

БІЛКИ ВОВНИ З ВИСОКИМ ВМІСТОМ ТИРОЗИНУ (ББТ), ЇХ СТРУКТУРА, СКЛАД ТА РЕГУЛЯЦІЯ БІОСИНТЕЗУ

І. А. МАКАР¹, В. В. ГАВРИЛЯК¹, П. В. СТАПАЙ¹, В. В. ГУМЕНЮК², Г. М. СЕДЛО²

¹Інститут біології тварин УААН

²Інститут землеробства і тваринництва західного регіону УААН

У статті узагальнено наявні відомості про одну із груп кератин-асоційованих протеїнів (КАР), які відзначаються великим вмістом тирозину та гліцину. Показана їх структурна організація, амінокислотний склад, шляхи регуляції біосинтезу, в тому числі на генетичному рівні.

Ключові слова: ВОВНА, КЕРАТИНИ, ТИРОЗИН, БІЛКИ БАГАТІ ТИРОЗИНОМ, ГЕНИ, ПЛАСТИЧНІСТЬ І ПОЖОВТІННЯ ВОВНИ.

Волос у широкому розумінні (волося, вовна, щетина та ін.) є продуктом функціональної діяльності волосяних фолікулів – специфічних залоз мікроскопічних розмірів, цибулини яких служать секреторною ділянкою, а зовнішня коренева піхва – каналом. Морфобудові, розвитку та діяльності волосяних фолікулів присвячено чимало наукових праць – монографій, оглядів, статей [1–5, 6, 7, 8–10].

Основною субстанцією волоса є твердий кератин (від грецького “керас” – ріг). Це типовий представник фібрилярних білків, характерною особливістю яких є високий вміст сірки. Окрім того, кератини відзначаються високою щільністю, поганою розчинністю у воді, стійкістю до дії багатьох хімічних чинників, у тому числі і ферментів [11].

Кератини характеризуються складною четвертинною структурою молекул. Субдиниці, які входять до їх складу, зокрема кератинів волосся і вовни, відзначаються високою гетерогенністю як за молекулярною масою, так і амінокислотним складом [12].

Вовняне волокно – це, по-суті, мультикомпонентна структура, яка складається приблизно із 170 окремих білкових молекул молекулярною масою від декількох тисяч до 100 000 кД. Як у типовому представнику фібрилярних білків, частка спіральних частин у кератині становить приблизно 60 %, причому це в основному α -спіральна конфігурація, стабільність якої забезпечується внутрішньопептидними зв'язками.

Дослідження структури кератину вовни ґрунтуються на його розчиненні, яке досягається попереднім окисленням або відновленням дисульфідних груп [11]. У результаті цього з овечої вовни виділено три групи білків: з високою молекулярною масою (~ 50 000 кД) і низьким вмістом сірки (фібрилярна структура або інтермедіальні філаменти – IF), які є упорядкованими білковими агрегатами, меншою молекулярною масою (~ 20 000 Д) і високим вмістом сірки (глобулярна структура), або кератин-асоційовані протеїни (КАР), а також білки, які відзначаються високим вмістом тирозину та гліцину (gly/tyr КАР). Їх молекулярна маса не перевищує 10000 кД, до того ж вони є складовою кератин-асоційованих протеїнів. Саме на цій групі білків ми зупинимося детально.

Про те, що овеча вовна містить білки, багаті тирозином (ББТ), вперше повідомили І. J. O'Donnel і Н. Zahn [13, 14]. Зокрема, було показано, що їх вміст у вовняному волокні коливається в межах 4–8 %, а вміст тирозину в них може сягати 10 і більше відсотків з розрахунку на суху речовину. Далі з'ясувалося, що між вмістом загального тирозину інтактною вовни і вмістом його у ББТ існує пряма залежність [15]. Щодо самого тирозину, то його вміст у вовняному волокні коливається у межах 2,5–4 % на суху масу і може змінюватися в залежності від багатьох чинників: породної приналежності тварин, характеру і стану їх вовняного покриву, умов годівлі й утримання та ін. Про значення цієї ароматичної амінокислоти для вовни відомо набагато менше, ніж, скажімо, про значення цистину, який вважається визначальною амінокислотою у синтезі кератину та формуванні структурної композиції вовняного волокна.

Існуючі щодо цього міркування донедавна носили гіпотетичний характер. Тим не менше, вважалось, що наявна у тирозині фенольна група мала би бути тим центром високої реактивності, яка, логічно, повинна би впливати на хімічні властивості вовни [16]. І справді, не виключається, що в молекулі кератину два залишки тирозину, з'єднуючись між собою, утворюють (як у випадку з циститом) поперечні ефірні зв'язки.

Існує декілька методів визначення у вовні вмісту ББТ, які, в принципі, ґрунтуються на її розчиненні в суміші 6 М розчині сечовини і 0,2 М розчині тіогліколяту натрію при рН 11, з подальшим алкілюванням сульфгідрильних груп ацетатом йоду і, нарешті, виділенням власне цих білків у вигляді S-карбоксиметилкератеїнових похідних шляхом фракційного очищення і діалізу [17].

Нами розроблений більш простіший, до того ж і продуктивніший метод [18], суть якого полягає у тому, що вовну протягом 35 хвилин обробляють 40-кратним об'ємом надмурашиної кислоти. При охолодженні з подальшою нейтралізацією охолодженого надмурашиного екстракту 20 % розчином гідроксиду натрію (до рН 6,0–7,0), наступним діалізом проти водопровідної води через обгортковий целофан, і на кінець, виділенням ББТ, які при цьому випадають в осад. Окрім цього цей метод підвищує селективність розділення білків вовни, тобто дає можливість фракціонувати їх на альфа-, бета- і гамма-кератози.

Як з'ясувалось згодом [11, 19–20], виділені з нативної вовни ББТ є гетерогенними сполуками. У даний час відомо три великі родини: КАР₆, КАР₇, КАР₈.

Зокрема, білки КАР₆ – містять приблизно 80 амінокислотних залишків, з яких 60 моль % припадає на гліцин і тирозин, а 11 моль % – на цистеїн. Н. Zahn і М. Biela [13], досліджуючи системно ці білки, повідомили, що вміст їх у вовні коливається в межах 7–10 %, хоча, звичайно, величина 1 %, яка є відомою, також вважається нормою, зокрема для овець породи лінкольн [21].

КАР₇ протеїни, зокрема компонент С₂ типу 1, а також КАР₈ мають подібний склад і фізичні властивості, хоча зовсім не пов'язані між собою. Так, КАР₇ – це основний білок, який складається з 84 амінокислот, з яких на частку тирозину і гліцину припадає 35 моль % і лише 7 моль % – на цистеїн. Слід зауважити, що в N-термінальній частині цього білка є ділянка, яка містить 18 амінокислот (20 % від загального білка) і, що головне, вона позбавлена як гліцину, так і тирозину.

КАР₈ – один з найменш відомих протеїнів у кератин-асоційованій групі, тобто в КАР. Він містить всього 61 амінокислотний залишок [22, 23] і за вмістом гліцину та тирозину уподібнений до КАР₇. Зокрема, сумарний вміст цих амінокислот у ньому становить 40 моль %, а цистеїну – 6 моль %. Важливо зауважити, що гліцин-тирозинові залишки концентруються у центральній частині білка, а 10 амінокислотних сегментів, що локалізовані на N- і C-термінальних кінцях, втратили гліцин, проте містять тирозин. Отже, за своєю структурною організацією він фактично протилежний протеїну КАР₇.

Порівняльна характеристика амінокислотного складу інтактної вовни та виділених із неї фракцій – ББТ і S-карбоксиметилкератеїнів вовни з високим і низьким вмістом сірки наведено у таблиці.

Як видно з наведених даних, овеча вовна, як і виділені з неї основні групи білків (фракцій) досить виразно відрізняються між собою за кількісним співвідношенням амінокислот. Найбільше за цим показником інтактну вовну нагадують білки, які характеризуються низьким вмістом сірки (цистину), тобто S-СМКА. Білки з високим вмістом сірки вигідно відрізняються як від натуральної вовни, так і S-СМКА порівняно більшим вмістом цистину (18 %) і проліну (13,6 %).

Баланс амінокислот у тирозин-багатих білках (ББТ) видозмінюються в основному за рахунок гліцину, вміст якого становить майже 31 % і тирозину – 18 %. Вміст решти амінокислот (за винятком фенілаланіну) у них фактично менший.

Коротко про регуляцію біосинтезу білків, які відзначаються високим рівнем тирозину. Подібно до двох інших груп кератинів вовни (S-СМКА і S-СМКВ) синтез тирозин-багатих білків вимагає скоординованої дії багатьох генів волосяного фолікула [24, 25].

У даний час описано експресію кортикальних генів. Усі вони тією чи іншою мірою активуються в кортикальних клітинах різних ділянок фолікула, починаючи з найнижчої і

включаючи зону формування стержня волоса. При цьому слід зауважити, що в першу чергу експресуються ті гени, які кодують синтез ББТ – $КАР_6$, $КАР_7$, $КАР_8$ [26]. Як з'ясувалось, принаймні 9 генів, що регулюють синтез $КАР_6$ у геномі вівці розташовані всередині сегменту ДНК (1 мільйон пар нуклеотидів), причому три з них всередині 40 тисяч пар нуклеотидів.

Таблиця

Амінокислотний склад вовни та її окремих фракцій [12]

Амінокислота	Інтактна вовна	ББТ	S-СМКА	S-СМКВ
Аланін	5,5	2,2	6,4	2,9
Аргінін	6,6	4,5	7,3	6,7
Аспарагінова к-та	6,5	3,5	8,1	4,1
Валін	5,9	2,1	5,9	6,7
Глютамінова к-та	11,3	3,1	14,1	6,4
Гістидин	0,8	0,4	0,7	0,9
Гліцин	8,8	30,8	8,8	5,4
Ізолейцин	3,4	1,0	3,7	3,0
Лейцин	7,8	8,3	10,3	5,0
Лізін	3,0	0,8	4,1	0,7
Метіонін	0,5	0	0,6	0
Пролін	6,0	4,2	4,2	13,6
Серин	9,6	12,6	7,3	11,9
Треонін	6,1	2,0	4,4	10,4
Тирозин	4,1	17,9	4,3	1,9
Фенілаланін	2,9	6,2	3,0	2,4
Цистин	11,4	0,8	6,8	17,9

Аліментарні фактори також справляють помітний вплив на біосинтез тирозин-багатих білків вовни [27]. Так, інфузія в сичуг мериносової вівці зеїну, суміші амінокислот і глютаміну призводила до підвищення у вовні вмісту цих білків, а також вмісту в ній тирозину.

Тирозин багаті білки вовни мають пряме відношення до формування її фізичних показників, особливо пластичності, тобто здатності вовняних волокон зберігати певну форму після припинення дії фактора, що зумовив її виникнення. Вовна з високою пластичністю характеризується значно більшим вмістом аморфної частки, тобто кератин асоційованих протеїнів, а отже і ББТ, які фактично є їх складовою. Окрім того, вовна з високою пластичністю відзначається і більшим вмістом тирозину [14, 28].

Як з'ясувалось, білки, багаті тирозином, мають відношення до пожовтіння вовни – однієї з її серйозних вад. Нагадаємо, що пожовтіння належить до найпоширеніших видів пошкоджень вовняного волокна як у процесі його росту, зберігання та переробки вовни. Пожовтіла вовна втрачає здатність до фарбування, до того ж, будучи пофарбованою, вона стає нестійкою до дії навколишніх чинників, особливо погодних умов.

Розрізняють два види пожовтіння вовни: пов'язане із фіксацією стороннього пігменту та утворення фарбувального продукту в самому волокні. Останнє розцінюється як результат фотохімічної деструкції певних амінокислот кератину вовни. Зокрема, вважається, що у цьому випадку пожовтіння настає внаслідок фотохімічної деструкції цистину з подальшим розпадом його в лужному середовищі поту й утворенням сірководню та амоняку; тирозину з утворенням 3,4-диоксифенілаланіну, амоняку та жовто-коричневого пігменту, а також тирозину з утворенням кінуреніну [29–33].

Пожовтіння вовни завжди супроводжується кількісним зменшенням у ній загального тирозину, ББТ та тирозину в них самих.

Висновки

Білки вовни, багаті тирозином, є однією із трьох основних груп кератинів, які значною мірою визначають склад та фізико-механічні параметри вовняних волокон і лежать в основі концепції генезису пожовтіння вовнової сировини.

I. A. Makar, V. V. Havrylyak, P. V. Stapaу, V. V. Humenyuk, H. M. Sedilo

TYROSINE-RICH PROTEINS OF WOOL, THEIR STRUCTURE, COMPOSITION AND THE REGULATION OF THEIR BIOSYNTHESIS

S u m m a r y

The analysis of literature data about the tyrosine-rich proteins of wool has been conducted in article. The structure, composition and regulation of these proteins has been shown.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

The Institute of Agriculture and Animal Breeding of Western Regione of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

1. *Бабкина Е. М.* Размножение клеток волосяных фолликулов у овец. – Фрунзе: ИЛИМ, 1973. – С. 24.
2. *Всеволодов Э. Б.* Волосяные фолликулы. – Алма-Ата, 1979. – 190 с.
3. *Birbeck M. S. C., Mercer E. H.* The electron microscopy of the human hair follicle. P.I. Introduction and the hair cortex // *J/ Biophys. Biochem. Cytol.* – 1957 а. - № 3. – P. 203-214.
4. Электронно-микроскопические и цитологические исследования морфогенеза волоса / Гуменюк В. В., Макар И. А., Швец С. Ф. и др. // *Методические рекомендации.* – Львов, 1985. – 31 с.
5. *Макар И. А.* Пути улучшения качества шерсти. – К.: Из-во УСХА, 1992. – 118 с.
6. *Marshall R. C., Orvin D. F. G., Gillespie J. M.* Structure and biochemistry of mammalian hard keratin // *Electron Microscope Rev.* – 1991. - № 4. – P. 47–83.
7. *Rogers G. E., Harding H. W. J.* Molecular mechanisms in the formation of hair. In: *Biology and disease of the Hair* /Ed. T. Kobory and W. Montagna. – University of Tokyo. – 1976. – P. 411–438.
8. *Седіло Г. М.* Субстратно-гормональна регуляція процесів вовноутворення // *Вісник аграрної науки.* – 2003. - № 9. – С.34–37.
9. *Hund P. I.* The nutritional biochemistry of wool and Hair follicles // *Anim. Sci.* – 2000. – V. 70. – P. 181–195.
10. *Макар І. А., Стапай П. В., Параняк Н. М., Гавриляк В. В., Лико І. Я., Седіло Г. М., Грабовська О. С.* Морфологічні аспекти формування та росту вовни овець // *Біологія тварин.* – 2001. – Т. 3. – В. (1). – С. 53–63.
11. *Powell B. C., Rogers G. E.* In: *Formation and Structure of human hair* / Ed. P. Jones, H. Zahn, H. Hocker. – Birkhauser Verlag Basel. – Switzerland. – 1997. – P. 108.
12. *Fraser R. D. B., MacRae T. P., Rogers G. E.* *Keratins.* Their Composition, Structure and Biosynthesis. – Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA. – 1972. – P. 310.
13. *O'Donnel I. J., Thompson E. O. P.* Studies on reduced wool. IV. The isolation of major component // *Austr. J. Biol. Sci.* – 1964. – V. 17. – P. 973–989.
14. *Zahn H., Biela M.* Uber die isolierung tyrosinreicher protein aus wolle // *Textil. Praxis.* – 1968 а. – V. 23. – P. 103–106.
15. *Gillespie J. M., Darskus R. L.* The relation between tyrosine content of various wool and their content of a class of proteins rich in tyrosine and glycine // *Austr.J.Biol.Sci.* – 1971. – V. 24. – P. 1189–1197.
16. *Александр П. А., Хадсон Р. Ф.* Физика и химия шерсти. – М., 1958. – С.
17. *Fraser R. D. B., Gillespie J. M., MacRae T. P.* // *Comp.Biochem. Physiol.* – 1973. – V. 44 В. – P. 943–947.
18. *Гуменюк В. В., Макар И. А.* Способ разделения белков шерсти. – Авт. св. СССР. – 1979. – № 702029.

19. *Kuczek E. S., Rogers G. E.* Sheep wool tyrosine+glycine-rich keratin genes: a family of low sequence homology // *Eur. J. Biochem.* 1987. – V. 166. – P. 79–85.
20. *Gillespie J. M.* The structural proteins of hair: isolation, characterization and regulation of biosynthesis. In: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the skin* / Ed. L.A. Goldsmith, Oxford Univer. Press, Oxford. – 1991. – P. VI. – P. 625–659.
21. *Fratini A., Powell B. C., Roger G. E.* Sequence, expression and evolutionary conservation of a gene encoding a glycine-tyrosine-rich keratin-associated protein of hair // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 4511–4518.
22. *Gillespie J. M.* Proteins rich in glycine and tyrosine from keratins // *Comp. Physiol.* – 1972. – V. 41 B. – P. 723–734.
23. *Casatarres J., Navarro J. M., Blessing M., Jorcano J. L.* Analysis of the control of expression and tissue specificity of the keratin 5 gene characteristic of basal keratinocytes // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 20489–20496.
24. *Compton J. G., Ferrera D. M., Yu D. W. et al.* Chromosomal localization of mouse hair keratin genes // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1991. – V. 642. – P. 32–43.
25. *Powell B. C., Crocker L. A., Rogers G. E.* Complete sequence of hair like intermediate filament type II keratin gene // *DNA Sequence.* – 1993. – V. 3. – P. 401–406.
26. *Frenkel M. J., Gillespie J. M., Reis P. J.* Factors influencing the biosynthesis of the Tyrosine-rich proteins of wool // *Austr. J. Biol. Sci.* – 1974. – V. 27. – P. 31–38.
27. *Powell B. C., Rogers G. E.* Differentiation in hard keratin tissues: hair and related structures. In: *Keratinocyte Handbook* / Ed. I. Leigh, F. Wan, F. B. Lane. – Cambridge Univ. Press, Cambridge. – 1994 a. – P. 401–436.
28. *Asquit R. S., Hirst L., Rivett D. E.* Effects of ultraviolet radiation as related to the yellowing of wool // *Appl. Polym. Symp.* – 1971. – V. 8. – № 1. – P. 333–345.
29. *Trela M. M.* Uodpornienie okrywy wlosowej skor futurkowych na wplyw fotochemiczny poprzez modyfikacje keratyny // *Przeglad skor zamy.* – 1980. – P. 110–112.
30. *Ашарья Р. М., Кулкарни В. Г., Монахар С.* Пожелтение шерсти у овец. – М.: Колос, 1984. – 84 с.
31. *Станай П. В.* К вопросу о механизмах пожелтения шерсти овец // *Сельскохозяйственная биология (серия биология животных).* – 1990.- № 2. – С. 174–181.
32. *Станай П. В., Макар І. А., Король В. І.* Попередження і ліквідація пожовтіння вовни // *Вісник аграрної науки.* – 1998. – № 5. – С. 40–44.
33. *Методические рекомендации. Пороки шерсти (утонение, пожелтение, свойлачиваемость) и пути их предотвращения.* – Львов, 1984. – 15 с.

