

Г. М. БОРИСКИНА, Л. А. ЦЕЙТЛИН

**ТРАНСГЛЮКОЗИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НАД-ГЛЮКОГИДРОЛАЗЫ
МЫШЦЫ СЕРДЦА**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 4 II 1972)

Для НАД-глюкогидролаз или НАДаз (КФ 3.2.2.5) многих животных тканей, помимо гидролитического расщепления никотинамидных коферментов с освобождением свободного никотинамида, показана также способность катализировать реакцию обмена между свободным никотинамидом и никотинамидом, находящимся в составе молекул НАД и НАДФ. Таким образом, НАДазы могут рассматриваться не только как гидролазы, но и как трансглюкозидазы (¹, ²). Специфичность глюкогидролаз как трансглюкозидаз весьма низкая и, как было установлено, в динуклеотиды могут внедряться различные соединения с образованием соответствующих аналогов (³, ⁴). Однако, НАДазам не всех органов присуща трансглюкозидазная активность. Так, ферменты, выделенные из митохондрий печени карпа (⁵), эритроцитов кролика (⁶) лишены способности катализировать синтез аналогов коферментов.

Ранее было показано, что гидролитическое расщепление никотинамидных коферментов в мышце сердца происходит достаточно интенсивно (⁷). Вопрос же о способности НАДазы мышцы сердца катализировать образование аналогов коферментов оставался открытым.

Целью настоящей работы явилось исследование способности НАДазы сердечной мышцы осуществлять трансглюкозидазные реакции.

Получение и выделение 3-ацетилпиридинового аналога НАД проводили по методу, предложенному А. Вуннеманн, Н. Сорег для НАДазы, выделенной из мозга кролика (⁸). Источником фермента служил ацетонированный порошок, полученный из автолизатов сердца кролика. Инкубационная смесь содержала:

30 μ мол. НАД, 300 μ мол. 3-ацетилпиридина, 100 мг белка, 10 мл фосфатного буфера 0,05 M, pH 7,5. После 60 мин. инкубации при 37° реакцию останавливали нагреванием проб в течение 1 мин. в кипящей водяной бане. Белок отделяли центрифугированием и центрифугат наносили на ионообменную колонку Дауэкс 1 \times 10 (форматная форма), размером 1 \times 40 см. Колонку промывали водой и элюировали продукты реакции возрастающими концентрациями муравьиной кислоты (ступенчатый градиент). Фракции, содержащие НАД и аналог, объединяли, лиофилизировали и дальнейшее разделение проводили хроматографированием на бумаге в трехфазном растворителе — изомасляная кислота : вода : аммиак в соотношениях 66 : 33 : 1. Локализацию пятен выявляли при помощи ультрамикроскопа. Для количественного определения участки хроматограммы, содержащие НАД и аналог, экстрагировали 0,1 N HCl. Концентрацию аналога и НАД в элюатах определяли, применяя специфическое энзиматическое восстановление алькогальдегидрогеназой с последующим спектрофотметри-

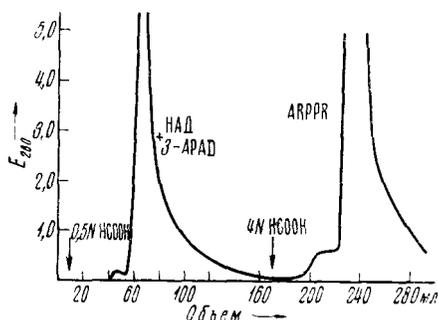


Рис. 1. Хроматографическое разделение НАД, его аналога (3-АРАД) и продукта гидролитического расщепления НАД — аденозиндифосфатрибозы (ARPPP) на колонке повообменника Дауэкс 1 \times 10

ческим определением восстановленных форм. Коэффициент миллимолярной экстинкции для 3-ацетилпиридинового аналога НАД при 365 м μ принимали равным 9,1⁽⁹⁾.

При инкубации ацетонированных препаратов из мышцы сердца в присутствии НАД и высоких концентраций 3-ацетилпиридина удалось осуществить ферментативный синтез соответствующего аналога НАД. Как видно из рис. 1, разделить НАД и его аналог, проводя элюцию ступенчатым градиентом муравьиной кислоты, не удается. Разделение было достигнуто хроматографированием на бумаге.

В ультрафиолете выявляются два отчетливых пятна, одно из которых соответствует НАД, другое 3-ацетилпиридиновому аналогу. 3-ацетилпиридиновый аналог НАД был идентифицирован по его спектральным свойствам, которые для окисленной и восстановленной форм полностью соответствовали литературным данным⁽⁹⁾: после восстановления аналога алкогольдегидрогеназой появлялся четко выраженный максимум при 365 м μ (рис. 2); отношение поглощения при 365 м μ к поглощению при 340 м μ составляло 1,45⁽²⁾.

Выход аналога составлял 28% от исходного количества НАД (из 30 μ мол. НАД образовалось 8,4 μ моля аналога). Трансглюкозидазная активность НАДазы, выраженная в μ молях образованного аналога за 1 час на 1 мг белка, составляла 0,067. Глюкогидролазная активность в контрольной пробе, не содержащей 3-ацетилпиридина, составляла 0,23 μ мол/мг в час.

На основании проведенных исследований можно считать установленным, что мышца сердца не лишена способности к осуществлению трансглюкозидазных реакций. Однако трансглюкозидазная активность НАДазы мышцы сердца кролика невелика (примерно на порядок ниже таковой мозга)⁽¹⁰⁾, что позволяет отнести НАДазу сердца к ферментам с преимущественно глюкогидролазным типом действия. Тем не менее установленные трансглюкозидазной активности НАДазы мышцы сердца открывают широкие перспективы для исследования влияния различных модификаций в структуре никотинамидных нуклеотидов на проявление их коферментной функции.

Авторы приносят глубокую благодарность акад. С. Е. Северину за постоянное внимание и ценные советы при проведении данной работы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
7 I 1972

Институт фармакологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. J. Zatman, N. O. Kaplan, S. P. Colowik, J. Biol. Chem., **200**, 197 (1953).
² N. O. Kaplan, M. M. Ciotti, J. Biol. Chem., **221**, 823 (1956). ³ L. J. Zatman, N. O. Kaplan et al., J. Am. Chem. Soc., **75**, 3293 (1953). ⁴ S. G. Alivisatos, F. Ungar et al., J. Biol. Chem., **235**, 1742 (1960). ⁵ K. Raczynska-Bojanowska, Postepy biochem., **9**, 201 (1963). ⁶ E. C. Hofmann, S. Rapoport, Biochem. Zs., **329**, 428, 437 (1957). ⁷ С. Е. Северин, Л. А. Цейтлин, Т. Н. Дружинина, Биохимия, **28**, 145 (1963). ⁸ A. Brunnemann, H. Coper, H. Herken, Arch. Exp. Pathol. u. Pharmacol., **244**, 223 (1962). ⁹ J. M. Siegel, G. A. Montgomery, R. M. Vock, Arch. Biochem. and Biophys., **82**, 288 (1959). ¹⁰ A. Brunnemann, H. Coper, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., **250**, 469 (1965).

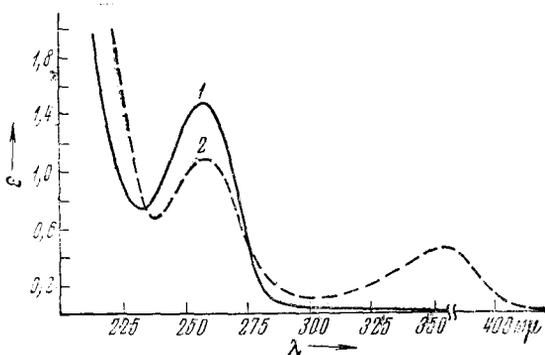


Рис. 2. Спектр окисленной и восстановленной форм 3-ацетилпиридинового аналога НАД. 1 — окисленная форма аналога, 2 — восстановленная форма аналога