

М. Н. ЛЮБИМОВА-ЭНГЕЛЬГАРТ, Г. А. ЮРЗИНА, С. А. БУРНАШЕВА
**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВИЗИРУЕМЫХ ИОНАМИ Ca И Mg
АТФаз В МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ РЕСНИЧЕК
ИНFUЗОРИИ TETRAHYMENA PYRIFORMIS**

(Представлено академиком А. А. Баевым 9 VIII 1972)

В предыдущих работах (^{1, 2}) на уровне электронно-микроскопической цитохимии было выяснено приблизительное распределение АТФаз (без дифференциации их природы) в морфологических структурах ресничек *Tetrahymena pyriformis* и жгутиках *Strig. oncopelti*.

На электронно-микроскопических снимках видна локализация АТФаз в виде крупных электронноплотных пятен в центральных и периферических фибриллах и матриксе ресничек *Tetrahymena pyriformis* и жгутиках *Str. oncopelti*. Более детальное изучение характера ассоциированных АТФаз нуждалось в дальнейших исследованиях. Электронно-микроскопические снимки, поскольку для активации ферментативной реакции применяли одновременно два ионных активатора Ca и Mg, не давали возможности установить природу АТФазы, связанной с различными участками морфологической структуры ресничек. Помимо общности результатов для двух ферментов в снимках было много больших электронноплотных образований, выявляющихся главным образом в матриксе ресничек. Распределение в матриксе сократительной АТФазы противоречило представлению о ее происхождении из сократительных структур. Не согласовывались также визуальные наблюдения количества черных точек с биохимическими данными, установившими, что в составе белков ресничек на долю структурных белков приходится около 60% от количества всех белков ресничек, в том числе 20% белка магний-активируемых и 40% кальций-активируемых АТФаз. Выяснение этих противоречий было предметом настоящей работы.

Методика эксперимента была той же, что и в предшествующей работе (^{3, 4, 5}), с единственным видоизменением в постановке ферментативных опытов, которые ставились только с одним ионом-активатором, предфиксация глутаровым альдегидом делалась только в половине опытов, в зависимости от задачи эксперимента.

Определение Ca- и Mg-активируемых АТФаз.

Реснички *Tetr. pyriformis* предфиксировались глутаровым альдегидом и затем инкубировались в указанной выше смеси в присутствии одного иона активатора, т. е. или Ca или Mg. Далее шла стандартная обработка. Результаты, полученные на электронно-микроскопических снимках, оказались совершенно неожиданными (рис. 1а *). В присутствии ионов Mg структура фибрилл ресничек не менялась, была отчетливо видна, а между центральными фибриллами и по краям периферических тянулись цепочки тонких черных точек Mg-АТФазы. Также черными точками фосфата свинца выявлялись и вторичные фибриллы. Совершенно иная картина выявилась с кальций-активируемой АТФазой (рис. 1б). На фоне слабовыраженного рисунка структур фибрилл в матриксе обнаруживается большое количество конгломератов электронноплотных точек, значительно превосходящих по размерам и количеству те, которые проявлялись при инкубации с двумя катионами. В этом же опыте еще более отчетливо наблюдался выход в мат-

* Рис. 1 и 2, см. вкл. к стр. 713.

рикс АТФазы, активируемой ионами кальция. Это коренное различие реакций двух белков в зависимости от присутствующего катиона — Са или Mg — на одну и ту же обработку ресничек для электронно-микроскопического анализа было непонятно. Здесь был возможен ряд предположений, и в том числе допущение взаимодействия между белками АТФазы, активируемой ионами Са и молекулами глутарового альдегида.

Действие глутарового альдегида на белок Са-АТФазы.

Принятый способ подготовки материала к электронно-микроскопическому анализу в общих чертах начинается с предфиксации материала в растворе глутарового альдегида (для уплотнения ткани и предотвращения диффузии фосфора), затем с проведения ферментативной реакции, фиксации материала и т. д. Ряд опытов для выявления локализации АТФаз были поставлены по методу Вахстейна и Мейселя, в который также входит предфиксация глутаровым альдегидом. В настоящее время глутаровый альдегид является наиболее распространенным предфиксатором в области цитохимии и применяется в концентрациях от 0,1 до 5,0 мол/л.

В начале шестидесятых годов, в период начала первых работ с предфиксацией, было обращено внимание только уплотняющие свойства глутарового альдегида в отношении ряда ферментов, далее его применяли без контроля. Однако затем выяснилось, что в области изучения полимеров проявляется иное действие глутарового альдегида. Глутаровый альдегид получил широкое применение в качестве агента, особенно успешно вызывающего «сшивку» макромолекул без потери ферментативных свойств (⁶). В 1967 г. Хабиб использовал его для получения нерастворимого трипсина. Далее тем же путем были получены нерастворимые ферменты — панаин, химотрипсин, субтилизин, каталаза и пр.

Вполне вероятно, что в случае определения Са-АТФазы глутаровый альдегид действует не как уплотнитель ткани, а производит сшивку молекул Са-АТФазы. Образующиеся нерастворимые молекулы отходят от фибрилл и переходят в матрикс. Поскольку при образовании таких макромолекул ферментативная активность сохраняется, то при последующей ферментативной реакции в этих конгломератах откладывается фосфор, реагирующий со свинцом и придающий всему конгломерату черный цвет (рис. 16). Постановка опытов без предфиксации в отдельности с ионами Са и Mg подтвердили наши предположения. Са-АТФаза полностью выявляется (рис. 2а) как основное вещество, покрывающее субъединицы фибрилл ресничек. В центре снимка имеется место, где можно обнаружить несколько поперечных срезов фибрилл и убедиться в том, как по всей наружной стенке субъединиц фибриллы распределяется черная окраска фосфата свинца, выделенного Са-АТФазой. Mg-АТФаза обнаруживается в другом месте структуры фибриллы (рис. 2б). Она располагается длинными цепочками черных точек между центральными фибриллами, составляет основу вторичных фибрилл и вкраплена по периферии фибрилл наружного кольца. Из электронно-микроскопических снимков очевидно, что эти два фермента составляют основную массу белков ресничек.

Картина поперечных срезов в увеличении не дает разницы распределения по морфологическим структурам Са- и Mg-активируемых АТФаз. В качестве примера на рис. 2 приведены поперечные срезы реснички с выявленной Mg-АТФазой. На фотографии отчетливо выявляется распределение отложений фосфата свинца по стенкам периферических и центральных фибрилл, в центре вторичных фибрилл, в ручках, наружной оболочке и пр. Та же самая картина наблюдается на поперечном срезе распределения Са-АТФазы. Для более детального изучения требуются большие увеличения и, особенно, большая четкость рисунка отложений фосфата свинца. Возможно все же, что для более детального изучения распределения Са-АТФазы нужно найти более мягкий уплотнитель и такой, который не давал бы комплекса с Са-АТФазой.

Помимо перечисленных АТФаз в субъединицах фибрилл *Tetr. rugiformis* была обнаружена пирофосфатаза. На поперечном срезе видны субъединицы. Примерно в каждой из них имеются черные точки фосфата свинца. Отсутствует пирофосфатаза только в ручках фибриллы А наружного кольца. При подсчете оказалось, что на каждую фибриллу приходится по 10—11 черных точек. Ранее в работе Бурнашевой и Юрзиной при промере и подсчете морфологически обнаруживаемых субъединиц фибрилл ресничек *Tetr. rugiformis* их было обнаружено 13.

Это совпадение не кажется случайным. Одинаковое число субъединиц и числа центров реакции с пирофосфатом, с одной стороны, и, с другой стороны, значительно меньший размер площади пирофосфатазы по отношению к площади субъединицы могут рассматриваться как свидетельство неоднородности субъединиц по белковому составу. И тогда вполне логично рассматривать субъединицу как комплекс белков, обладающих различной ферментативной активностью.

Из анализа экспериментально полученного материала выступают те основные причины, которые до последнего времени препятствовали обнаружению кальций-активируемой АТФазы на структуре не только у ресничек и фибрилл, но вообще у простейших, растений и пр.

Основной причиной является свойство белка Са-АТФазы «сшиваться» глутаровым альдегидом в более крупные агрегаты, которые извлекаются из основной структуры, переходят в матрикс и там, сохранив свою ферментативную активность, выявляются в виде бесформенных черных конгломератов. Следовательно, при определении Са-АТФазы предфиксация глутаровым альдегидом должна быть исключена⁽⁶⁾.

Определение АТФаз должно проводиться только с одним определенным ионом-активатором, поскольку только в этом случае удастся определить распределение специфических АТФаз по морфологическим структурам. Из анализа рис. 2а, показывающего распределение Са-АТФазы в структурах ресничек *Tetr. rugiformis*, можно судить о значительном содержании этого фермента в фибриллах ресничек. Эти наблюдения согласуются также с биохимическими данными, указывающими на то, что содержание Са-АТФазы достигает 40% от общего количества белков ресничек.

В структуре субъединиц обнаружена пирофосфатаза. Фермент широко распространен в мире простейших. Обнаружение третьего фермента в субъединицах фибрилл, вероятно, надо рассматривать как указание на многообразие белков в составе субъединиц фибрилл.

Приведенные данные о распределении АТФаз носят предварительный характер, поскольку в снимках со снятой предфиксацией глутаровым альдегидом рисунок структур в некоторой степени диффузен и в дальнейшем для точной аналитической ориентировки нужно будет подыскать ушлотнитель, не дающий комплексирования с молекулой белка фермента.

Помимо АТФаз в субъединицах ресничек обнаружен в небольшом количестве фермент пирофосфатаза. На основании этих данных высказывается предположение о белковой неоднородности субъединиц ресничек.

Авторы выражают благодарность Р. Р. Мосолову за предоставление литературных источников по действию глутарового альдегида.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
3 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. А. Бурнашева, Л. Г. Федорова, М. Н. Любимова, Усп. совр. биол., 56, 6, 365 (1963). ² С. А. Бурнашева, Г. А. Юрзина, М. Н. Любимова, Цитология, 9, 6, 695 (1969). ³ E. Kellenberger, E. Boy de Tour, J. Ultrastr. Res., 11, 545 (1964). ⁴ E. S. Reynolds, J. Cell. Biol., 17, 208 (1963). ⁵ M. Wachstein, J. Meisel, Am. Clin. Pathol., 27, 13 (1957). ⁶ A. F. S. A. Habeeb, Arch. Biochem. and Biophys., 119, № 1—3, 264 (1967).