

М. Ф. КОНСТАНТИНОВА

**УСТОЙЧИВОСТЬ К НАГРЕВУ И ТРИПСИНУ АДЕНИЛАТКИНАЗЫ
ДВУХ ВИДОВ ЛЯГУШЕК, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО
ТЕПЛОЛЮБИВОСТИ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 17 VI 1971)

Согласно гипотезе (1), уровень конформационной подвижности белковых молекул является существенным в приспособлении вида к температуре среды. Косвенным показателем величины конформационной гибкости может служить устойчивость белковых макромолекул к денатурирующему действию нагрева. Этим можно объяснить многократно обнаруживаемое различие в теплоустойчивости одноименных белков у близкородственных видов, отличающихся по теплолюбивости. Другим косвенным показателем конформационной гибкости белковых молекул является устойчивость их к протеиназам. В литературе имеется ряд данных, показывающих, что многие воздействия на белок сходно изменяют его устойчивость и к нагреву, и к протеиназам (2, 3). Было обнаружено (4-6), что белки более теплолюбивых видов устойчивее не только к нагреву, но и к протеиназам. Уровень теплоустойчивости многих белков (особенно термостабильных) может не иметь приспособительного значения. Устойчивость же к протеиназам должна отражаться на сроке полужизни белка, что имеет существенное значение для регуляции количества белка в клетке (2, 3).

Задача настоящей работы состояла в параллельном исследовании устойчивости белка — аденилаткиназы — к нагреву и протеолизу на примере двух близкородственных видов лягушек, существенно отличающихся по теплолюбивости: южной озерной (*Rana ridibunda*) и северной травяной (*Rana temporaria*).

Аденилаткиназа (АДК) выделялась из мышц задних конечностей лягушки по методу Котельниковой (7), модифицированному методу Калькара (8). В отличие от метода Котельниковой, полученный белок освобождался от ионов аммония путем диализа сначала против 2% раствора сервокислого аммония, потом в течение ночи против деионизированной воды (8). Препарат исследовался на ультрацентрифуге. Оказалось, что у обоих видов лягушек, помимо основного пика, присутствует еще один пик — белок с большим молекулярным весом, не обладающий активностью АДК. Количество белка в растворе определялось спектрофотометрически при 310 мμ, методом микробиурета по Итцхаки и Гиллу (9). Устойчивость АДК к нагреву и к протеолизу характеризовалась через устойчивость активного центра. Для определения теплоустойчивости раствор белка в закрытой пробирке выдерживали 30 мин. при определенной температуре в термостате, быстро охлаждали и определяли ферментативную активность. Реакцию протеолиза проводили в термостатированной кювете при температуре 25°, определенном значении рН 7,5 и при постоянном перемешивании раствора. Через определенные промежутки времени отбирались пробы, в которых определялась ферментативная активность. Соотношение концентрации белка и протеолитического энзима в кювете составляло 100 : 1. Для определения ферментативной активности использовался гексакиназный метод (8). Реакционная смесь имела следующий состав: 0,5 мл белка (20—30 μг), 0,1 мл 0,05 М MgCl₂, 0,1 мл 1% нейтрализованной Na-соли АДФ и

0,3 мл 0,1 М трис-НСl-буфера рН 7,5, содержащего 5 мг глюкозы и 0,2 мг гексокиназы. Реакция проводилась 15 мин. при 30° и останавливалась добавлением равного объема 10% трихлоруксусной кислоты. Фильтрат подвергался 11-минутному кислотному гидролизу в кипящей бане. В гидролизате определялось суммарное количество неорганического фосфора по Фиске и Суббароу. В контрольных пробах АДК добавлялась после трихлоруксусной кислоты. Теплоустойчивость и устойчивость к протеиназе характеризовалась степенью энзиматической активности проб, после прогрева или после взаимодействия с протеиназой. Она выражалась в процентах от активности контрольной пробы. Полученные данные обрабатывались статистически. Различия между средними значениями процесса гидролиза статистически значимо на уровне $p = 0,001$. В работе использовался трипсин отечественного производства.

На рис. 1 представлены результаты определения теплоустойчивости АДК травяной (рис. 1, 1) и озерной (рис. 1, 2) лягушек. Видно, что исследуемый белок является удивительно термостабильным у обоих видов, но кривая теплоустойчивости АДК менее теплолюбивой северной лягушки располагается в области более низких температур, по сравнению с кривой для южной озерной лягушки. Температуры, вызывающие 50% потерю ферментативных свойств энзимов, соответствуют 62,5° для АДК северного вида и 73,5° для АДК южного. Таким образом, АДК южной, более теплолюбивой лягушки на 11° теплоустойчивее АДК северной лягушки. Полученные данные хорошо согласуются с результатами Глушанковой (10), определявшей теплоустойчивость АДК у этих же видов. Приводимые ею значения 50% утраты ферментативной активности приходится на 66° для травяной и на 77° для озерной лягушек, т. е. различия в теплоустойчивости между сравниваемыми видами составляют те же 11°. Разница в значениях, характеризующих 50% снижение активности, может быть объяснена различиями

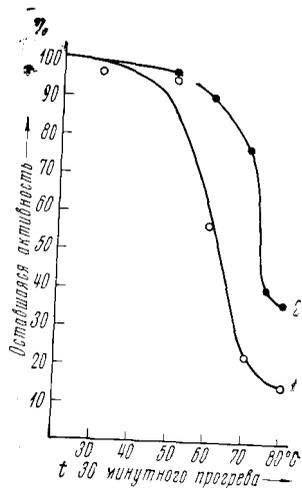


Рис. 1. Теплоустойчивость аденيلاتкиназы двух видов лягушек. 1 — теплоустойчивость АДК *Rana temporaria*, 2 — теплоустойчивость АДК *Rana ridibunda*

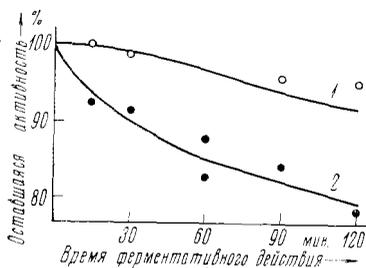


Рис. 2. Устойчивость аденيلاتкиназы северной и южной лягушек к трипсину. 1 — АДК *Rana ridibunda*, 2 — АДК *Rana temporaria*

в методах, применявшихся для выделения фермента. Результаты триптического гидролиза АДК травяной и озерной лягушек показаны на рис. 2. Сопоставление кривых обнаруживает значительное различие в ходе гидролиза белков. На кривой 1, характеризующей устойчивость АДК теплолюбивой озерной лягушки, 15-минутное воздействие трипсина не приводит к снижению ферментативной активности АДК, и даже значительное увеличение срока переваривания до 2 час. лишь незначительно снижает ее. АДК северной лягушки оказывается более чувствительной, уже через 15 мин. наблюдается некоторое снижение активности, а удлинение срока воздействия приводит к снижению активности на 20%. Таким образом, различие в устойчивости к нагреву аденيلاتкиназ исследуемых видов сопровождается аналогичным различием в их устойчивости к трипсину. Подобный параллелизм между устойчивостью к нагреву и устойчивостью к протеолизу у этих же видов лягушек обнаружен и на других белках. Так, различия в

теплоустойчивости проколлагена кожи северной и южной лягушек сопровождаются сходными различиями в устойчивости их к коллагеназе (⁴). Сывороточный альбумин северной лягушки, по сравнению с южной, оказался одновременно более чувствительным и к нагреву, и к трипсину (⁵). В работе (⁶) показано, что гексокиназы из разных органов крысы различаются по устойчивости к нагреву. Точно в такой же последовательности различаются они и по устойчивости к 3 протеолитическим энзимам: трипсину, химотрипсину и панкреатической протеиназе.

Приведенные данные позволяют говорить, что уровень устойчивости белков к протеиназам, в той же мере что и теплоустойчивость, отражает уровень конформационной гибкости макромолекул и приводится в соответствие с температурой среды в процессе дивергентной эволюции видов.

Институт цитологии
Академии наук СССР

Поступило
7 VI 1971

Ботанический институт им. В. Л. Комарова
Академии наук СССР
Ленинград

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Я. Александров, Усп. совр. биол., 60, 1 (4), 28 (1965). ² В. Я. Александров, Усп. совр. биол., 67, 3, 283 (1969). ³ V. Ja. Alexandrov, Currents in Modern Biol., 3, 9 (1969). ⁴ В. Я. Александров, А. П. Андреева, Цитология, 9, 1288 (1967). ⁵ В. Н. Витвицкий, ДАН, 194, 46, 950 (1970). ⁶ L. Grossbard, R. T. Schimke, J. Biol. Chem., 241, 15, 3546 (1966). ⁷ А. В. Котельникова, Биохимия, 18, 5, 522 (1953). ⁸ Н. М. Kalckar, J. Biol. Chem., 148, 127 (1943). ⁹ F. Itzhaki, D. M. Gill, Anal. Biochem., 9, 401 (1964). ¹⁰ М. А. Глушанкова, Сборн. Теплоустойчивость клеток животных, 1965, стр. 200.