

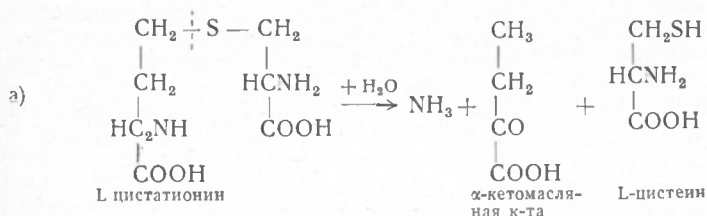
Е. В. ГОРЯЧЕНКОВА

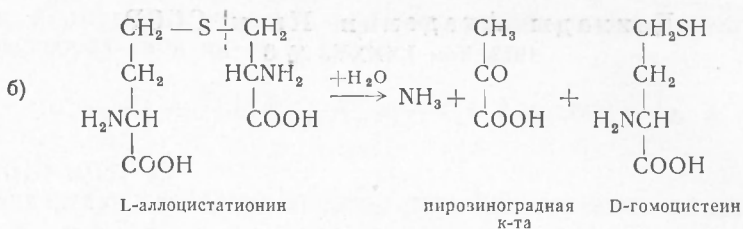
**РОЛЬ ФОСФОПИРИДОКСАЛЯ В ЭНЗИМАТИЧЕСКОМ
ОБРАЗОВАНИИ И РАСЩЕПЛЕНИИ ЦИСТАТИОНИНА
ПРИ ПЕРЕСУЛЬФИРОВАНИИ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 19 V 1952)

В 1950 г. А. Браунштейном и автором (1) было показано, что активность ферментной системы, образующей L-цистеин из гомоцистеина и серина путем пересульфирования, резко снижена в вытяжках из печени В₆-авитаминозных крыс. Активность этой ферментной системы восстанавливается полностью при введении авитаминозным крысам 2—3 инъекций пиридоксина, а также при добавлении синтетического фосфопиридоксаля (ФП) к ферментной вытяжке в пробирке. Таким образом, было установлено участие пиридоксалевого энзима в процессе пересульфирования. Как известно, промежуточным продуктом в этом процессе служит тиоэфир цистатионин. Оставалось невыясненным, участвует ли ФП в образовании цистатионина, в его расщеплении или в обеих промежуточных реакциях пересульфирования (1). В целях выяснения этого вопроса нами был проведен синтез цистатионина, в основном по схеме Стекола (2).

В 1950 г. при очистке фермента пересульфирования из печени крыс (по прописи (3)) нами было обнаружено, что уже на первых стадиях очистки (при добавлении 0,5 объема спирта) ферментный препарат теряет способность образовывать цистеин из гомоцистеина и серина, тогда как активность десульфгидразы цистеина и «тионазы», расщепляющей цистатионин, сохраняется до конца очистки (3). Эти опыты указывали на участие двух различных ферментов в процессе пересульфирования. Это предположение нашло затем подтверждение в работе Бинкли (4), который разделил систему пересульфирования на два фермента: 1) фермент, конденсирующий гомоцистеин и серин с образованием цистатионина, и 2) систему, расщепляющую цистатионин (и другие тиоэфиры (5)), или «тионазу». Действие конденсирующего фермента аналогично конденсации индола с серином в триптофан под влиянием пиридоксалевого энзима (6). Расщепление L-цистатионина и L-аллоцистатионина (содержащего остаток D-гомосерина) «тионазой» протекает следующим образом:





Это расщепление носит тот же характер, что и действие пиридоксальных энзимов — гомоцистеиндесульфгидразы (7) и гомосериндесаминазы (8) в случае реакции а), триптофаназы и цистеиндесульфгидразы (9) в случае реакции б). Согласно теории Браунштейна и Шемякина (6), все эти реакции легко объяснить свойствами шиффовых оснований, возникающих при конденсации соответствующих β- или γ-замещенных аминокислот с пиридоксальпротеидами. Поэтому заранее представлялось вероятным, что как конденсирующий фермент, так и «тионаза» являются протеидами фосфопиридоксала. Это предположение получило полное подтверждение в наших опытах, изложенных в настоящем сообщении*.

Экспериментальная часть

Постановка опытов. Опыты проводились с экстрактами печени контрольных и В₆-авитаминозных крыс (1). В части опытов проводилось разделение ферментов — синтезирующего цистатинин (фракция I) и расщепляющего его (фракция II — «тионаза») (4). Для исследования синтеза цистатинина или суммарного процесса пересульфирования субстратами служили DL-серин и тиолактон DL-гомоцистеина, который перед опытом переводили в гомоцистеин путем подщелачивания раствора на фенолфталеин. Опытные пробы содержали 1 мл экстракта печени (или 0,5 мл очищенной ферментной фракции), 4 · 10⁻⁴ М KCN (для торможения десульфирования цистеина и гомоцистеина), 10 мг DL-гомоцистеина и 20 мг DL-серина или 5 мг цистатинина, KCl-цитратный или фосфатный буфер (рН 7,5—7,7). Объем проб — 5,2 мл. Опытные и соответствующие контрольные пробы инкубировали 2—3 часа в атмосфере N₂ при 38°. Расщепление цистатинина и суммарный процесс пересульфирования измерялись по приросту цистеина методом Салливана (1); гомоцистеин, образующийся из L-аллоцистатинина, при этом не учитывался. Активность конденсирующего фермента ввиду отсутствия специфических методов для определения цистатинина и гомоцистеина исследовалась следующими способами:

1. По убыли SH-групп по методу Кассель и Бранд (12).
2. Визуально — методом хроматографии на бумаге (растворитель — фенол, в атмосфере, насыщенной парами 3% HCl и фенола). Серусодержащие аминокислоты в опытных пробах и растворах «свидетелях» после нанесения на бумагу (10—12 μл) окисляли 33% раствором H₂O₂ по Денту. После прохождения растворителя и высушивания хроматограммы проявлялись нингидрином и на них идентифицировались пятна, соответствующие серину и продуктам окисления цистеина, гомоцистеина и цистатинина.

* В исследованиях, опубликованных в течение ряда лет, Бинкли приписывал роль коэнзиматических факторов тионазы (которую он идентифицирует с десульфгидразой) целому ряду веществ: ионам Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, АТФ, адениловой кислоте, глутатиону и, наконец, в 1951 г. (10) — фолиевой кислоте. После опубликования в Chemical Abstracts (в 1950 г. и в начале 1951 г.) рефератов работ нашей лаборатории о роли ФП в десульфировании цистеина (9) и пересульфировании (1) Бинкли (11), не упоминая о наших исследованиях, отказывается от своих прежних представлений и также приходит к выводу об участии ФП в образовании цистеина путем пересульфирования.

3. Образование цистатионина определялось, кроме того, следующим косвенным путем (4): в инкубируемых пробах конденсирующий фермент разрушали кипячением, после чего добавляли активный раствор «тионазы», полученный из печени нормальной крысы; пробы инкубировали вторично и определяли по Салливану цистеин, отщепляющийся из цистатионина, образовавшегося при первом инкубировании. Этот способ дает лишь относительные величины содержания цистатионина в пробах.

А. Расщепление цистатионина. В табл. 1 сопоставлены количества цистеина, образуемые экстрактами печени контрольных крыс из цистатионина (в среднем 1,44 мг на 1 г ткани печени) и из гомоцистеина + серин (в среднем 1,29 мг/г); эти величины весьма сходны. У крыс, находившихся в течение 2 мес.

на синтетической диете без витамина В₆, величины расщепления цистатионина снижены в среднем до 0,35 мг/г цистеина, или на 75%,

Таблица 2
Синтез и расщепление цистатионина ферментами из печени крыс

Расщепляющий фермент (прирост цистеина в мг/г)			Конденсирующий фермент (убыль гомоцистеина в мг/г)		
Контр. крысы	В ₆ -авитам. крысы		Контр. крысы	В ₆ -авитам. крысы	
	без добавок	с ФП 1 γ/мл		без добавок	с ФП 1 γ/мл
1,17	0,47	—	7,37	3,07	—
1,15	0,24	—	6,59	1,54	—
0,88	0,23	—	6,14	0,92	—
0,70	0,19	0,60	6,14	0,76	9,98
0,68	0,16	—	5,99	0	4,15
0,63	0,06	—	5,30	—	—
0,42	—	—	3,69	0	1,93
Средн. 0,80	0,23	—	5,90	1,16	—
0,57*	—	2,95*	0,53**	0**	1,18**
			—	0,61**	0,95**

* Апоэнзим, полученный путем диализа тионазы нормальной печени при рН 4,5.

** Определения цистеина, образуемого в прокипяченных пробах при последующей инкубации с активной тионазой.

диализа против ацетатного буфера (0,01 М, рН 4,5) и восстановлена добавлением ФП.

Б. Конденсация гомоцистеина с серином. Как видно

Таблица 1
Образование цистеина в экстрактах печени крыс из цистатионина и из гомоцистеина + серин

Из цистатионина, мг/г	В ₆ -авитам. крысы		И, гомоцистеина + серин, мг/г	
	без добавок	с ФП 1 γ/мл	Контр. крысы	В ₆ -авитам. крысы
1,83	0,64	1,54	2,10	0,38
1,78	0,59	1,16	1,43	0,35
1,60	0,34	—	1,21	0,18
1,23	0,33	—	1,10	0,17
1,14	0,10	—	0,94	0,12
1,06	0,08	—	0,96	0,02
Средн. 1,44	0,35	—	1,29	0,20

т. е. почти в такой же степени, как суммарный процесс пересульфирования, понижающийся до 0,20 мг/г, или на 80%. При добавлении к экстракту печени ФП (5 γ на пробу) расщепление цистатионина усиливается в 2—2,5 раза.

Такие же результаты дали опыты, приведенные в табл. 2, в которых исследовалось образование цистеина из цистатионина в присутствии расщепляющего фермента («тионазы»), выделенного из экстрактов печени контрольных и В₆-авитаминозных крыс. Здесь же приведены данные опыта, в котором активность тионазы, полученной из нормальной печени, была доведена до низкой величины путем 48-часового

из табл. 2, активность конденсирующего фермента, синтезирующего цистатионин в печени контрольных крыс, выше активности расщепляющего фермента и выражается исчезновением в среднем 5,9 мг гомоцистеина в пересчете на 1 г исходной ткани печени. При недостаточности витамина В₆ убыль гомоцистеина снижается в большинстве случаев очень значительно (в среднем до 1,16 мг/г). При добавлении к пробам ФП (5 γ) активность конденсирующего фермента повышается до величин, превосходящих норму. Аналогичные результаты были получены

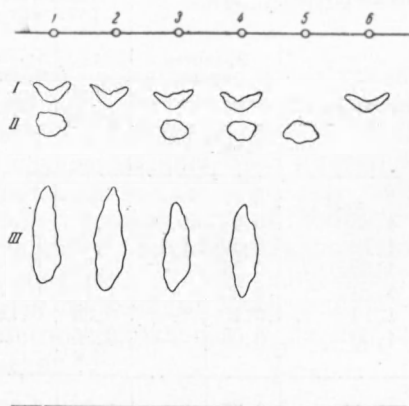


Рис. 1. Хроматограмма синтеза цистатионина из гомоцистеина и серина. I — гомоцистеин, II — цистатион, III — серин. Пробы: 1 — 40 μл вытяжки опытной пробы от контрольной крысы, 2 — то же от В₆-авитаминозной крысы, 3 — то же от В₆-авитаминозной крысы + ФП, 4 — 3 μл раствора гомоцистеина (0,2%), цистатионина (0,2%) и серина (0,2%), 5 — 3 μл раствора цистатионина (0,2%), 6 — 3 μл раствора гомоцистеина (0,2%)

В опытах, где синтез цистатионина оценивался по количеству цистеина, образующегося при последующей инкубации с «тионазой» (табл. 2), а также методом распределительной хроматографии. После инкубирования конденсирующего фермента от нормальных крыс с гомоцистеином и серином на хроматограммах проявляется (нингидрином) пятно, соответствующее цистатионину. В опытах с той же ферментной фракцией из печени В₆-авитаминозных крыс цистатионин не обнаруживается, но он имеется на хроматограммах из проб, содержащих добавленный ФП (см. рис. 1).

В суспензиях клеток *Str. faecalis*, выросших на нормальных средах с добавлением пиридоксала и содержащих высокоактивную цистеиндесульфгидразу⁽⁹⁾, нам не удалось наблюдать образование цистеина из цистатионина или из гомоцистеина + серин при различных условиях опыта. Эти данные не согласуются с представлениями Бинкли об идентичности цистеиндесульфгидразы и «тионазы», а заставляют думать, что, возможно, *Str. faecalis* синтезируют цист(е)ин не путем пересульфирования, а другими путями, но также при участии витамина В₆.

Приношу глубокую благодарность действительному члену АМН СССР проф. А. Е. Браунштейну за руководство работой.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
14 IV 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Браунштейн и Е. Горяченкова, ДАН, **74**, 529 (1950). ² J. Stekol, J. Biol. Chem., **173**, 153 (1948). ³ F. Binkley and D. Okeson, *ibid.*, **182**, 273 (1950). ⁴ F. Binkley, *ibid.*, **191**, 531 (1951). ⁵ F. Binkley, *ibid.*, **186**, 287 (1950); **192**, 209 (1951). ⁶ А. Браунштейн и М. Шемякин, ДАН, **85** № 5 (1952). ⁷ R. Kallio, J. Biol. Chem., **192**, 371 (1951). ⁸ А. Браунштейн и Р. Азарх, ДАН, **85**, № 2 (1952). ⁹ А. Браунштейн и Р. Азарх, ДАН, **71**, 93 (1950); Р. Азарх и В. Гладкова, ДАН, **85**, № 1 (1952). ¹⁰ F. Binkley, J. Am. Chem. Soc., **72**, 2809 (1951). ¹¹ F. Binkley, *ibid.*, **73**, 3538 (1951); J. Biol. Chem., **194**, 109 (1952). ¹² E. Brand and B. Kassel, *ibid.*, **125**, 115 (1938).