

А. В. КОТЕЛЬНИКОВА

**О ДЕЗАМИНИРОВАНИИ АДЕНОЗИНДИФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ
ДЕЗАМИНАЗОЙ АДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ
В ПРИСУТСТВИИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ПЕЧЕНИ**

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 6 VII 1948)

Нами был обнаружен в печени кроликов энзим фосфомутаза аденозиндифосфорной кислоты (1), открытый в мышцах Colowick и Kalckar (2). В нашей работе выводы о содержании этого энзима в печени были основаны на доказательстве, с помощью двух различных энзиматических тестов, образования из аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) в присутствии экстрактов из печени одного из продуктов реакции дисмутации, аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). В настоящей работе приводятся данные, позволяющие заключить об образовании из АДФ в присутствии печеночных экстрактов также и адениловой кислоты, второго продукта реакции дисмутации АДФ.

Мы получали АДФ тем же методом, что и при работе с энзимами мышц (3), экстракты из печени готовили так же, как в предыдущей работе (1), лишь время экстракции растертой печени водой было сокращено до 1 часа. Препараты дезаминазы адениловой кислоты получали по Schmidt'у (4) с добавлениями по Kalckar'у (5). АДФ, на основании работы Kalckar'a (5), не дезаминируется препаратами дезаминазы адениловой кислоты, если эти препараты освобождены от миокиназы (фосфомутаза АДФ мышц).

Мы проводили опыты с различными фракциями препарата дезаминазы: с фильтратом, образующимся при подкислении основного бикарбонатного экстракта мышц после отфильтровывания осадка (этот раствор употреблял сам Schmidt), и с осадком, который Schmidt не исследовал, но с которым работал Kalckar (5) при исследовании миокиназы. Предварительно обе фракции были проверены на способность дезаминировать адениловую кислоту и оказались вполне активными.

При проведении опытов мы инкубировали АДФ при $\text{pH} = 7,2$ с препаратом дезаминазы и экстрактами из печени. Содержание аммиака мы определяли в вакуумном аппарате Парнаса. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Растворы АДФ (табл. 1, опыт 105), а также и адениловой кислоты не содержали измеримых количеств аммиака; это позволило нам ставить большую часть опытов, применяя в качестве контролей энзиматические препараты без субстратов. С растворимой фракцией дезаминазы в табл. 1 приведен опыт 109. Одна дезаминаза (раствор) отщепляла от АДФ, за счет большого содержания фосфомутаза, 36% $\text{NH}_2 - \text{N}$ АДФ, в присутствии экстракта печени — 48%, т. е. почти теоретическое количество. Сам печеночный экстракт, в пределах ошибки метода, дезаминирующим действием не обладал. Так как раствор дезаминазы содержал большое количество фосфомутаза АДФ, то мы перешли к

Таблица 1

Деаминарование АДФ в присутствии экстрактов из печени
(инкубация 1 час при 37°, pH=7,2)

№ опыта	Система		Взято NH ₂ -N АДФ в γ	Найдено NH ₂ -N в γ	Отщепилось NH ₂ -N	
					γ	% NH ₂ -N АДФ
105	АДФ (без энзимов)	Контр.	83	0	0	0
109	Деаминаза (раствор)	Проба	83	45,0	30,0	36
		Контр.	—	15,0	—	—
	Деаминаза (раствор) + печеночный экстракт	Проба	83	59,1	40,8	48
		Контр.	—	18,3	—	—
	Печеночный экстракт	Контр.	83	2,5	2,5	3
110	Деаминаза (осадок), Mg 0,001 M	Проба	80	59,3	57,6	72
		Контр.	—	1,7	—	—
	Деаминаза (осадок), отмытая 10 раз, Mg 0,001 M	Проба	80	22,5	20,0	25
		Контр.	—	2,5	—	—
	Деаминаза (осадок), отмытая 10 раз, + печеночный экс- тракт, Mg 0,001 M	Проба	80	72,3	66,5	83
		Контр.	—	5,8	—	—
114	Деаминаза (осадок) отмытая 20 раз, Mg 0,001 M	Проба	83	13,4	11,7	14
		Контр.	—	1,7	—	—
	Деаминаза (осадок), отмытая 20 раз, + печеночный экс- тракт, Mg 0,001 M	Проба	83	48,4	36,7	44
		Контр.	—	11,7	—	—

работе с осадком деаминазы. В опыте 110 мы обрабатывали осадок деаминазы 0,005 M ацетатным буфером (pH=5) 10 раз, в опыте 114—20 раз. Все же и при многократном промывании удавалось лишь значительно понизить содержание фосфомутазы АДФ в препарате деаминазы, но не удалить ее полностью. В опыте 110 без отмыывания препарат отщеплял 72% NH₂-N АДФ, после 10-кратного отмыывания — 25%. Добавление экстракта печени увеличивало отщепление NH₂-N АДФ до 83%. В опыте 114 после 20-кратного промывания деаминаза отщепляла 14% NH₂-N АДФ, в присутствии экстракта печени — 44%, т. е. в 3 раза больше, что свидетельствовало о содержании в печеночном экстракте фосфомутазы АДФ.

Данные табл. 1 показывают, что при работе с осадком деаминазы деаминарование АДФ неотмытым препаратом деаминазы или отмытым не много раз, но в присутствии экстракта из печени (опыт 110), обычно превышало теоретически ожидаемую величину — 50% NH₂-N АДФ, если принять, что за счет действия фосфомутазы половина АДФ превращается в адениловую кислоту, которая деаминируется, а вторая половина — в АТФ, которая не деаминируется.

Это явление можно объяснить двумя предположениями: 1) или препарат деаминазы частично сохраняет после обработки ацетатным буфером (pH=5) аденозинтрифосфатазную активность (превращение АДФ в адениловую кислоту в этом случае будет превышать 50%, так

как образующаяся АТФ вновь переходит в АДФ путем дефосфорилирования), или же 2) кроме адениловой кислоты, дезаминированию может подвергаться также и АТФ, образующаяся при дисмутации; на такую возможность указала работа Д. Фердмана и З. Нечипоренко (6). Чтобы выяснить этот вопрос, мы исследовали, дезаминируется ли в условиях наших опытов АТФ препаратами дезаминазы и каково соотношение между процессами ее дезаминирования и дефосфорилирования. Опыты показали, что дефосфорилирование АТФ препаратами дезаминазы идет и, как правило, превышает дезаминирование, так что дезаминирование является вторичным процессом по отношению к дефосфорилированию; тем самым было подтверждено первое предположение. Так, в опыте 113 препарат дезаминазы, отмытый 10 раз 0,005 М ацетатным буфером (рН = 5), отщеплял 23% всего лабильного фосфата АТФ и 19% $\text{NH}_2 = \text{N}$ АТФ.

Мы поставили своей задачей выработать такие условия обработки осадка дезаминазы, чтобы сократить длительность процесса отмыwania и получить более стандартные препараты дезаминазы. После небольших видоизменений метода мы получили уже после 10-кратного отмыwania препарат дезаминазы, отщепляющий от АДФ, в среднем, 15% $\text{NH}_2 = \text{N}$, в то же время полностью расщепляющий адениловую кислоту. После 15-кратного отмыwania дезаминаза отщепляла от АДФ 7—11% $\text{NH}_2 = \text{N}$, но способность дезаминировать адениловую кислоту падала на $\frac{1}{3}$, поэтому мы использовали для дальнейших опытов препарат дезаминазы, отмытый 10 раз.

С этим препаратом было исследовано дезаминирование АДФ в присутствии экстрактов печени, обработанных HCl , для освобождения от аденозиндифосфатазной активности*, как это мы делали в предыдущей работе (1). Каков бы ни был механизм действия аденозиндифосфатазы, это действие должно быть исключено, так как оно может приводить к образованию адениловой кислоты, помимо действия фосфомутаза АДФ, что может явиться источником ошибочных выводов. Для сравнения фосфомутаза печени и мышц дезаминазным тестом мы исследовали также экстракт из мышц, полученный одновременно и одинаковым способом с экстрактом из печени. На рис. 1 приведены данные о фосфомутиазной активности экстрактов печени и мышц, обработанных HCl по миозинному тесту.

Как видно из рис. 1, оба экстракта обладают большой фосфомутиазной активностью, проба 26 без миозина с экстрактом печени, обработанным HCl , не отличается от контроля, т. е. аденозиндифосфатазной активности нет (в мышечных экстрактах, по нашим данным (3), аденозиндифосфатазная активность вообще отсутствует).

В табл. 2 приведены результаты опытов по дезаминированию АДФ отмытым препаратом дезаминазы в присутствии экстракта печени, а также и экстракта мышц, обработанных HCl . Эти данные показыва-

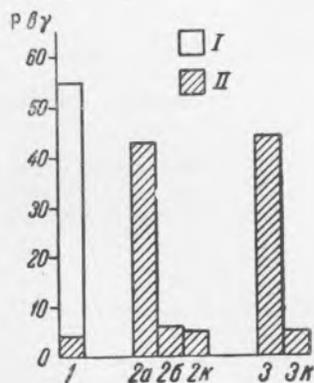


Рис. 1. Активность по миозинному тесту фосфомутаза печеночного и мышечного экстрактов, обработанных HCl ; Mg 0 001 М, рН = 7,6. I — лабильный P. II — неорганический P; 1 — кислотный гидролиз АДФ; 2а — АДФ + M_3 (трижды пересаживенный миозин) + экстракт печени, обработанный HCl ; 2б — то же без M_3 ; 2к — контроль; 3 — АДФ + M_3 + экстракт мышц, обработанный HCl ; 3к — контроль

* Под аденозиндифосфатазной активностью мы подразумеваем энзиматическую реакцию, первичную или балансовую — неизвестно, приводящую к отщеплению одного фосфата от АДФ.

Таблица 2

Деаминарование АДФ отмытыми препаратами деаминазы в присутствии экстрактов печени и мышц, обработанных HCl (инкубация 30 мин. при 37°, рН = 7,2, Mg 0,001 M)

№ опыта	Система		Взято NH ₂ -N АДФ в γ	Найдено NH ₂ -N в γ	Отщепилось NH ₂ -N	
					γ	% NH ₂ -N АДФ
174	Деаминаза, отмытая 10 раз	Проба	77	11,9	11,0	14
		Контр.	—	0,9	—	—
	Деаминаза, отмытая 10 раз, + печеночный экстракт, обработанный HCl	Проба	77	41,3	36,2	47
		Контр.	—	5,1	—	—
175	Деаминаза, отмытая 10 раз	Проба	78	15,4	14,0	18
		Контр.	—	1,4	—	—
	Деаминаза, отмытая 10 раз, + печеночный экстракт, обработанный HCl	Проба	78	47,8	38,0	49
		Контр.	—	9,8	—	—
	Деаминаза, отмытая 10 раз, + мышечный экстракт, обработанный HCl	Проба	78	44,1	37,6	43
		Контр.	—	6,5	—	—
177	Экстракт печени	Проба	78	21,5	0	0
		Контр.	—	21,9	—	—
	Экстракт мышц	Проба	78	7,9	0	0
		Контр.	—	8,4	—	—

ют, что в присутствии печеночных экстрактов, обработанных HCl, деаминарование АДФ препаратами отмытой деаминазы идет весьма интенсивно, почти достигая теоретически ожидаемой величины 50% NH₂ — N АДФ. В опыте 175 показано, что реакция идет одинаково как с экстрактом печени, так и с экстрактом мышц. В опыте 177 еще раз подтверждается, что ни экстракт печени, ни экстракт мышц сами деаминирующим действием не обладают. Результаты опытов позволяют заключить, что увеличение деаминарования АДФ в присутствии экстрактов печени как обработанных, так и необработанных HCl, зависит от содержания в экстрактах печени фосфомутазы АДФ, которая образуется из АДФ адениловую кислоту (и АТФ) и по характеру катализируемой реакции не отличается от фосфомутазы АДФ из мышц.

Приношу благодарность акад. Я. О. Парнасу за ценные советы по данной работе.

Лаборатория физиологической химии
Академии Наук СССР

Поступило
6 VII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. В. Котельникова, ДАН, 59, 527 (1943). ² S. Solowick and H. Kalckar, J. biol. Chem., 148, 117 (1943). ³ А. В. Котельникова, Биохимия, 13, 66 (1948). ⁴ K. Schmidt, Z. physiol. Chem., 179, 243 (1928). ⁵ H. Kalckar, J. biol. Chem., 148, 127 (1943). ⁶ Д. Фердман и З. Нечипоренко, Укр. биохим. журн., 19, 67 (1947).