Comparative Study of Biochemical Characters of Parvalbumin from White Skeletal Muscles and Other Tissues (Testes and Ovaries) of Lizard Family: Agamidae (*Agama pallida*), and (*A. stellio stellio*)

By

Adam Osman Abaker

B. Sc. Science and Education, Al-Fashir University, Sudan, 1996.

Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirement for the degree of Master of Science, Department of Biological Sciences at Yarmouk University

Abstract

Ca^{2+}-binding proteins have a great importance because of their regulatory roles in various biological systems particularly in muscles and endocrine glands. Parvalbumin (PV) is a member of Ca^{2+}-binding proteins family. In the present study, PV-isoforms from muscles, testes and ovaries of the lizard *Agama pallida* and *A. stellio stellio* were studied. Isolated PVs revealed the presence of more than one PV-isoform in muscles of both animals, whereas only one isoform has been detected in each testes and ovaries of both animals. According to isoelectric focusing the white skeletal muscles from both animals revealed the presence of two sub-isoforms in the major-PV, whereas no sub-isoforms were detected in case of the minor-PV. Testis-PVs of both animals exhibited the presence of two sub-isoforms according to the same method.

The concentrations of PV in one kilogram tissue as measured by Bradford (1976) method, were found to be 1.8g, 0.06g, and 0.006g in white skeletal muscle, testes and ovaries of *A. stellio stellio*, respectively. Whereas *A. pallida* contains 1.27, 0.06 and 0.004 grams PV from one kilogram of white skeletal muscle, testes, and ovaries, respectively.

The electrophoretic mobilities obtained from the protein samples using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) revealed that the molecular weights (MW) of muscle-PVs were 12.0, 11.77 and 11.96, 11.77 kDa for *A.stellio stellio* and for *A. pallida* muscles respectively. *A. stellio stellio* and *A. pallida* testis-PVs revealed the same MW of 11.9 kDa and so did the ovary-PVs of both animals. The isoelectric points (p*Is*) of iso-PVs obtained by using isoelectric focusing-polyacrylamide gel electrophoresis (IEF-PAGE) were 5.1, 4.85, and 4.6 for *A. stellio stellio* muscles, and the same values were obtained for *A.pallida*

دراسة مقارنة للخصائص البيوكيميائية لبروتين البارفالبومن من العضلات الهيكلية البيضاء و أنسجة أخرى (الخصي و المبايض) لعائلة الحراذين أكاميدي: (أكاما ستيليو ستيليو) و (أكاما باليدا)

مقدم البحث:

آدم عثمان أبكر

إشراف:

د. سعد الجسابي

تخصص دقيق: كيمياء حيوية

قسم العلوم الحياتية-جامعة اليرموك

٢٠٠١

الملخص

من المعلوم أن البروتينات التي تقوم بربط أيونات الكالسيوم تمتاز بأهمية بالغة لدورها الأساسي التنظيمي في مختلف الأنظمة البيولوجية و خاصة في العضلات و بعض الأنسجة الأخرى، و يعتبر بروتين البارفالبومن واحد من أبرز هذه البروتينات المهمة.

لقد تم في هذا البحث دراسة أشكال [نظائر] هذا البروتين في العضلات الهيكلية البيضاء و خصي و مبايض نوعين من الحراذين التي تعود إلى عائلة الأكاميدا، هما أكاما ستيليو ستيليو و أكاما باليدا، حيث تجرى هذه الدراسة لأول مرة على هذا النوع من الزواحف.

لقد أوضحت هذه الدراسة وجود اثنين شكل متناظر (isoform) للبارفالبومن في العضلات الهيكلية البيضاء لكلا النوعين من الحراذين، و أطلق عليهما البارفالبومن الرئيسي(major) و البارفالبومن الفرعي(minor). بينما وجود متناظر واحد فقط في أنسجة الخصي و المبايض في كلا النوعين من الحيوانات.

وقد وجد و باستخدام تقنية الفصل بالتركيز الكهربائي المتناظر (isoelectric focusing) انقسام الشكل المتناظر الرئيسي في العضلات الهيكلية البيضاء في كلا النوعين من الحراذين إلى اثنين من تحت الشكل المتناظر(sub-isoform) بينما لم ينقسم الشكل المتناظر الفرعي. أما البروتينات المعزولة من الخصي والتي لها شكل متناظر واحد، فقد انقسمت أيضا إلى اثنين من تحت الشكل المتناظر باستخدام التقنية المذكورة أعلاه.

لقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن تركيز البارفالبومن بالنسبة لحرذون أكاما ستيليو ستيليو هي كما يلي:

١- بالنسبة للعضلات الهيكلية البيضاء هو ١,٨غم بروتين لكل كيلو غرام من العضلات.

٢- بالنسبة للخصي هو ٠,٠٦غم بروتين لكل كيلو غرام من أنسجة الخصي.

٣- بالنسبة للمبايض هو ٠,٠٠٦غم بروتين لكل كيلو غرام من أنسجة المبايض.

أما بالنسبة لحرذون أكاما باليدا فقد كانت التراكيز كما يلي:

١- بالنسبة للعضلات الهيكلية البيضاء هو ١,٢٧غم لكل كيلو غرام.

٢- بالنسبة للخصي هو ٠,٠٦غم لكل كيلو غرام.

٣- بالنسبة للمبايض هو ٠,٠٠٤غم لكل كيلوغرام.

وقد تم تحديد الوزن الجزيئي لبروتين البارفالبومن المستخلص من هذه النماذج باستخدام الفصل بالهجرة الكهربائية (SDS-PAGE) و كانت الأوزان الجزيئية بالنسبة للعضلات الهيكلية البيضاء للأكاما ستيليو ستيليو هي ١٢ و ١١,٧٧كيلو دالتون، أما بالنسبة للأكاما باليدا فهي١١,٩٦ و ١١,٧٧ كيلو دالتون، بينما ظهر أن الأوزان الجزيئية للبارفالبومن من للأنسجة غير العضلية (الخصي و المبايض) ١,٩٠كيلو دالتون.

لقد وجد أن قيم نقطة التعادل الكهربائي(pI) للأشكال المتناظرة و تحت الأشكال المتناظرة في العضلات الهيكلية البيضاء لحرذون أكاما ستيليو ستيليو هي ٥,١ و ٤,٨٥ و٤,٦ ، تم الحصول على ذات القيم في حرذون الأكاما باليدا. أما بالنسبة لخصي حرذون أكاما ستيليو ستيليو فهي ٥,١ و ٥,٠، بينما المستخلصة من النسيج المقابل في حرذون أقاما باليدا فقد كانت ٥,٢ و ٥,١.

لقد تم بواسطة الفصل الكرماتوغرافي عزل و تنقية الأشكال المتناظرة للبارفالبومن، حيث عزل بصورة نقية عدد اثنين (شكل متناظر) من العضلات الهيكلية البيضاء لكل حرذون، بينما وجد شكل متناظر واحد فقط في خصي كل واحد من هذين النوعين من الحراذين.

لقد تم استخدام تقنية الانتشار المناعي المزدوج لتحديد درجة القرابة بين بروتين البارفالبومن من هذين النوعين من الحراذين، و قد ظهر أن الشكلين المتناظرين (الرئيسيين) للعضلات الهيكلية البيضاء لكلا النوعين متطابقين، أما الشكل المتناظر لبروتين العضلات الهيكلية البيضاء في حرذون أكاما ستيليو فلم يتفاعل مع الجسم المضاد لبارفالبومن من خصية حرذون أكاما باليدا.