

УДК 577.154+636.2

БИОХИМИЯ

Л. Н. ВИКТОРОВА, Е. В. РАМЕНСКИЙ

ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗА ГЛАДКИХ МЫШЦ

ВЫДЕЛЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 24 III 1975)

Гликогенфосфорилаза скелетных мышц принадлежит к числу хорошо изученных ферментов ⁽¹⁾. Кроме того, описан целый ряд гликогенфосфорилаз, выделенных из различных тканей и органов животных. В этом ряду лучше других исследована гликогенфосфорилаза печени ⁽²⁾. Хотя гликогенфосфорилазная активность мускулатуры матки млекопитающих является постоянным объектом изучения, свойства очищенной гликогенфосфорилазы гладких мышц до сих пор неизвестны ^(3, 4). Содержание гликогенфосфорилазы в тканях матки на порядок ниже, чем в печени, и на два порядка ниже, чем в скелетных мышцах ⁽⁵⁾, что создает значительные трудности при выделении фермента. В настоящей работе представлены метод выделения и некоторые свойства гликогенфосфорилазы матки коровы.

Активность гликогенфосфорилазы определяли методом Кори ⁽⁶⁾ с незначительными модификациями. Измеряя активность на первых ступенях очистки, ферментативную реакцию останавливали не минеральной, а трихлоруксусной кислотой. Концентрацию белка определяли методом Лоури. За единицу активности принимали количество белка, освобождающее 1 мкмоль неорганического фосфата за 30 мин. при 30° и концентрациях субстратов, использованных в методе Кори.

Освобожденные от жира матки отмывали и замораживали при -20°. Оттаявшую ткань измельчали, фермент экстрагировали на холоду в течение 2 час. раствором 50 мМ NaF — 1 мМ ЭДТА, pH 7, из расчета 2 л на 1 кг ткани. Экстракт отделяли центрифугированием при 2000 g на холоду и диализовали против буфера 1 мМ трис-HCl — 1 мМ ЭДТА — 0,1 мМ меркаптоэтанол, до 0,5 насыщения. Выпавший за ночь при 4° осадок белка отделяли центрифугированием при 2000 g, повторно центрифугировали при 23 000 g и диализовали против буфера 1 мМ трис-HCl — 1 мМ ЭДТА — 0,1 мМ меркаптоэтанол, pH 7,1. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 66 000 g и отбрасывали, раствор повторно диализовали против 25 мМ NaF — 1 мМ ЭДТА при 7,1 pH. Фермент адсорбировали на предварительно отмытом в растворе 50 мМ NaF — 1 мМ ЭДТА и на отцентрифугированном при 66 000 g гликогене печени свиньи производства Олайнского завода. Адсорбцию проводили в течение 2,5 час. при 0 — 2°, в раствор белка вносили 2% гликогена, комплекс гликогенфосфорилаза — гликоген отделяли центрифугированием при 66 000 g и тщательно отмывали от посторонних белков раствором NaF — ЭДТА. В случае необходимости комплекс гликогенфосфорилазы с гликогеном замораживали при -20°. В таком виде фермент сохранял активность не менее 1 мес. Десорбцию гликогенфосфорилазы проводили в растворе, содержащем 55 мМ β-глицерофосфат — 3 мМ цистеин-HCl — 0,4 мМ ЭДТА, pH 7, в течение 10 мин. при 42° с последующим центрифугированием при 82 000 g в течение 70 мин. при 20°. Десорбцию повторяли, полученный раствор фермента концентрировали с помощью ячейки «Diaflo

Amicon» на фильтре XM100, вновь фракционировали сульфатом аммония при 0,5 насыщения, диализовали и высаживали 25 % ацетоном на холоду.

Очищенный в 900 раз препарат при электрофорезе в полиакриламидном геле (7) с последующим окрашиванием кумасси давал только одну полосу. Она специфически окрашивалась на фосфорилзную активность только в присутствии АМФ (8). Коэффициент седиментации этого препарата, растворенного в 100 мМ NaF — 1 мМ ЭДТА — 0,1 мМ меркаптоэтанол, pH 7, равнялся 8,4 S. Электрофореграмма препарата гликогенфосфорилзазы Б представлена на рис. 1.



Рис. 1. Электрофореграмма препарата гликогенфосфорилзазы Б мнотетрия в полиакриламидном геле

По литературным данным, величины молекулярных весов гликогенфосфорилзаз А и Б гладких мышц были определены равными 232 000 и 197 000 соответственно (4). Эти данные были получены при пропускании неочищенного экстракта матки крысы через гель сефадекса. Известно, что некоторые ферменты обмена сахаров могут адсорбироваться на сефадексах (9). В наших опытах также наблюдалась адсорбция гликогенфосфорилзазы на сефадексах. Метод геля-фильтрации в этом случае дает заниженные величины молекулярных весов. С другой стороны, описано образование стехиометрических комплексов гликогенфосфорилзазы с гликогеном (10), что может привести к завышению величины молекулярного веса фермента. Таким образом, вопрос о величинах молекулярных весов гликогенфосфорилзазы гладких мышц остается неясным.

Для определения молекулярного веса гликогенфосфорилзазы мнотетрия коровы методом геля-фильтрации мы применили биогель Р-200. Очищенный препарат гликогенфосфорилзазы Б, полученный после десорбции с гликогена при 42°, концентрировали и наносили на колонку 1,8×85 см в растворе 100 мМ NaF — 1 мМ ЭДТА — 0,1 мМ меркаптоэтанол, pH 7,2, при 25°. Свободный объем элюции (V_0) определяли с помощью голубого декстрана. Для построения калибровочного графика использовали следующие белки: яичный альбумин (мол. вес. 45 000), гемоглобин

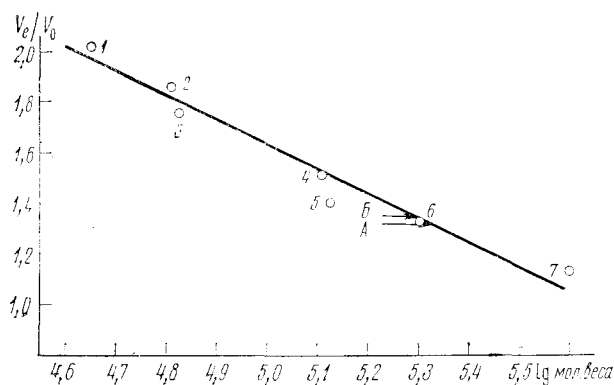


Рис. 2. Зависимость молекулярного веса гликогенфосфорилзаз А и Б мнотетрия от объема элюции на биогеле Р-200. Стандартные белки: 1 — яичный альбумин; 2 — гемоглобин; 3 — сывороточный альбумин, мономер; 4 — фитогемагглютинин; 5 — сывороточный альбумин, димер; 6 — фосфорилзаза Б скелетных мышц кролика; 7 — фосфорилзаза А скелетных мышц кролика. Стрелками отмечено положение гликогенфосфорилзаз А и Б мнотетрия

бин (мол. вес 64 000), сывороточный альбумин, мономер (мол. вес 67 000), фитогемагглютинин, (мол. вес 130 000), сывороточный альбумин, димер (мол. вес 134 000), фосфорилазу Б скелетных мышц кролика, димер (мол. вес 260 000), фосфорилазу А скелетных мышц кролика, тетрамер (мол. вес 400 000). Как видно на рис. 2, молекулярный вес гликогенфосфорилазы Б миометрия был равен 200 000.

Под действием препарата киназы фосфорилазы Б скелетных мышц кролика ⁽¹⁴⁾ в среде, содержащей АТФ и Mg^{2+} , мы наблюдали переход гликогенфосфорилазы Б гладких мышц в активную форму — гликогенфосфорилазу А, которую также пропускали через биогель. Как видно из рис. 2, активация фермента сопровождалась незначительным уменьшением V_c — объема элюции данного белка. Кажущееся увеличение молекулярного веса гликогенфосфорилазы А миометрия до 210 000, лежащее в пределах точности метода, очевидно, вызвано конформационными изменениями в молекуле, происходящими при активации. Образование гликогенфосфорилазы А ферментативным путем *in vitro* не сопровождалось удвоением молекулярного веса.

Гликогенфосфорилаза Б миометрия проявляла ферментативную активность только в присутствии АМФ.

Последующее добавление сульфата натрия активировало обе формы фермента. Реакционная смесь содержала 20 мМ β-глицерофосфат, 16 мМ глюкозо-1-фосфат, 1 % гликоген и 2 мМ АМФ (в случае фосфорилазы Б), а также возрастающие концентрации сульфата натрия. Как видно из рис. 3, в присутствии 0,8 М Na_2SO_4 ферментативная активность возрастала для фосфорилазы Б в четыре раза. Солевая активация фосфорилазы А в этих условиях выражена слабее.

Измеряли начальные скорости синтеза гликогена под действием гликогенфосфорилазы миометрия в зависимости от концентрации глюкозо-1-фос-

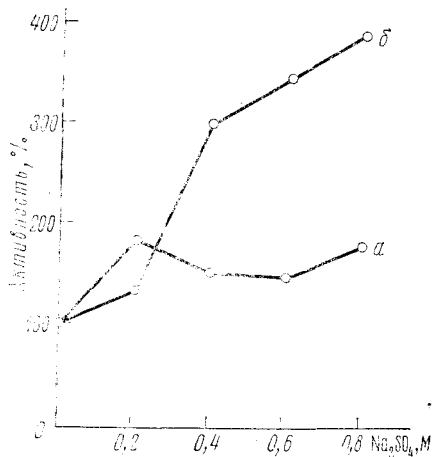


Рис. 3. Влияние концентрации сульфата натрия на активность гликогенфосфорилаз А (а) и Б (б) миометрия. За 100% принята активность ферментов в отсутствие сульфата натрия

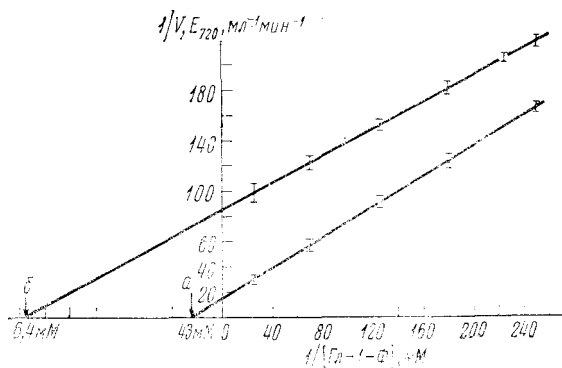


Рис. 4. Зависимость начальной скорости ферментативного расщепления глюкозо-1-фосфата (Гл-1-ф) гликогенфосфорилазами А (а) и Б (б) миометрия от его концентрации. Стрелками отмечены соответствующие величины K_m

фата. Реакционная смесь содержала глюкозо-1-фосфат в пределах от 4 до 40 мМ, 0,25% гликоген, очищенный от следов АМФ, 1 мМ АМФ (в случае фосфорилазы Б) и фермент в количестве, превращающем не более 3% глюкозо-1-фосфата за 10 мин. в 20 мМ β -глицерофосфате при 30° и рН 6,8. Как видно из рис. 4, величина кажущейся K_m гликогенфосфорилазы Б миомеррии равнялась 6,4 мМ. Эта величина совпадает с K_m гликогенфосфорилазы скелетных мышц кролика, равной 6,5 мМ ⁽¹²⁾. Кажущаяся K_m гликогенфосфорилазы А миомеррии равна 43 мМ.

Таким образом, гликогенфосфорилазная система миомеррии, представленная двумя ферментами — фосфорилазой А и фосфорилазой Б, имеет следующие особенности. Неактивный фермент, гликогенфосфорилаза Б, проявляет активность только в присутствии АМФ и, по данным седиментации и гель-фильтрации, имеет молекулярный вес, совпадающий с молекулярным весом гликогенфосфорилазы Б скелетных мышц и неактивного фермента печени ⁽²⁾. В отличие от фермента скелетных мышц, последующее внесение Na_2SO_4 на фоне АМФ резко повышает его активность. Соответствующий фермент печени активируется на фоне АМФ только при добавлении Na_2SO_4 , присутствие АМФ в бессолевой среде практически не выявляет его активности. Под действием киназы фосфорилазы наблюдается ферментативный переход гликогенфосфорилазы Б в гликогенфосфорилазу А. Активная форма фермента для проявления каталитических свойств не нуждается в АМФ, но в присутствии сульфата натрия несколько увеличивает свою активность. Превращаясь в активную форму, гликогенфосфорилаза миомеррии, подобно активному ферменту печени и в отличие от гликогенфосфорилазы А скелетных мышц, остается димером, а не переходит в тетрамер. K_m гликогенфосфорилазы А миомеррии в 10 раз превышает K_m в отношении глюкозо-1-фосфата у фермента скелетных мышц и в 100 раз у фермента печени ⁽¹³⁾. Кроме того, гликогенфосфорилаза А гладких мышц, в отличие от гликогенфосфорилазы А скелетных мышц, заметно ингибируется глюкозо-6-фосфатом ⁽¹⁴⁾.

Обнаруженные свойства гликогенфосфорилаз миомеррии отличают их от ферментов скелетных мышц и печени.

Авторы признательны проф. В. О. Шпикитеру за ценные советы.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
24 III 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. П. Лисовская, Н. Б. Ливанова, В кн.: Аллостерическая регуляция действия ферментов (сер. Биологическая химия), М., 1971, стр. 99. ² М. М. Appleman, E. G. Krebs, E. H. Fischer, Biochemistry, v. 5, 2101 (1966). ³ G. A. Rinard, Biochim. et biophys. acta, v. 286, 416 (1972). ⁴ H. P. Schane, Anal. Biochem., v. 11, 371 (1965). ⁵ Л. Н. Викторова, Е. В. Раменский, Г. В. Сафина, Бюлл. эксп. биол. и мед., т. 75, № 2, 41, (1973). ⁶ B. Illingworth, G. Cori, In: Biochemical Preparations, v. 3, N. Y., 1953, p. 1. ⁷ B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, 404 (1964). ⁸ C. H. Davis, L. H. Schliselfeld et al., J. Biol. Chem., v. 242, 20, 4824 (1967). ⁹ Г. Я. Вудершайн, А. А. Прокопенков, Биохимия, т. 38, 113 (1973). ¹⁰ R. L. De Lange, R. G. Kemp et al., J. Biol. Chem., v. 243, 2200 (1968). ¹¹ E. G. Krebs, E. H. Fischer, Biochim. et biophys. acta, v. 20, 150 (1956). ¹² Г. В. Силонова, Н. Б. Ливанова, Б. И. Курганов, Молек. биол., т. 3, 768 (1969). ¹³ V. T. Maddaiah, N. B. Madsen, J. Biol. Chem., v. 241, 17, 3573 (1966). ¹⁴ L. N. Viktorova, E. V. Ramensky, In: Joint US — USSR Symposium on Biological Pyridoxal Catalysis, Leningrad, 1974.