



УДК 577.152.241*1.042

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЫШЕЧНОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ Б
С ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДОМ И ЕГО АНАЛОГАМИ

Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов В. И.,
Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Глебова Г. Д.,
Пекель Н. Д., Березовский В. М.

Научно-производственное объединение «Витамины», Москва

Изучено ингибирование гликогенфосфорилазы Б из скелетных мышц кролика FMN и его аналогами с заместителями в положениях 6 и 8. Ингибирующее действие FMN проявляется в снижении предельной скорости ферментативной реакции и увеличении концентрации «полунасыщения» для АМР. Значения концентрации «полунасыщения» (в мкМ) для ингибиторов возрастают в ряду: FMN (13,5), 6-бром-FMN (27), 8 α -окси-FMN (30), 8-диметиламино(нор)-FMN (33), 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (44), 6-амино-FMN (96), 8-окси(нор)-FMN (109), 6-нитро-FMN (170), 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (260). Существование комплексов гликогенфосфорилазы Б с FMN и его аналогами доказано методами спектрофотометрии и седиментации в аналитической ультрацентрифуге. Показано, что FMN препятствует индуцируемому АМР переходу димерной формы фермента в тетрамерную. Обнаружено ингибирование гликогенфосфорилазы Б высокими концентрациями АМР.

Гликогенфосфорилаза Б (КФ 2.4.1.1) *in vivo* катализирует фосфоролитическое расщепление гликогена [1]. Образующийся α -D-глюкозо-1-фосфат используется для повышения уровня глюкозы в крови и как источник энергии мышечного сокращения [2]. В покоящейся мышце активность гликогенфосфорилазы Б подавлена высокими концентрациями АТФ и глюкозо-6-фосфата [3]. Фосфорилирование гликогенфосфорилазы Б, катализируемое киназой гликогенфосфорилазы (КФ 2.7.1.38), переводит ее в гликогенфосфорилазу А, которая способна расщеплять гликоген и при высоких концентрациях АТФ и глюкозо-6-фосфата. Авторами работы [4] показано, что FMN является высокоэффективным ингибитором мышечной гликогенфосфорилазы А. Сродство FMN к гликогенфосфорилазе А несколько больше, чем у рибофлавина и FAD, и более чем на порядок превышает сродство кофеина, теофиллина и аллопуринола. FMN связывается в аллостерическом центре («нуклеотидный ингибиторный центр»), удаленном на расстояние 10 Å от активного центра, в котором связывается α -D-глюкозо-1-фосфат. Присоединение FMN к гликогенфосфорилазе А происходит таким образом, что плоскость изоаллоксазинового кольца FMN оказывается приблизительно параллельной плоскостям бензольных колец остатков Tyr-612 и Phe-285. При этом все атомы изоаллоксазинового кольца становятся недоступными растворителю. В образовании комплекса определяющую роль играют дисперсионные силы притяжения [5].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия гликогенфосфорилазы Б из скелетных мышц кролика с FMN и некоторыми его 6- и 8-замещенными производными: 6-бром-, 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-, 6-амино-, 6-нитро-, 8-диметиламино(нор)-, 8-окси(нор)-, 8 α -окси- и 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN.

Интересно, что аналоги рибофлавина и его коферментных форм, содержащие в положении 8 изоаллоксазинового кольца вместо метильной группы окси- и диметиламиногруппы, а в положении 8 α или 6 S-цистеинильную группу, выделены из ряда живых организмов [6].

Для оценки прочности связывания FMN гликогенфосфорилазой Б нами был использован метод седиментации в аналитической ультрацентрифуге. Типичная картина седиментации смеси гликогенфосфорилазы Б с FMN представлена на рис. 1а. Поглощение регистрировали при длине волны, соответствующей максимуму поглощения FMN (445 нм). В изученных ус-

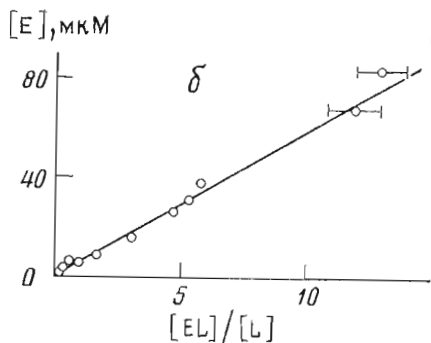
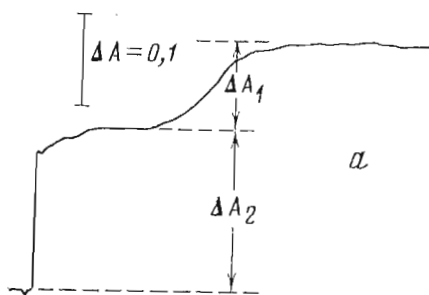


Рис. 1

Рис. 1. Связывание FMN (17 мкМ) гликогенфосфорилазой Б: а — седиментация комплекса фермента (10 мкМ) с FMN (направление седиментации слева направо); б — линейная анаморфоза данных по связыванию

Рис. 2. Спектр оптического поглощения свободного FMN (1) и FMN, связанного гликогенфосфорилазой Б. (2)

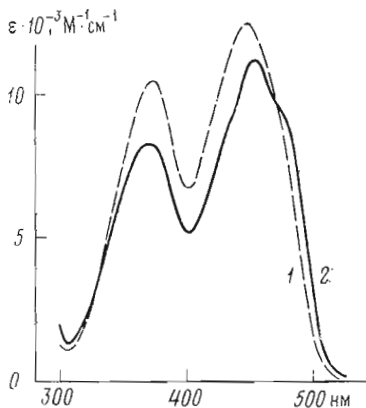


Рис. 2

ловиях FMN практически не седиментирует и наблюдаемая граница седиментации связана с движением гликогенфосфорилазы Б, содержащей связанный FMN. Высота границы седиментации (ΔA_1) соответствует поглощению связанного FMN, а высота остаточного плато (ΔA_2) — поглощению свободного FMN. Микроскопическую константу диссоциации комплекса гликогенфосфорилазы Б с FMN рассчитывали графически, используя уравнение, соответствующее случаю, когда каждая субъединица фермента содержит один FMN-связывающий центр:

$$[E] = K \frac{[EL]}{[L]} = K \frac{\varepsilon_2 \Delta A_1}{\varepsilon_1 \Delta A_2},$$

где $[E]$ — равновесная концентрация гликогенфосфорилазы Б в расчете на мономер, $[L]$ и $[EL]$ — равновесные концентрации свободного и связанного лиганда, ε_1 и ε_2 — величины молярного поглощения связанного и свободного FMN (величина ε_1 найдена равной $10,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; спектр FMN, связанного гликогенфосфорилазой Б, см. рис. 2). Линейный характер зависимости $[E]$ от $[EL]/[L]$ (рис. 1б) можно рассматривать как подтверждение того, что одна субъединица фермента связывает одну молекулу FMN. Величина константы диссоциации, рассчитанная из наклона прямой, оказалась равной $5,9 \pm 0,4 \text{ мкМ}$. Заметим, что константа диссоциации комплекса гликогенфосфорилазы А с FMN составляет 2 мкМ (в присутствии 50 мМ глюкозы) [5]. Таким образом, обе формы гликогенфосфорилазы (А и Б) образуют весьма прочные комплексы с FMN.

В связи с тем что коммерческие препараты FMN содержат, как правило, $10\text{--}20\%$ рибофлавин-4'-монофосфата [7], представляло интерес провести сравнительную оценку сродства рибофлавин-4'- и -5'-монофосфатов к гликогенфосфорилазе Б. С этой целью мы разделили методом хроматографии на бумаге препарат синтетического FMN на две фракции, соответствующие 5'-FMN и 4'-FMN. Константы диссоциации комплекса фермента с 4'- и 5'-формами FMN, определенные методом седиментации в аналитической ультрацентрифуге в присутствии $0,3 \text{ М}$ KCl, оказались равными соответственно $14,7 \pm 1,3$ и $14,9 \pm 1,3 \text{ мкМ}$ (при 20°C). Таким образом, обе формы FMN, различающиеся по положению фосфатной груп-

пы, обладают одинаковым сродством к гликогенфосфорилазе Б. Сопоставление полученного значения константы диссоциации комплекса гликогенфосфорилазы Б с FMN с соответствующей величиной, измеренной в 0,1 М KCl, указывает на то, что повышение ионной силы раствора ослабляет прочность связывания FMN ферментом.

Дополнительные доказательства образования комплекса FMN (и некоторых его аналогов) с гликогенфосфорилазой Б были получены методом спектрофотометрии. Как видно из рис. 2, спектр оптического поглощения FMN (96 мкМ) изменяется в присутствии избытка гликогенфосфорилазы Б (116 мкМ). При связывании с белком значительно уменьшается интенсивность полос поглощения FMN 373 и 445 нм, полоса поглощения FMN 373 нм смещается на 2 нм в сторону меньших длин волн, полоса поглощения 445 нм смещается на 8 нм в сторону больших длин волн, появляется заметное плечо в области 470 нм. Заметное плечо на длинноволновой стороне первой полосы спектра поглощения FMN наблюдается также для FMN, находящегося в комплексе с апофлавоксином *Peptostreptococcus elsdenii* [8] и для тетраацетилрибофлавина в среде хлороформа [9]. В спектре водного раствора тетраацетилрибофлавина это плечо отсутствует. Следует отметить, что спектральные характеристики FMN не зависят от pH в интервале 5,5–8,0. Поэтому вероятной причиной появления bathochромного сдвига может быть уменьшение полярности микроокружения FMN при связывании с белком. По данным работы [5], FMN оказывается в неполярном окружении при связывании с кристаллической гликогенфосфорилазой А.

Разностный спектр оптического поглощения системы гликогенфосфорилаза Б+FMN (рис. 3) характеризуется наличием положительного пика при 488 нм и отрицательных пиков при 435 и 377 нм (кроме того, имеются плечи при 460 и 420 нм). Появление положительного пика при 488 нм обусловлено bathochромным сдвигом первой полосы поглощения FMN при связывании с ферментом. Интересно, что в длинноволновой области разностного спектра поглощения 3-метиллюмифлавина, полученного путем вычитания спектра поглощения 3-метиллюмифлавина в воде из спектра его поглощения в бензоле, также наблюдается положительный пик [10]. Появление разностного спектра при связывании 8-диметиламино(нор)-, 8-окси(нор)-, 6-амино-, 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-, 6-нитро-, 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-, 6-бром- и 8 α -окси-FMN с гликогенфосфорилазой Б (рис. 3) также, по-видимому, обусловлено уменьшением полярности микроокружения флавина при переходе в связанное состояние, хотя нельзя исключить эффектов, вызванных изменением рК ионогенных групп флавинов.

Высокое сродство гликогенфосфорилазы Б к FMN позволяет использовать спектрофотометрию для титрования FMN-связывающих центров фермента. При длине волны 488 нм отношение молярного поглощения связанного FMN ($\epsilon_{свля} = 6,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) к молярному поглощению свободного FMN ($\epsilon_{своб} = 4,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) максимально ($\epsilon_{свля}/\epsilon_{своб} = 1,48$). Эта величина равна 1,21 при 435 нм, 1,22 при 377 нм и 1,23 при 401 нм. Поэтому спектрофотометрическое титрование целесообразно проводить при 488 нм. Кривая спектрофотометрического титрования гликогенфосфорилазы Б FMN (рис. 4) характеризуется наличием двух прямолинейных участков. В точке излома концентрация FMN равна 113 ± 3 мкМ, а концентрация гликогенфосфорилазы Б с учетом разбавления — 110 мкМ в расчете на мономер. Поскольку титрование проводилось в условиях, когда $[E]_0 \gg K$ и $[L]_0 \gg K$, точка излома кривой титрования прямо указывает стехиометрию комплекса белок — FMN. Она, как видно, соответствует связыванию одной молекулы FMN одной субъединицей гликогенфосфорилазы Б.

Расчет величины молярного поглощения флавина из участка кривой титрования гликогенфосфорилазы Б FMN после точки излома дает величину $4,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, которая отличается от значения молярного поглощения свободного FMN при 488 нм. Это различие, по-видимому, можно объяснить тем, что молекула гликогенфосфорилазы Б содержит дополнительные центры связывания FMN с существенно меньшим сродством к

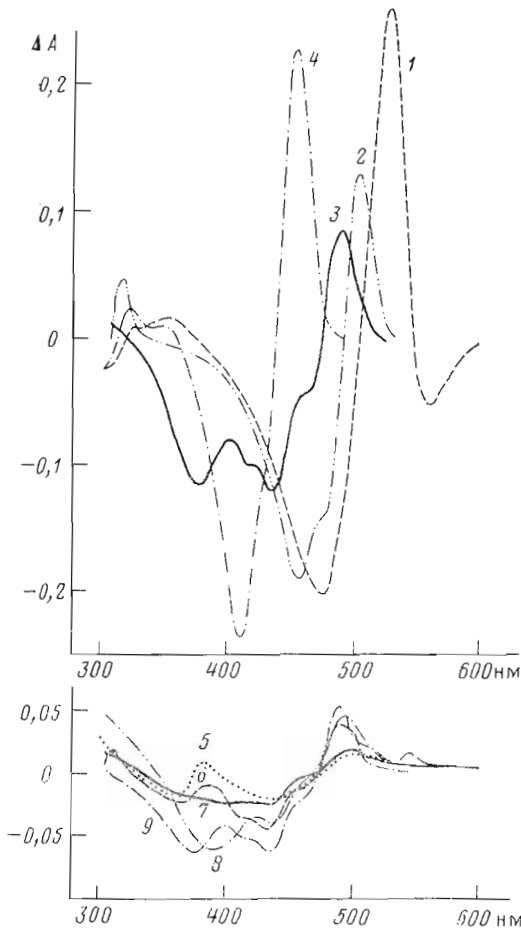


Рис. 3

Рис. 3. Разностные спектры оптического поглощения смеси гликогенфосфорилазы Б (42 мкМ) с FMN и его аналогами (в скобках приведена концентрация, мкМ): 1 — 8-диметиламино(пор)-FMN (73), 2 — 8-окси(пор)-FMN (75), 3 — FMN (99), 4 — 6-амино-FMN (91), 5 — 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (50), 6 — 6-нитро-FMN (86), 7 — 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (52), 8 — 6-бром-FMN (74), 9 — 8 α -окси-FMN (44)

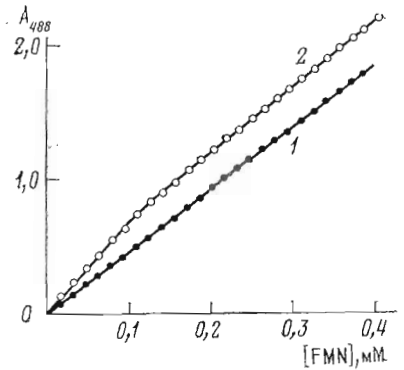


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость оптического поглощения FMN при 488 нм от его концентрации в отсутствие (1) и в присутствии гликогенфосфорилазы Б (2). Исходная концентрация фермента 116 мкМ

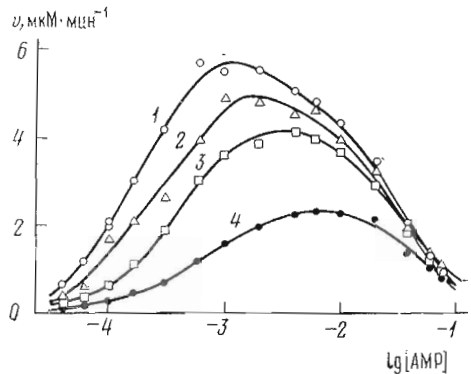


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б (98 нМ), от молярной концентрации AMP в присутствии FMN в следующих концентрациях (мкМ): 1 — 0; 2 — 15; 3 — 40; 4 — 120

флавины. Аналогичный вывод был сделан также авторами работы [5] при изучении связывания FMN с гликогенфосфорилазой А микрокалориметрическим методом.

В настоящей работе впервые исследовано ингибирование гликогенфосфорилазы Б под действием FMN. Нами изучено влияние FMN на характер зависимости скорости ферментативной реакции (v), катализируемой гликогенфосфорилазой Б, от концентрации AMP. Концентрацию AMP варьировали в интервале 40 мкМ — 75 мМ. Из рис. 5 следует, что высокие концентрации AMP подавляют ферментативную активность. В соответствии с существующими представлениями субъединица гликогенфосфорилазы содержит два центра связывания AMP: активаторный и ингибиторный нуклеотидные центры [11]. Восходящая ветвь кривой зависимости v от [AMP] отражает связывание AMP в активаторном центре. Обнаруженное нами ингибирующее действие высоких концентраций AMP (ниспадающая ветвь зависимости v от [AMP]) может быть объяснена присоединением

Таблица 1

**Параметры уравнения Хилла для активации
гликогенфосфоорилазы Б АМР в присутствии FMN**

| [FMN], мкМ | n_H | $[A]_{0,5}$, мМ | V , мкМ·мин ⁻¹ |
|------------|-----------|------------------|-----------------------------|
| 0 | 1,30±0,08 | 0,19±0,01 | 6,6±0,2 |
| 15 | 1,26±0,07 | 0,33±0,06 | 5,9±0,5 |
| 40 | 1,32±0,09 | 0,40±0,07 | 4,7±0,5 |
| 120 | 1,14±0,10 | 0,7±0,1 | 2,6±0,1 |

Таблица 2

**Параметры уравнения Хилла для ингибирования
гликогенфосфоорилазы Б АМР в присутствии FMN**

| [FMN], мкМ | n_H | $[I]_{0,5}$, мМ | v_0 , мкМ·мин ⁻¹ |
|------------|-----------|------------------|-------------------------------|
| 0 | 1,36±0,07 | 25,6±0,3 | 5,6±0,3 |
| 15 | 1,34±0,04 | 29,2±0,6 | 5,1±0,3 |
| 40 | 1,50±0,06 | 35,0±0,7 | 4,3±0,2 |
| 120 | 1,76±0,17 | 50±5 | 2,5±0,1 |

второй молекулы АМР к субъединице фермента с посадкой ее в нуклеотидном ингибиторном центре. Анализ зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации АМР показал, что обе ветви удовлетворительно описываются соответствующими формами уравнения Хилла, предложенными для действия аллостерических активаторов и ингибиторов [12]. Для расчета значений коэффициента Хилла (n_H) использовали разностный метод, предложенный в работе [13]. Заметим, что для ниспадающей ветви зависимости v от [АМР] формула для расчета коэффициента Хилла дает величину n_H со знаком «минус». Для расчета «концентрации полунасыщения» ($[A]_{0,5}$ и $[I]_{0,5}$), максимальной скорости (V) и уровня скорости ферментативной реакции (v_0), с которого начинается ингибирование высокими концентрациями АМР, экспериментальные данные линеаризовали в координатах $\{v/[A]^{n_H}v\}$ или $\{v/[I]^{n_H}v\}$. Коэффициент Хилла для восходящей ветви зависимости v от [АМР] равен $1,30 \pm 0,08$ (табл. 1). Эта величина несколько меньше значений n_H , полученных авторами работ [14, 15]. Мы полагаем, что авторы цитированных работ получили завышенные значения коэффициента Хилла, так как они использовали в качестве величины V не предельное значение скорости реакции при $[АМР] \rightarrow \infty$ (в предположении отсутствия ингибирования АМР), а значение v при концентрациях АМР, при которых еще не наблюдается спада ферментативной активности, т. е. в районе 1 мМ АМР. Рассчитанные нами значения V (табл. 1) в 1,16 раз превышают значение скорости реакции при 1 мМ АМР. Для ниспадающей ветви v от [АМР] коэффициент Хилла составляет $1,36 \pm 0,07$. Величина v_0 оценена равной $5,6 \pm 0,3$ мкМ·мин⁻¹ (табл. 2). Можно было ожидать, что оценка значений V и v_0 соответственно из восходящей и нисходящей ветвей зависимости v от [АМР] приведет к одной и той же величине. Полученное расхождение значений V и v_0 остается пока не объясненным.

В присутствии FMN коэффициент Хилла для АМР остается практически постоянным и лишь при концентрации FMN 120 мкМ наблюдается некоторое уменьшение величины n_H (табл. 1). В то же время FMN оказывает заметное влияние на параметры $[A]_{0,5}$ и V : с увеличением концентрации FMN происходит увеличение величины $[A]_{0,5}$ и уменьшение величины V . Снижение величины V , соответствующей скорости реакции в условиях насыщения активаторных центров фермента АМР, означает образование тройного комплекса, включающего в себя фермент, АМР и FMN. Естественно полагать, что в тройном комплексе FMN занимает нуклеотидный ингибиторный центр. Снижение величины $[A]_{0,5}$ в присутствии FMN мож-

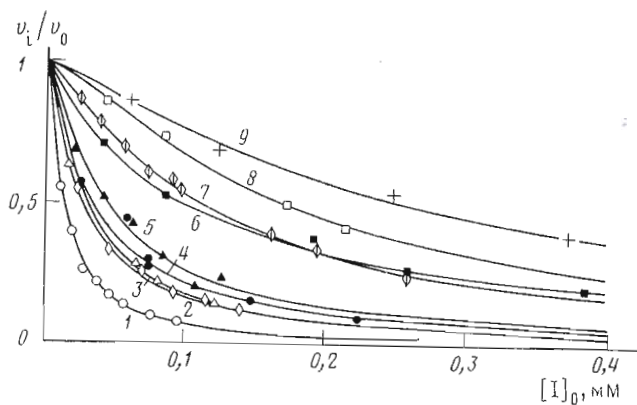


Рис. 6. Зависимость относительной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б в присутствии 0,1 мМ АМР, от концентрации ингибитора: FMN (1), 6-бром-FMN (2), 8 α -окси-FMN (3), 8-диметиламино(нор)-FMN (4), 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (5), 6-амино-FMN (6), 8-окси(нор)-FMN (7), 6-нитро-FMN (8), 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN (9). Точки — экспериментальные данные, сплошные кривые рассчитаны с использованием средних значений параметров уравнения Хилла, приведенных в табл. 2

но трактовать как указание на то, что связывание FMN в нуклеотидном ингибиторном центре ослабляет прочность связывания АМР в нуклеотидном активаторном центре. На основании зависимости V от концентрации FMN может быть рассчитана кажущаяся константа диссоциации комплекса между FMN и ферментом, активаторный нуклеотидный центр которого насыщен АМР. В условиях нашего эксперимента эта величина, рассчитанная графически в координатах Диксона [16], равна 75 мкМ. Коэффициент Хилла для АМР, вычисленный для ниспадающей ветви зависимости v от $[AMP]$, увеличивается с ростом концентрации FMN, достигая значения $1,76 \pm 0,17$ при концентрации FMN 120 мкМ (табл. 2). Одновременно с увеличением концентрации FMN происходит увеличение $[I]_{0,5}$ для АМР и уменьшение величины v_0 . Наблюдаемый антагонизм в действии двух ингибиторов (АМР в избыточных концентрациях и FMN), который проявляется в увеличении значений $[I]_{0,5}$ и n_H для одного ингибитора в присутствии другого, обусловлен особым характером взаимодействий между нуклеотидными ингибиторными центрами: связывание ингибитора I_1 в ингибиторном центре одной субъединицы ухудшает сродство ингибитора I_2 к ингибиторному центру другой субъединицы.

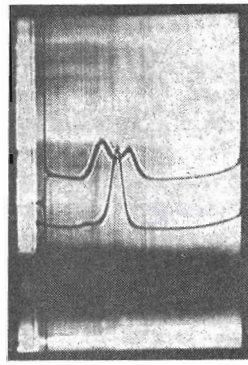
Изученные аналоги FMN так же, как и сам FMN, являются ингибиторами гликогенфосфорилазы Б (рис. 6). Для проверки обратимости действия ингибиторов гликогенфосфорилазу Б инкубировали в течение различных промежутков времени (до 30 мин) с FMN или его аналогами, концентрации которых превышали в 3 раза максимальные концентрации, используемые при изучении их влияния на активность гликогенфосфорилазы Б

Таблица 3

Параметры уравнения Хилла для ингибирования гликогенфосфорилазы Б FMN и его аналогами

| Ингибитор | n_H | $[I]_{0,5}$, мкМ |
|---|-----------------|-------------------|
| FMN | $1,31 \pm 0,04$ | $13,5 \pm 0,6$ |
| 6-Бром-FMN | $1,22 \pm 0,04$ | 27 ± 4 |
| 8- α -Окси-FMN | $1,30 \pm 0,06$ | 30 ± 1 |
| 8-Диметиламино(нор)-FMN | $1,15 \pm 0,07$ | 33 ± 2 |
| 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN | $1,24 \pm 0,14$ | 37 ± 3 |
| 6-Амино-FMN | $1,03 \pm 0,04$ | 96 ± 4 |
| 8-Окси(нор)-FMN | $1,24 \pm 0,02$ | 109 ± 2 |
| 6-Нитро-FMN | $1,34 \pm 0,11$ | 170 ± 10 |
| 8 α -(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN | $1,24 \pm 0,24$ | 260 ± 40 |

Рис. 7. Шлирен-седиментограмма гликогенфосфорилазы Б (88 мкМ) в отсутствие (нижняя кривая) и в присутствии 68 мкМ FMN (верхняя кривая). Направление седиментации слева направо. Время седиментации 27 мин



(концентрация флавина изменялась в интервале от 285 мкМ в случае FMN до 1,15 мМ в случае 6-амино-FMN). Значения скорости ферментативной реакции, полученные после 25-кратного разбавления смеси фермента с FMN или его аналогами, совпадают со значениями скорости, измеренными при запуске реакции ферментом при условии равенства конечных концентраций ингибитора в реакционной смеси. Эти данные свидетельствуют об обратимом характере ингибирования гликогенфосфорилазы Б FMN и его аналогами. Зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации флавина удовлетворительно описываются формой уравнения Хилла, в которой предельное значение v при $[I]_{0,5} \rightarrow \infty$ принимается равным нулю. Величина n_H для FMN (табл. 3) превышает единицу ($n_H = 1,31 \pm 0,04$), что указывает на существование положительных кооперативных взаимодействий между нуклеотидными ингибиторными центрами, занимаемыми FMN, в димерной молекуле гликогенфосфорилазы Б. 4'- и 5'-Формы FMN практически не различаются по своим ингибиторным свойствам по отношению к гликогенфосфорилазе Б: для 4'-формы FMN $n_H = 1,28 \pm 0,09$ и $[I]_{0,5} = 13 \pm 1$ мкМ, а для 5'-формы FMN $n_H = 1,34 \pm 0,07$ и $[I]_{0,5} = 14 \pm 1$ мкМ. Из табл. 3 следует, что введение аминогруппы в положение 6 изоаллоксазинового кольца и диметиламиногруппы в положение 8 сопровождается заметным снижением кооперативности взаимодействия центров, связывающих флаavin: величина n_H снижается до $1,03 \pm 0,04$ и $1,15 \pm 0,07$ соответственно. Для остальных аналогов FMN значение n_H близко к соответствующей величине, полученной для самого FMN.

Введение различных заместителей в положения 6 и 8 изоаллоксазинового кольца ухудшает связывание аналога с гликогенфосфорилазой Б, что проявляется в увеличении величины $[I]_{0,5}$. Наихудшим сродством обладают 6-амино-, 8-окси(нор)-, 6-нитро- и 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN. К числу заместителей, введение которых снижает сродство флавина к ферменту, относятся, как видно, электронодонорная аминогруппа, электроноакцепторная нитрогруппа и отрицательно заряженная ацетилцистеинильная группа. Для аналогов FMN с ацетилцистеинильной группой ингибирующая способность сильно зависит от положения заместителя: аналог с заместителем в положении 8 является гораздо более слабым ингибитором, чем аналог с заместителем в положении 6 (значения $[I]_{0,5}$ различаются в 7 раз). 8-Окси(нор)-FMN при нейтральных значениях pH находится в депротонированной *n*-бензохиноидной форме [17], которая, по-видимому, неблагоприятна с точки зрения связывания в ингибиторном центре гликогенфосфорилазы Б.

В заключение нами было изучено влияние FMN на ассоциацию гликогенфосфорилазы Б, индуцируемую АМР. При достаточно высоких концентрациях белка в присутствии 1,0 мМ АМР (15°C) значительная доля фермента представлена тетрамерной формой (нижняя кривая на рис. 7; коэффициент седиментации тетрамерной формы составляет 12S). Небольшой пик, седиментирующий с меньшей скоростью, соответствует димерной форме. При внесении в систему FMN (68 мкМ) преобладающей становится димерная форма (коэффициент седиментации равен 8S; верхняя кривая). Таким образом, FMN препятствует проявлению ассоциирующего действия

АМР. Одной из причин этого может быть снижение сродства фермента к АМР, вызываемое FMN.

Физиологическая важность взаимодействия витамина В₂ и его коферментных форм с гликогенфосфорилазой может состоять в том, что эти соединения выступают в роли регуляторов процессов метаболизма гликогена. Известно, что большие дозы рибофлавина повышают содержание гликогена в печени млекопитающих, а при экспериментальном арибофлавинозе наблюдается обратный эффект — уменьшение содержания гликогена в печени [18].

Экспериментальная часть

Гликогенфосфорилазу В выделяли из скелетных мышц кролика по методу, описанному в работе [19]. Четырехкратно перекристаллизованный препарат фермента использовали не более чем в течение 2 недель после выделения. АМР удаляли из раствора фермента адсорбцией на активированном угле Norit А по методике, описанной в работе [19]; полученный препарат гликогенфосфорилазы использовали в течение 1 дня. Гликоген из печени свиньи производства Олайнского завода химреактивов очищали по методике, описанной в работе [20]; средняя молекулярная масса и доля концевых глюкозных остатков гликогена составляют $5,5 \cdot 10^6$ [21] и 6,4% [22] соответственно. Концентрацию фермента определяли, исходя из значений оптического поглощения белка при 280 нм, коэффициент экстинкции и молекулярная масса субъединицы фермента приняты равными $1,32 \text{ (г/л)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [23] и 97 000 [24] соответственно. Синтетический FMN производства НПО «Витамины» использовали без дополнительной очистки во всех экспериментах, за исключением особо оговоренных. Препарат синтетического FMN разделяли на две фракции методом хроматографии на бумаге в системе пиридин — изобутанол — вода — уксусная кислота, 33:33:33:1 [25, 26]. Фракция с меньшей подвижностью соответствовала рибофлавин-5'-монофосфату, с большей — рибофлавин-4'-монофосфату с возможной примесью рибофлавин-3'-монофосфата [25, 27]. 8-Оксия(нор)-, 8-диметиламино(нор)- и 8 α -окси-FMN были синтезированы по методикам, описанным в работах [17, 28, 29], 6-амино-, 6-нитро-, 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)- и 6-бром-FMN были получены по методу, описанному в работе [30]. 8 α -(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN синтезирован конденсацией 8 α -бром-2',3',4'-триацетил-FMN с N-ацетил-L-цистеином с последующей очисткой на сефадексе G-10; спектр поглощения (фосфатный буфер, pH 7,0) ($\epsilon \cdot 10^{-4}$): 224 (3,32), 268 (3,17), 365 (0,82), 446 (1,22); pK_{a1} 4,5; pK_{a2} 6,7; pK_{a3} 8,9. Концентрации флавинов определяли спектрофотометрически с использованием следующих величин молярного поглощения: $\epsilon_{445} = 1,25 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для FMN [31], $\epsilon_{473} = 3,96 \cdot 10^4$ для 8-окси(нор)-FMN [17], $\epsilon_{445} = 1,23 \cdot 10^4$ для 8 α -окси-FMN [29], $\epsilon_{505} = 3,11 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для 8-диметиламино(нор)-FMN [32]. Величины молярного поглощения 6-амино-, 6-бром- и 6-нитро-FMN полагали равными величинам молярного поглощения 6-амино-, 6-бром- и 6-нитрорибофлавина соответственно, а именно: $\epsilon_{428} = 1,9 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для 6-аминорибофлавина [33], $\epsilon_{445} = 9,7 \cdot 10^3$ для 6-бромрибофлавина [33], $\epsilon_{442} = 1,23 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для 6-нитрорибофлавина. Последняя величина была рассчитана исходя из $\epsilon_{442} = 1,01 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для 6-нитрорибофлавина в этаноле [34] и соотношения оптических плотностей эквимоларных растворов 6-нитрорибофлавина в воде и этаноле, равного 1,22 при 442 нм. Молярное поглощение 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN полагали равным молярному поглощению FMN, C-6-атом которого образует ковалентную связь с SH-группой остатка цистеина, входящего в состав триэтанол-аминдегидрогеназы, а именно: $\epsilon_{437} = 1,23 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [35]. В работе использовали динатриевую соль аденозин-5'-монофосфорной кислоты и дикалиевую соль глюкозо-1-монофосфорной кислоты производства фирмы Reanal (Венгрия), остальные реактивы производства «Союзреактив» марки х.ч. и ч.д.а.

Седиментационные исследования проводили на аналитической ультрацентрифуге Spinco (модель E), оборудованной абсорбционной оптической системой, фотометрическим сканирующим устройством, монохроматором, мультиплексором и двухкоординатным самописцем NE-230 (фирма EMG, ВНР). Общую концентрацию фермента (в расчете на мономер) при изучении связывания FMN варьировали в интервале 3,0–10,2 мкМ. Поглощение FMN регистрировали при 445 нм. Скорость вращения ротора (тип An-F) составляла 60 000 об/мин. Эксперименты по связыванию проводили в присутствии 0,1 М KCl при 20° С. Ассоциацию гликогенфосфорилазы Б изучали с помощью пилрен-оптики. Скорость вращения ротора (тип An-D) составляла 56 000 об/мин.

Абсолютный спектр оптического поглощения FMN, связанного гликогенфосфорилазой Б, определяли по двухкюветной разностной схеме с использованием спектрофотометра Cary-219 (Varian, Швейцария) в присутствии 0,1 М KCl при 20° С. В кювету образца помещали смесь растворов FMN и белка, а в кювету сравнения — раствор белка с такой же концентрацией, что и в кювете образца.

Разностные спектры комплексов гликогенфосфорилазы Б с FMN и его аналогами регистрировали по четырехкюветной схеме с использованием спектрофотометра Cary-219 при 20° С (0,3 М KCl). В ячейку образца помещали две кюветы с длиной оптического пути 0,5 см, в которые наливали смесь растворов гликогенфосфорилазы Б и FMN в соотношении 1 : 1 по объему; в ячейку сравнения помещали 5-мм кювету с раствором гликогенфосфорилазы Б и такую же кювету с FMN. Длина оптического пути этих четырех кювет отличалась не более чем на 0,1%. В случае FMN, 6-амино-, 8-диметиламино(нор)- и 8-окси(нор)-FMN вносили поправку на изменение спектральных характеристик флавина при двукратном разбавлении раствора.

Спектрофотометрическое титрование гликогенфосфорилазы Б проводили при 488 нм с использованием 5-мм кварцевой кюветы. В кювету помещали 1,25 мл раствора белка (232 мкМ) и порциями по 10 мкл добавляли раствор FMN (1,92 мМ). Для добавления раствора FMN использовали микропипетку фирмы Centaur Sciences (США). Относительная ошибка величины добавляемого объема раствора составляла 0,3%. В значения A_{488} и величину концентрации FMN вводили поправку на разбавление.

Ферментативную реакцию проводили в направлении синтеза гликогена в присутствии 4 мМ глюкозо-1-фосфата и 1,0 г/л гликогена при 30° С. Ионную силу всех растворов доводили до 0,3 М с помощью KCl. Вклад глюкозо-1-фосфата и АМР в суммарную ионную силу рассчитывали на основании величин pK 6,01 [36] и 6,24 [37] соответственно (для 30° С и ионной силы 0,3 М). Каталитическую активность гликогенфосфорилазы Б определяли турбидиметрическим методом, описанным в работе [38], при 310 нм с использованием спектрофотометра Cary-219. Ферментативную активность в присутствии 6-амино-, 6-нитро-, 6-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-, 6-бром-, 8-окси(нор)-, 8-диметиламино(нор)- и 8 α -окси-FMN определяли при 350, 305, 320, 320, 330, 350 и 550 нм соответственно. Ферментативную реакцию запускали, добавляя от 30 до 50 мкг гликогенфосфорилазы Б к реакционной смеси. Специально было показано, что порядок добавления компонентов реакционной смеси не влияет на величину начальной скорости ферментативной реакции. Относительная ошибка определения скорости ферментативной реакции составляла 3%.

Все эксперименты с гликогенфосфорилазой Б проводили в 0,05 М глицилглициновом буфере, pH 6,8, в присутствии 0,2 мМ EDTA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graves D. J., Wang J. H. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1972, v. 7, p. 435–482.
2. Ньюхолл Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М.: Мир, 1977, с. 179–183.
3. Morgan H. E., Parmeggiani A. J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 8, p. 2440–2445.
4. Kasvinsky P. J., Shechosky S., Fletterick R. J. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 24, p. 9102–9106.

5. Sprang S., Fletterick R., Stern M., Yang D., Madsen N., Sturtevant J. *Biochemistry*, 1982, v. 21, № 9, p. 2036-2048.
6. Березовский В. М., Жилина Т. А. *Химия природн. соедин.*, 1979, № 3, с. 255-275.
7. Mayhew S. G., Strating M. J. *Eur. J. Biochem.*, 1975, v. 59, № 2, p. 539-544.
8. Mayhew S. G., Massey V. *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, № 4, p. 794-802.
9. Müller F., Mayhew S. G., Massey V. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 23, p. 4654-4662.
10. Veeger C., Dervartanian D. V., Kaise J. F., De Kok A., Koster J. F. In: *Flavins and flavoproteins* / Ed. Slater E. C. Amsterdam: Elsevier, 1966, p. 242-262.
11. Johnson L. N., Stora E. A., Wilson K. S., Sansom M. S. P., Weber I. T. *J. Mol. Biol.*, 1979, v. 134, № 3, p. 639-653.
12. Курганов Б. И. *Аллотерические ферменты*. М.: Наука, 1978, с. 42-49.
13. Силонова Г. В., Ливанова Н. Б., Курганов Б. И. *Молекулярн. биология*, 1969, т. 3, вып. 5, с. 768-784.
14. Madsen N. B., Schechosky S. *J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, № 14, p. 3301-3307.
15. Oikonomakos N. G., Soliroudis T. G., Evangelopoulos A. E. *Biochem. J.*, 1979, v. 181, № 2, p. 309-320.
16. Уэбб Л. *Ингибиторы ферментов и метаболизма*. М.: Мир, 1966, с. 159.
17. Глебова Г. Д., Березовский В. М. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 1, с. 51-61.
18. Шилова П. И., Яковлев Т. Н. *Основы клинической витаминологии*. Л.: Медицина, 1974, с. 38-42.
19. Fischer E. H., Krebs E. G. *J. Biol. Chem.*, 1958, v. 231, № 1, p. 65-71.
20. Sutherland E. W., Wosilait W. D. *J. Biol. Chem.*, 1956, v. 218, № 1, p. 459-468.
21. Чеботарева Н. А., Лисовская Н. П., Курганов Б. И. *Молекулярн. биология*, 1979, т. 13, вып. 1, с. 228-236.
22. Klinov S. V., Chebotareva N. A., Lissovskaya N. P., Davidov D. R., Kurganov B. I. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 709, № 1, p. 91-98.
23. Buc M. H., Ulmann A., Goldberg M., Buc H. *Biochimie*, 1971, v. 53, № 3, S. 283-289.
24. Titani K., Koide A., Hermann J., Ericsson L. H., Kumar S., Wade R. D., Walsh K. A., Nourath H., Fischer E. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 11, p. 4762-4766.
25. Scola-Nagelschneider G., Hemmerich P. *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 66, № 3, p. 567-577.
26. Адамяева Р. В. Синтез и свойства фосфорных эфиров рибофлавина. Дис... канд. хим. наук. М.: ВНИВИ, Минмедпром СССР, 1969, с. 119.
27. Nielsen P., Rauschenbach P., Vacher A. *Analyt. Biochem.*, 1983, v. 130, № 2, p. 359-368.
28. Петисова Т. П., Березовский В. М. *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 3, с. 402-403.
29. Ливвак Ж. И., Жилина Т. А., Березовский В. М. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 10, с. 1536-1541.
30. Ливвак Ж. И., Березовский В. М. В кн.: Успехи химии азотистых гетероциклов. Тез. докл. III Всес. конф. по химии гетероциклических соединений. Ростов-на-Дону, 1983, с. 131.
31. Березовский В. М. *Химия витаминов*. М.: Пищевая пром-сть, 1973, с. 548-552.
32. Ливвак Ж. И., Березовский В. М. *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 1, с. 47-55.
33. Ghisla S., Kenney W. C., Knapper W. P., McIntire W., Singer T. P. *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 12, p. 2537-2544.
34. Ливвак Ж. И., Березовский В. М. *Ж. орган. химии*, 1978, т. 14, № 2, с. 440-445.
35. Steenamp D. J., Kenney W. C., Singer T. P. *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 8, p. 2812-2817.
36. Palter K., Lukton A. *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 53, № 2, p. 613-623.
37. Tuttavuori J., Suntionen S. *Finn. Chem. Lett.*, 1980, № 4, p. 113-118.
38. Сугрובה Н. П., Лисовская Н. П., Курганов Б. И. *Биохимия*, 1982, т. 47, вып. 11, с. 1883-1888.

Поступила в редакцию
6.1.1984

THE INTERACTION OF MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE B WITH FLAVIN MONONUCLEOTIDE AND ITS ANALOGUES

KLINOV S. V., CHEBOTAREVA N. A., KURGANOV B. I., LITVAK Zh. I.,
ZHILINA T. A., GLEBOVA G. D., PEKEL N. D., BEREZOVSKII V. M.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

The inhibition of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase B by FMN and its analogues with substituents in the positions 6 and 8 has been studied. Inhibiting action of FMN is manifested in reducing the limiting rate of enzymic reaction and in increasing the half-saturation concentration of AMP. The inhibitor half-saturation values (in μM) increase in the following order: FMN (13,5), 6-bromo-FMN (27), 8 α -hydroxy-FMN (30), 8-dimethylamino(nor)-FMN (33), 6-(N-acetyl-L-cystein-S-yl)-FMN (44), 6-amino-FMN (96), 8-hydroxy(nor)-FMN (109), 6-nitro-FMN (170), 8 α -(N-acetyl-L-cystein-S-yl)-FMN (260). The existence of the glycogen phosphorylase B complexes with FMN or its analogues has been proved by spectrophotometry and sedimentation in analytical ultracentrifuge. FMN has been shown to hinder AMP-induced transition of dimeric form of the enzyme to tetrameric one. AMP at high concentrations has been found to inhibit glycogen phosphorylase B.