

Е. В. ПЕТУШКОВА

ОБ ОБРАЗОВАНИИ КОМПЛЕКСА МЕЖДУ КАРНОЗИНОМ И АТФ

(Представлено академиком С. Е. Севериным 21 IX 1970)

В наших предыдущих работах (¹, ²) было установлено тормозящее влияние дипептида карнозина на АТФазную активность миозина в области развития субстратного торможения. Проведенный при этом кинетический анализ, а также данные (³) по исследованию сокращения глицирированных мышечных волокон показали, что при некоторых условиях карнозин может усиливать действие АТФ. Одним из вероятных объяснений этого факта явилось предположение об образовании комплекса между АТФ и карнозином, который мог бы обладать большим сродством к сократительным белкам, чем сам АТФ. Приводимые ниже экспериментальные данные указывают на возможность образования такого комплекса при определенных условиях.

Методика. Количественное и качественное определение имидазольных соединений и тирозина проводили обычным способом по диазореакции Паули. Хроматографическую разгонку проводили в камерах для нисходящей хроматографии на бумаге Ватман № 1 4 раза по 24 часа: 2 раза в бутанолуксусной смеси при соотношении: бутанолуксусная кислота: вода, равном 4:1:5, используя верхний слой в качестве растворителя, а нижний для насыщения камеры, и два раза в бутанолуксусной смеси 40:15:5 (нерасслаивающаяся смесь). После высушивания на хроматограмме определяли локализацию нуклеотидов по поглощению в ультрафиолете, а затем хроматограмму проявляли нингидрином или диазореактивом.

Результаты. При хроматографии в бутанолуксусной смеси АТФ (200 мкг) не уходит от точки старта, образуя большое (до 5—6 см по ходу растворителя) пятно с четкими границами. Стандарт карнозина (20—30 мкг) уходит от старта на 20—25 см и образует сильно вытянутое, размытое и иногда как бы раздвоенное пятно. При нанесении таких же количеств карнозина вместе с АТФ его поведение резко меняется: карнозин теперь располагается внутри пятна АТФ, ближе к его передней границе, и образует резко очерченную компактную полоску. Только иногда, особенно при нанесении больших количеств карнозина, некоторая часть его (не более 5—10%) уходит вперед за пределы пятна АТФ, имея вид «усов» по бокам основного пятна и слабоокрашенной полоски впереди него, которая располагается все-таки значительно ниже, чем стандарт карнозина. В общем виде такое пятно имеет характерную кольцеобразную форму с сильно утолщенной и четко отграниченной нижней частью, полностью располагающейся внутри пятна АТФ. Для того чтобы выяснить, насколько этот феномен является специфическим для карнозина, тем же хроматографическим методом проводили исследование взаимодействия АТФ с гистидином, имидазолом, тирозином, а также различных препаратов АТФ с различными препаратами карнозина. Каждую полоску хроматограммы разрезали вдоль пополам и одну половину проявляли нингидрином, а другую диазореактивом. Опыты показали, что карнозин во всех случаях задерживается и концентрируется внутри пятна АТФ. В несколько меньшей степени это свойственно и гистидину: он образует так-

же пятно кольцеобразной формы, но уже около 50% его выходит за пределы пятна АТФ. Имидазол и тирозин далеко уходят от линии старта и идут немного ниже фронта растворителя, причем наличие АТФ совершенно не сказывается на их продвижении. Одновременно удалось установить, что положительная диазореакция, свойственная некоторым препаратам АТФ (прежде всего, препаратом Ивановского мясокомбината), обусловлена наличием примеси карнозина (иногда до 0,7%).

Для выяснения специфичности наблюдаемого эффекта в отношении нуклеотида были поставлены хроматограммы, на которые в одно пятно с карнозином наносили АДФ, АМФ, аденозин, аденин, а также ГТФ. Все эти соединения обладают различной подвижностью в исследуемом растворителе, так, например, скорость продвижения у АМФ, имеющей гидрофильную фосфатную группу, значительно меньше, чем скорость продвижения аденозина и тем более аденина, обладающих лучшей растворимостью в неполярной подвижной фазе и продвигающихся почти что с фронтом растворителя. АДФ, ГТФ и АТФ располагаются примерно на одном уровне, образуя не уходящее со старта пятно до 8—9 см длиной (по ходу растворителя). Ни с одним из этих соединений, кроме АТФ, не наблюдалось взаимодействия карнозина, приводящего к образованию пятна кольцеобразной формы и задержки его продвижения. Следовательно, эта задержка не обусловлена ни «солевым мешком», ни электростатическим взаимодействием карнозина с АТФ, так как в этом случае те же результаты были бы получены и с АДФ и тем более с ГТФ. Видимо, следует предположить специфическое взаимодействие АТФ и карнозина. Опыт показал, что это взаимодействие обнаруживается только в присутствии неводной слабополярной фазы. В других условиях комплекса обнаружить взаимодействия не удастся: например, при электрофорезе имидазол, гистидин и карнозин движутся в сторону, противоположную АТФ. Данные, полученные с помощью распределительной хроматографии, подтверждаются и при изучении распределения карнозина между несмешивающимися слоями водной и слабополярной бутанольной фазы в присутствии и в отсутствие АТФ. Для увеличения растворимости карнозина и АТФ в бутанольном слое увеличивали его насыщенность водой, добавляя этиловый спирт (на 23 мл воды и 25 мл бутанола 8 мл этилового спирта). Карнозин и АТФ растворяли в нижнем слое (0,1—0,6 мл в разных опытах), добавляли 4,5—6,0 мл верхнего слоя, пробирку энергично встряхивали и после расслоения проводили определение содержания карнозина в верхнем и нижнем слоях с помощью диазореакции. Если на определение брать три миллилитра верхнего бутанольного слоя, то при проведении диазореакции 1 мл воды из него, содержащий все окрашенное вещество, переходит в водный раствор с реактивами. Остаточные сверху два миллилитра бутанола не мешают диазореакции и колориметрированию и даже стабилизируют окраску. Коэффициент распределения — отношение концентрации вещества в водной фазе к концентрации вещества в неводной фазе, в данном случае — бутанольной, — составлял в наших опытах примерно 30 для карнозина и около 100 для АТФ. В присутствии АТФ содержание карнозина в верхнем слое значительно снижается (табл. 1), т. е. создается впечатление, что АТФ, которая в основном содержится в нижнем слое, образует с карнозином соединение, обладающее более гидрофильными свойствами, чем сам карнозин. Действие АТФ не обусловлено неспецифическим обезвоживанием верхнего слоя, так как замена ее на КСl в трех-четырекратном по сравнению с АТФ количестве не вызывает снижения содержания карнозина в верхнем слое, хотя объем нижнего слоя при этом также увеличивается. Следует отметить, что и при рН 4,8 и при рН 7,8 получаются сходные результаты. Добавление одновременно АТФ и КСl вызывает еще большее увеличение объема нижнего слоя, но содержание карнозина в верхнем слое снижается значительно меньше, чем в присутствии одной АТФ. Другие соли щелочных металлов ведут

себя совершенно аналогично KCl. Если вместо одновалентных катионов добавлять двухвалентные в тех же концентрациях, то эффект снижения концентрации карнозина в верхнем слое в присутствии АТФ значительно снимается.

О влиянии одновалентных и двухвалентных катионов на содержание карнозина (в $\mu\text{г}$) в верхнем слое в присутствии и в отсутствие АТФ можно судить на основании приведенных ниже данных:

	Без солей	NaNO ₃	KNO ₃	MgCl ₂	Ca(NO ₃) ₂
Без АТФ	41	42	38	39	43
Добавка АТФ	16	21	20	33	38

Таким образом, между карнозином и АТФ образуется комплекс, обладающий более гидрофильными свойствами, чем сам карнозин или АТФ. В пользу этого предположения говорят также опыты по осаждению АТФ спиртом.

Если к пробе, содержащей 0,5 мл водного раствора свободной АТФ (4 $\mu\text{моля}$), добавить абсолютный спирт, то выпадение осадка (помутнение раствора) начинается при добавлении 1,1 мл спирта. В пробе, содержащей одновременно с АТФ 7 $\mu\text{мол.}$ (около 1,5 мг) карнозина, выпадение осадка начинается только при добавлении 1,6 мл спирта. Нужно

отметить, что при добавлении 6,0 мл абсолютного спирта происходит полное осаждение АТФ в обеих пробах. Осадок АТФ, дважды промытый 5 мл водно-спиртового раствора, содержит всю АТФ (4,1 $\mu\text{моля}$, определено по поглощению в ультрафиолете) и 940 $\mu\text{г}$ карнозина (около 4,2 $\mu\text{моля}$), хотя в контрольной пробе, не содержащей АТФ, карнозин не осаждается даже при добавлении 20-кратного объема спирта вследствие низкой концентрации. При частичном осаждении АТФ (добавление 6-кратного объема спирта) в осадке обнаруживается около $\frac{1}{3}$ всего количества АТФ (1,2—1,4 $\mu\text{моля}$) и примерно полуторное количество карнозина (1,8—2,2 $\mu\text{моля}$).

Трудно сказать что-либо определенное относительно возможной природы комплекса карнозина с АТФ. Самым характерным для него является то, что он образуется только при наличии неполярной или слабополярной фазы. Здесь можно провести аналогию с имеющимися в литературе данными об образовании молекулярных комплексов между пуринами и некоторыми ароматическими углеводородами, приводящем к увеличению растворимости последних (4). Обращает на себя внимание тот факт, что для возникновения комплекса необходимы, во-первых, наличие структуры карнозина или гистидина (свободный имидазол если и связывается, то очень слабо); во-вторых, в 6 положении кольца трифосфонуклеотида должна находиться не OH-, а NH₂-группа (с ГТФ комплекса не образуется) и, в-третьих, сравнительно прочное соединение, не распадающееся при длительном протекании растворителя при хроматографии, образуется только при наличии не менее трех фосфатных остатков в адениновом нуклеотиде. Наиболее вероятным представляется образование между карнозином и АТФ водородных и солеобразных связей, так как известно, с одной стороны, что именно такие связи стабилизируются и усиливаются при добавлении слабополярных веществ, будучи в то же время сравнительно

Таблица 1
Содержание карнозина в верхнем слое в присутствии АТФ ($\mu\text{г}$)

№ пробы	Состав проб	Объем нижнего слоя после расслоения, мл	pH 4,8	pH 7,8
1	Карнозин	0,1	49,5	56
2	Карнозин + АТФ	0,25	22,5	30
3	Карнозин + KCl	0,30	45,0	49,5
4	Карнозин + KCl + АТФ	0,35	28,0	37,5

Примечание. Общее содержание карнозина в пробе 110 $\mu\text{г}$. Объем верхнего слоя 4,5 мл. АТФ добавлен в количестве 1,5 $\mu\text{мол}$ (2 и 3 пробы). Объем нижнего слоя (исходный) 0,1 мл; KCl 12 $\mu\text{мол.}$ (3 и 4 пробы).

нестойкими в водных растворах. С другой стороны, известен факт образования за счет водородных связей довольно прочных комплексов гистидина с гидроксилами пентоз (⁵).

Установленный факт может иметь значение и *in vivo*, поскольку живые клетки представляют собой системы, содержащие как водные, так и неводные фазы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
4 IX 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. М. Бочарникова, Е. В. Петушкова, Биохимия, **32**, 1, 17 (1967).
² И. М. Бочарникова, Е. В. Петушкова, Биохимия, **32**, 1, 119 (1967).
³ W. J. Bowen, Arch. Biochem. and Biophys., **112**, 3 (1965). ⁴ Б. Пюльман, А. Пюльман, Квантовая биохимия, М., 1965. ⁵ О. Л. Поляновский, Роль функциональных групп белка в ферментах, Сборн. Ферменты, «Наука», 1964, стр. 101.