

Н. Б. ЛИВАНОВА, Т. Б. ЕРОНИНА, Г. В. СИЛОНОВА

## ГИБРИДИЗАЦИЯ ФОСФОРИЛАЗ А И Б

(Представлено академиком А. И. Опариным 14 IV 1972)

Одним из путей регуляции активности мышечной гликогенфосфорилазы (КФ 2.4.1.1.) является энзиматическое взаимопревращение двух ее форм — фосфорилазы А, фосфорилированной формы, активной без адениловой кислоты, с молекулярным весом 400 000 <sup>(1)</sup>, и фосфорилазы Б, нефосфорилированной формы, неактивной в отсутствии АМФ \*, с молекулярным весом 200 000 <sup>(1)</sup>. Превращение фосфорилазы А в фосфорилазу Б катализируется ферментом фосфатазой фосфорилазы А (КФ 3.1.3.17) и состоит в отщеплении четырех фосфатных групп от молекулы фосфорилазы А. Обратная реакция превращения фосфорилазы Б в А катализируется ферментом киназой фосфорилазы Б (КФ. 2.7.1.38) и требует добавки АТФ и ионов магния <sup>(2, 3)</sup>. Фишер и сотрудники <sup>(4, 5)</sup>, исследуя ферментативные переходы фосфорилаза А  $\rightleftharpoons$  фосфорилаза Б, высказали гипотезу о промежуточном образовании так называемых «гибридных» форм фосфорилазы, т. е. молекул, в которых часть мономеров фосфорилирована, а часть нет. Такие гибриды должны по своим свойствам занимать промежуточное положение между полностью фосфорилированной формой — фосфорилазой А и полностью дефосфорилированной формой — фосфорилазой Б. По данным Фишера <sup>(4, 5)</sup>, частично фосфорилированные формы фосфорилазы обладают большим сродством к субстрату Г-1-Ф, чем фосфорилаза Б, но меньшим, чем фосфорилаза А. Кроме того, эти формы угнетаются Г-6-Ф, тогда как фосфорилаза А к нему нечувствительна, и при высокой концентрации белка ассоциируют в тетрамер под действием Г-1-Ф и диссоциируют на димеры в присутствии Г-6-Ф.

В настоящей работе мы исследовали возможность образования гибридных форм фосфорилазы из смеси мономеров фосфорилазы А и Б.

Фосфорилазу Б выделяли из скелетных мышц кролика по методу Фишера и Кребса <sup>(6)</sup> в модификации Лисовской <sup>(7)</sup>. Фосфорилазу А получали из 4-кратно перекристаллизованной фосфорилазы Б в присутствии очищенного препарата киназы фосфорилазы Б, АТФ и ионов магния <sup>(8)</sup>. Фосфорилазу А перекристаллизовывали трижды из 0,02 М цистеина или 0,03 М меркаптоэтанола. Содержание белка определяли спектрофотометрически, используя  $A_{230}^{1\%} = 13,4$  <sup>(1, 9)</sup>. Активность фосфорилазы определяли в направлении синтеза гликогена по методу Иллингворс и Кори <sup>(10)</sup>.

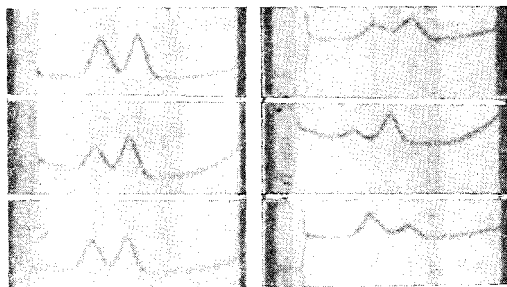
Глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат и 5'-АМФ получали от фирмы «Reanal» Венгрия, препараты были хроматографически чистыми. В работе использовали Na-β-глицерофосфат фирмы «Merck», ФРГ, меркаптоэтанол фирмы «Fluka», Швейцария. Гликоген очищали от примеси нуклеотидов пропуская через колонку с активированным углем <sup>(11)</sup>.

Перед проведением гибридизации кристаллы фосфорилазы Б и А отделяли центрифугированием, затем растворяли в 0,04 М глицерофосфатном буфере pH 7,0 и ставили на диализ при 2° на 36 час. против того же буфера для полного удаления меркаптоэтанола. Фосфорилазу Б перед диализом

\* Принятые сокращения: АМФ — аденозин-5'-монофосфат; Г-1-Ф — глюкозо-1-фосфат; Г-6-Ф — глюкозо-6-фосфат.

пропускали через колонку с активированным углем и целлюлозой для удаления АМФ (<sup>12</sup>). После описанной обработки смешивали растворы фосфорилаз А и Б в пропорции 1:1, конечное содержание белка в смеси было 6–7 мг/мл. Отбирали аликвот смеси (исходная смесь фосфорилаз А и Б), добавляли к нему меркаптоэтанол до концентрации 0,03 М и хранили при 2–4°, стальную смесь подвергали дальнейшей обработке: к 3 мл смеси добавляли 1 мл раствора, содержащего 130  $\mu$ мол. глицерофосфата, 540  $\mu$ мол.

Рис. 1. Влияние Г-1-Ф (75 мМ, средний ряд) и Г-6-Ф (2 мМ, нижний ряд) на седimentацию исходной смеси фосфорилаз А и Б (левая колонка) и той же смеси после реассоциации (правая колонка). Верхний ряд — контроль. Температура 20°, время 40 мин. после достижения максимальной скорости 52 640 об/мин., угол наклона границы фазовой пластинки 65°, седimentация слева направо, концентрация белка 5–7 мг/мл, буфер глицерофосфатный 0,04 М, рН 7



KCl и 5  $\mu$ мол. *n*-хлормеркурибензоата и оставляли на 3 часа при 20° для полной диссоциации фосфорилаз А и Б на мономеры (<sup>13</sup>). Контроль в ультрацентрифуге показал практически полный переход димеров фосфорилазы Б и тетрамеров фосфорилазы А в форму мономеров с  $s = 5,6$  S. Реассоциацию и гибридизацию проводили следующим образом: к смеси после диссоциации добавляли меркаптоэтанол до концентрации 0,05 М и подвергали раствор повторному замораживанию и оттаиванию, затем ставили на ночь на диализ при 4° против 0,04 М глицерофосфатного буфера с 0,03 М меркаптоэтанолом, рН 7.

Анализ смеси фосфорилаз после гибридизации в ультрацентрифуге выявил наличие двух компонентов с  $s = 8,6$  S и  $s = 13,2$  S, причем доли тяжелого компонента оказывалась слегка увеличенной по сравнению с исходной смесью (рис. 1, верхний ряд). Поведение в ультрацентрифуге исходной смеси фосфорилаз А и Б и той же смеси после гибридизации, в присутствии Г-1-Ф или Г-6-Ф, заметно различается. Когда Г-1-Ф или Г-6-Ф добавляется к исходной смеси фосфорилаз, наблюдается лишь слабый сдвиг равновесия димер  $\rightleftharpoons$  тетрамер в пользу тетрамера или димера соответственно (рис. 1, левая колонка). Этот незначительный сдвиг равновесия в смеси фосфорилаз в присутствии фосфорных эфиров, по-видимому, обеспечивается образованием при добавлении Г-1-Ф гибридных тетрамеров из димеров фосфорилазы А и Б ( $a_2b_2^*$ ) и их расщеплением при добавлении Г-6-Ф (<sup>4</sup>), поскольку каждая из фосфорилаз в отдельности не меняет степени ассоциации в присутствии глюкозо-фосфатов. Эти сдвиги равновесия димер  $\rightleftharpoons$  тетрамер значительно сильнее выражены в смеси после реассоциации (рис. 1, правая колонка), что однозначно свидетельствует в пользу образования при реассоциации гибридных димерных форм из фосфорилированных и нефосфорилированных мономеров ( $ab$ ). По данным Фишера (<sup>4</sup>), такие формы легче, чем исходные фосфорилазы, ассоциируют в тетрамеры в присутствии Г-1-Ф ( $(ab)_2$ ;  $(ab)a_2$ ;  $(ab)b_2$ ) и диссоциируют на димеры в присутствии Г-6-Ф.

Проведенный нами сравнительный анализ активности исходной и реассоциированной смеси фосфорилаз в присутствии разных концентраций Г-1-Ф и при добавлении Г-6-Ф также подтвердил образование гибридных форм при реассоциации. Была обнаружена четко выраженная активация

\* Буквами а и б обозначены мономеры фосфорилазы А и Б соответственно, цифровыми индексами — число мономеров каждой формы фосфорилазы в димере или тетрамере.

смеси фосфорилаз после реассоциации высокими концентрациями субстрата Г-1-Ф. На рис. 2 приведены кривые зависимости начальной скорости от концентрации Г-1-Ф для исходной смеси и для той же смеси после реассоциации. Для исходной смеси фосфорилаз (рис. 2, 1)  $V_{\max} \approx 7,0$   $\mu\text{мол. Р}_n$  в минуту на 1 мг белка достигается уже при концентрации Г-1-Ф 30 мМ\*. Ход кривой зависимости скорости от концентрации Г-1-Ф для реассоциированной смеси фосфорилаз (рис. 2, 2) существенным образом отличается от такового для исходной смеси. Величина  $V_{\max}$  для реассоции-

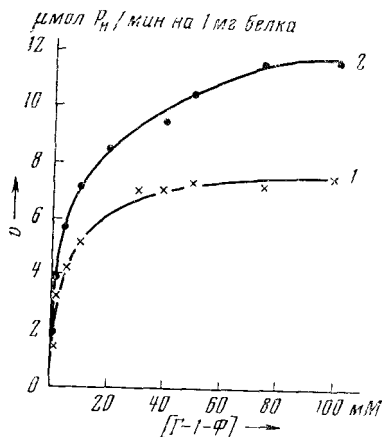


Рис. 2

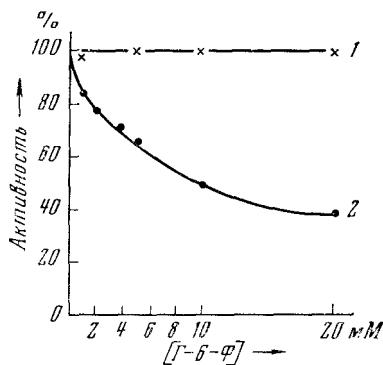


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата Г-1-Ф для исходной (1) и реассоциированной (2) смеси фосфорилаз А и Б, 0,04 М глицерофосфатный буфер рН 6,8; гликоген 1%, без АМФ; концентрация белка в пробе 25  $\mu\text{г/мл}$

Рис. 3. Угнетение исходной (1) и реассоциированной (2) смесей фосфорилаз А и Б глюкозо-6-фосфатом. Условия опыта те же, что и на рис. 2; концентрации Г-1-Ф в пробах 0,075 М

рованной смеси  $\approx 11,5$ , т. е. в 1,7 раза выше величины  $V_{\max}$  для исходной смеси. Кроме того, насыщение субстратом для реассоциированной смеси паступает при более высокой концентрации Г-1-Ф, чем для исходной смеси. Таким образом, в реассоциированной смеси мы наблюдаем эффект активации высокими концентрациями субстрата, что указывает на наличие в этой смеси гибридных форм, состоящих из фосфорилированного и нефосфорилированного мономера (аб). Такие формы, согласно Фишеру (4), обладают меньшим сродством к Г-1-Ф, чем фосфорилаза А, но большим, чем фосфорилаза Б, поэтому проявляют активность в отсутствие АМФ при высоких концентрациях субстрата.

Поскольку фосфорилаза А нечувствительна к Г-6-Ф, а фосфорилаза Б без АМФ вообще не проявляет активности, не удивительно, что исходная смесь не ингибируется Г-6-Ф (рис. 3, 1). Активность же реассоциированной смеси, измеренная при высокой концентрации Г-1-Ф (0,075 М), существенно угнетается Г-6-Ф (рис. 3, 2). Это, по-видимому, является следствием образования при реассоциации гибридных форм, которые, в отличие от фосфорилазы А, чувствительны к действию Г-6-Ф (4).

Пока еще неясно, могут ли частично фосфорилированные гибридные формы образовываться в физиологических условиях. Это представляется вполне реальным, если *in vivo* реакции взаимопревращения фосфорилаз

\* Поскольку в реакционной среде отсутствовал АМФ, активность фосфорилазы Б не выявлялась; следовательно, активность исходной смеси — это активность только фосфорилазы А.

протекают не по принципу «все или ничего», а путем постепенного фосфорилирования или дефосфорилирования субъединиц фосфорилазы (<sup>2</sup>, <sup>4</sup>), а также если фосфорилазы в клетке в определенных условиях диссоциируют до мономеров (например, при низкой концентрации белка и температуре 37°). Во всяком случае, существование неполностью фосфорилированных форм фосфорилазы, весьма чутко реагирующих на изменение концентрации фосфорных эфиров Г-1-Ф и Г-6-Ф, и, возможно, занимающих промежуточное положение между фосфорилазой А и фосфорилазой Б по аллостерическим свойствам, создавало бы дополнительные возможности регуляции активности этого ключевого фермента углеводного обмена.

Выражаем искреннюю благодарность М. Н. Любимовой-Энгельгардт за постоянный интерес к работе и ценное обсуждение.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
13 IV 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Ph. Cohen, Th. Duewer, E. H. Fischer, *Biochemistry*, **10**, 2683 (1971).
- <sup>2</sup> E. H. Fischer, A. Posker, J. C. Saari, *Essays Biochem.*, **6**, London—N. Y., 1970, p. 23.
- <sup>3</sup> Н. П. Лисовская, Н. Б. Ливанова, В сборн. Аллостерическая регуляция действия ферментов, М., 1971, стр. 99.
- <sup>4</sup> S. S. Hurd, D. Teller, E. H. Fischer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 79 (1966).
- <sup>5</sup> E. H. Fischer, S. S. Hurd et al., In: *Control of Glycogen Metabolism*, 4th FEBS Meeting, Oslo, 1968, p. 13.
- <sup>6</sup> E. H. Fischer, E. G. Krebs, *J. Biol. Chem.*, **231**, 65 (1958).
- <sup>7</sup> Н. П. Лисовская, Н. Б. Ливанова, Г. В. Сплонова, *Биохимия*, **29**, 1012 (1964).
- <sup>8</sup> E. G. Krebs, In: *Methods in Enzymology*, **8**, N. Y.—London, 1966, p. 543.
- <sup>9</sup> M. H. Bus, A. Ullman et al., *Biochemie*, **53**, 283 (1971).
- <sup>10</sup> B. Illingworth, G. T. Cori, In: *Biochem. Prep.*, **3**, N. Y.—London, 1953, p. 4.
- <sup>11</sup> E. W. Sutherland, W. D. Wosilait, *J. Biol. Chem.*, **218**, 459 (1956).
- <sup>12</sup> E. H. Fischer, E. G. Krebs, In: *Methods in Enzymology*, **5**, N. Y., 1962, p. 369.
- <sup>13</sup> N. B. Madsen, C. F. Cori, *J. Biol. Chem.*, **223**, 1055 (1956).
- <sup>14</sup> H. E. Morgan, A. Parmeggiani, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2440 (1964).