

Л. П. ТЕР-ТАТЕВОСЯН, Г. Т. АДУНЦ, И. Г. АСЛАНЯН,  
А. А. ГАСПАРЯН, Г. К. ПАРСАДАНЯН

## СУБКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ ТКАНЕЙ КУР

Изучалась субклеточная локализация фосфопротеин-фосфатазы (ФПФ-азы) (КФЭ.1.3.16) в различных тканях кур. Наиболее богата ФПФ-азной активностью надмитохондриальная надосадоочная.

Свойства фосфопротеинфосфатазы (фосфопротеинфосфогидролазы КФ Э.1.3.16) (ФПФ-азы) и протеникиназы тканей млекопитающих, участвующих в регуляции деятельности фосфосодержащих ферментов и других фосфопротеинов привлекают в последнее время внимание многих исследователей [14]. Значение и особенности ФПФ-азы птиц изучены весьма недостаточно. Известно, однако, что энергетический обмен, и в частности обмен фосфопротеинов, у них отличается своеобразием. В связи с этим в настоящей работе было сочтено целесообразным рассмотреть субклеточное распределение ФПФ-азы в тканях кур и изучить как «оперативную» модификацию ее активности под действием общепринятых активаторов и ингибиторов, так и возможную индукцию синтеза фермента при введении гидрокортизона и тироксина.

*Материал и методика.* В опытах были использованы гидрокортизон фирмы «Рихтер» и L-тироксин (натриевая соль) фирмы «Реанал». В качестве субстрата для ФПФ-азы был взят чистый (по Хаммарстену) казеин фирмы «Реанал». Активность ФПФ-азы в гомогенатах тканей взрослых кур и куриных эмбрионов определяли по Файнштейну и Фольку [6], с некоторыми модификациями [3]. Неорганический фосфат ( $P_i$ ) определяли по Фиске и Суббароу [7]. Инкубационная смесь содержала 2,5 мл 1% раствора казеина, 0,5 мл гомогената ткани (1:10 в/об), и 0,5 мл раствора соответствующего реагента. Все растворы готовили на 0,2 М боратном буфере рН 6,2. Реакцию останавливали добавлением 1,5 мл 30% ТХУ. Активность ФПФ-азы выражали в мкг  $P_i$ , отщелачившегося от казеина в расчете на 1 г ткани в 1 час (при 37°).

Гидрокортизон вводили в пугу яйца в количестве 2,5 мг на 100 г веса, а цыплятам и взрослым курам—внутримышечно, в расчете 5 мг на 100 г веса. Животных забивали для определения активности ФПФ-азы через 3 часа после введения гормона.

Тироксин вводили тем же способом в расчете 0,5 мг (эмбрионы) или 1 мг (цыплята, взрослые куры) на 100 г веса в течение 2 дней, после чего животных декапитировали и гомогенаты тканей использовали для определения активности фермента.

*Результаты и обсуждение.* Изучение субклеточной локализации ФПФ-азы имеет значение для выяснения интимных механизмов действия ферментов, ответственных за синтез и деградацию фосфопротеинов (ФП). Имеется достаточное количество работ по распределению ФПФ-азы в тканях млекопитающих [1, 4, 5, 10]. Приведенные нами в табл. 1 данные характеризуют особенности распределения ФПФ-азы в различных тканях кур.

Таблица 1

Субклеточное распределение фосфопротеинфосфатазы в различных тканях взрослых кур, мкг Ф<sub>п</sub>, отщепившегося от казеина, на 1 г ткани за 1 час (при 37°)

Ткань	Гомогенат	Ядра	Митохондрии	Цитоплазма + микросомы	Активность во фракциях, % к гомогенату
Мозг	650±35	78±4	93±6	461±25	97,2
Сердце	668±25	157±19	56±8	406±12	92,6
Печень	1000±24	140±10	118±10	684±29	94,2
Скелетные мышцы	288±35	95±14	22±2	142±16	90,0
Селезенка	804±27	98±10	154±12	484±26	90,0

Наибольшая активность ФПФ-азы отмечается в печени и селезенке кур, а наименьшая — в скелетных мышцах. Во всех тканях основная часть активности была сосредоточена в фракции цитоплазма + микросома (50 — 70% от общей активности гомогената), тогда как в других фракциях субклеточных частиц фермент представлен в значительно меньшем количестве. ФПФ-аза, как и находящаяся в клеточном соке протеинкиназа, могут участвовать в фосфорилировании и дефосфорилировании фосфопротеинов цитоплазмы и цитоплазматических мембран.

Для выяснения тканевой специфичности ФПФ-азы было испытано действие ряда низкомолекулярных соединений, действующих на ее активность (табл. 2). Тиоловые соединения — цистеин ( $10^{-3}$ — $10^{-4}$  М), глутатион-SH ( $10^{-2}$ — $10^{-3}$  М) повышают активность ФПФ-азы печени, мозга и скелетных мышц, но несколько снижают ее в сердечной мышце. Во всех случаях эффект цистеина был более выраженным, чем действие глутатиона. Из соединений, блокирующих SH-группы, монойодацетат (МИА) в концентрации  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  М незначительно снижал активность фермента в большинстве исследованных тканей. В этом отношении ФПФ-азы мышц составляли исключение, существенно активируясь МИА. Будучи более жестким тиоловым агентом, п-ХМБ резко ингибировал активность ФПФ-азы во всех исследованных тканях кур в концентрации  $10^{-3}$  М и несколько менее при  $10^{-5}$  М. При этом, по характеру пересечения кривых на графике двойных обратных величин (рис.) установлено, что ингибирование это носит неконкурентный характер, NaF оказался эффективным ингибитором ФПФ-азы тканей кур в концентрациях  $10^{-2}$  —  $10^{-3}$  М. Из данных таблиц следует, что фермент сердечной и скелетных мышц несколько отличается от ФПФ-азы мозга и печени. Свойства последних в общем более совпадают с описанными в литературе свойствами ФПФ-азы из тканей различных животных [14].

Значительный интерес представляет и выяснение роли различных гормонов в регуляции процессов фосфорилирования и дефосфорилирования белков [5, 13]. Показано, что эстроген индуцирует синтез специфического белка IP матки крысы [8], обладающего ФПФ-азной актив-

Таблица

Действие некоторых низкомолекулярных соединений на активность фосфопротеинфосфатазы тканей взрослых кур, мкг Ф<sub>II</sub>, отщипившегося от казенна, на 1 г ткани за 1 час при 37°

Ткань	Норма	Цистеин		Глутатон		п-ХМБ		Моноацетат		NaF	
		10 <sup>-3</sup> М	10 <sup>-4</sup> М	10 <sup>-2</sup> М	10 <sup>-3</sup> М	10 <sup>-3</sup> М	10 <sup>-5</sup> М	10 <sup>-3</sup> М	10 <sup>-4</sup> М	10 <sup>-2</sup> М	10 <sup>-3</sup> М
Мозг	594 ± 29	679 ± 46	758 ± 17	629 ± 24	552 ± 19	81 ± 14	430 ± 23	504 ± 47	557 ± 27	165 ± 15	502 ± 21
Сердце	640 ± 25	552 ± 27	590 ± 49	595 ± 21	568 ± 27	143 ± 16	490 ± 27	650 ± 28	590 ± 31	205 ± 11	550 ± 27
Печень	880 ± 28	1020 ± 27	1043 ± 26	977 ± 12	1033 ± 36	222 ± 22	740 ± 36	828 ± 13	756 ± 36	230 ± 32	732 ± 36
Мышцы	251 ± 17	381 ± 14	350 ± 29	291 ± 30	355 ± 19	15 ± 5	120 ± 10	350 ± 17	397 ± 8	6 ± 3	145 ± 13

Таблица 3

Действие тироксина и гидрокортизона на активность фосфопротеинфосфатазы тканей кур в ходе онтогенеза, мкг Ф<sub>II</sub>, отщипившегося от казенна, на 1 г ткани за 1 час при 37°

Условия опыта	12-дневные эмбрионы				16-дневные эмбрионы				1-дневные цыплята				Взрослые куры			
	мозг	печень	сердце	мышцы	мозг	печень	сердце	мышцы	мозг	печень	сердце	мышцы	мозг	печень	сердце	мышцы
Норма	620 ± 13	720 ± 20	550 ± 13	440 ± 7	530 ± 11	740 ± 19	480 ± 12	430 ± 10	910 ± 15	885 ± 17	670 ± 12	395 ± 7	665 ± 35	846 ± 60	561 ± 35	242 ± 14
Тироксин	212 ± 6	176 ± 11	119 ± 8	84 ± 5	106 ± 3	110 ± 14	126 ± 6	46 ± 2	74 ± 9	630 ± 10	540 ± 42	455 ± 12	772 ± 22	1432 ± 20	601 ± 11	508 ± 26
Гидрокортизон	591 ± 7	705 ± 5	411 ± 8	442 ± 10	640 ± 21	762 ± 77	455 ± 30	470 ± 14	738 ± 51	495 ± 14	467 ± 13	635 ± 14	545 ± 19	711 ± 9	574 ± 27	304 ± 20

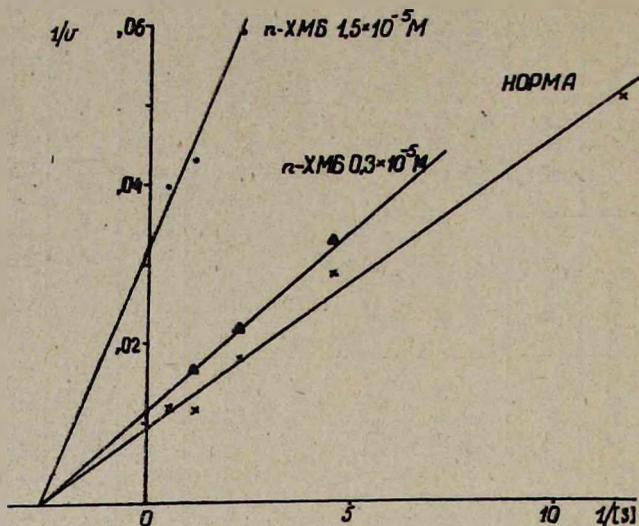


Рис. Зависимость обратных величин скоростей реакции ( $1/\text{мкг Р}_{ii}$  на 1 г ткани) от обратных величин концентраций субстрата ( $1/\text{М}$  содержащегося в казеине фосфора  $\times 10^3$ ) в присутствии различных концентраций п-ХМБ.

ностью [15]. По сообщению Лю и Грингард [9], 9-фторгидрокортизон и альдостерон способствуют повышению активности фосфатазы мембранного фосфопротеина Д из пузыря жабы, не вызывая в то же время существенных изменений в активности протеинкиназы. В свою очередь одним из нас еще в 1964 г. был изучен обмен фосфопротеинов в условиях экспериментального тиреотоксикоза у кроликов. Было установлено, что хроническое введение тиреоидина приводит к повышению содержания ФП и снижению ФПФ-азной активности в сердечной и скелетных мышцах [2]. Однако все еще отсутствуют сведения о характере воздействия того или иного гормона на активность ФПФ-азы в ходе индивидуального развития организма. Мы задались целью изучить действие тироксина и гидрокортизона на ФПФ-азу куриных эмбрионов, цыплят в день их вылупления и у взрослых кур. Активность ФПФ-азы у зародышей определяли на 12-й, 16-й дни инкубации. Было принято во внимание, что к 12-му дню развиваются щитовидная, надпочечная и другие железы, а у 16—17-дневных эмбрионов начинается интенсивное использование минеральных солей скорлупы для костеобразования. Перенос же неорганических ионов через клеточные мембраны тесно связан с обменом ФП. Кроме того, нами было ранее установлено, что свойства ФПФ-азы тканей куриного эмбриона претерпевают определенные изменения на 15—16-й дни инкубации и к моменту вылупления [3]. Проведенные нами эксперименты показали, что под влиянием тироксина резко подавляется ФПФ-азная активность во всех тканях развивающегося эмбриона и у однодневных цыплят (у последних составляет исключение ФПФ-аза мышц) (табл. 3). В то же время у взрослых кур наблюдается существенное повышение активности фермента во всех тканях и особенно в скелетных мышцах (более чем вдвое).

Гидрокортизон не вызывает резких сдвигов в активности ФПФ-азы тканей эмбриона, но угнетает активность фермента во всех тканях (кроме мышц) у однодневных цыплят. У взрослых же кур этот гормон понижает активность ФПФ-азы мозга и печени. Следует особенно отметить, что ФПФ-аза мышц проявляет нарастающую чувствительность к этому гормону в ходе эмбриогенеза, с максимальным активированием к моменту вылупления (на 60%). Эффект этот сохраняется и у взрослых кур.

Предметом оживленной дискуссии в последнее время является правомерность использования тех или иных ФП в качестве «подходящих субстратов для ФПФ-азы [5, 12]. Проведенные нами кинетические исследования позволили установить достаточно высокое сродство ФПФ-азы к используемому в наших опытах казеину. Величина  $K_m$  по этому субстрату составляла  $3,7 \times 10^{-4}$  М (рис.).

Приведенные в предыдущей [3] и настоящей работах данные о влиянии низкомолекулярных активаторов и ингибиторов и гормональной индукции (табл. 2 и 3) свидетельствуют как о тканевой гетерогенности ФПФ-аз, так и об определенных изменениях в ее свойствах в ходе индивидуального развития. Последнее, по-видимому, обусловлено тонкой адекватной регуляцией активности отдельных молекулярных форм фермента в условиях постоянного изменения функционального состояния развивающегося организма под влиянием как внутриклеточных, так и интегрированных эффекторов.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 17.XI 1975 г.

Լ. Պ. ՏԵՐ-ԹԱԹԵՎՈՍՅԱՆ, Գ. Թ. ԱԴՈՒՆՑ, Ի. Հ. ԱՍՍԱՆՅԱՆ,  
Ա. Ա. ԳԱՍՊԱՐՅԱՆ, Հ. Կ. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ

**ՀԱՎԵՐԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ՖՈՍՖՈՊՐՈՏԵԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ  
ԵՆԹԱԲՋՋԱՅԻՆ ՏԵՂԱԲԱՇԵՈՒՄԸ ԵՎ ՈՐՈՇ  
ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ**

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է ֆոսֆոպրոտեին ֆոսֆատազայի (ՖՊՖ-ազայի) (ՅԿ 3.1. 3. 16) ենթաբջջային ընկալիզացիան հավերժ տարրեր հյուսվածքներում: Ամենաբարձր ՖՊՖ-ազային ակտիվությամբ օժտված է վերմիտոքոնդրիալ հեղուկը: Սրտի և կմախքային մկանների ՖՊՖ-ազան խթանիչների և ինհիբիտորների նկատմամբ ունեցած ռեակցիայով տարբերվում է ուղեղի և լյարդի ՖՊՖ-ից: Ներարկված (0,5—1 մգ 100 գ կշռին) տիրոքսինի ազդեցությունը տարրեր է անհատական զարգացման ընթացքում: էմբրիոնների և նոր զուրս եկող ձտերի մոտ այդ հորմոնը ընկճվում է, իսկ սեռահասուն հավերժ մոտ զգալիորեն բարձրացնում է ՖՊՖ-ազայի ակտիվությունը հյուսվածքներում: Հիդրոկորտիզոնի ներարկումը (2,5—5 մգ 100 գ կենդանի քաշին) էմբրիոնալ զարգացման ընթացքում չի առաջացնում խիստ տեղաշարժ ՖՊՖ-ազայի ակտիվության մեջ, այն դեպքում, երբ պոստնատալ շրջանում այն ակտիվացնում է մկանների ՖՊՖ-ազան՝ ընկճելով ուղեղի և լյարդի ֆերմենտները:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Парсаданян Г. К. Укр. биохим. журн., 36, 821, 1964.
2. Парсаданян Г. К. Изв. АН Арм. ССР (биол. науки), 17, 12, 85, 1964.
3. Тер-Татевосян Л. П., Парсаданян Г. К., Адунц Г. Т. и Асланян И. Г. Биологический журнал Армении, 28, 11, 1975.
4. Abe M., Tsulki S. Blochim Biophys Acta, 350, 383, 1974.
5. Barnes L. D. and Hul U. S. F. Endocrinology, 96, 119, 1975.
6. Feinstein R. N. and Folk M. E. J. Biol. Chem., 177, 339, 1949.
7. Fiske C., Subbarow J. J. Biol. Chem., 66, 375, 1925.
8. Katzenellenbogen B. S. and Gorski J. J. Biol. Chem., 247, 1299, 1972.
9. Liu A. Y.—C. and Greengard P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3869, 1974.
10. Maeno H., Greengard P. J. Biol. Chem., 247, 3269, 1972.
11. Najjar V. A. and Constantopoulos A. Mol. Cell. Biochem., 2, 87, 1973.
12. Nakat C., Thomas J. A. J. Biol. Chem., 249, 6459, 1974.
13. Saderling T. R., Corbin J. D., Park C. R. J. Biol. Chem., 248, 1822, 1973.
14. Taborsky G. „Phosphoproteins“, in Adv. Prot. Chem., AP, p. 1, 1974.
15. Vokaer A. and Jacobelli S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4482, 1974.