ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
XXXII, 12, 1979

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 574.6:577.152

К ВОПРОСУ О ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФОСФОПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ

Г. К. ПАРСАДАНЯН, Л. П. ТЕР-ТАТЕВОСЯН

Универсальный механизм регуляции каскада ферментативных реакций превращения углеводов и липидов путем фосфорилирования/дефосфорилирования соответствующих ферментных белков находится под контролем протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз (ФПФ-аз). Последние служат для ускорения анаболизма и подавления катаболизма. Известно, что сама фосфатаза является мишенью для действия инсулина и др. гормонов [14].

В последние годы пристальное внимание исследователей привлекают и вопросы оперативной внеклеточной модуляции активности ФПФ-азы [5, 8, 16]. Нами, в частности, было показано, что АТФ является мощным активатором ФПФ-азы сердечной мышцы ряда животных [1]. Обнаружен также термостабильный белковый ингибитор ФПФ-азы, играющий важную роль в регуляции деятельности этого фермента [4, 6, 9, 10, 12]. Наличие такого ингибитора впервые показано Брандтом и др. [4] при очистке фосфатазы фосфорилазы из печени кролика. Те же авторы обнаружили этот фермент в скелетной мышце и сердце. Нами было установлено, что регуляторный белок из скелетной мышцы способен фосфорилироваться, что приводит к повышению его ингибиторных свойств [21]. Установлен молекулярный вес этого белка и выделен ^{32}P-меченый пептид необычного аминокислотного состава, в котором фосфат соединен не с серином, а с треонином [19].

В связи с этим возникла необходимость дальнейшего изучения роли и механизма действия некоторых внутриклеточных компонентов в управлении ФПФ-азной активностью.

Материал и методика. В качестве источника ФПФ-азной активности использовалась сердечная мышца белых крыс массой 120—150 г. Ткань быстро промывали на холоде 0,2 М боратным буфером (pH 6,2), после чего гомогенизировали в том же буфере в течение 3 мин. Гомогенат ткани центрифугировали в течение 20 мин при 10 000 g и осадок отбрасывали. Активность ФПФ-азы в этих экстрактах определяли по методу Файнштейна и Фолька в модификации, описанной нами ранее [1]. Количество отщепившегося от казеина $P_н$ определяли по Таусски и Шору [20] или Тараян и сотр. [3] и выражали в мкг на 1 г ткани в 1 час.

Изофокусировку частично очищенных препаратов фермента [7] осуществляли на 110-миллилитровой колонке ЛКБ модели 8101 в градиенте сахарозы при 2°, в среде,

содержащей амфолины (1%). Разделение нанесенных 20—30 мг белка длилось 26—28 ч при конечном напряжении 400 в и силе тока 0,3 мА.

Результаты и обсуждение. Ранее уже было показано, что АТФ является не только активатором, но и протектором ФПФ-азы [1]. Оказалось, что предынкубация препаратов ФПФ-азы с АТФ в значительной степени предотвращала термоинактивацию фермента.

Как известно, термоденатурация ферментного белка является следствием сочетанного воздействия таких факторов, как белок-белковые взаимодействия, деструкция функциональных групп, развертывание пептидных цепей и т. д. При этом в той или иной мере затрагивается конфигурация каталитического и (или) аллостерического центров фермента. Изучив эффект АТФ на *предварительно* термоденатурированном препарате фермента, можно было в известной мере расшифровать характер изменений в активности ФПФ-азы при ее термообработке.

Как было установлено, после 5-минутной инкубации тканевого экстракта при 50° наблюдается четырехкратное падение активности ФПФ-азы сердечной мышцы крыс (с $2\pm0{,}01$ до $0{,}5\pm0{,}08$ мкг $P_н$/мг белка/час). Активирующий эффект АТФ (3 мМ) не только сохраняется, но и значительно усиливается (в 2,3 раза) при инкубации его с термоинактивированным препаратом фермента. Можно поэтому предположить, что термоденатурация затрагивает скорее область каталитического центра, тогда как аллостерический центр регуляции (через который реализуется взаимодействие с АТФ) остается практически незатронутым.

Поскольку имеющиеся литературные сведения не содержали информации о возможном влиянии аминокислот на активность ФПФ-азы, нами было изучено также воздействие целого ряда природных аминокислот и их некоторых дериватов, взятых в физиологических и субфизиологических концентрациях, на активность ФПФ-азы сердечной мышцы. Оказалось, что глутаминовая, аспарагиновая кислоты, n-ацетиласпарагиновая кислота, ГАМК, фенилаланин, аргинин, триптофан, лизин, гистидин, аланин, метионин, валин, аланин и лейцин в концентрациях 10^{-2} — 10^{-4} М не влияют или почти не влияют на деятельность ФПФ-азы.

Особый интерес представляет регуляция ферментов, происходящая на уровне белок-белковых взаимодействий. В последние годы обнаружено существование белковых ингибиторов или регуляторных субъединиц, осуществляющих контроль над уровнем активности как протеинкиназ [15, 17], так и протеинфосфатаз [2, 4, 6, 9, 10, 12, 21]. В то же время установлено, что эффект этих термостабильных ингибиторов избирателен в отношении субстратов. Так, ингибирующий белок из мышцы кроликов тормозит реакцию дефосфорилирования фосфорилазы А, но не фосфорилированных гистонов или протаминов [18]. Нами также было показано, что белковый ингибитор, получаемый по Брандту и др. [4], эффективен при использовании фосфорилазы А в качестве субстрата, но не тормозит реакцию дефосфорилирования фосвитина и казеина [2].

Таблица

Некоторые свойства белковых ингибиторов ФПФ-азы сердечной мышцы белых крыс

Изоэлектрическая точка		Ингибитор I	Ингибитор II
		pI. 5,5—5,8	pI. 6,5—6,7
Подавление ФПФ-азной активности	до термообработки, %	на 60	на 92
	после термообработки, %	на 9	на 90

В настоящей работе нами предпринята попытка дальнейшей очистки и уточнения некоторых параметров белковых ингибиторов ФПФ-азы. Как видно из данных таблицы, изофокусировка белков позволила выявить два белковых ингибитора ФПФ-азы с изоэлектрическими точками в диапазоне pH 5,5—5,8 и 6,5—6,7 соответственно. Первый из этих ингибиторов резко отличался от описанных в литературе гермостабильных ингибиторов ФПФ-азы, поскольку после термообработки (5 мин, 95°) почти полностью утрачивал свою активность. До термообработки же этот белок был способен подавлять активность фермента на 60%. Ингибитор II термостабилен и более эффективен: до термообработки фракции, содержащей этот белок, он ингибировал ФПФ-азу на 92%, этот эффект сохранялся и после соответствующей температурной обработки.

Таким образом, впервые обнаружен термолабильный ингибитор ФПФ-азы. В свете последних сообщений о существовании множественных форм белковых ингибиторов [10, 11], а также белковых деингибиторов и активаторов [7, 13] ФПФ-азы возрастает интерес к изучению такой формы оперативной внутриклеточной регуляции метаболических процессов, как белок-белковые взаимодействия.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 13.VI 1979 г.

ՖՈՍՖՈՊՐՈՏԵԻՆ ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻ ՆԵՐԲՋՋԱՅԻՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐՄԱՆ ՈՐՈՇ ՀԱՐՑԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Հ. Կ. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ, Լ. Պ. ՏԵՐ-ԹԱԴԵՎՈՍՅԱՆ

Հետազոտվել է ԱՏՖ-ի, ամինաթթուների և սպիտակուցային արգելակիչների մասնակցությունը սպիտակ առնետների սրտամկանի ֆոսֆոպրոտեին ֆոսֆատազայի (ՖՊՖ-ազայի) ակտիվության կարգավորման մեջ։

Հաստատվել է, որ ԱՏՖ-ի խթանող ազդեցությունը պահպանվում է նաև նշված ֆերմենտի մասնակի թերմոակտիվազրկումից հետո։

Իզոֆոկուսացման եղանակով հայտնաբերվել են ՖՊՖ-ազայի երկու սպիտակուցային արգելակիչներ և պարզաբանվել է նրանց որոշ ֆիզիկա-քիմիական բնութագրերը։ ՖՊՖ-ազայի ակտիվության վրա ուսումնասիրված ամինաթթուների էական ազդեցություն չի նկատվել։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Парсаданян Г. К., Асланян И. Г., Тер-Татевосян Л. П.* Укр. биохим. журн., *49*, 3, 23, 1977.
2. *Парсаданян Г. К., Гергей П., Бот Г.* Биолог. ж. Армении, *30*, 12, 63, 1977.
3. *Тараян В. М., Мирзоян Ф. В., Карапетян З. А.* ДАН АрмССР, *63*, 3, 168, 1976.
4. *Brandt H., Lee E. Y. C. and Killilea S. D.* Biochem. Biophys. Res. Commum., *63*, 950, 1975.
5. *Cohen P.* Trends Biochem. Sci., *1*, 38, 1976.
6. *Cohen P., Nimmo G. A. and Antoniw J. F.* Biochem. J., *162*, 435, 1977.
7. *Defrein G., Goris J. and Merlevede W.* 11 FEBS Meeting Abstr., A 1—9, 102, Copenhagen, 1977.
8. *Gilbo D. P., Nutall F. Q.* Biochem. Biophys. Acta, *338*, 57, 1974.
9. *Huang F. L. and Glinsmann W.N.* FEBS Lett., *62*, 326, 1976.
10. *Huang F. L. and Glinsmann W. H.* Eur. J. Biochem., *70*, 419, 1976.
11. *Huang F. L., Tao S., Glinsmann W. H.* Biochem. Biophys. Res. Commun., *78*, 615, 1977.
12. *Khandelwall R. L. and Zinman S. M.* J. Biol. Chem., *253*, 560, 1978.
13. *Khandelwal R. L. and Zinman S. M.* Biochem. Biophys. Res. Commum., *82*, 1340, 1978.
14. *Killilea S. D., Brandt H. and Lee E. Y. C.* Trends in Biochem. Sci., *1*, 30, 1976.
15. *Kwast-Welfeld J., Kaniuga Z.* Int. J. Biochem., *9*, 5, 331, 1978.
16. *Lee E. Y. C., Brandt H. and Capulong Z. L.* Adv. Enzywol. Regul., *14*, 467, 1975.
17. *Mangeat P., Chahinian H. and Marchis-Mouren G.* Biochimie, *60*, 566, 1978.
18. *Nakai C. and Glinsmann W. H.* Mol. Cell. Biochem., *15*, 133, 1977.
19. *Ryllat D. B., Nimmo G. A. and Cohen P.* 11 FEBS Meeting Abstr., A 1—4 002, Copenhagen, 1977.
20. *Taussky H. H., Shorr E.* J. Biol. Chem., *202*, 675, 1953.
21. *Tóth G., Gergely P., Parsadanian H. K. and Bot G.* Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung., *12*, 4, 389, 1977.