

НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННЫХ I- И D-ФОРМ ГЛИКОГЕНСИНТЕТАЗЫ МОЗГА КРЫС

Ц. М. СУДЖЯН

Из мозга крыс выделены и частично очищены I- и D-формы гликогенсинтетазы. Изучение их кинетических свойств показало, что K_m для УДФ глюкозы I-формы гликогенсинтетазы мозга снижается в присутствии глюкозо-6-фосфата. D-форма фермента активна только в присутствии относительно высокой его концентрации.

Лелуар и соавт. [6—8] показали, что основным ферментом, регулирующим биосинтез гликогена, является гликогенсинтетаза (ГС). В мозговой и других тканях этот фермент присутствует в зависимой (D) и не зависимой (I) от глюкозо-6-фосфата молекулярных формах. В наших предыдущих исследованиях [1] было показано, что изменение функциональной активности высших отделов ЦНС как под воздействием естественных физиологических раздражителей, так и психотропных веществ оказывает влияние на активность I- и D-форм ГС в мозговой ткани.

Кинетические свойства ГС мозга были изучены при выделении фермента на уровне гомогената [3, 10]. Однако I- и D-формы фермента не были выделены отдельно. В настоящем исследовании нами выделены, частично очищены I- и D-формы ГС мозга крыс и изучены их кинетические свойства.

Материал и методика. Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Выделение и очистку I- и D-форм ГС (УДФГ: гликоген- α -4-глюкозил трансфераза, КФ 2. 4.1.11) проводили по методу Пассонье и Шварца [11] в нашей модификации, заключающейся в том, что при выделении I- и D-форм фермента крыс замораживали в жидком азоте; гомогенизацию ткани проводили в четырехкратном объеме 25 мМ триса, рН 7,5, содержащего 1 мМ ЭДТА, вместо 5 мМ дитиотрептола добавляли 5 мМ 2-меркаптоэтанола (трис-МЭ-ЭДТА). Все процедуры проводили при 0—4°.

При выделении I-формы гомогенат центрифугировали при 8000 g. К надосадочной жидкости добавляли сульфат аммония до концентрации 2 М, поддерживая рН 7,5 гидроокисью аммония. Через 30 мин центрифугировали. Осадок диализовали в течение 24 час. против трис-МЭ-ЭДТА буфера, затем диализат центрифугировали для удаления денатурированного белка. В дальнейшем добавляли кальций фосфатный гель, приготовленный по Кайлину и Хартри [4], в котором отношение концентрации белка в растворе к твердому гелю составляло 1:0,25. Гель осаждали центрифугированием и промывали тем же буфером в объеме, равном объему диализуемой жидкости. Фермент с геля элюировали 0,2 М фосфатным буфером, рН 7,5, дважды, объемом, эквивалентным объему диализата до обработки гелем. Затем солубилизованный

фермент концентрировали осаждением 1 М сульфатом аммония и нейтрализовали описанным выше методом. Осадок диализовали против 100 объемов трис-МЭ-ЭДТА в течение ночи. Диализованный раствор наносили на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой (ДЕ-32 фирмы Whatman, Англия), размерами 1,3×6,0 см, предварительно уравновешенную трис-МЭ-ЭДТА буфером. Эфлюент собирали по 3,3 мл с помощью коллектора с охлаждающей системой марки Mifem (Венгрия), измеряли во фракциях оптическую плотность при 280 нм и определяли активность ГС. Наибольшая активность фермента отмечалась во фракциях 36—40. Эти фракции собирали и концентрировали вакуумным диализом.

Выделение и очистку D-формы ГС проводили вышеописанным способом с некоторыми добавлениями. Мозг крыс гомогенизировали в 4-х объемах трис-МЭ-ЭДТА, содержащего 20 мМ KF, и центрифугировали при 8000 g. К надосадочной жидкости добавляли равное ей количество 50 мМ N-трис (гидроксиметил) метил-2-аминоэтан сульфоновой кислоты (ТЭС) буфера, pH 7,0, содержащего 50 мМ KF, 20 мМ MgCl₂, 0,6 мМ этилен гликол-бис (β-аминоэтиловый эфир) N,N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТК), 20 мМ теофиллина, 20 мМ АТФ и 20 мкмоль циклического 3',5'-АМФ. На этом этапе I-форма ГС в присутствии протеникиназы в гомогенате [12] переходит в D-форму. Температуру полученной смеси доводили до 30° и инкубировали в течение 20 мин. Добавляли твердый сульфат аммония до концентрации 2 М, приводили к pH 7,5 с помощью гидроксида аммония и осадок собирали. Солюбилизацию кальций фосфатным гелем и второе сульфат аммонийное осаждение проводили так же, как и для I-формы, но в присутствии 20 мМ KF. После диализа, когда некоторая часть активности ГС была вновь обращена в I-форму, диализованную фракцию снова инкубировали с описанным выше ТЭС реагентом. ДЕ-32 колоночную хроматографию проводили так же, как и для I-формы фермента.

Активность ГС определяли измерением количества УДФ, образующегося из УДФ-глюкозы (УДФ) в присутствии гликогена; содержащее УДФ-примененем пируваткиназы (ПК), катализирующей перенос фосфата из фосфоэнолпирувата (ФЭП) на УДФ с образованием УТФ и пирувата. Количество освободившегося пирувата эквивалентно содержанию УДФ [9]. Для определения активности ГС в присутствии глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф) брали 0,03 мл смеси, содержащей равные количества 0,75 М глицинового буфера с 0,025 М ЭДТА (pH 8,5), 0,05 М Г-6-Ф и 40 мг/мл гликогена, добавляли 0,005 мл 0,03 М цистина, 0,005 мл фермента, 0,01 мл УДФГ (в 1 мл 25×10⁻⁷ М). Различные концентрации УДФГ и Г-6-Ф, используемые при изучении кинетических свойств I- и D-форм ГС, приведены в соответствующих опытах. При определении активности ГС в отсутствие Г-6-Ф вместо него добавляли глициновый буфер. Смесь инкубировали 10 мин при 37°, кипятили 2 мин при 100°. Затем добавляли по 0,025 мл 0,01 М ФЭК и ПК (0,1 г в 20 мл). Содержимое пробирок инкубировали 15 мин при 37°, добавляли 0,15 мл 0,1%-ного динитрофенилгидразина, через 5 мин прибавляли 0,2 мл 10 и NaOH и 2,2 мл этанола. Оптическую плотность измеряли при 520 нм в кювете 1 см. Г-6-Ф, УДФ и ФЭП—фирмы Sigma, ПК—фирмы Reanal.

Результаты и обсуждение. Процедура очистки I-формы ГС позволила повысить ее удельную активность примерно в 100 раз. Выход составлял 23%. В течение очистки доля I-формы ГС повышается от 72 до 94%. Удельная активность ее достигает 170,8 мкмоль УДФ/мг белка/мин. Типичная схема очистки D-формы ГС мозга представлена в табл. 1.

Доля D-формы фермента с 8% на первом этапе повышается и достигает 96% на этапе первого перехода I в D (активность фермента при этом измеряли в присутствии и в отсутствие Г-6-Ф). На последующих этапах процент D-формы был понижен несмотря на присутствие KF, подавляющего фосфатазную активность. Доля D-формы ГС достигает

Таблица 1

Очистка D-формы ГС мозга крыс

Фракции	Объем фракции,	Белок, мг/мл	Общая актив- ность, мкмоль УДФ/мл/мин	Удельная актив- ность, мкмоль УДФ/мг/мин	Выход %	% D	Степень очистки
	мл						
Гомогенат	84,0	20,16	2743,40	1,62	100	8	1
Первый I D переход	98,0	1,83	1226,96	6,84	44	96	4,1
2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ осадение	6,0	17,40	745,20	7,14	27	81	4,4
Элюат с кальций фосфатного геля	25,5	2,88	671,99	9,12	24	79	5,6
1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ осадение	1,4	11,94	482,0	28,80	17	72	17,8
Второй I D переход	2,8	5,70	480,0	30,0	17	97	18,5
DE-32 колонка концентрированная	0,9	3,20	445,60	154,70	16	97	95,5

97% при повторной инкубации со смесью, необходимой для перехода I- в D-форму. Этот процент сохраняется и на этапе колоночной хроматографии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используемый метод выделения и очистки I- и D-форм ГС приемлем для тканей с низкой ферментативной активностью, в частности для мозга.

Согласно данным литературы, инкубация очищенной ГС с гликогеном приводит к активации фермента [11, 13]. Результаты опытов, полученные нами при изучении влияния инкубации с гликогеном на активность I-формы ГС, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Активность I-формы ГС мозга при преинкубации с гликогеном и без него

Фракции	Активность I-формы ГС, мкмоль УДФ мл/мин		Отношение с гликогеном/без
	без гликогена	с гликогеном	
Гомогенат	38,80	43,30	1,18
2 M (NH ₄) SO ₄ осадок	231,61	357,41	1,50
Элюат с кальций фосфатного геля	134,56	457,50	3,40
1 M (NH ₄) SO ₄ осадок	1624,70	3736,80	2,80

Время преинкубации фермента с гликогеном—15 мин при 37°.

Из приведенных данных видно, что преинкубация фермента с гликогеном повышает его активность во всех исследуемых фракциях. Она повышается в 3,5 раза на этапе элюата с кальций фосфатного геля. Исходя из полученных данных в последующем мы изучали влияние различных сроков инкубации фермента с гликогеном на активность очищенных I- и D-форм ГС.

Из табл. 3 следует, что активность как D-, так и, особенно, I-формы ГС возрастает при инкубации фермента с гликогенной «затравкой».

Время преинкубации, мин	D-форма ГС	I-форма ГС
	ммоль УДФ/мл/мин	
0	152,42	163,81
15	223,55	457,52
30	294,22	564,91
60	364,35	645,88
90	386,24	724,92
90 б/гликогена	183,42	151,28

Наряду с этим, было также показано [11], что присутствие гликогенной «затравки» существенно не влияет ни на максимальную скорость активности I- и D-форм ГС, выделенной из мозга свиньи, ни на сродство к УДФГ. По-видимому, концентрация гликогена в этих опытах была не очень существенной, так как I-форма мозговой ГС, очевидно, связана с гликогеном в нативном состоянии [10], и ее активность не зависит от гликогенной «затравки».

В дальнейшем мы изучали кинетические свойства I-формы ГС K_M для УДФГ определяли по Лайнуиверу-Берку в отсутствие и в присутствии Г-6-Ф (рис. 1). Очевидно, в отсутствие Г-6-Ф K_M равна 0,166 мМ,

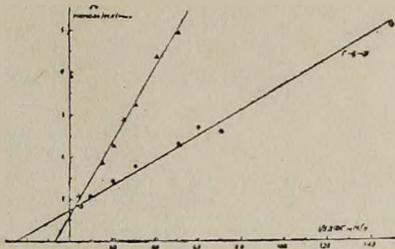


Рис. 1.

Рис. 1. Активность I-формы ГС из мозга крысы как функция концентрации УДФГ. Концентрация Г-6-Ф—5 мМ.

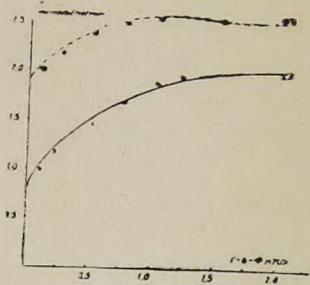


Рис. 2.

Рис. 2. Активность I-формы ГС мозга при двух концентрациях УДФГ [1) 0,5 мМ; 2) 5 мМ] и различных концентрациях Г-6-Ф.

а V_{\max} —2,0 мкмоль/мл/мин. В присутствии 5 мМ Г-6-Ф достигает 0,04 мМ, а V_{\max} —1,33 мкмоль/мл/мин. Таким образом, в присутствии Г-6-Ф K_M для УДФГ I-формы ГС понижается в 4 раза. Полученные нами данные позволяют сделать следующее сравнение: концентрация УДФГ в мозге, составляя 60—70 мкмоль/кг [3], приблизительно в 5 раз ниже, чем в печени (350 мкмоль/кг) [5]. Наряду с этим, K_M для УДФГ I-формы ГС в отсутствие Г-6-Ф, по нашим данным, составляя 0,17 мМ, также около 5 раз в мозге ниже, чем в печени [2]. Как видно из рис. 2, активность I-формы ГС при концентрации УДФГ 0,5 мМ при увеличе-

нии Г-6-Ф до 2 мМ/л повышается от 0,8 до 2 мкмоль/мл/мин, а при концентрации 5 мМ и том же содержании Г-6-Ф с 1,9 до 2,6 мкмоль/мл/мин. Из полученных нами данных следует, что при меньшей концентрации УДФГ с увеличением содержания Г-6-Ф активность фермента возрастает в большей степени (в 2,5 раза), чем при концентрации, близкой к насыщающей, когда она возрастает лишь в 1,3 раза.

В опытах по изучению кинетики D-формы ГС мозга (рис. 3) нами выявлено, что при концентрации Г-6-Ф 0,75 мМ K_M для УДФГ состав-

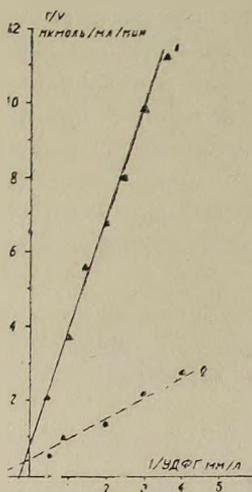


Рис. 3.

Рис. 3. Активность D-формы ГС из мозга крыс как функция концентрации УДФГ при двух концентрациях Г-6-Ф [1) 0,75 мМ; 2) 3 мМ].

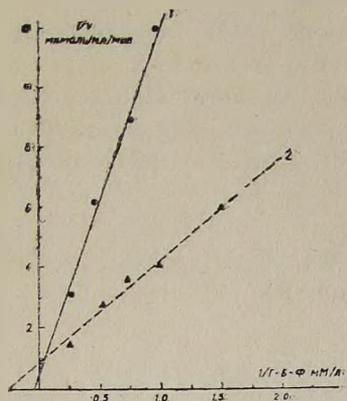


Рис. 4.

Рис. 4. Активность D-формы ГС мозга при двух концентрациях УДФГ [1) 0,5 мМ; 2) 5 мМ] как функция концентрации Г-6-Ф.

ляет 5,0 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 1,2 мкмоль/мл/мин. Когда она повышается до 3 мМ, K_M для УДФГ понижается в 5 раз, составляя 1,0 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 2,25 мкмоль/мл/мин. В отличие от I-формы ГС D-форма в отсутствие Г-6-Ф полностью неактивна, поэтому можно использовать метод Лайпунвера-Берка ($1/V$ график против $1/\text{Г-6-Ф}$) при определении активности D-формы ГС как функции концентрации Г-6-Ф при 2-х концентрациях УДФГ (рис. 4), K_M для Г-6-Ф при 0,5 мМ УДФГ составляет 25 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 1,4 мкмоль/мл/мин. При более высоком уровне УДФГ (5 мМ) она понижается и составляет 5,5 мМ, а $V_{\text{макс}}$ — 1,25 мкмоль/мл/мин. Исходя из этих данных можно заключить, что D-форма ГС активна только в присутствии относительно высокой концентрации Г-6-Ф.

Ереванский медицинский институт
лаборатория биосинтетических реакций мозга

Поступило 16.II 1979 г.

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՈՒՂԵՂԻ ԳԼԻԿՈԳԵՆ ՍԻՆԹԵՏԱԶԱՅԻՆ ՄԱՍՆԱԿԻ
ՄԱՔՐՎԱԾ I- ԵՎ D-ՉԵՎԵՐԻ ՈՐՈՇ ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Յ. Մ. ՍՈՒՋՅԱՆ

Առնետները ուղեղից առանձնացվել և մաքրման են ենթարկվել զլիկոգեն սինթետազայի I և D-ձևերը: Մաքրման հետևանքով զլիկոգեն սինթետազայի I և D-ձևերի տեսակարար ակտիվությունները համապատասխանաբար հասնում են 170,8 և 154,7 մմկմոլմգ սպիտակուցի/րոպեի: Կինետիկական հատկությունների ուսումնասիրությունը ցույց է տվել, որ զլիկոգենսինթետազայի I-ձևը K_M ՈՒԴՖԳ համար գլուկոզո-6-ֆոսֆատի առկայությամբ իջնում է: Ընդ որում, ՈՒԴՖԳ ավելի փոքր կոնցենտրացիայի ժամանակ զլիկոգեն սինթետազայի I-ձևի ակտիվությունը գլուկոզո-6-ֆոսֆատի կոնցենտրացիայի մեծանալու հետ միասին աճում է ավելի մեծ աստիճանով, քան երբ ՈՒԴՖԳ կոնցենտրացիան մոտենում է հագեցման:

Գլիկոգենի զլիկոգեն սինթետազայի D-ձևը ակտիվ է գլուկոզո-6-ֆոսֆատի համեմատաբար բարձր կոնցենտրացիայի ժամանակ:

SOME CHARACTERISTICS OF PARTIALLY PURIFICATED
I-AND D-FORMS OF RAT BRAIN GLYCOGEN SYNTHETASE

Ts. M. SUDJAN

Glycogen synthetase I and D-forms of rat brain have been isolated and purified. The study of their kinetic properties has shown that K_M of the I-form of glycogen synthetase for UDPG decreases in the presence of glucose-6-phosphate. D-form is active only at a relatively high concentrations of glucose-6-phosphate.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хачатрян Г. С., Суджян И. М. *Вопр. мед. химии*, 19, 5, 539, 1973.
2. Bishop J. S., Lerner J. J. *Biol. Chem.*, 242, 1354, 1967.
3. Goldberg N. D., O'Tbole A. G. *J. Biol. Chem.*, 244, 11, 3053, 1969.
4. Kellin D., Hartree E. F. *Proc. Roy. Soc.*, 124, 397, 1938.
5. Kreutner W., Goldberg N. D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 58, 1515, 1967.
6. Leloir L. F., Cardini C. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 6340, 1957.
7. Leloir L. F., Olavarria J. M., Goldemberg S. H. *et al. Arch. Biochem.*, 81, 508, 1958.
8. Leloir L. F. *J. Biol. Chem.*, 235, 919, 1960.
9. Leloir L. F., Goldemberg S. *Meth. in enzymol.*, 5, 145, 1962.
10. Passonneau J. V., Brunner E. A. *et al. J. Neurochem.*, 18, 2317, 1971.
11. Passonneau J., Scawartz J. *The J. of Biol. Chem.*, 250, 6, 2287, 1975.
12. Rottenberg D. A., Passonneau J. V., Lust W. D. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 48, 1192, 1972.
13. Thomas J. A., Lerner J. *Biochim. Biophys. Acta*, 293, 62, 1973.