

С. Я. ДАВЫДОВА

## О ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ЛАБИЛИЗАЦИИ $\alpha$ -ВОДОРОДА ОКСИКИСЛОТ

(Представлено академиком А. И. Опариным 12 XII 1952)

До известного времени реакция непосредственного обмена водорода аминокислот с водородом среды не имела прямых доказательств и возможность ее даже отвергалась (1). Предположение о возможности замены  $\alpha$ -водорода аминокислот на водород воды было высказано Дю-Виньо, Шонгеймером и др. (2) в их работе о механизме ацетилирования  $\alpha$ -фениламиномасляной кислоты. На ту же возможность указывает Боварник (3) в исследованиях по синтезу специфического полипептида *d*-глутаминовой кислоты у *B. subtilis*.

Первое доказательство прямой ферментативной лабилизации стабильных связей С—Н в  $\alpha$ -положении вне зависимости от обмена аминокрупп было получено в работах А. С. Кониковой, М. Г. Крицман, Р. В. Тейс (4) и в последующей работе А. С. Кониковой, Н. Н. Добберт, А. Е. Браунштейн (5). В первой цитируемой работе авторы нашли, что глутаминовая кислота, образующаяся в результате переаминирования  $\alpha$ -дейтеро-*dl*-аланина с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой, не содержит избытка дейтерия. Весь дейтерий из аланина переходит в среду. В отсутствие фермента глутаминоаминоферазы эта реакция не идет. Работая с высоко очищенной глутаминоаминоферазой, Коникова, Добберт и Браунштейн нашли, что реакция ферментативного переаминирования проходит двухступенчато. Вначале под влиянием фермента происходит лабилизация  $\alpha$ -водорода аминокислоты и обмен его на водород среды, причем катализ обмена  $\alpha$ -водорода является термостабильной и относительно не специфической функцией аминоферазы. В дальнейшем при наличии кетокислоты происходит собственно реакция переаминирования.

Спринсен и Риттенберг (6) исследовали лабилизацию  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -водородных атомов в аминокислотах. Они синтезировали лейцин, меченный дейтерием в водородах при  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -углеродных атомах и N<sup>15</sup> в аминокгруппе, и глицин, содержащий D в метильной группе и N<sup>15</sup> в аминокгруппе. Изотопный лейцин и глицин скармливались крысам, затем выделялся лейцин из каркаса и внутренних органов и гиппуровая кислота из мочи. Изотопный анализ показал, что лабилизация водорода произошла только в  $\alpha$ -положении. Не только в аминокислотах, но и в кислотах жирного ряда происходит ферментативная лабилизация  $\alpha$ -водорода. Так установлен был обмен D янтарной кислоты с водородом воды в отсутствие акцепторов водорода под влиянием сукцинодегидразы (7). Нами (8) была показана лабилизация  $\alpha$ -водорода яблочной кислоты под влиянием маликодегидразы. Было найдено, что если для окисления яблочной кислоты до щавелевоуксусной требуется одновременное присутствие как маликодегидразы, так и козимазы, то в лабилизации  $\alpha$ -водорода козимаза не участвует.

Установив каталитическую лабализацию  $\alpha$ -водорода яблочной кислоты под влиянием маликодегидразы, мы исследуем в настоящей работе влияние ядов на этот ферментативный процесс, а также предел специфичности дегидраз, катализирующих лабализацию  $\alpha$ -водорода янтарной и яблочной кислот, меченных высоким содержанием дейтерия.

### Экспериментальная часть

Дейтерированная яблочная кислота получалась при каталитическом гидрировании в присутствии платиновой черни, диэтилового эфира щавелевоуксусной кислоты газообразным дейтерием. Внедрение изотопа в кислоты производилось в специальном аппарате для восстановления газообразным D, описанным А. А. Меркуловым (9). Получающийся в результате восстановления диэтиловый эфир дейтеро-яблочной кислоты отделялся от образующейся в этой реакции в качестве примеси диэтилового эфира дейтеро-янтарной кислоты путем отгонки в высоком вакууме. Диэтиловый эфир дейтеро-янтарной кислоты отгонялся при давлении в 3 мм и 55°. Основная фракция перегонялась при давлении в 1/3 мм и при 75°. Эта фракция и представляла собой диэтиловый эфир дейтеро-яблочной кислоты. Омыление эфира производилось нормальным раствором едкого натрия в 5% избытке по отношению к эквивалентному количеству эфира. В воде, полученной после сжигания определенной навески яблочной кислоты, измерялось содержание D. Концентрация D в положении стабильной связи с углеродом, содержащим оксигруппу, равнялась 35,28%.

Исходным продуктом для получения диэтилового эфира янтарной кислоты служила фумаровая кислота, которая переводилась в диэтиловый эфир, а затем в присутствии платиновой черни каталитически гидрировалась газообразным D. Полученный диэтиловый эфир дейтеро-янтарной кислоты омылялся 5% избытком 1 N NaOH. Янтарная кислота содержала 53% D при 3-м и 4-м углеродах в местах дейтерирования. Фермент маликодегидраза был получен из грудной мышцы голубя. Активность фермента проверялась по скорости обесцвечивания метиленовой сини. 0,7 мл полученного ферментного препарата обесцвечивали 0,3 мл 1/5000 M раствора метиленовой сини за 2 мин. В отсутствие козимазы, а также при действии кипяченого фермента обесцвечивания не происходило. Активность фермента проверялась также по окислению яблочной кислоты в аппарате Варбурга. За 60 мин. инкубирования при 37° поглощалось 420 мл O<sub>2</sub>, что соответствует окислению 42  $\mu$ M яблочной кислоты из добавленных 700  $\mu$ M. Фермент сукцинодегидраза был получен в виде экстракта из сердечной мышцы кролика. 0,9 мл полученного ферментного экстракта обесцвечивали при анаэробных условиях при 37° 0,3 мл 1/5000 M метиленовой сини за 7 мин., в аэробнозе за 60 мин. инкубирования при 37° в присутствии 0,8 мл ферментного экстракта поглощалось 340 мл O<sub>2</sub>, что соответствует 34  $\mu$ M янтарной кислоты из добавленных 796  $\mu$ M.

Известно, что даже самые незначительные концентрации щавелевоуксусной кислоты являются сильнейшим ядом в процессе окисления яблочной кислоты. Продуктом окисления яблочной кислоты под влиянием маликодегидразы является щавелевоуксусная кислота, которая обычно связывается цианистым калием. Если цианистый калий не добавлять, то в ходе реакции фермент будет отравлен образующейся щавелевоуксусной кислотой. Сильнейшим ядом для сукцинодегидразы является селенит, который в концентрации 0,02 M полностью тормозит дегидразную функцию и не влияет на окислительную. Эти известные в литературе данные о действии щавелевоуксусной кислоты и селенита на дегидразы яблочной и янтарной кислот и были нами использованы

при изучении процесса ферментативной лабализации  $\alpha$ -водорода яблочной и янтарной кислот (см. табл. 1).

Результаты опыта, представленного в табл. 1, указывают на то, что образующаяся щавелевоуксусная кислота, не будучи связанной KCN (проба № 2), тормозит окисление яблочной кислоты, однако на лабализацию

Таблица 1

Действие ядов на лабализирующую функцию маликодегидразы (Состав проб: 700  $\mu$ M яблочной кислоты, 3 мг козимазы, 19 мг цианистого калия, 0,2 мл 0,02 M селенита, метиленовая синь, 0,8 мл маликодегидразы. D<sub>2</sub>O в конечной концентрации 23%, pH среды 7, общий объем пробы 3 мл. Белки осаждались 10% раствором NaWO<sub>4</sub> и  $\frac{2}{3}$  N раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. О лабализации  $\alpha$ -водорода яблочной кислоты судили по вхождению в нее D из среды)

№ проб	Ябл. к-та	D-янт. к-та в $\mu$ M	Козимаза	KCN	Сукцинодегидр.	Селенит	Маликодегидр.	Мет. синь	Окисл. ябл. к-ты в $\mu$ M	% избытка D	% обмена
1	+	—	+	+	—	—	+	+	42	1,204	31,4
2	+	—	+	—	—	—	+	+	2,3	1,288	33,6
3	+	—	—	—	+	+	—	—	анаэроб.	1,462	38,1
4*	—	+	—	—	+	+	—	—		0,000	0,0

\* В пробе № 4 опыт поставлен с дейтеро-янтарной кислотой, поэтому о реакции судили по выхождению дейтерия из кислоты в среду.

зацию  $\alpha$ -водорода яблочной кислоты не влияет. Данные пробы № 4 дают основание заключить, что селенит в анаэробных условиях тормозит как дегидразную функцию сукцинодегидразы, так и ее способность вызывать лабализацию  $\alpha$ -водородов янтарной кислоты.

Дополнительно к данным, изложенным в первом сообщении (8), где было показано, что лабализация  $\alpha$ -водорода яблочной кислоты происходит и в отсутствие акцепторов водорода, мы поставили опыт с целью выяснения, сказывается ли присутствие акцепторов водорода (метиленовая синь) на интенсивности обмена  $\alpha$ -водорода яблочной кислоты, а также как влияет подавление одной из функций фермента (окислительной функции сукцинодегидразы) на лабализацию. Данные этих опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Лабализация  $\alpha$ -водорода яблочной кислоты

(Объем пробы 2,5 мл, pH 7,1, инкубация 2 часа при 37°)

№ проб	D-ябл. к-та в $\mu$ M	Маликодегидр.	Козимаза в мг	KCN в мг	Мет. синь в мл	D-янт. кисл. в $\mu$ M	Сукцинодегидр.	Атомн. % избытка D	% обмена
1	750	0,7	3	19	—	—	—	0,0033	12,2
2	750	0,7	3	19	0,3	—	—	0,0057	21,1
3	—	—	—	—	—	1000	0,7	0,0119	6,3
4	—	—	—	—	—	1000	0,7	0,0078	4,1

Сравнение процентов обмена  $\alpha$ -водородов в опыте 1 и 2 табл. 2 показывает, что хотя обмен происходит и в отсутствие акцептора водорода, однако наличие в пробе метиленовой сини увеличивает интенсивность обмена  $\alpha$ -водорода. В опыте № 4 фермент сукцинодегидраза обесцвечивал метиленовую синь, но была утрачена окислительная функ-

ция и в связи с этим лабилизация  $\alpha$ -водорода осуществлялась с несколько меньшей интенсивностью, чем под влиянием фермента, активного в обеих своих функциях.

Получив данные о действии ядов на ферментативную лабилизацию  $\alpha$ -водорода в яблочной и янтарной кислотах, мы сделали попытку выяснить, является ли процесс ферментативной лабилизации  $\alpha$ -водорода специфическим в отношении действующих ферментов. В опыте с янтарной кислотой мы прибавили вместо сукцинодегидразы фермент маликодегидразу. Так как имеющийся в нашем распоряжении препарат маликодегидразы мог содержать примеси других ферментов и, в частности, сукцинодегидразу, то для выяснения специфичности действия сукцинодегидразы мы применили селенит, который, как показали наши опыты, выключает не только дегидразную функцию сукцинодегидразы, но и лабилизирующую. Результаты опыта представлены в табл. 3.

Таблица 3

Энзиматическая лабилизация  $\alpha$ -водорода янтарной кислоты (Состав проб: 1000  $\mu$ M D-янтарной кислоты, 0,7 мл сукцинодегидразы, 0,2 мл 0,05 M селенита, фосфатный буфер  $1/15$  M, pH 7,1. Объем проб 2 мл, инкубация проб 2 часа при 37° в анаэробных условиях; о реакции судили по выхождению D из кислоты в среду)

№№ проб	D-янт. к-та в $\mu$ M	Сукцинодегидр.	Кипячен. сукцинодегидр.	Селенит	Маликодегидр.	Атомч. % избытка D	% обмена	Примечание
1	1000	0,7	—	—	—	0,0119	6,3	Без инкубации
2	1000	—	0,7	—	—	0,0000	0,0	
3	1000	0,7	—	—	—	0,0000	0,0	
4	1000	—	—	0,2	0,7	0,0000	0,0	

Сравнение результатов, полученных в пробах №№ 1 и 4 (табл. 3), показывает, что лабилизация  $\alpha$ -водорода янтарной кислоты является специфической ферментативной реакцией.

### Результаты

Полученные нами данные по действию ядов на лабилизацию  $\alpha$ -водородов в яблочной и янтарной кислотах, а также по влиянию активности различных функций ферментов на этот процесс говорят о том, что катализ различных ступеней ферментной реакции, повидимому, осуществляется различными группами фермента. Окисление яблочной и янтарной кислот совершается ступенчато: вначале происходит лабилизация  $\alpha$ -водородов, а затем собственно ферментная реакция. Компоненты реакции, условия действия ферментов и влияние ядов на этих ступенях могут быть различными. Работы по исследованию лабилизации  $\alpha$ -водородов в аминокислотах дают основание предположить, что в белковой цепочке может происходить не только обмен аминокислот, но и более мелких групп и даже атомов.

Поступило  
19 V 1952

### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> G. Foster, D. Rittenberg, R. Schoenheimer, J. Biol. Chem., **125**, 13 (1938). <sup>2</sup> V. du Vigneaud, M. Cohn et al., *ibid.*, **131**, 273 (1939). <sup>3</sup> M. Bovarnik, *ibid.*, **145**, 415 (1942). <sup>4</sup> А. С. Коникова, М. Г. Крицман, Р. В. Тейс, Биохимия, **7**, 86 (1942). <sup>5</sup> А. С. Коникова, Н. Н. Добберт, А. Е. Браунштейн, Биохимия, **12**, 556 (1947). <sup>6</sup> D. Shemin, D. Rittenberg, J. Biol. Chem., **167**, 875 (1947). <sup>7</sup> E. Weinmann, M. Morehouse, R. Winzler, *ibid.*, **168**, 717 (1947). <sup>8</sup> С. Я. Давыдова, А. С. Коникова, ДАН, **60**, 251 (1948). <sup>9</sup> А. А. Меркулов, Вопросы медицинской химии, **2** (1951).