

3. Kabsch W., Sander C. On the use of sequence homologies to predict protein structure: Identical pentapeptides can have completely different conformations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984. — 81, N 4.— P. 1075—1078.
4. Shaw G. S., Hodges S., Sykes B. D. Calcium-induced peptide association to form an intact protein domain: NMR structural evidence // Science.— 1990.— 249, N 4966.— P. 280—283.
5. Sternberg M. J. E., Islam S. A. Local protein sequence similarity does not imply a structural relationship // Prot. Eng.— 1990.— 4, N 2.— P. 125—131.
6. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 22.— P. 10881—10890.
7. Троцкий Г. В. Дефектные белки: постсинтетическая модификация.— Киев: Наук. думка, 1991.— 232 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 31.08.92

УДК 591.175.4

Э. Б. Бабийчук, А. М. Филенко,
Д. Стемпковски, И. Конколь, В. М. Данилова

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА НА АГРЕГАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕГО АКТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ

Проведено сравнительное исследование агрегационных характеристик (при 42°C) активных фрагментов миозина скелетных мышц кролика — химотриптического субфрагмента-1 (X-C1) без регуляторной легкой цепи (РЛЦ), Mg-напаинового субфрагмента-1 (Mg-C1), включающего РЛЦ, и тяжелого меромиозина (ТММ), содержащего дефосфорилированные или фосфорилированные РЛЦ. Показано, что помимо гидрофобных взаимодействий большее влияние на связывание РЛЦ с шарнирным сегментом головки миозина оказывают двухвалентные катионы. Полученные результаты позволяют предположить, что в присутствии двухвалентных катионов РЛЦ оказывает стабилизирующее воздействие на лабильные структуры головки миозина — «существенную» легкую цепь — и через нее на фрагмент с молекулярной массой 50 000. Действие фосфорилирования РЛЦ противоположно таковому двухвалентных катионов: оно приводит к некоторой дестабилизации структуры головки, что свидетельствует об ослаблении связывания фосфорилированной РЛЦ с головками и может служить косвенным указанием на «подстрочную» роль фосфорилирования РЛЦ при функционировании сократительной системы скелетных мышц.

Введение. Главную роль в системе сокращения мышц играет миозин. Его молекула состоит из нескольких структурных фрагментов, различающихся функционально. Эти фрагменты взаимодействуют между собой в процессе сократительного акта [1, 2]. Основная нагрузка при этом приходится на головки, представляющие собой глобулярные структуры, образованные N-концевыми участками двух тяжелых цепей миозина. На каждой головке размещены АТФазный и актинсвязывающий центры миозина. Помимо тяжелых цепей головки содержат также по две нековалентно связанные легкие цепи: «существенные» (СЛЦ), играющие важную роль в стабилизации структуры головок [3], и «регуляторные» (РЛЦ), которые в гладких мышцах и в мышцах беспозвоночных принимают непосредственное участие в регуляции сокращения. В таких сократительных системах регуляция осуществляется либо через Ca²⁺-зависимое фосфорилирование — дефосфорилирование РЛЦ, либо при непосредственном связывании Ca²⁺ с РЛЦ [4, 5]. РЛЦ миозина скелетных мышц также способны связывать Ca²⁺ и фосфорилироваться в процессе сокращения, однако непосредственного участия в регуляции запуска сокращения мышц они не принимают и, по-видимому, выполняют иные, неясные до сих пор функции.

Удобным объектом для изучения роли легких цепей миозина являются препараты изолированных головок миозина, известные под названием субфрагмент-1 (С1). Они несколько различаются в зависимости от способа получения [6—8]. Так, химотриптический С1 (X-C1) — ре-

© Э. Б. Бабийчук, А. М. Филенко, Д. Стемпковски, И. Конколь, В. М. Данилова, 1993

зультат ограниченного гидролиза препаратов миозина α -химотрипсином в отсутствие двухвалентных катионов — имеет укороченную тяжелую цепь (96 000) и только одну легкую цепь (СЛЦ). Mg-С1, выделенный с помощью папаина в присутствии Mg^{2+} , содержит более длинную тяжелую цепь (102 000) за счет шарнирного участка между головкой и стержневой частью миозина и обе легкие цепи. Для исследования структурно-функциональных характеристик миозина также широко используется еще один его активный фрагмент — тяжелый меромиозин (ТММ), образующийся при гидролизе миозина α -химотрипсином в среде с высокой ионной силой в присутствии двухвалентных катионов.

ТММ содержит две головки и часть стержня миозина (субфрагмент-2 (С2)), которая не принимает участия в образовании толстых нитей [9].

В настоящей работе сделан анализ особенностей взаимодействия регуляторных легких цепей миозина

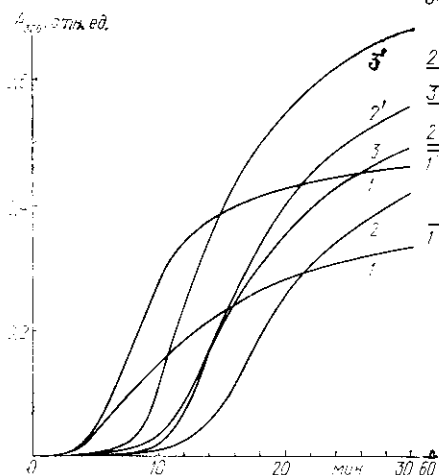


Рис. 1. Изменение во времени оптического поглощения (светорассеяния) (A_{320}) препаратов ТММ при действии повышенной температуры (42°C). Препараты ТММ (0,2 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей (ммоль/л): трис-НС1 (рН 7,8)—30; КС1—100, NaN_3 —1; дитиотреитол—1; ЭДТА—1 (кривые 1, 1'), или CaCl_2 —1 (кривые 2, 2'), или MgCl_2 —1 (кривые 3, 3'). Кривые 1'—3' относятся к препаратам ТММ с фосфорилированными РЛЦ, 1—3 — к препаратам с дефосфорилированными РЛЦ

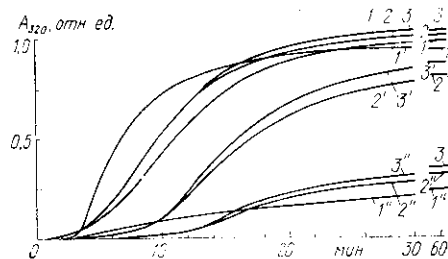


Рис. 2. Изменение во времени оптического поглощения (светорассеяния) (A_{320}) препаратов X-С1 (кривые 1—3), Mg-С1 (кривые 1'—3') и ТММ (кривые 1''—3'') при действии повышенной температуры (42°C). Названные препараты (0,1 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей (ммоль/л): трис-НС1 (рН 7,2)—30; КС1—100, NaN_3 —1; дитиотреитол—1; ЭДТА—1 (кривые 1, 1' и 1''), или CaCl_2 —1 (кривые 2, 2' и 2''), или MgCl_2 —1 (кривые 3, 3' и 3''). Все препараты дефосфорилированы

с тяжелыми цепями его головок и влияния на это взаимодействие фосфорилирования РЛЦ и двухвалентных катионов. Для этого применяли препараты Mg-С1, X-С1 и ТММ, содержащий полностью фосфорилированные или полностью дефосфорилированные РЛЦ. Агрегационные характеристики белковых препаратов регистрировали с помощью метода светорассеяния.

Материалы и методы. В работе использовали трис-основание, папаин, α -химотрипсин, соевый ингибитор трипсина, NaN_3 , додецилсульфат натрия (DS-Na) фирмы «Serva» (Германия), кумасси ярко-голубой R-250 фирмы «Reanal» (Венгрия). Остальные реактивы квалификации х. ч. и ч. д. а. — отечественного производства.

Миозин из скелетных мышц кролика выделяли по методике Перри [10] с некоторыми модификациями. С1 миозина, содержащий интактные РЛЦ (Mg-С1), получали в соответствии с работой [8]; химотриптический С1 (X-С1) — по методу [11]; ТММ, содержащий полностью фосфорилированные или полностью дефосфорилированные РЛЦ, — по [12]. Степень фосфорилирования РЛЦ определяли с помощью электрофореза в мочеvine. Чистоту препаратов проверяли с помощью DS-Na-гель-электрофореза, а также путем анализа их спектров поглощения. Поглощение и светорассеяние используемых препаратов измеряли на спектрофотометре «Specord M-40» (Германия).

Результаты и обсуждение. Опыты со всеми активными фрагментами миозина проводили в стандартных условиях. Растворы препаратов термостатировали в кварцевой кювете (1×1 мм) в кюветном отделении спектрофотометра при 42 °С. В процессе термостатирования (приблизительно в течение 1 ч) светорассеяние исследуемых препаратов регистрировали в режиме непрерывной записи при длине волны 320 нм. В таких условиях собственные хромофоры белков практически не поглощают. Результаты экспериментов приведены на рис. 1 и 2. Из рис. 1 видно, что фосфорилирование РЛЦ приводит к усилению агрегатообразования ТММ при нагревании: светорассеяние быстрее нарастает во времени и достигает более высокого уровня (кривые 2, 2' и 3, 3'). Замена в растворе ионов Ca^{2+} на Mg^{2+} вызывает усиление агрегатообразования препаратов ТММ (кривые 2, 3 и 2' и 3'). И, наконец, при наличии в растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), связывающей двухвалентные катионы, агрегатообразование ТММ начинается быстрее, но при этом кривая светорассеяния достигает более низкого уровня, чем в случае наличия в растворе двухвалентных катионов (кривые 1—3 и 1'—3'). Для фосфорилированного ТММ уровень светорассеяния при наличии ЭДТА выше, чем для дефосфорилированного (кривые 1 и 1').

Кривые временной зависимости светорассеяния для различных препаратов С1 (Х-С1 и Mg-С1) представлены на рис. 2. Для сравнения приведены также аналогичные кривые для ТММ. Как видно, в случае Х-С1 (кривые 1—3) замена ионов Ca^{2+} на Mg^{2+} практически не влияет на кривую светорассеяния; эффект ЭДТА на уровень агрегатообразования также незначителен, хотя на начальных этапах оно несколько замедляется. Что же касается препаратов Mg-С1, то для них при замене в растворе Ca^{2+} на Mg^{2+} степень агрегатообразования повышается, как и в случае ТММ. Нужно отметить, что при наличии в растворе двухвалентных катионов субфрагмент Mg-С1 характеризуется большей устойчивостью к воздействию повышенных температур по сравнению с Х-С1: хорошо выраженное агрегатообразование у препаратов Mg-С1 наступает значительно позже (сравнить кривые 2', 3' и 2, 3 на рис. 2). Кривая светорассеяния препаратов Mg-С1 существенно меняется при добавлении ЭДТА (см. рис. 2, кривая 1'): агрегатообразование нарастает во времени и достигает более высокого уровня, чем в случае присутствия в растворе двухвалентных катионов (в отличие от препаратов ТММ).

Из данных рис. 2 следует также, что для препаратов Х-С1, Mg-С1 и ТММ, которые использовали в опытах при концентрациях 1 мг/мл, наблюдаются различные максимальные уровни светорассеяния. Однако эти различия только кажущиеся. При использовании одинаковых молярных концентраций этих препаратов в расчете на одну головку и с учетом того, что масса молекулы Mg-С1 несколько больше таковой Х-С1, а молекула ТММ содержит две головки и субфрагмент-2, все три группы кривых выходят на достаточно близкие уровни светорассеяния.

Интерпретация полученных данных требует некоторых предварительных сведений, касающихся поведения различных структурных элементов активных фрагментов миозина (ТММ и С1) при нагревании и воздействии других денатурирующих факторов. Как уже упоминалось, основные функциональные центры размещены на головках миозина (С1) и формируются его тяжелыми цепями. Тяжелая цепь С1 при ограниченном трипсинолизе расщепляется на фрагменты с молекулярными массами (м. м.) 25 000, 50 000 и 20 000 или 24 000 (для Х-С1 и Mg-С1 соответственно) [13, 14]. Наиболее лабильной структурой характеризуется фрагмент 50 000, денатурационные, необратимые изменения которого могут происходить при действии добавок различных органических веществ или повышенных (>35 °С) температурах [15—17]. С помощью метода светорассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии в структуре С1 выделено не менее трех кооперативно плавящихся структурных элементов, которые в большой степени соот-

ветствуют триптическим фрагментам тяжелой цепи С1 [18—20]. Микрокалориметрические исследования показывают, что, по крайней мере, часть фрагмента с м. м. 50 000 образует наиболее лабильный структурный домен с максимумом теплопоглощения (плавления) 39—40 °С [21]. Интервалу плавления этого домена соответствует также область плавления СЛЦ. Максимумы теплопоглощения двух доменов субфрагмента-1 приходятся на 47—48 и 51 °С. При температуре 51 °С плавится также РЛЦ [21]. Стержневой участок ТММ (субфрагмент-2) представляет собой также термоустойчивую структуру с максимумом плавления 51 °С [22]. Таким образом, с учетом этих данных можно полагать, что в процессе инкубирования использованных препаратов при температуре 42 °С происходят необратимые денатурационные изменения, как правило, во фрагменте с м. м. 50 000, сопровождающиеся плавлением, по крайней мере части его структуры (структурный домен 1). При такой же температуре плавится СЛЦ, которая локализована в основном на фрагменте с м. м. 20 000 [14]. Остальные структурные элементы исследуемых препаратов оставались интактными в указанных выше условиях. В ходе проведения экспериментов целенаправленной модификации подвергался только один элемент — РЛЦ.

Полученные результаты показывают, что ионы Ca^{2+} обладают значительным стабилизирующим воздействием на структуру головки миозина как в случае ТММ (фосфорилированного или дефосфорилированного) (см. рис. 1), так и в случае Mg-С1 (см. рис. 2). При замене Ca^{2+} на Mg^{2+} денатурационные изменения в структуре головок идут быстрее, о чем свидетельствует более быстрое и интенсивное агрегатобразование. Поскольку СЛЦ размещена на фрагменте с м. м. 20 000 и контактирует с одной стороны с фрагментом размером 50 000, а с другой — с РЛЦ, размещенной главным образом на шарнирном участке [14], можно полагать, что РЛЦ через СЛЦ может влиять на фрагмент с м. м. 50 000. С одной РЛЦ, как известно, связывается один ион Ca^{2+} [23—25]. Нам представляется, что наиболее вероятное следствие связывания Ca^{2+} заключается в усилении взаимодействия между РЛЦ и СЛЦ. Ион Ca^{2+} может связываться в одном месте РЛЦ (возможно, с образованием координационной связи с тяжелой цепью), модифицируя при этом расположенный в другом месте участок контакта с СЛЦ, или же образовывать координационную связь в месте контакта РЛЦ и СЛЦ. Координационные связи между отрицательно заряженными группами через ион Ca^{2+} известны для многих Ca^{2+} -связывающих белков [26]. На наличие такой связи между РЛЦ и другими структурными элементами головки скелетномышечного миозина указывает тот факт, что сродство Ca^{2+} к РЛЦ, связанной с головкой, во много раз больше, чем к свободной РЛЦ [27, 28]. Связывание Mg^{2+} в структурах, эволюционно приспособленных для Ca^{2+} , должно давать более слабую координационную связь и соответственно меньший стабилизирующий эффект, что и наблюдается в наших опытах. В пользу такого представления о характере воздействия двухвалентных катионов на структуру головки миозина, как нам кажется, свидетельствует различие кривых светорассеяния для препаратов X-С1 и Mg-С1 (см. рис. 2). У препаратов Mg-С1, содержащих полный набор легких цепей, агрегатобразование замедляется (кривые 2', 3') по сравнению с препаратами X-С1 (кривые 2, 3), содержащими только СЛЦ и для которых, следовательно, стабилизация через взаимодействие РЛЦ и СЛЦ невозможна. Такое же замедление агрегатобразования характерно и для препаратов ТММ (см. рис. 2, кривые 2'', 3'').

Из литературы известно, что фосфорилирование, ответственное за регуляцию сокращения гладких мышц, существенно влияет на структуру РЛЦ, ослабляя ее связь с головкой миозина [29]. Благодаря таким изменениям на молекуле миозина, по-видимому, становятся доступными участки его взаимодействия с актином. Полученные нами данные для скелетных мышц подтверждают подобное действие фосфорилирования на РЛЦ. При фосфорилировании РЛЦ их стабилизирую-

ище влияние на активные фрагменты миозина скелетных мышц уменьшается: агрегация ТММ начинается быстрее и достигает более высоких уровней, чем у дефосфорилированных препаратов ТММ (см. рис. 1, кривые 2', 3'). Учитывая вышеизложенное, а также исходя из представления о том, что запуск сокращения скелетных мышц осуществляется через актиновую нить, можно предположить, что фосфорилирование РЛЦ миозина здесь играет роль «подстроечного», или модулирующего, фактора.

ЭДТА при использованной в наших опытах концентрации (1 мМ), по-видимому, удаляла около 50 % РЛЦ из активных фрагментов миозина [30]. Вследствие этого, во-первых, нужно ожидать существенного уменьшения стабилизирующего действия РЛЦ на структуру головки и, во-вторых, должны образовываться дополнительные центры агрегации по гидрофобным участкам связывания удаленных РЛЦ. Оба фактора способствуют усилению агрегатообразования, что особенно наглядно проявляется в случае препаратов Mg-S1 (см. рис. 2, кривая 1'), агрегатообразование которых резко нарастает и достигает в присутствии ЭДТА более высокого уровня, чем в присутствии двухвалентных катионов (см. рис. 2, кривые 2', 3'). Однако мы наблюдали несколько иной характер влияния ЭДТА на светорассеяние препаратов ТММ (см. рис. 1, кривые 1, 1'). На начальном этапе нарастание агрегатообразования идет так же интенсивно, однако кривые светорассеяния выходят на уровни, более низкие, чем таковые соответствующих кривых для препаратов ТММ, содержащих двухвалентные катионы (см. рис. 1, кривые 2, 3 и 2', 3'). Этот факт можно объяснить, основываясь на результатах Шауба с сотр. [31], которые, исследуя миозиновые молекулы, свободные от РЛЦ, обнаружили внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия между двумя головками по участкам связывания РЛЦ. В условиях нашего эксперимента такие взаимодействия на начальных этапах, скорее всего, не оказывают большого влияния на интенсивность агрегатообразования из-за значительной подвижности головок. Однако позже, после формирования достаточно плотных агрегатов, ограничивающих подвижность головок, взаимодействие между последними вследствие ограничения действия энтропийного фактора усиливается, что приводит к уменьшению количества дополнительных центров агрегации и соответственно к понижению уровня светорассеяния на достаточно продвинутых стадиях агрегатообразования. При фосфорилировании ТММ, как упоминалось выше, связь РЛЦ с головкой ослабляется, из-за чего при воздействии ЭДТА на головки миозина должно удаляться больше РЛЦ по сравнению с дефосфорилированными препаратами. Как следствие, у фосфорилированных препаратов можно ожидать большего количества дополнительных центров агрегатообразования, чем и объясняется более высокий уровень светорассеяния у фосфорилированных препаратов ТММ (см. рис. 1, кривая 1') по сравнению с дефосфорилированными (см. рис. 1, кривая 1).

Важно отметить, что несильное, но все же заметное замедление агрегатообразования в растворах X-S1 при воздействии ЭДТА (см. рис. 2, кривая 1) объясняется удалением из раствора двухвалентных катионов, которые играют, по-видимому, определенную роль в стабилизации формирующихся агрегатов через образование межмолекулярных координационных связей.

Summary. Aggregative characteristics (at 42°C) of active skeletal muscle myosin fragments — chymotryptic subfragment 1 lacking regulatory light chain (RLC), Mg-papain subfragment 1, containing RLC, and heavy meromyosin, containing dephosphorylated or phosphorylated RLC — were studied comparatively. Besides hydrophobic interactions, divalent cations are shown to exert large influence on binding of RLC with myosin head hinge region. The experimental data suggest that in the presence of divalent cations RLC stabilizes the labile myosin head structures — 50 kDa fragment and «essential» light chain. The effect of RLC phosphorylation is opposite to divalent cation influence:

it leads to some destabilization of head structure the evidence for which is the weaker binding of phosphorylated RLC to the head. It may be an indirect indication for «auxiliary» role of RLC phosphorylation in functioning of skeletal muscle contractive system.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vibert P., Cohen C.* Domains, motions and regulation in the myosin head // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—1988.—9, N 4.—P. 846—852.
2. *Mornet D., Bonet A., Audemard E., Bonicel J.* Functional sequences of myosin head // *Ibid.*—1989.—10.—N 1.—P. 10—24.
3. *Sivaramakrishnan M., Burke M.* The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 2.—P. 1102—1109.
4. *Kendrick-Jones L., Jakes R.* Myosin linked regulation: A chemical approach // *Myocardial failure Int. symp.* / Eds Rottach-Egern, Tagersec.—Berlin, 1977.—P. 28—40.
5. *Kendrick-Jones J., Szentkiralyi E. M., Szent-Gyorgyi A. G.* Regulatory light chains in myosins // *J. Mol. Biol.*—1976.—104, N 4.—P. 747—775.
6. *Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H.* Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation // *Ibid.*—1969.—42, N 1.—P. 1—29.
7. *Weeds A. G., Taylor R. S.* Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin // *Nature.*—1975.—257, N 5521.—P. 54—56.
8. *Yamamoto K., Sekine T.* Substructure of myosin subfragment 1 as revealed by digestion with proteolytic enzymes // *J. Biol. Chem.*—1980.—87, N 1.—P. 219—226.
9. *Szent-Gyorgyi A. G.* Meromyosins, the subunits of myosin // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1953.—42, N 1.—P. 305—320.
10. *Perry S., Zydowo M.* A ribonucleoprotein of skeletal muscle and its relation to the myofibril // *Biochemistry.*—1959.—72, N 4.—P. 628—690.
11. *Margossian S. S., Lowey S.* Interaction of myosin subfragment with F-actin // *Ibid.*—1978.—17, N 25.—P. 5431—5439.
12. *Stepkowsky D., Szczesna D., Wrotek M. et al.* Factors influencing interaction of phosphorylated and dephosphorylated myosin with actin // *Biochim. et biophys. acta.*—1985.—831, N 1.—P. 321—329.
13. *Balint M., Wolf I., Tarsufalvi A. et al.* Location of SH-1 and SH-2 in the heavy chain segment of heavy meromyosin // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1978.—190, N 2.—P. 793—799.
14. *Mitchell E., Jakes R., Kendrick-Jones J.* Location of light chain and actin binding sites on myosin // *Eur. J. Biochem.*—1986.—161, N 1.—P. 25—35.
15. *Setton A., Muhrad A.* Effect of mild treatment on the ATPase activity and proteolytic sensitivity of myosin subfragment 1 // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1984.—235, N 2.—P. 411—417.
16. *Burke M., Sivaramakrishnan M.* Substructure of skeletal myosin subfragment 1. Preferential destabilization of a domain by methanol and its effect on catalytic activity // *J. Mol. Biol.*—1986.—261, N 26.—P. 12230—12336.
17. *Бабійчук Е. Б., Філенко А. М., Омелянюк В. С., Данилова В. М.* Термічна лабільність структури домену 50 кДа субфрагмента 1 міозину // *Докл. АН УРСР. Сер. Б.*—1989.—№ 1.—С. 54—55.
18. *Зима В. Л., Філенко А. М., Данилова В. М., Омелянюк В. С.* Конформаційні змінення і доменна організація субфрагмента 1 міозина // *Молекуляр. генетика і біофізика.*—К.: Вища шк., 1988.—Вып. 13.—С. 95—101.
19. *Філенко А. М., Зима В. Л., Данилова В. М. и др.* Структурна організація субфрагмента 1 міозина скелетних м'язів // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 3.—С. 39—45.
20. *Шныров В. Л., Левицкий Д. И., Веденкина Н. С. и др.* Доменная структура субфрагмента 1 миозина // *Докл. АН СССР.*—1989.—304, № 6.—С. 1497—1499.
21. *Левицкий Д. И.* Структура головки миозина и функции его легких цепей: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—М., 1991.—49 с.
22. *Потехин С. А., Трапков В. А., Привалов П. Л.* Стадийность тепловой денатурации спиральных фрагментов миозина // *Биофизика.*—1979.—24, № 1.—С. 46—50.
23. *Bagshaw C. R., Kendrick-Jones J.* Identification of the divalent metal ion binding domain of myosin regulatory light chains using spin labelling techniques // *J. Mol. Biol.*—1980.—140, N 3.—P. 411—433.
24. *Werber M. M.* Metal binding to myosin and DTNB-light chain // *Experientia.*—1978.—34, N 5.—P. 575—576.
25. *Minowa O., Matsuda S., Yagi K.* Calcium-induced conformational changes of 20 000 Dalton light chain of vertebrate striated muscle myosin // *J. Biochem.*—1983.—94, N 1.—P. 25—36.
26. *Пермяков Е. А.* Парвальбумин и родственные кальцийсвязывающие белки.—М.: Наука, 1985.—190 с.
27. *Srivastava S., Muhrad A., Wikman-Coffelt J.* Influence of myosin heavy chains on the calcium binding properties of the light chain, LC₂ // *Biochem. J.*—1981.—193, N 3.—P. 925—939.
28. *Wikman-Coffelt J.* Properties of the non-specific calcium binding sites of rabbit skeletal muscle myosin // *Ibid.*—1980.—185, N 2.—P. 265—268.
29. *Bremel R. D.* Myosin-linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle // *Nature.*—1974.—252, N 5482.—P. 405—407.

30. Kasman K., Kakol I. The influence of ethylenediaminetetraacetate on white skeletal muscle myosin // *Biochim. et biophys. acta.*— 1977.— 491, N 2.— P. 509—514.
31. Schaub M. C., Huber P., Jauch A. et al. Removal of regulatory light chains from skeletal muscle myosin affects its interaction with actin by exposing a sticky patch at the base of the head portion // *J. Muscle Res. Cell Motil.*— 1988.— 9, N 1.— P. 81.

НИИ физиологии ун-та им. Тараса Шевченко, Киев
Ин-т эксперим. биологии им. Ненцкого ПАН, Варшава

Получено 24.07.92

УДК 577.161.25:577.112.828

Л. Б. Бондаренко, Р. И. Яхимович, В. К. Бауман

ВЛИЯНИЕ 1α -ОКСИВИТАМИНА D_3 И 24,25-ДИОКСИВИТАМИНА D_3 НА ПУЛ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ДРУГИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ

В экспериментах на цыплятах проведено сравнительное изучение антирахитической активности витамина D_3 , 1α -ОН D_3 и 24,25-(ОН) $_2D_3$ и их способности снижать уровень холестерина и изменять содержание свободных аминокислот в сыворотке крови.

Эффекты витамина D_3 и его производных, хотя и сходны по характеру, однако заметно различаются в зависимости от дозы и химической структуры вещества. Наибольшим эффектом на данные показатели обладал 1α -ОН D_3 . Введение ОН-группы по С-24 вместо С-1 обуславливает снижение способности производного витамина D_3 регулировать обмен Са и Р, и увеличение — при воздействии на обмен холестерина.

Введение. Важной химической особенностью веществ D-витаминной природы является их способность к различным структурно-функциональным модификациям. В результате существует большое количество аналогов витамина D, антирахитическая активность которых варьирует в широких пределах. Наиболее изучены производные витамина, содержащие гидроксильные группы в положениях С-1, С-24 и С-25. Физиологическая значимость гидроксирования витамина D_3 по данным положениям до настоящего времени полностью неясна. Несет ли каждая из указанных гидроксильных групп строго специфическую функциональную нагрузку — окончательно не выяснено даже для антирахитической активности метаболитов витамина D. Исследования же новых, нетрадиционных направлений биологической активности веществ D-витаминной природы велись, в основном, с использованием самого витамина и его гормонально активной формы — $1,25$ -(ОН) $_2D_3$.

Полученные нами ранее результаты свидетельствуют о том, что как витамин D_3 , так и $1,25$ -(ОН) $_2D_3$ способны, помимо регуляции обмена Са и Р, воздействовать на пул свободных аминокислот и содержание холестерина в сыворотке крови цыплят [1, 2]. При этом метаболит оказывал на данные показатели более сильный и далеко не всегда аналогичный витамину D_3 эффект.

Целью данной работы являлось сравнительное изучение влияния двух других веществ D-витаминной природы — 1α -ОН D_3 и 24,25-(ОН) $_2D_3$ на антирахитические показатели, содержание различных фракций холестерина и пул сыворотки крови цыплят.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на цыплятах породы Хайсекс белый кросс в первый месяц их жизни. Первая группа цыплят получала рацион, полноценный в отношении всех необходимых питательных компонентов, но лишенный витамина D_3 [3]. Цыплята второй группы получали, кроме исходного рациона, еще и витамин D_3 из расчета 10 МЕ в день на птицу, что обеспечивало 100 % физиологической потребности в данном витамине [3]. Птицам третьей группы вместо витамина D_3 давали 1α -ОН D_3 в дозе 2,5 МЕ в день на птицу, а