ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ: ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXX, № 12, 1977 г.

УДК 577.15.02

Г. К. ПАРСАДАНЯН, П. ГЕРГЕЙ, Г. БОТ

ОБ УЧАСТИИ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА В РЕГУЛЯЦИИ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ФОСФАТАЗЫ ФОСФОРИЛАЗЫ И КИНАЗЫ ФОСФОРИЛАЗЫ

Выявлен механизм действия фосфо- и дефосфоформы термостабильного белкового ингибитора на фосфатазу фосфорилазы в присутствии различных субстратов-фосфопротеинов. Установлена также роль этого белка как модулятора киназы фосфорилазы, выделенной из мышц кролика.

Гликоген и липиды являются соединениями, запасающими энергию в тканях высших животных, и их мобилизация представляет важный физиологический процесс. Исследование регуляции этого процесса на гормональном и ферментативном уровнях выявляет сложную и тонкую систему модуляции активности вовлеченных в него ферментов посредством их фосфорилирования и дефосфорилирования. Очевидная важность этого механизма, раскрывающего последовательность молекулярных событий, начиная с взаимодействия гормон-клетка и кончая активацией физиологических процессов, обусловливает интенсивное исследование реакций фосфорилирования и дефосфорилирования. В последнее время выявлено важное значение регуляторных субъединиц в реализации деятельности ряда ферментов, участвующих в этих процессах [1, 2]. Имеются, в частности, сведения о том, что фосфатаза фосфорилазы А в нативном виде представлена в виде белкового комплекса фермент-ингибитор [3].

Эти начальные, но многообещающие сведения побудили нас к изучению механизма действия и природы регуляторного белка—ингибитора фосфатазы.

Материал и методика. Белковый термостабильный ингибитор фосфатазы фосфорилазы выделен по методу Брантда и др. [4]. Концентрация препарата составляла 0,5 мг белка/мл.

Препарат фосфорилазы получен методом Фишера и Кребса [5], он содержал 20—25 мг белка/мл, или 1000—1300 Е/мл.

Киназа фосфорилазы выделена методом, предложенным Кохеном [6]. Очищенный препарат ее содержал 8—10 мг белка/мл. Фосфатазу фосфорилазы очищали по Брандту и др. [4], активированный препарат ее содержал 5,5 мг белка/мл. Все перечисленные препараты выделены из скелетных мышц кролика.

В качестве субстратов для фосфатазы фосфорилазы использовали мышечную фосфорилазу А, казеин (фирмы «Реанал») и фосвитин (Калбиохем). Содержание неорганического ортофосфата в среде определяли по Таусски и Шору [7], ак-

тивность фосфорилазы—методом Кори [8], фосфатазную активность—по Келлеру и Кори [9], если субстратом служила фосфорилаза А или фосвитин, или по Файнштейну и Фольку [10], если в качестве субстрата использовался казеин. Содержание белка определяли методом Лоури и др. [11].

Объем и состав инкубационной смеси варьировали в различных сериях опытов в зависимости от поставленных задач. При исследовании влияния белкового ингибитора на фосфопротеинфосфатазную активность в присутствии различных субстратов применялась реакционная смесь: для фосвитина (общий объем—0,55 мл)—825 мкг фосфатазы, 55 мкг ингибитора, 2 мг фосвитина, на трис (40 мМ)—ЭДТА (2 мМ)——МЭ (10 мМ) буфере, pH 6,8; для казеина (общий объем—0,55 мл)—825 мкг фосфатазы, 55 мкг ингибитора, 3 мг казеина на 0,2 М боратном буфере, pH 6.2. В обоих случаях реакцию останавливали 0,2 мл 30% ТХУК. Для фосфорилазы А—550 мкг фосфорилазы, 550 мкг фосфатазы, 55 мкг ингибитора; объем смеси доводили до 0,3 мл трис-ЭДТА-МЭ буфером (см. выше). Реакцию останавливали 2,7 мл стоп-буфера (100 мМ NaF—80 мМ β-глицерофосфат натрия—4 мМ ЭДТА, pH 6,8).

Для изучения влияния белкового ингибитора на активность киназы фосфорилазы применяли реакционную смесь следующего состава: 1 мг фосфорилазы Б, 25 мкг ингибитора, 1 мкг киназы, 3 мкмоля Mg $(CH_3COO)_2$ и 1 мкмоль АТФ; объем смеси доводили до 0,3 мл трис (0,125 М)—β-глицерофосфат (0,125 М) буфером с pH 8,6. Реакцию останавливали 4,7 мл стоп-буфера.

При изучении зависимости активности киназы фосфорилазы от концентрации белкового ингибитора реакционная смесь содержала: 1 мг фосфорилазы Б, 2,5 мкг киназы, 3 мкмоля Mg $(CH_3COO)_2$, 1 мкмоль АТФ, ингибитор (45—185 мкг). Объем смеси доводили до 0,35 мл трис—глицерофосфатным буфером. Реакцию останавливали 4,65 мл стоп-буфера.

Исследование действия белкового ингибитора на активность киназы фосфорилазы в зависимости от ее концентрации проводилось в реакционной смеси (объем 0,3 мл) следующего состава: 1 мкг фофорилазы Б, 0,1 мл трис-глицерофосфатного буфера, 50 мкг ингибитора, 1—5 мкг киназы, 3 мкмоля Mg $(CH_3COO)_2$ и 1 мкмоль АТФ. Реакцию останавливали 4,7 мл стоп-буфера.

При изучении влияния добавок субстрата на скорость фосфорилирования фосфорилазы Б в присутствии белкового ингибитора использована реакционная смесь: 2 мкг киназы, фосфорилаза Б (1—2 мг), 75 мкг ингибитора, 3 мкмоля ацетата магния и 1 мкмоль АТФ. Объем смеси доводили до 0,35 мл трис-глицерофосфатным буфером. Реакцию останавливали 4,65 мл стоп-буфера.

Для разделения субъединиц киназы фосфорилазы препарат фермента предварительно подвергали термообработке (5 мин., 100°) в додецилсульфате аммония (0,2% р-р на 50 мМ глицерофосфат—2 мМ ЭДТА—2 мМ МЭ буфере, pH 6,8). Гельхроматография субъединиц киназы проведена на колонке с Сефадексом G-200 (1.5×40 см), уравновешенной 0,2% раствором додецилсульфата аммония (см. выше). Объем каждой фракции—3,5 мл.

Результаты и обсуждение. Блокирующее действие термостабильного белка Брандта-Ли на процесс ферментативного дефосфорилирования было испытано с применением различных субстратов-фосфопротеинов.

Как видно из рис. 1, этот белок блокировал реакцию дефосфорилирования фосфорилазы А, причем фосфоформа ингибитора действовала наиболее эффективно, снижая активность фосфатазы фосфорилазы в 3 раза. В то же время с другими фосфопротеинами—казеином и фосвитином—ингибирующего эффекта не наблюдалось. Небольшое увеличение неорганического фосфата в присутствии фосфоингибитора свидетельствует скорее всего о его собственном дефосфорилировании.

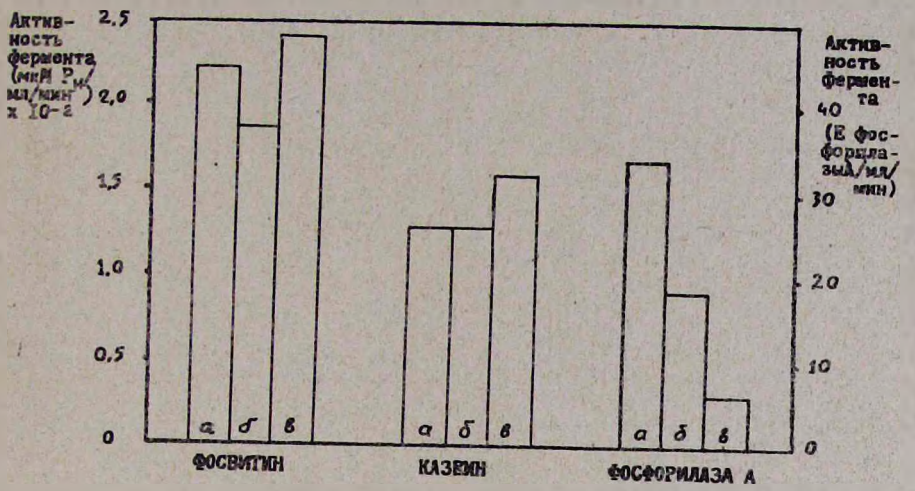

Рис. 1. Влияние белкового ингибитора на фосфопротеинфосфатазную активность в присутствии различных субстратов; *а*—реакционная смесь без ингибитора, *б*—с дефосфоингибитором, *в*—с фосфоингибитором.

Возник вопрос, не может ли этот регуляторный белок модулировать и обратную реакцию—фосфорилирование фосфорилазы Б соответствующей киназой. Данные, приведенные на рис. 2, свидетельствуют о том,

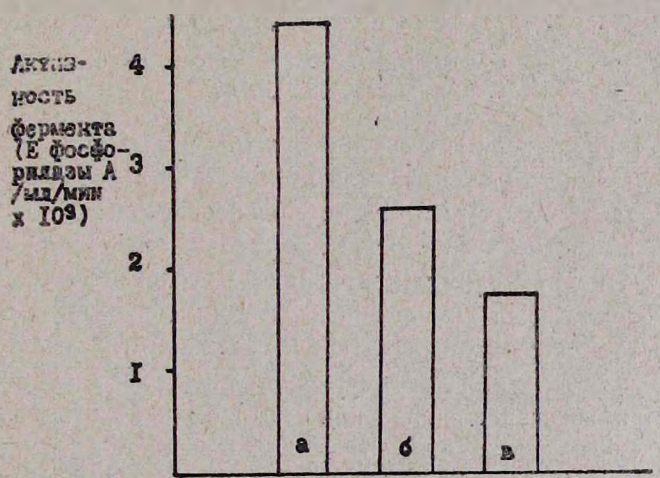

Рис. 2. Влияние белкового ингибитора на активность киназы фосфорилазы *а*, *б* и *в*, см. пояснения к рис. 1.

что эта реакция также ингибируется в присутствии белка Брандта-Ли, причем, как и в предыдущем случае, фосфоформа ингибитора действует эффективнее, вызывая более чем двукратное ингибирование.

Рис. 3 и 4 иллюстрируют некоторые кинетические характеристики фосфорилаза-киназной реакции в присутствии белкового ингибитора. При возрастании содержания ингибитора вплоть до 0,5 мг на 1 мл

пнкубационной смеси сохраняется линейная зависимость ингибирования от концентрации белка Брандта-Ли (рис. 3).

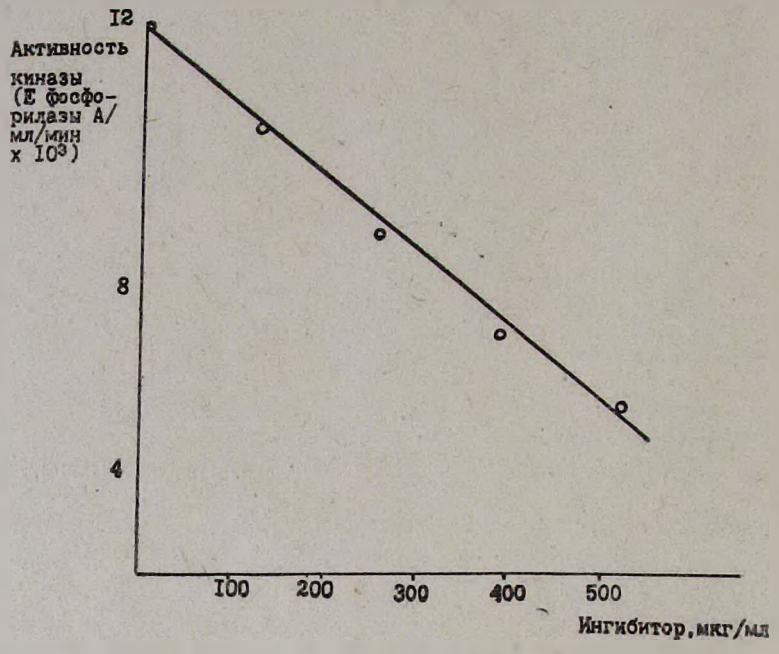

Рис. 3. Зависимость фосфорилаза-киназной активности от концентрации белкового ингибитора

Картина образования фосфорилазы А в зависимости от концентрации соответствующей киназы в присутствии и без белкового ингибитора представлена на рис. 4. Повышение содержания киназы в инкубационой смеси оказывается малоэффективным и в концентрации более 5 мг/мл не приводит к дальнейшему ускорению фосфорилирования фосфорилазы Б. Приведенные факты подтверждают предположение, что термостабильный ингибитор соединяется скорее с субстратом, а не с ферментом. Поэтому и повышение концентрации фермента не приводит к восстановлению или хотя бы к некоторому увеличению скорости ферментативного фосфорилирования.

Наконец, было установлено, что образование фосфорилазы А резко возрастает после добавления к предынкубированной с ингибитором реакционной смеси дополнительной порции фосфорилазы Б (рис. 5).

Если бы протеин-ингибитор блокировал киназу, а не субстрат (фосфорилазу Б), добавление последнего вряд ли привело бы к увеличению выхода конечного продукта—фосфорилазы А.

Нами была предпринята также попытка выяснить природу термостабильного белка-ингибитора. В 1973 г. Кохен [6] установил, что после термообработки при 100° в присутствии додецилсульфата препа-

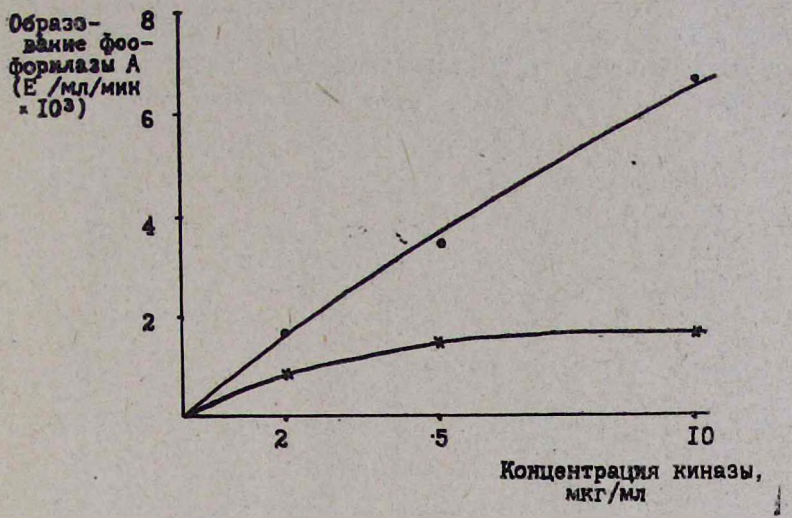

Рис. 4. Действие белкового ингибитора на активность киназы фосфорилазы в зависимости от ее концентрации

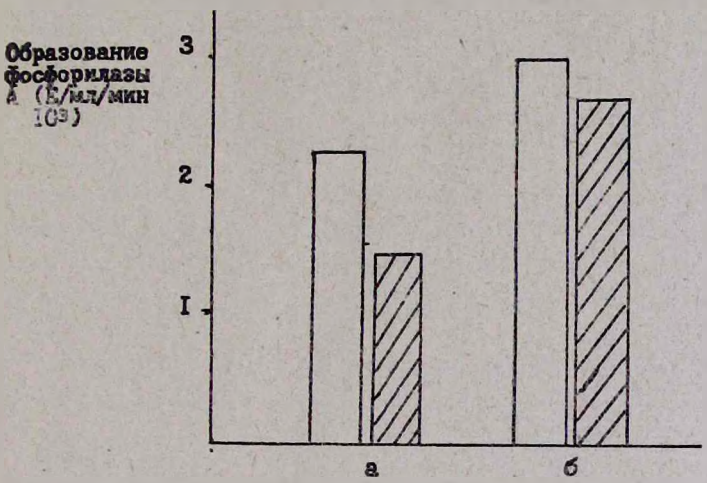

Рис. 5. Влияние добавления субстрата на скорость фосфорилирования фосфорилазы Б в присутствии белкового ингибитора. Реакционная смесь без ингибитора— □; с ингибитором— ▨. Общее количество фосфорилазы Б в реакционной смеси составляло 1 мг (а) или 2 мг (б).

рат киназы фосфорилазы, пропущенный через колонку с Сефадексом G-200, давал два-три белковых пика. Возникло предположение, что один из этих белков может оказаться тем самым термостабильным ингибитором фосфопротеинфосфатазы, который был выделен Брандтом и Ли [3]. На рис. 6 приведен элюционный профиль термообработанной в додецилсульфате киназы фосфорилазы. Белковые пики отмечены в 10, 18 и 24 фракциях. Первый пик действительно обладал определенным ингибирующим эффектом.

Основываясь на полученных данных и учитывая то обстоятельство, что при очистке как фосфатазы, так и киназы всегда остается со-

путствующая активность противоположно действующего фермента, можно предположить существование своеобразного нативного комплекса фосфатаза+киназа+регуляторная ингибиторная субъединица,

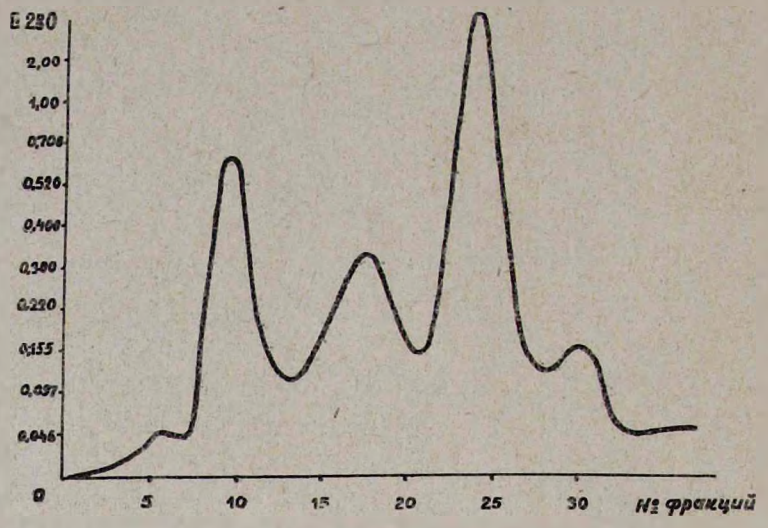

Рис. 6. Элюционный профиль субъединиц киназы фосфорилазы после гель-хроматографии на сефадексе G-200.

в котором регуляторный белок модифицирует ферментативную реакцию, блокируя при этом не сам фермент, а фосфо- или дефосфоформу субстратов—фосфопротеинов. Благодаря этому киназная или фосфатазная реакции в обычных условиях протекают не с максимальной скоростью.

В последующих исследованиях будет проверено действие ингибиторного белка и на другие фосфатазы для выяснения степени его специфичности.

Институт биохимии АН АрмССР,
Дебреценский медицинский университет,
Институт медицинской химии, Венгрия

Поступило 5.VII 1977 г

Հ. Կ. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ, Պ. ԳԵՐԳԵՅ, Գ. ԲՈՏ

ՋԵՐՄԱԿԱՅՈՒՆ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԱՅԻՆ ԻՆՀԻԲԻՏՈՐԻ ՄԱՍՆԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱՅԻ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ԵՎ ՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱՅԻ ԿԻՆԱԶԱՅԻ ԳՈՐԾՈՒՆԵՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՄԵՋ

Ա մ փ ո փ ո ւ մ

Բացահայտվել է թերմոստաբիլ սպիտակուցային ինհիբիտորի ֆոսֆո- և դեֆոսֆոձևերի ազդեցության մեխանիզմը ֆոսֆորիլազայի ֆոսֆատազա-

յի վրա տարբեր սուբստրատների՝ ֆոսֆոպրոտեիններիի ներկայությամբ: Բացահայտված է նաև, որ այդ սպիտակուցը հանդես է գալիս որպես մոդուլյատոր ճագարի մկաններից անջատված ֆոսֆորիլազայի կինազայի համար:

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rubin C. S., Rosen O. M.* Ann. Rev. Biochem., 44, 831, 1975.
2. *Killilea S. D., Brandt H., Lee E. Y. C.* Trends in Biochem., Sci., 1, 30, 1976.
3. *Brandt H., Killilea S. D., Lee E. Y. C.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 598, 1974.
4. *Brandt H., Lee E. Y. C., Killilea S. D.* Biochem. Biophys Res. Commun., 63, 950, 1975.
5. *Fisher E. H., Krebs E. G.* Methods in Enzymol., 5, 369, AP, N.—Y., London, 1962.
6. *Cohen P.* Eur. J. Biochem., 34, 1, 1973.
7. *Taussky H. H., Shorr E.* J. Biol. Chem., 202, 675, 1953.
8. *Cory G. T., Illingworth B., Keller P. J.* Methods in Enzymol., 1, 200, AP, N.—Y., 1955.
9. *Keller P. J., Cory G. T.* J. Biol. Chem., 214, 127, 1955.
10. *Feinstein R. N.* and *Folk M. E.* J. Biol. Chem., 177, 339, 1949.
11. *Lowry O. H., Kosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.