и др., Биофизика, 13, 873 (1968). ¹¹ H. O. Lowry, L. N. Rosebroug et al., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). ¹² Н. В. Самосудова, М. М. Огиевская и др., Биофизика, 13, 877 (1968). ¹³ F. Pere, J. Mol. Biol., 27, 203 (1967).