

Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД и Е. Г. ПЛЫШЕВСКАЯ

## О РОЛИ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛ ГЛИКОГЕНА В ПРОЦЕССЕ ОБРАЗОВАНИЯ ГЛИКОГЕНО-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

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

Предыдущими исследованиями (1) было установлено участие полуацетальных гидроксильных или «потенциально-свободных» альдегидных групп молекул гликогена в образовании гликогено-белковых комплексов. Представляло интерес выяснить, какова роль «неальдегидных» концов молекул в этом процессе.

Для решения этого вопроса мы подвергали гликоген действию  $\beta$ -амилазы и исследовали способность получающихся при этом  $\beta$ -декстринов (или «ядер» молекул гликогена) образовывать комплексы с белками.

$\beta$ -декстрины мы получали при действии очищенной  $\beta$ -амилазы (свободной от  $\alpha$ -амилазы) на гликоген. С этой целью к раствору гликогена (100 мл 0,15—0,20% раствора) прибавлялось 50 мл предварительно прокипяченного раствора ацетатного буфера (рН 4,8) и 75—100 мл раствора 0,2%  $\beta$ -амилазы, полученной из соевой муки по методу Бурн и Пита (2).

После 48-часовой инкубации производилось осаждение белков три хлоруксусной кислотой, и раствор  $\beta$ -декстрина осаждался двойным объемом спирта. Полученные препараты подвергались затем 2- или 3-кратному переосаждению спиртом, а затем высушивались в вакуум-эксикаторе. Для того чтобы обеспечить полное отщепление глюкозных остатков концевых ветвей до мест ветвлений в молекулах исходного препарата гликогена, в некоторых случаях полученные  $\beta$ -декстрины подвергались повторному  $\beta$ -амилолизу.

Таблица 1

Препарат	Расщепляемость $\beta$ -амилазой в %	Образование комплекса *
Гликоген мышц лягушек, 5 V 1950	31	+
$\beta$ -декстрин, полученный из гликогена мышц лягушек, 5 V 1950	0	—
Гликоген мышц кролика, 2 X 1949	43	+
$\beta$ -декстрин, полученный из гликогена мышц кролика, 2 X 1949	0	—
Гликоген мышц кролика, 6 VI 1951	50	+
$\beta$ -декстрин, полученный из гликогена мышц кроликов, 6 VI 1951	0	—

\* Наличие комплекса +, отсутствие комплекса —.

Данные о расщепляемости  $\beta$ -амилазой исходных препаратов гликогенов и полученных препаратов  $\beta$ -декстринов и об их способности образовывать комплексы с миозином приведены в табл. 1.

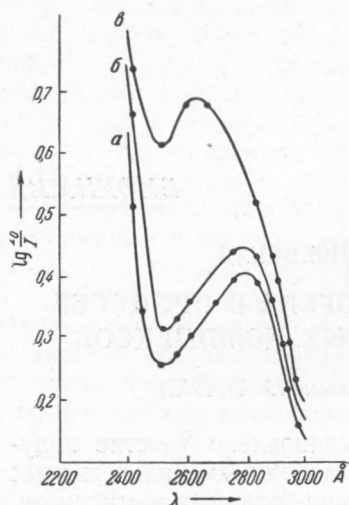


Рис. 1. Спектр поглощения миозина в присутствии гликогена и  $\beta$ -декстрина. *a* — миозин; *б* — миозин +  $\beta$ -декстрин из гликогена, 5 V 1950; *в* — миозин + гликоген, 5 V 1950

Полученные спектры поглощения микрофотометрировались на микрофотометре Крюсса с механической записью на фотографическую пластинку. Концентрация миозина при этом была такова, что раствор его содержал 0,5 мг  $N_2$ /мл, а концентрация гликогенов и  $\beta$ -декстринов была равна 2 мг/мл. Источником ультрафиолетового излучения служила криптоновая лампа сверхвысокого давления.

На рис. 2 приведены микрофотограммы спектра поглощения миозина в присутствии того же препарата  $\beta$ -декстрина, что и на рис. 1.

Как видно из этих микрофотограмм, спектр поглощения миозина в присутствии и в отсутствие  $\beta$ -декстрина совершенно идентичен (рис. 2 *a* и *б*). Максимум же поглощения комплекса гликогена с миозином резко смещен в коротковолновую часть спектра (рис. 2 *в*).

Таким образом, «ядра» молекул гликогена, т. е. молекулы гликогена, лишённые концевых ветвей, как это видно из табл. 1 и рис. 1 и 2, не оказывают влияния на спектры поглощения миозина и, следовательно, не образуют с ним комплекса.

Как видно из приведенных данных, препараты  $\beta$ -декстринов вовсе не расщепляются  $\beta$ -амилазой. Тот же эффект обнаруживается при исследовании других препаратов  $\beta$ -декстринов.

Исследование спектра поглощения миозина в присутствии  $\beta$ -декстринов показало, что последние не оказывают на спектр влияния, как это свойственно некоторым препаратам гликогена (3).

Как видно из рис. 1, максимум спектра поглощения миозина находится у  $\lambda$  2775 Å, максимум поглощения комплекса гликогена с миозином у  $\lambda$  2625 Å. Максимум же поглощения  $\beta$ -декстрина с миозином совпадает с максимумом поглощения самого миозина.

Приведенные кривые получены с помощью спектрофотометра Бекмана\*. Концентрация миозина была такова, что раствор его содержал 0,12 мг  $N_2$ /мл, а концентрация гликогена и  $\beta$ -декстрина была равна 0,24 мг/мл.

Все дальнейшие исследования проводились нами на ультрафиолетовом спектрогра-

фе Q-12. Полученные спектры поглощения микрофотометрировались на микрофотометре Крюсса с механической записью на фотографическую

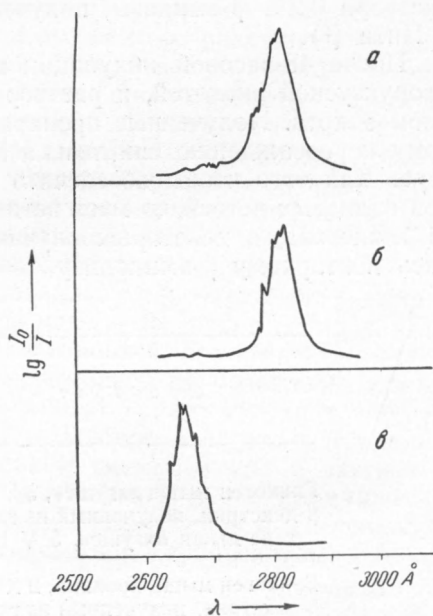


Рис. 2. Микрофотограммы спектров поглощения миозина в присутствии гликогена и  $\beta$ -декстрина. *a* — миозин; *б* — миозин +  $\beta$ -декстрин из гликогена, 5 V 1950; *в* — миозин + гликоген, 5 V 1950

\* В лаборатории фотосинтеза Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР.

На основании вышеизложенного представляло интерес исследовать вопрос о том, образуют ли комплексы с белками декстрины, полученные при действии на гликогены мышц фосфоролазы, так как  $\beta$ -амилаза в мышцах не содержится, а фосфоролаза, являясь ферментом мышечной ткани, действует подобно  $\beta$ -амилазе, катализируя распад  $\alpha$  1 : 4 глюкозидных связей в полисахариде.

Отличием декстринов, получаемых с помощью фосфоролазы, от  $\beta$ -декстринов является наличие в них некоторого числа глюкозных остатков в концевых ветвях, так как последующее действие  $\beta$ -амилазы вызывает их дополнительный распад (4).

Получение декстринов при действии на гликогены мышц фосфоролазой (мы будем в дальнейшем для краткости обозначать их ф-декстринами) сводилось к следующему.

К 30 мл 0,5% раствора гликогена, 6 мл 1% нейтрализованного раствора солянокислого цистеина и 5 мл фосфатного буфера М/3 (рН 6,8—7,0) прибавлялось 8—10 мл раствора высокоочищенной фосфоролазы (5). После 24-часовой инкубации при 36—38° в инкубационную смесь прибавлялось 5—8 мл вновь приготовленного раствора фермента, и инкубация продолжалась еще 24 часа. Затем ферментный процесс останавливался прибавлением трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%), и раствор после удаления осадка и центрифугирования осаждался двойным объемом спирта. Полученный ф-декстрин очищался многократным переосаждением из водного раствора спиртом и высушивался в вакуум-эксикаторе.

Для выяснения вопроса о возможности образования комплексов ф-декстринов с белками мы исследовали спектры поглощения миозина в присутствии полученных ф-декстринов.

Микрофотограммы, приведенные на рис. 3, показывают, что ф-декстрины, подобно  $\beta$ -декстринам, не образуют комплексов с белками.

Таким образом, при действии фосфоролазы, отщепляющей неполностью все глюкозные остатки от концевых ветвей молекул гликогенов, последние теряют тем не менее способность взаимодействовать с белками. Приведенные данные дают возможность заключить, что в образовании гликогено-белковых комплексов играют роль не только полуацетальные гидроксилы (потенциальные альдегидные группы), но и концевые («неальдегидные») ветви молекул.

Выяснение влияния длины концевых ветвей молекул гликогена на его способность взаимодействовать с белком является предметом наших дальнейших исследований.

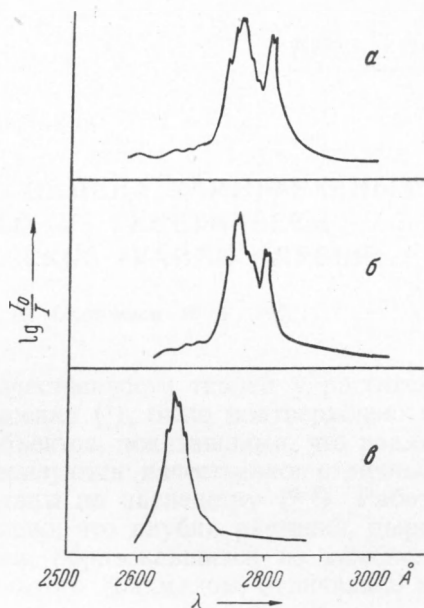


Рис. 3. Микрофотограммы спектров поглощения миозина в присутствии гликогена и ф-декстрина. а — миозин; б — миозин + ф-декстрин из гликогена, 1 II 1951; в — миозин + гликоген. 1 II 1951

Лаборатория физиологической химии  
Академии наук СССР  
Лаборатория биофизики изотопов и излучений  
при Отделении биологических наук  
Академии наук СССР

Поступило  
14 IV 1952

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> Е. Л. Розенфельд и О. Н. Панченко, Биохимия, 17, 2 (1952). <sup>2</sup> E. Bourne, A. Masey and S. Peat, J. Chem. Soc., 883 (1945). <sup>3</sup> Е. Л. Розенфельд и Х. М. Равикович, ДАН, 59, 45 (1948). <sup>4</sup> S. Hestrin, J. Biol. Chem., 179, 943 (1949). <sup>5</sup> А. Н. Петрова и Е. Л. Розенфельд, Биохимия, 15, 3 (1950).