Г. К. ПАРСАДАНЯН, И. Г. АСЛАНЯН, Г. Т. АДУՆՇ, Լ. Բ. ԹԵՐ-ԿԱՏԵՎՈՍՅԱՆ,
Ա. Ա. ԳԱՏՔԱՐՅԱՆ

СУБКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Изучалась активность фосфопротеинфосфатазы (ФП-азы) в гомогенатах, субклеточных фракциях сердечной мышцы быков, свиней, кроликов, белых крыс и кур.

Диализ и гельфильтрация через Сефадекс Г-25 приводили к падению активности фермента растворимой фракции сердца крыс.

Поскольку добавление адентов (ортофенактролина, 8-оксихинолина, цианида, мочевины в концентрации 10^{-2} — 10^{-5} М) к гомогенату ткани не привело к какому-либо сдвигу в активности фермента, сделано заключение, что выводимый при диализе низкомолекулярный кофактор не относится к ионам металлов.

Открытие Харрисом [8] в икре лягушки фермента, дефосфорилирующего фосфопротеины, повлекло за собой целую серию исследований, посвященных более детальному изучению свойств фосфопротеинфосфатазы (ФП-азы). В этих работах высказывалась мысль о том, что обнаруженная во многих тканях животных и растений ФП-аза является однотипным каталитически активным белком, обладающим примерно одинаковыми свойствами независимо от источника его выделения [4, 5, 9, 13, 21]. Наиболее частым объектом изучения в этот период становилась ФП-аза селезенки и печени, которая несмотря на высокую активность не была достаточно специфичной, расщепляя фосфоэфирные связи во многих органических соединениях [11, 21, 24]. Были даже высказаны предположения, что название ФП-аза является неточным, и исследователи, по существу, имеют дело с неспецифичной кислой фосфатазой или фосфорамидазой [22, 23]. Однако проведенные в более поздний период работы окончательно подтвердили как само существование фермента ФП-азы, специфичного к фосфосернистой связи в ФП, так и его гетерогенность и наличие изоферментного спектра [3, 10, 12, 17, 25]. Одновременно расширился выбор изучаемых тканей, в частности интенсивно стали изучаться ФП-аза мозга млекопитающих, икры рыб и морских беспозвоночных, которые наряду с ФП-азой содержат в значительном количестве эндогенные ФП, являющиеся естественным субстратом для этого фермента. Малонизученной пока остается ФП-аза сердечной и скелетных мышц различных животных. Известные нам исследования мышечной ФП-азы проводились главным образом в направлении сравнения активности этого фермента в различных типах мышц или в мышцах различных животных [1, 4, 6].

До последнего времени не предпринималось попыток изолировать и очистить ФП-азу мышц, изучить ее кинетические параметры, уточнить роль этого фермента в мышечном метаболизме. Между тем фермент дефосфорилирующий фосфорсодержащие белки ФП-аза, по-видимому, играет существенную роль в регуляции активности целого ряда ферментов гликолитического цикла, являющихся по своему строению ФП. Возможно также ее непосредственное участие в акте мышечного сокращения, в частности в дефосфорилировании фосфомозина [6].

Определенные работы по изучению свойств ФП-азы мышц были проведены нами [2, 3, 19].

Настоящая работа посвящена рассмотрению особенностей внутриклеточного распределения ФП-азы в сердечной мышце различных животных и изучению некоторых свойств ФП-азы сердца белых крыс.

Материал и методика. Опыты были поставлены на сердечной мышце взрослых свиней, крупного рогатого скота, кроликов, белых крыс и кур.

Ткани декапированных животных немедленно помещались на лед, и дальнейшая их обработка осуществлялась в холодной комнате при температуре 0—4°. Мышца сердца отмывалась от крови, освобождалась от жира и соединительнотканых элементов и измельчалась в гомогенизаторе Морринга с 0,25 М раствором сахарозы (в соотношении 1:10) в течение 5 мин.

Отдельные клеточные фракции выделялись методом дифференциального центрифугирования по схеме, предложенной Перри и Греем [20] и Роузом [22]. Гомогенат ткани центрифугировался 10 мин при 600g для осаждения ядерно-миофибрилярной фракции. Надосадочная жидкость центрифугировалась 15 мин при 19000g. Получающийся при этом осадок отмывался однократно 0,25 М раствором сахарозы. Объединенная надосадочная фракция состояла из гналоплазмы и микросом, а митохондриальная фракция была сосредоточена в осадке. Белок в гомогенате и субклеточных фракциях определялся методом Лоури [14].

Активность ФП-азы (КФ 3.1.3.16) определялась по Файнштейну и Фольку [7] с некоторыми изменениями. В качестве субстрата использовался казенин. Реакционная смесь содержала 1 мл гомогената или соответствующей фракции и 5 мл 1% раствора казенина, приготовленного на 0,2М боратном буфере рН 6,1. После одночасовой инкубации при 37° ферментативную реакцию останавливали 3 мл 30% ТХУ. Активность фермента выражали в мкг отщепившегося фосфата на 1 г сырого веса ткани или на 1 мг белка (удельная активность) в 1 час.

Результаты и обсуждение. Была изучена в сравнительном аспекте активность ФП-азы как в гомогенатах, так и отдельных субклеточных фракциях сердечной мышцы у ряда сельскохозяйственных и лабораторных животных. Поскольку особенности внутриклеточного распределения белка в сердечной мышце изучены весьма недостаточно, мы определяли также содержание белка в отдельных субклеточных фракциях этой ткани у указанных выше животных. Соотношение активности фермента в той или иной фракции и содержания белка в ней позволило составить представление также и об удельной активности фермента. Результаты проведенных экспериментов приведены в табл. 1—3.

Как видно из табл. 1, наибольшей ФП-азной активностью обладает сердечная мышца белых крыс и кур, а ниже всего она у крупного рогатого скота и свиней.

Таблица 1
Активность фосфопротеинфосфатазы в гомогенате и субклеточных фракциях сердечной
мышцы различных животных (средневзвешенная величина, мкг Р на 1 г ткани
за 1 час при 37°)

Животное	Гомогенат	Ядра + мио- фибриллы	Митохондрии	Микросомы + гиалоплазма
Бык	300±45 (5)	159±23 (5)	10±2,7 (5)	70±9 (5)
Свинья	355±17 (4)	189±23 (4)	54±11 (4)	91±4 (4)
Кролик	412±12 (7)	186±12 (7)	59±3 (7)	170±10 (7)
Крыса	880±54 (8)	300±48 (5)	46±8 (5)	566±28 (9)
Кура	815±42 (6)	197±35 (6)	39±9 (5)	481±43 (6)

В скобках здесь и в последующих таблицах — число опытов.

Из субклеточных фракций высокой ФП-азной активностью (в расчете на 1 г ткани) отличалась ядерно-миофибрилярная фракция. Следует однако указать, что значительная часть ФП-азной активности этой фракции относится, по-видимому, к загрязняющим ее фрагментам полуразрушенных клеток и тканей. Весьма велика также активность фермента во фракции микросомы+гиалоплазма, а у крыс и кур это вообще наиболее богатая ФП-азой фракция. 64% всей активности ФП-азы мышцы сердца крыс и 59% — кур сосредоточено в указанной фракции.

Поскольку по имеющимся сведениям ФП-аза в микросомах практически отсутствует [18, 22], можно предположить, что у кур и белых крыс она в основном сосредоточена в цитозоле, а не в клеточных гранулах.

Таблица 2
Содержание белка в гомогенате и субклеточных фракциях сердечной мышцы
у разных животных (средневзвешенная величина, мг белка на г ткани)

Животное	Гомогенат	Ядра + мио- фибриллы	Митохондрии	Микросомы + гиалоплазма
Бык	217±15 (4)	168±19 (4)	15±0,1 (4)	31±4 (4)
Свинья	195±11 (4)	138±11 (4)	7±0,5 (4)	24±2 (4)
Крыса	220±10 (7)	96±16 (4)	15±3 (4)	49±2 (6)
Кролик	129±4 (8)	89±4 (8)	16±0,6 (8)	25±2 (8)
Кура	202±23 (6)	141±15 (6)	18±2 (6)	40±4 (6)

Судя по данным табл. 2, можно отметить, что как содержание белка в гомогенатах тканей, так и распределение его по отдельным клеточным фракциям сердца разных животных носит в общем однотипный характер. Особняком стоит лишь мышца сердца кролика, где содержание белка несколько ниже, чем у остальных рассмотренных животных.

В табл. 3 приведены данные относительно удельной активности ФП-азы, позволяющие судить о том, что фермент этот не только по тотальной, но и по удельной активности локализован в растворимой фракции. Ни в одной из фракций, содержащих клеточные гранулы (за исключением митохондрий сердца свиней), удельная активность ФП-азы не достигает столь высокого уровня, как в гиалоплазме. Она превышает активность гомогената сердца у быка на 64%, свиньи — в 2 раза, кроли-

Таблица 3

Удельная активность фосфопротенифосфатазы в гомогенате и субклеточных фракциях мышц сердца различных животных, мкг Р на мг белка за 1 час при 37°

Животное	Гомогенат	Ядра+мио- фибриллы	Митохондрии	Микросомы+ гялоплазма
Бык	1,4	0,9	0,7	2,3
Свинья	1,8	1,4	7,3	3,8
Кролик	3,1	2,0	3,7	6,8
Крыса	4,0	3,1	3,0	11,4
Кура	4,0	1,4	2,1	12,0

ка—в 2,2 раза, крыс и кур—около 3 раз. Полученные результаты согласуются с данными литературы о внутриклеточном распределении ФП-азы в тканях различных животных [6, 15, 16, 18, 22].

К настоящему времени назрела необходимость в получении высокоочищенных препаратов ФП-азы для выяснения вопросов кинетических параметров, уточнения специфичности и механизма действия фермента.

Поскольку наиболее высокая ФП-азная активность была выявлена в надосадочной фракции, полученной при 19000g из сердца крыс, мы сочли целесообразным использовать этот источник в качестве исходного материала для последующей очистки фермента.

При выделении ферментов обычно применяют те или иные приемы удаления низкомолекулярных соединений из исходного материала. При этой процедуре, однако, могут выводиться низкомолекулярные кофакторы, от которых в значительной мере зависит активность фермента.

Нами были испробованы диализ гомогената и проведение цитоплазматической фракции через коллоид Сефадексом Г-25. При пропускании через Сефадекс Г-25 указанной фракции сердечной мышцы крыс активность ФП-азы в ней полностью исчезала. Диализ гомогената сердца против дистиллированной воды при температуре 4° в течение суток также приводил к значительному понижению активности фермента. Так, если в исходном гомогенате активность ФП-азы составляла 900 ± 40 мкг Р/г ткани, то в диализованном гомогенате активность падала до 300 ± 20 , в то время, как в контрольной пробе, хранившейся в тех же условиях без диализа, активность ФП-азы почти не изменялась, составляя 860 ± 35 мкг Р/г ткани. Были предприняты попытки к выяснению природы низкомолекулярного фактора, удаление которого приводило к падению ФП-азной активности. Одной из возможных причин могло оказаться удаление ионов металлов, играющих определенную роль в осуществлении каталитической функции ферментов. Для выяснения этого вопроса использовались комплексообразующие реагенты (8-оксихинолин, ортофенагролин, тиомочевина, цианид). Добавление комплексообразователей в диапазоне концентраций 10^{-5} — 10^{-2} М не привело, однако, к существенным изменениям активности фермента (табл. 4). Помимо приведенных в таблице данных, было испробовано также действие KCN, что также не повлекло за собой никаких сдвигов в активности ФП-азы. Ранее нами было установлено также, что активность ФП-азы мышц белых крыс не изменяется под действием ЭДТА [19].

Таблица 4

Влияние металлсвязывающих агентов на активность фосфопротеинфосфатазы гомогенатов сердечной мышцы белых крыс (средневзвешенная величина, мкг Р на 1 г ткани за 1 час при 37°)

Комплексообразователь	Конечная концентрация реагента в реакционной смеси, М				
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	Контроль
Гномочевина	700±55 (4)	740±10 (4)	700±35 (4)	740±30 (4)	720±40 (4)
Ортофенан троллин	—	640±60 (5)	450±42 (5)	580±35 (5)	600±65 (5)
8-оксихинолин	—	680±55 (6)	740±75 (6)	730±65 (6)	740±60 (6)

Как известно, активность металлоферментных комплексов и большинства истинных металлоферментов тормозится аддентами. В силу своей индифферентности к металлсвязывающим агентам ФП-аза не может быть, по-видимому, отнесена к металлоферментам, и ионы металлов следует исключить из числа возможных низкомолекулярных кофакторов, удаление которых приводит почти к трехкратному падению активности фермента. Для выяснения природы выводимого при анализе низкомолекулярного соединения будут проделаны модельные опыты с добавлением к диализату некоторых коферментов и других биоактивных соединений.

Проведенные исследования позволили нам уточнить некоторые особенности ФП-азы сердечной мышцы и произвести выбор наиболее перспективного источника для последующей ее очистки.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 11.III 1974 г.

Հ. Կ. ՓԱՐՈՒԿԻԱՆՅԱՆ, Ի. Հ. ԱՍԸԱՆՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԳՈՒՆՅ, Լ. Պ. ՏԵՐ-ՔԱՔԵԼՈՍՅԱՆ,
Ա. Ա. ԿԱՍՊԱՐՅԱՆ

ՍՐՏԻ ՄԿԱՆԻ ՖՈՍՖՈՊՐՈՏԵԻՆՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԵՆԹԱԲՋՋԱՅԻՆ ԲԱՇԽՈՒՄԸ
ԵՎ ՈՐՈՇ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԸ

Ա մ ֆ ո ֆ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է ֆոսֆոպրոտեինֆոսֆատազայի ակտիվությունը խոշոր եղջերավոր անասունների, խոզերի, ճագարների, սպիտակ առնետների և հավերի սրտամկանի հոմոգենատներում և ենթաբջջային ֆրակցիաներում: Դիալիզը և գելֆրոտացիան Սեֆադեկս Γ-25-ով հանդեցրել են առնետների սրտամկանի լուծելի ֆրակցիայից ստացած ֆերմենտի ակտիվության անկման:

Քանի որ ազենդները (օ-ֆենանտրոլին, 8-օքսիխինոլին, ցիանիդ, միզանյութ, 10^{-2} — 10^{-5} M շնչենտրացիաներում) ավելացումը հյուսվածքի հոմոգենատի վրա չի առաջացրել ֆերմենտի ակտիվության նկատելի փոփոխություն, կարելի է եզրակացնել, որ դիալիզի ընթացքում դուրս եկած ցածրամոլեկուլյար կոֆակտորը մետաղի իոնն չէ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Еришов В. В. Укр. биох. журн., 43, 459, 1971.
2. Парсаданян Г. К. Укр. биох. журн., 6, 821, 1964.
3. Парсаданян Г. К. Биологический журнал Армении, 20, 9, 20, 1967.
4. Симонян А. А. Изв. АН АрмССР. Биол. науки, 15, 6, 77, 1962.
5. Сквирская Э. Б., Силич Т. П. Укр. биох. журн., 29, 8, 1957.
6. Bargoni N., Fossa T., Sisini A. Enzymologia, 26, 66, 1963.
7. Feinsteln R. N., Folk M. E. J. Biol. Chem., 177, 339, 1949.
8. Harris D. L. J. Biol. Chem., 165, 541, 1946.
9. Hasegawa K., Mizuno M. Agr. Biol. Chem., 27, 706, 1963.
10. Hofman T. Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 18, 3, 280, 1970.
11. Hofman T. Biochem. J., 99, 135, 1958.
12. Kanamori M. Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 15, 1, 1967.
13. Li S. O., Ho Y. S. Sheng Hua Hsuen Pao, 1, 107, 1958.
14. Lowry O. H. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
15. Maeno H., Greengard P. J. Biol. Chem., 247, 3269, 1972.
16. Meisler M. H., Langan T. A. J. Biol. Chem., 244, 4961, 1969.
17. Ohtake M. Gifu Daigaku Igakubu Kiyo, 15, 1, 43, 1967.
18. Paigen K., Griffits S. K. J. Biol. Chem., 234, 299, 1959.
19. Parsadanian H. K. FEBS Y Meeting, Abstracts, 256. Praha, 1968.
20. Perry S. W., Gray T. S. Biochem. J., 64, 184, 1956.
21. Revel H., Racker E. Biochim. Biophys Acta, 43, 465, 1960.
22. Rose S. P. R. Nature, 194, 1280, 1962.
23. Singer M. F., Fruton J. S. J. Biol. Chem., 229, 111, 1957.
24. Sundurajan T. A., Sarma P. S. Biochem. J., 56, 125, 1954.