

Г. А. КРИТСКИЙ

## К ВОПРОСУ О ПРОСТЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЕ ФОСФОРИЛАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 XI 1948)

В нашем предыдущем сообщении<sup>(1)</sup> были представлены данные, указывающие на то, что простетическая группа фосфорилазы *a* не является ее активной группой, поскольку эта группа обща всем ферментам и белкам и может быть удалена из фосфорилазы адсорбцией на угле, так что белок сохраняет свою ферментативную активность. При более точных определениях оказалось, что после очистки фосфорилазы активированным углем в ней все-таки можно обнаружить некоторое количество пентозы. В дальнейшем было также обнаружено, что многократным переосаждением путем растворения фосфорилазы в цистеин-пирофосфатном буфере с  $pH=7,0$  и осаждения ее 0,7 объемом насыщенного раствора сульфата аммония с  $pH=7,0$  удаётся удалить из фосфорилазы почти всю простетическую группу без заметного изменения ферментативной активности белка. Однако и этим путем последние следы пентозы удалить из фосфорилазы не удаётся. Так, в одном опыте на 1 мг фермента до переосаждения приходилось 3,7  $\gamma$  пентозы, а после трех переосаждений 0,15  $\gamma$  пентозы\*.

В то же время ранее указанный нами факт<sup>(1)</sup>, что эта нуклеиново-кислотная или нуклеотидная простетическая группа фосфорилазы совершенно не специфична для этого фермента и, вероятно, свойственна всем ферментам и белкам, был подтвержден в дальнейших опытах. Так например, простетическая группа по реакции на пентозу<sup>(2)</sup> нами была обнаружена в кристаллическом трипсине и в казеине\*\*. Хотя о строгом постоянстве состава комплексов белков и ферментов с другими веществами не может быть и речи<sup>(3)</sup>, тем не менее мы считаем, что хотя бы ориентировочные данные по этому вопросу представляют существенный интерес, поскольку это явление комплексообразования необходимо учитывать при изучении самых различных биохимических и физиологических процессов. Выяснение биологической роли этих простетических групп затрудняется, помимо других причин, еще и тем, что их химический состав до сих пор почти не известен. Так например, в простетической группе фосфорилазы еще никем не были хотя бы качественно определены пуриновые основания.

В связи с вышеизложенным мы сообщаем некоторые наши данные по определению состава простетической группы фосфорилазы. Нам кажется, что эти данные представляют существенный интерес не только в отношении полученных результатов, но и в отношении тех новых модификаций методов анализа, которые были при этом применены.

\* Возникает вопрос, не находятся ли эти, удаляемые только при денатурации белка, следы нуклеотидов внутри спиралей полипептидных цепей фосфорилазы.

\*\* Фабричный препарат некристаллического пепсина и препарат пероксидазы, полученный по Вильштеттеру, также давали положительную реакцию на пентозу.

1. Определение пуриновых оснований фосфорилазы *a*. Хотя поиски удобных методов определения пуриновых оснований начались уже около 100 лет тому назад, мы и до настоящего времени еще не имеем такого метода определения пуриновых оснований, который бы позволял определять достаточно малые их количества в смеси с многочисленными другими веществами, находящимися в тканях и препаратах. С одной стороны, такие более старые и „надежные“ методы определения, как метод Косселя-Крюгер-Штеудель<sup>(4)</sup>, потребовали бы для определения пуриновых оснований в фосфорилазе ее выделения из нескольких десятков кроликов для каждого определения; с другой стороны, новейшие спектральные или хро-

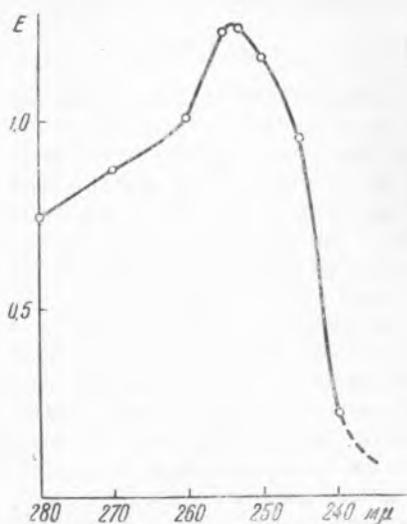


Рис. 1. Спектр поглощения протетической группы фосфорилазы; рН=3,0

тографические методы приложимы только к уже довольно чистым смесям пуриновых оснований. Это затруднение, как нам кажется, в существенной мере разрешается описанным ниже методом анализа, в котором существенно новыми являются первые стадии, тогда как последующие в значительной мере позаимствованы из метода Блоха<sup>(5)</sup>.

Препарат некристаллической фосфорилазы, полученный из мышц 4 взрослых кроликов, был растворен в 60 мл воды. В полученный раствор были добавлены 15 мл 50% трихлоруксусной кислоты. Осадок белка удалялся центрифугированием. Из центрифугата А был взят 1 мл для спектрофотометрического определения пуриновых оснований Б и 1 мл для определения фосфора в протетической группе фосфорилазы В\*. Остальная часть центрифугата Г

была оставлена для препаративного выделения пуриновых оснований.

Спектрофотометрирование трихлоруксусного раствора протетической группы фосфорилазы производилось в аппарате Бекмана. При этом перед анализом раствор был разбавлен в 100 раз. В компенсационную кювету с растворителем наливался раствор трихлоруксусной кислоты с небольшим количеством сульфата аммония так, чтобы концентрация этих веществ в компенсационном растворе была равна их концентрации в испытуемом растворе. Спектрофотометрируя этот раствор\*\*, мы обнаружили максимум поглощения в зоне 2540 Å, т. е. в зоне, промежуточной между зоной максимального поглощения аденина (2600 Å) и зоной максимального поглощения гипоксантина (2500 Å). Спектр поглощения протетической группы фосфорилазы представлен на рис. 1. Из этой кривой видно, что в протетической группе фосфорилазы возможно присутствие аденина и гипоксантина.

Препаративное выделение пуриновых оснований протетической группы фосфорилазы было проведено следующим путем. Раствор Г

\* Поскольку препарат фосфорилазы получался по методу Кори с жестким диализом экстракта в аппарате для ускоренного диализа<sup>(6)</sup> и перед анализом был промыт встряхиванием в 0,41 насыщенном растворе сульфата аммония с рН=7,0, можно было полагать, что препарат был свободен от случайных примесей фосфора, тем более что в процессе его приготовления глицерофосфат натрия был заменен на сукцинат натрия.

\*\* Пользуюсь случаем выразить признательность Г. П. Брин за фотометрирование растворов.

(см. выше) разбавлялся дистиллированной водой до 1 л и нагревался в колбе на водяной бане под тягой при 100° в течение 7 час. (до исчезновения запаха хлороформа). Благодаря этому нагреванию происходил, с одной стороны, процесс гидролиза простетической группы фосфорилазы и, с другой стороны, разложение трихлоруксусной кислоты на хлороформ и углекислоту, которые улетучивались. Затем раствор пуриновых оснований упаривался досуха в присутствии небольшого количества соляной кислоты. Сухой остаток растворялся в 15 мл 1 *N* соляной кислоты в 10 *N* муравьиной кислоте и нагревался на водяной бане при 100° в течение 1 часа при помешивании стеклянной палочкой. После охлаждения испытуемой смеси до комнатной температуры в нее добавляется 0,5 объема 95% этанола и 40% раствор едкого натра до момента, когда бумажка конго будет окрашиваться от этого раствора только в слабо синий цвет, после чего добавляют в смесь 0,1 объема цитратного буфера с рН=5,0 и затем 1,0 мл суспензии закиси меди. Содержимое пробирки перемешивается; если закись меди растворится, то добавляют ее еще до тех пор, пока не останется некоторое количество нерастворенной закиси меди. Пробирку помещают в водяную баню при 100° на 15 мин., в течение которых содержимое пробирки помешивают стеклянной палочкой.

Образовавшийся красноватый осадок отделяется центрифугированием. Осадок промывается в центрифужной пробирке 2 раза с помощью 40% этанола и затем горячей водой. Промывание должно повторяться до тех пор, пока промывные воды не станут бесцветными. Обычно 3 промываний достаточно. К медно-пуриновому осадку добавляют около 100 мл 2% перегнанной соляной кислоты, нагревают до кипения и пропускают в смесь сероводород до полного осаждения меди, затем раствор пуриновых оснований отфильтровывают от сульфата меди и фильтрат упаривают в вакууме на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в воде, подщелачивают аммиаком и пуриновые основания осаждают аммиачным раствором хлорида серебра. Осадок серебряных солей пуриновых оснований центрифугируют, промывают небольшим количеством 2% раствора аммиака и полученный осадок разлагают при температуре кипения 1% перегнанной соляной кислотой. Центрифугат от хлорида серебра упаривают в вакууме на водяной бане досуха. Остаток содержит пуриновые основания с примесью хлористого аммония. Последний был удален растворением осадка в цитратном буфере с небольшим количеством хлористого натрия и еще одним осаждением пуриновых оснований с помощью закиси меди, как это описано для первого осаждения. Переведение пуринов из соединений с закисью меди в хлориды также производится по методу, соответствующему первому осаждению. Выделенные таким путем пуриновые основания почти полностью растворялись в 2% аммиаке, что говорило о том, что заметного количества гуанина в них не было.

В вышеописанном методе выделения пуриновых оснований из фосфорилазы осаждение белка трихлоруксусной кислотой можно заменить осаждением его уксусной кислотой при кипячении.

Таким образом удалось выделить чистые пуриновые основания в виде их хлоридов, также дававших интенсивное поглощение в зоне 2540 Å.

2. Определение фосфора и величины молекулы простетической группы фосфорилазы *a*. 1 мл только что приговленного раствора простетической группы фосфорилазы (раствор В, см. выше) был анализирован на общий фосфор, легко гидролизуемый (100° в 1 *N* соляной кислоте, 15 мин.) и неорганический. При этом оказалось, что общего фосфора было 28γ, легко гидролизуемого 2γ

и неорганического фосфора 13 γ. Таким образом, трудно гидролизуемого фосфора было 13 γ. Очевидно, что неорганический фосфор возник из легко гидролизуемого фосфора в процессе анализа, поскольку удаление неорганического фосфора из препарата перед анализом было, повидимому, достаточно полным.

Для суждения о величине молекулы простетической группы фосфорилазы мы получили трихлоруксусный экстракт из кристаллической фосфорилазы, нейтрализовали его содой и диализовали в аппарате для ускоренного диализа в течение 2 дней, затем раствор упаривали на водяной бане до небольшого объема и с полученным раствором проводили реакцию на пентозу, которая оказалась очень слабо положительной, что говорит о наличии только следов высокомолекулярного компонента в простетической группе фосфорилазы *a*.

Таким образом, наши данные указывают на то, что простетическая группа фосфорилазы состоит в основном из фосфорилированных дериватов аденозина и инозина, содержащих как трудно гидролизуемый, так и легко гидролизуемый фосфор и не влияющих или мало влияющих на фосфорилазную активность. Кроме того, очевидно, присутствуют и следы нуклеиновой кислоты.

Сопоставляя наши исследования о простетической группе фосфорилазы с исследованиями других авторов (<sup>6-8</sup>) об активируемости фосфорилазы адениловой кислотой, можно считать в основном доказанным, что фосфорилаза представлена в природе в разных формах, которые можно было бы назвать энзимерами. Животные фосфорилазы *a*, *b* и *c* (<sup>1</sup>) различаются по своим нуклеиновым и нуклеотидным группировкам и по наличию или отсутствию активности без адениловой кислоты. Характерным отличием растительной фосфорилазы, которую можно было бы назвать фосфорилазой *d*, является то, что на ее активность адениловая кислота не оказывает никакого влияния. Очевидно, что вышеупомянутое явление энзимерии или многообразия ферментов, обуславливающих одну и ту же ферментативную реакцию, является вообще широко распространенным биологическим явлением.

Приношу благодарность проф. Н. М. Сисакяну, при неоценимой поддержке которого была выполнена настоящая работа.

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

Поступило  
30 XI 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Г. А. Критский, ДАН, 61, № 6 (1948). <sup>2</sup> H. Albaum and W. Umbreit, J. Biol. Chem., 167, 369 (1947). <sup>3</sup> S. J. Przylecki, Обзор в книге E. Vatapp и K. Myrbäck, Die Methoden der Fermentforschung, 1941, I, стр. 432. <sup>4</sup> В. С. Асатиани, Руководство по биохимич. методике, 1939, стр. 548. <sup>5</sup> A. Bloch, J. Frankl. Inst., 236, 217 (1943). <sup>6</sup> Г. А. Критский, Биохимия, 13, в. 5, 453 (1948). <sup>7</sup> Н. М. Сисакян и А. М. Кобякова, ДАН, 61, № 6 (1948). <sup>8</sup> Я. К. Парнас, Физиолог. журн. СССР, 24, 285 (1938). <sup>9</sup> G. T. Cori and C. F. Cori, J. Biol. Chem., 158, 321 (1945).