

А. М. ЯГНЯТИНСКАЯ, Г. А. СОЛОВЬЕВА

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛИКОГЕНСИНТЕТАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 30 VII 1974)

В последнее время гликогенсинтетаза (ГС; УДФГ:гликоген- α -4-глюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.11) выделена в высокоочищенном состоянии из нескольких источников, в том числе из скелетных мышц кролика ⁽¹⁾ и печени крысы ⁽²⁾. Во всех случаях белок в процессе выделения освобождался от гликогена. Однако гликоген — один из субстратов ГС и вполне вероятно, что он может способствовать сохранению нативности структуры и свойств фермента.

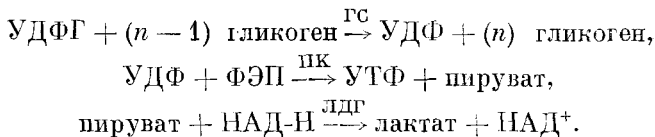
Мы уже сообщали ⁽³⁾, что гликогенсинтетаза скелетных мышц кролика, полученная в виде комплекса белок — гликоген, характеризуется необычным кинетическим поведением. Задачей настоящей работы было более детальное изучение кинетических особенностей фермента.

ГС выделяли по описанному нами ранее методу ⁽³⁾ с некоторыми модификациями. Очистка включала изоэлектрическое осаждение белков при рН 4,9—5,1 в присутствии гликогена, экспозицию подкисленного экстракта в течение часа, высокоскоростное центрифугирование и хроматографию суспендированного осадка на ДЭАЭ-целлюлозе. На всех стадиях в буфере присутствовал глицерин, его содержание составляло 25%. С ионообменника гликогенсинтетазу элюировали при ступенчатом изменении рН буфера и концентрации КСl. Перед нанесением белка ДЭАЭ-целлюлозу уравнивали 50 мМ трис-НСl буфером, содержащим 5 мМ ЭДТА, 25% глицерин, 0,1 М КСl, рН 7,4 при 5° С. Первую фракцию белка, проявляющего гликогенсинтетазную активность, элюировали таким же буфером, но концентрация КСl составляла в нем 0,2 М рН 8,1; при элюции второй фракции ГС [КСl]=0,3 М, рН 8,6. Работу проводили с белком первой фракции. Его удельная активность была в 100—120 раз выше, чем в тканевом экстракте, выход составлял около 30%. Препараты фермента хранили при —20° или при +4°.

В процессе очистки гликогенсинтетазную активность (А) измеряли по Лелуару ⁽⁴⁾ с некоторыми модификациями. Инкубационная смесь содержала реагенты в следующих конечных концентрациях: 2,6 мМ УДФГ, 1% гликоген, 7 мМ глюкозо-6-фосфат, 50 мМ трис-НСl, 5 мМ ЭДТА, общий объем 0,2 мл, рН 8,2. Инкубацию проводили 15 мин. при 37°. Реакцию останавливали термоденатурацией. К охлажденным пробам добавляли фосфоэнолпируват (ФЭП), MgCl₂, КСl и пируваткиназу (ПК) в общем объеме 0,04 мл, так чтобы конечные концентрации указанных реагентов были: ФЭП 1,2 мМ, MgCl₂ 8,5 мМ, КСl 120 мМ. Инкубацию продолжали еще 15 мин. при 37°. Затем к каждой пробе добавляли по 0,3 мл 1% раствора динитрофенилгидразина, приготовленного на 2 N HCl, и через 5 мин. — по 0,4 мл 10 N NaOH и 2,2 мл этанола. Пробы перемешивали, центрифугировали и колориметрировали на СФ-4 при 520 нм.

Кинетические исследования проводили на СФ-4 в сопряженной системе с лактатдегидрогеназой (ЛДГ) и ПК без предварительной остановки гликогенсинтетазной реакции. Ферментативные реакции в кювете прохо-

дили по следующей схеме:



Таким образом, за ходом гликогенсинтезной реакции можно было следить по уменьшению оптической плотности при 340 нм. Состав ре-

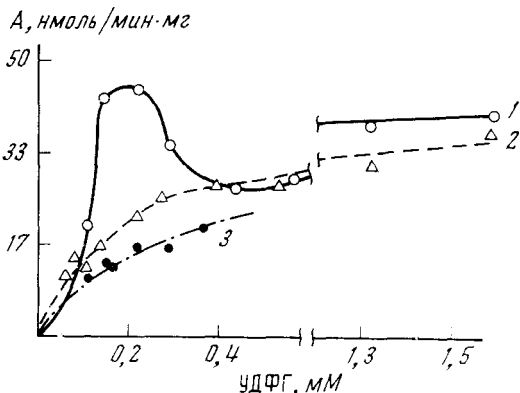


Рис. 1. Зависимость кинетики насыщения ГС субстратом от концентрации фермента и изменение этой зависимости при хранении. Содержание белка (в мкг) в реакционной смеси: 1 — 12; 2 — 48; 3 — 48, но измерения проведены через неделю после построения кривой 2

акционной смеси: 8 мМ MgCl₂, 130 мМ KCl, 0,07% гликоген, 7 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,12 мМ НАД-Н, 0,12 мМ ФЭП, 0,02—1,66 мМ УДФГ, 50 мМ трис-НСl, 5 мМ ЭДТА, ПК, ЛДГ, ГС; общий объем 3 мл, рН 8,1. Реакцию начинали внесением в кювету УДФГ. Перед этим реакционную смесь, включая и ГС, преинкубировали при комнатной температуре 20—30 мин. В такой постановке опыта гликогенсинтезная реакция была линейна во времени не менее получаса. При определении активности фермента этим методом ошибка не превышала 10%. Белок определяли микробуретовым методом⁽⁵⁾ и по поглощению при 260 и 280 нм.

Кинетический анализ выделенных препаратов ферментного белка показал, что всегда существуют условия, при которых зависимость скорости реакции (или активности) от концентрации одного из субстратов (УДФГ) выражается не гиперболой, а имеет более сложный характер. На кривых наблюдаются дополнительные плато или промежуточные максимумы в области низких концентраций УДФГ, иногда на начальном участке графики сигмоидальны (рис. 1—3).

Сложные кинетические зависимости могут свидетельствовать о присутствии в ферментном препарате нескольких изоформ со значительно различающимися кинетическими константами⁽⁶⁾, нескольких взаимопревращающихся и активных форм одного и того же белка⁽⁷⁾, а также о сочетании обоих указанных выше случаев.

Однако, если сложная кинетика обусловлена только присутствием в препарате фермента изоформ, характер кривых не должен изменяться при изменении концентрации ферментного белка в пробе. В нашем случае вариации концентрации фермента (Е) приводили к изменению характера зависимости А от концентрации УДФГ: повышение концентрации фермента вызывало упрощение кинетических кривых и приближение их к простым S-образным или гиперболическим (рис. 1, 1 и 2; рис. 3, 1—3).

Указанное выше влияние концентрации фермента на характер кинетических закономерностей позволяет отдать предпочтение предположению о существовании равновесной системы олигомерных форм фермента, хотя и не исключает возможности параллельного присутствия зависимой и независимой форм ГС (I и D). На возможность взаимных превращений различных олигомерных форм фермента указывают и кинетические зависимости, полученные в различные сроки хранения ферментного препарата:

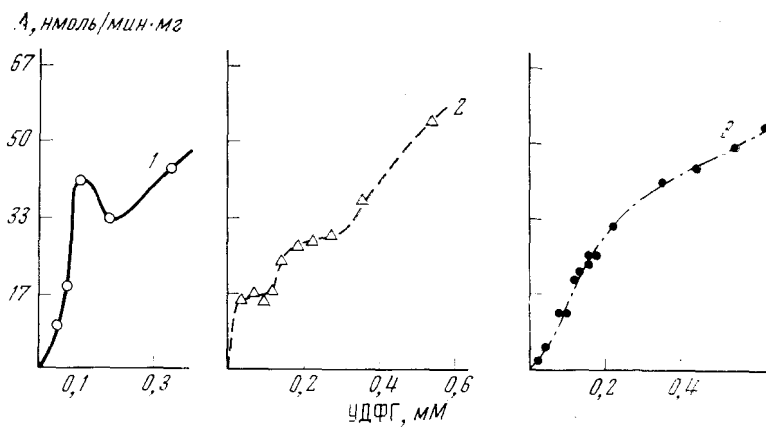


Рис. 2. Влияние хранения ферментного препарата на характер зависимости A от $[S]$. Содержание белка в реакционной смеси — 40 мкг. Кривая 2 построена спустя 2 дня после 1; 3 — спустя неделю после кривой 2

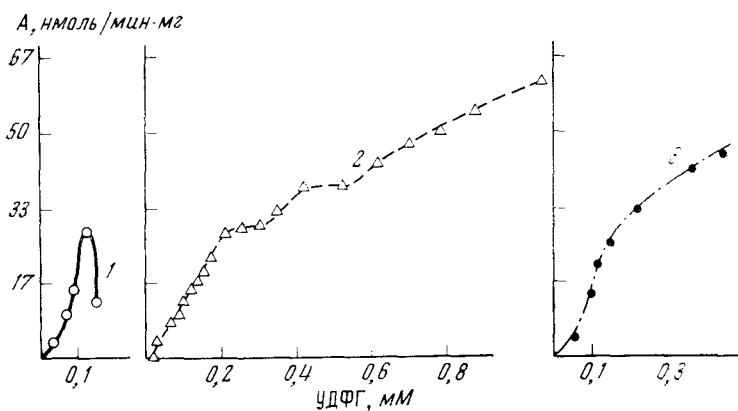


Рис. 3. Зависимость кинетики гликогенсинтетазной реакции от концентрации ферментного белка в пробе (в мкг): 1 — 20; 2 — 25; 3 — 40

(рис. 2; состав инкубационной смеси, pH и концентрация Е одинаковы). Как видно из рис. 2, зависимости A от $[S]$ также упрощаются. Возможно, что и повышение концентрации фермента, и начальные этапы старения препарата белка приводят к аналогичному результату — переходу фермента в какие-то сходные состояния, может быть, преимущественно в одну активную форму. Дальнейшее хранение фермента приводило к снижению активности ГС (рис. 1, 2 и 3).

Кинетика зависимости активности ГС от концентрации ферментного белка в пробе также носила сложный характер (рис. 4, 1 и 2) и упростилась при старении белка (рис. 4, 3). Эти данные вполне согласуются с предположением о присутствии в препарате фермента диссоциирующей системы его олигомерных форм.

Общепризнано, что ГС — сложный регуляторный фермент. Однако до настоящего времени для нее показана либо обычная гиперболическая, либо S-образная кинетика по УДФГ*. Сигмоидальность проявлялась, как правило, в присутствии ингибиторов и (или) при недостатке (отсутствии) глюкозо-6-фосфата^(8, 9). Исключение составлял лишь фермент печени крысы, для которого S-образная кинетика была характерна даже в присутствии 20 мМ глюкозо-6-фосфата⁽¹⁰⁾. Мы проводили опыты без добав-

* Исключая наше предварительное сообщение⁽³⁾.

ления ингибиторов и в присутствии близких к насыщающим концентраций глюкозо-6-фосфата. Другим, известным из литературы, типом необычной кинетики гликогенсинтетазы является начальный всплеск активности при наблюдении за ферментативной реакцией во времени. Зависимость скорости реакции от концентрации УДФГ при этом подчиняется уравнению Михаэлиса (¹¹). В нашем случае ферментативная реакция была линейна во времени.

Отсутствие в литературе данных о сложном кинетическом поведении ГС может быть объяснено тем, что исследование зависимости A от $[S]$

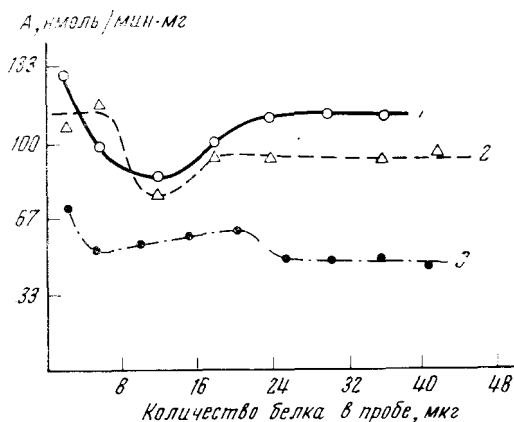


Рис. 4. Зависимость удельной активности ГС от концентрации ферментного белка и влияние старения препарата белка на эту зависимость: 1 — 1,42 мМ; 2 — 0,71 мМ; 3 — 0,71 мМ УДФГ, но измерение проведено через 3 недели после построения кривой 2

проводилось авторами при более высоких концентрациях ферментного белка и субстрата. Аналогичные концентрации Е и УДФГ в наших условиях также дают плавные кривые (рис. 1, 3). Кроме того, возможность диссоциации — ассоциации свободной от гликогена ГС была показана методами гельфильтрации (¹) и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (¹²). При этом УДФГ, глюкозо-6-фосфат и др. метаболиты влияли на состояние равновесия между олигомерными формами фермента, смещая его в определенном направлении; в отсутствие метаболитов авторы наблюдали лишь один пик активности (¹²). Однако во многих работах имеются указания на то, что в от-

сутствии гликогена гликогенсинтетаза сильно агрегирует (^{1, 12, 13}).

Из полученных нами данных следует, что ГС скелетных мышц кролика в присутствии имеющегося в препарате гликогена, но в отсутствие УДФГ и глюкозо-6-фосфата существует в виде нескольких олигомерных форм, равновесие между которыми смещается в процессе хранения. УДФГ в разбавленных белковых растворах, по-видимому, стабилизирует определенные соотношения между ними. Близкие к насыщающим концентрации УДФГ так же, как и относительно высокие концентрации ферментного белка в реакционной смеси, сдвигают равновесие реакции ассоциации — диссоциации в сторону образования, вероятно, преимущественно одной формы фермента. Наличие на кинетических кривых зависимости A от $[E]$ максимумов и минимумов указывает на то, что промежуточные формы обладают различной удельной активностью.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. E. Brown, J. Larner, *Biochim. et biophys. acta*, v. 242, 1, 69 (1974). ² D. C. Lin, H. L. Segal, *J. Biol. Chem.*, v. 248, 20, 7007 (1973). ³ Г. А. Соловьева, А. М. Ягнятская, *Укр. біохім. журн.*, т. 6, 44, 724 (1972). ⁴ L. F. Leloir, S. H. Goldemberg, *J. Biol. Chem.*, v. 235, 4, 919 (1960). ⁵ Д. Бэйли, *Методы химии белков*, М., 1965. ⁶ J. M. Reiner, *Behavior of Enzyme Systems, An Analysis of Kinetics and Mechanisms*, Minnesota, 1959. ⁷ Б. И. Курганов, *Молекулярная биология*, т. 2, 2, 166 (1968). ⁸ S. Hizukuri, J. Larner, *Biochem.*, v. 3, 11, 1783 (1964). ⁹ G. Weeks, J. M. Ashworth, *Biochem. J.*, v. 126, 3, 617 (1972). ¹⁰ N. Magner, K. H. Kim, *J. Biol. Chem.*, v. 248, 8, 2790 (1973). ¹¹ K. K. Schlender, J. Larner, *Biochim. et biophys. acta*, v. 293, 1, 73 (1973). ¹² R. J. Staneloni, R. Piras, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 42, 2, 237 (1971). ¹³ C. H. Smith, J. Larner, *Biochim. et biophys. acta*, v. 264, 2, 224 (1972).