

А. М. ЯГНЯТИНСКАЯ, Г. А. СОЛОВЬЕВА

ИЗУЧЕНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЛИКОГЕНСИНТЕТАЗЫ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 26 II 1975)

Гликогенсинтетаза (УДФГ*: α -1,4-глюкан- α -4-глюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.11) — фермент, осуществляющий удлинение молекулы гликогена посредством переноса остатка глюкозы с УДФГ на затравку гликогена в положение 1,4. Установлено, что свободный от гликогена фермент способен изменять свой молекулярный вес (м.в.) под действием добавленных извне метаболитов ⁽¹⁾.

Показано, что в молекулу гликогенсинтетазы входит несколько субъединиц с м.в. 85 000—100 000 ⁽²⁻⁵⁾. Вопрос о том, насколько сложно устроены эти субъединицы, в настоящее время остается открытым ^(3, 6). В литературе нет также единого мнения относительно м.в. целой молекулы ГС ⁽¹⁻⁷⁾ и, следовательно, о количестве входящих в ее состав субъединиц. Существенные различия в м.в., например 140 000 и 520 000 для фермента печени крысы ^(5, 7), могут быть обусловлены, в частности, тем, что фермент, освобожденный в процессе выделения от гликогена, образует прочные агрегаты различного молекулярного веса, у которых понижена способность к обратимой ассоциации — диссоциации в отсутствие добавленных извне метаболитов **.

Целью данной работы было определение м.в. фермента, выделенного в виде комплекса белок — гликоген, а также определение м.в. его субъединиц. ГС выделяли по методу, описанному нами ранее ⁽⁸⁾.

Электрофоретические исследования проводили в различных условиях: 1) в 7% ПААГ в системе Орнштейна — Дэвиса ⁽⁹⁾, иногда гель готовили на 0,06—1,4% растворе гликогена или (и) 25% растворе сахарозы; 2) в градиенте ПААГ по Коппершлегеру ⁽¹⁰⁾; 3) в ДСН по Веберу и Осборн ⁽¹¹⁾, перед электрофоретическим разделением белок обрабатывали 1% раствором ДСН и 1% раствором МЭ в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, рН 7,0, на кипящей водяной бане в течение 10 мин., в некоторых опытах электродный буфер содержал 0,1% МЭ.

Для выявления белковых зон гели фиксировали в 20% растворе трихлоруксусной кислоты в течение получаса и окрашивали 0,25% раствором кумасси бриллиантового голубого, приготовленным на воде или смеси метанол:уксусная кислота:вода (5:1:5). Хранили электрофореграммы в 3—7% растворе уксусной кислоты или в метанол-уксусной смеси.

Локализацию ГС на электрофореграммах устанавливали по ее активности в элюатах соответствующих белковых зон. Активность оценивали по уменьшению оптической плотности при 340 нм на СФ-4 ⁽⁸⁾.

Ранее мы уже сообщали ⁽¹²⁾, что полученные препараты фермента гетерогенны в 7% ПААГ в системе Орнштейна — Дэвиса. Определение активности ГС в элюатах ПААГ показало, что она обнаруживается не менее

* Принятые сокращения: УДФГ — уридиндифосфатглюкоза; ГС — гликогенсинтетаза; ПААГ — полиакриламидный гель; ДСН — додецилсульфат натрия; МЭ — β -меркаптоэтанол.

** Так, по данным ⁽⁴⁾ связанный с гликогеном фермент показывал гетерогенность в ПААГ. Свободная от гликогена ГС агрегировала и не входила в ПААГ без предварительной обработки детергентом. Обработанный детергентом белок при электрофореze был гомогенен ⁽⁴⁾.

чем в двух различных участках электрофореграммы (рис. 1а). Результаты кинетических исследований свидетельствуют о способности ГС к обратимой ассоциации — диссоциации⁽⁸⁾.

Интересно было выяснить, в какой мере электрофоретическая гетерогенность препарата фермента может быть обусловлена его способностью к обратимой ассоциации — диссоциации. Для этого мы проводили повторное электрофоретическое разделение отдельных белковых зон после их элюции с 7% ПААГ. На рис. 1 представлены типичные схемы электрофоретического разделения исходного препарата ГС, а также повторного

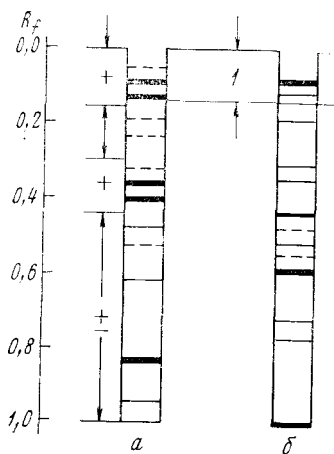


Рис. 1

Рис. 1. Схемы электрофореграммы исходного препарата ГС и электрофореграммы, полученной после повторного разделения одного из ее участков в 7% ПААГ в системе Орнштейна — Дэвиса. а — электрофореграмма исходного препарата фермента; слева знаками + и ± указаны зоны гликогенсинтетазной активности; справа цифрой 1 отмечен участок электрофореграммы, взятый для повторного разделения, схема которого представлена в части б

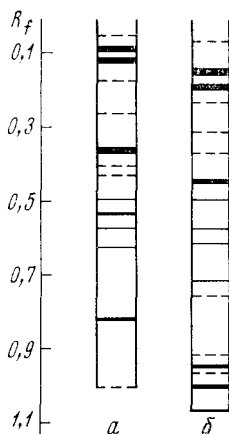


Рис. 2

Рис. 2. Схемы электрофореграмм препарата ГС в 7% ПААГ (система Орнштейна — Дэвиса), содержащем сахарозу, в присутствии (а) и в отсутствии (б) гликогена в геле

электрофоретического разделения. На повторной электрофореграмме виден практически весь спектр белковых полос исходного препарата. Аналогичная картина получается при повторном разделении любого участка исходной электрофореграммы. Таким образом, электрофоретическая гетерогенность фермента могла быть обусловлена свойством ГС образовывать равновесную систему олигомерных форм.

С другой стороны, при введении в ПААГ гликогена увеличивалась электрофоретическая подвижность всех основных белковых зон (рис. 2). Кроме того, появлялась еще одна дополнительная полоса (реже 2 и более) с R_f больше 1,0. Интенсивность ее окрашивания возрастала по мере увеличения концентрации гликогена в геле.

Следует рассмотреть две возможности: специфическое и неспецифическое влияние гликогена. В последнем случае естественно было бы ожидать, что электрофоретическая подвижность белков в присутствии гликогена снизится. Действительно, электропейтральная, крупная и сильно разветвленная молекула полисахарида могла бы создать для разделяемых молекул белка стерические препятствия. Однако в нашем случае электрофоретическая подвижность белков увеличивается. Это позволяет предполагать образование комплексов гликогена с разделяемыми белками и, как следствие, изменение зарядов молекул белков, т. е. специфичность эффекта. Анализ условий выделения ГС показал, что препарат фермента мог содержать

лишь незначительное количество примесных белков. Следовательно, электрофоретическая гетерогенность препарата ГС действительно обусловлена способностью фермента к обратимой ассоциации — диссоциации.

Для дальнейшей характеристики выделенного фермента мы определили м.в. входящих в его состав белков в градиенте ПААГ. Оказалось, что в препарате присутствуют белки с очень широким спектром м.в. — от 20 000 до 320 000, а иногда и выше. Например, один из препаратов ГС содержал белки следующих м.в.: до 30 000, 63 000, 81 000, 87 000, 102 000, 110 000, 138 000, 176 000, 205 000, 214 000, 222 000, 265 000. Столь незначительные различия в величинах м.в. отдельных белков могли бы быть обусловлены

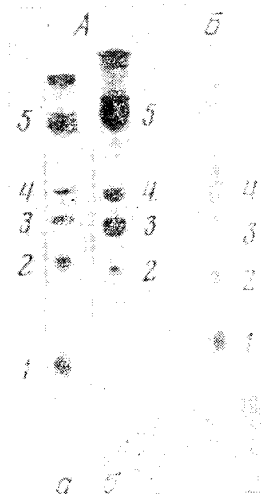


Рис. 3. Примеры электрофореграмм, полученных при разделении белка в присутствии ДСН. А — исходный препарат ГС; В — элюат, соответствующий участку 1 рис. 1а. а — препарат с цитохромом с, б — без цитохрома с. Цифрами указаны зоны, соответствующие следующим м.в. Для А: 1 — мономер цитохрома с; 2 — 28 000; 3 — 39 000; 4 — 48 000; 5 — 86 000. Для В: 1 — 12 000; 2 — 25 000; 3 — 44 000; 4 — 98 000

присутствием множественных форм ГС только в том случае, если м.в. субъединицы фермента достаточно мал.

По литературным данным, м.в. субъединицы освобожденной от гликогена ГС, определенный при электрофоретическом разделении белка в присутствии детергента, равен 85 000—100 000 (²⁻⁵). Результаты электронной микроскопии свидетельствуют о существовании субъединиц с м.в. около 40 000 и 50 000 (⁶). Опыты Брауна и Ларнера по изменению степени агрегации свободной от гликогена ГС при изменении температуры дают возможность предположить существование еще более мелких субъединиц с м.в. около 11 000—13 000 (³).

Проведенное нами определение м.в. субъединиц связанного с гликогеном белка в присутствии ДСН показало, что разрушить белки ферментного препарата до субъединиц какого-то одного м.в. не удастся. Всегда присутствуют зоны со следующими м.в.: 80 000—100 000, 45 000—50 000, 35 000—40 000 и около 25 000 (рис. 3А). Заманчиво было бы предположить, что полученные нами белки с м.в. около 45 000—50 000 и 35 000—40 000 соответствуют субъединицам с м.в. около 40 000 и 50 000, полученным Ребуном с соавторами (⁶) при анализе электронных микрофотографий, и вместе составляют субъединицу в 90 000. Белок же с м.в. около 25 000 — устойчивый димер (если мономер около 11 000), который в наших условиях дальше не разрушается. Однако большое количество предполагаемых субъединиц вызывало некоторое сомнение в принадлежности всех их к одному и тому же белку.

Для выяснения этого вопроса мы провели разделение в ПААГ, содержащем ДСН и МЭ, элюатов отдельных белковых зон с ПААГ после электрофореза исходного препарата в системе Орнштейна — Дэвиса (рис. 3Б). Как видно из рисунка, на электрофореграмме обнаруживается значительное количество белка с м.в. около 11 000. Повторное электрофоретическое

разделение любого участка электрофореграммы исходного препарата дает аналогичную картину. Поскольку подвижность этой субъединицы соответствует подвижности цитохрома с — мономера, не представляется возможным точно определить ее м.в., а также м.в. ассоциатов.

Таким образом, из полученных нами данных следует, что простейшей субъединицей ГС скелетных мышц кролика является полипептид с м.в. около 11 000. В условиях эксперимента он способен агрегировать, давая полимеры любой степени сложности.

Трудно сказать, каков истинный м.в. ГС *in vivo*. Возможно, что все обнаруженные нами олигомерные формы фермента существуют в клетке. Однако не исключено, что часть агрегатов — артефакты данной постановки опыта. Тем не менее, приведенные нами экспериментальные данные подтверждают высказанное в начале работы предположение о том, что несовпадение м.в. ГС, полученное разными авторами (¹⁻⁷), может быть обусловлено примененными при выделении фермента операциями.

К сожалению, мы не можем сказать, какие именно олигомеры ГС активны и как они различаются по своей активности. Это — одно из возможных направлений дальнейших исследований свойств данного фермента.

Авторы выражают благодарность академику С. Е. Северину за ценные советы при обсуждении и написании данной работы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
26 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Staneloni, R. Piras, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 42, 2, 237 (1971).
² T. Soderling et al., J. Biol. Chem., v. 245, 23, 6317 (1970). ³ N. Brown, J. Larner, Biochem. et biophys. acta, v. 242, 1, 69 (1971). ⁴ C. Smith, N. Brown, J. Larner, Biochim. et biophys. acta, v. 242, 1, 81 (1971). ⁵ D. Lin, H. Segal, J. Biol. Chem., v. 248, 20, 7007 (1973). ⁶ L. Rebhun, C. Smith, J. Larner, Molec. and Cell. Biochem., v. 1, 1, 55 (1973). ⁷ P. McVerry, K. H. Kim, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 48, 6, 1636 (1972). ⁸ А. М. Ягнятинская, Г. А. Соловьева, ДАН, т. 219, № 1, 253 (1974).
⁹ B. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, 404 (1964). ¹⁰ G. Kopperschlager et al., FEBS Letters, v. 5, 3, 221 (1969). ¹¹ K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., v. 244, 16, 4466 (1969). ¹² Г. А. Соловьева, А. М. Ягнятинская, Укр. биохим. журн., 44, 6, 724 (1972).