



УДК 577.152.241*1.042

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЫШЕЧНОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ Б
С ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДОМ И ЕГО АНАЛОГАМИ

Климов С. В., Чеботарева Н. А., Еурганов Б. И.,
Литвак Ж. И., Жулина Т. А., Пекель Н. Д.,
Березовский В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Изучено ингибирование гликогенфосфорилазы Б из скелетных мышц кролика FAD и его аналогами с заместителями в положении 8 изоаллоксазинового кольца. Значения концентрации «полунасыщения», $[I]_{0.5}$, для ингибиторов возрастают в ряду: FAD (44 мкМ), 8 α -окси-FAD (60 мкМ), 8-диметиламино(нор)-FAD (69 мкМ), 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD (106 мкМ). Из сопоставления этих значений $[I]_{0.5}$ с полученными ранее соответствующими значениями для аналогов FMN следует, что модификация по положению 8 изоаллоксазинового кольца флавина слабее влияет на величину концентрации «полунасыщения» в случае аналогов FAD. Существование комплекса гликогенфосфорилазы Б с FAD и его аналогами доказано методами спектрофотометрии и седиментации. Положения максимумов оптического поглощения связанного FAD в комплексе с ферментом в области 300–500 нм совпадают с соответствующими величинами для FMN. Показано, что FAD препятствует индуцируемому AMP переходу димерной формы фермента в тетрамерную.

Ингибирование гликогенфосфорилазы (КФ 2.4.1.1) скелетных мышц кролика различными гетероциклическими соединениями обусловлено их связыванием в аллостерическом центре («нуклеотидный ингибиторный центр»), который находится на расстоянии 10 Å от активного центра фермента [1–4]. Физиологическая функция нуклеотидного ингибиторного центра гликогенфосфорилазы, по-видимому, состоит в регуляции фосфорилиза гликогена [1, 5]. Аденин, аденозин, инозин, кофеин и FMN образуют интеркалятивные комплексы с аминокислотными остатками Tyr⁶¹² и Phe²⁸⁵ гликогенфосфорилазы А (фосфорилированной формы фермента) [3]. AMP и NADH образуют гидрофобные кластеры с аминокислотными остатками Phe²⁸⁵, Phe²⁸⁶, Tyr⁶¹² и Met⁶¹¹ гликогенфосфорилазы Б (дефосфорилированной формы фермента). При связывании в нуклеотидном ингибиторном центре NADH сохраняет свернутую конформацию, в которой гетероциклические основания расположены вблизи друг друга, но в отличие от свернутой конформации свободного динуклеотида не являются копланарными. Расстояние между С-4-атомом никотинамидного гетероцикла и С-6-атомом аденинового основания NADH составляет 3,0 Å. Плоскости гетероциклических оснований NADH, связанного в ингибиторном центре гликогенфосфорилазы Б, составляют угол 98° [4].

Прочность связывания лиганда в нуклеотидном ингибиторном центре гликогенфосфорилазы зависит от природы гетероциклического соединения. Сродство гликогенфосфорилазы А к FMN более чем на два порядка превышает ее сродство к аденозину [3]. Введение различных заместителей в положения 6 и 8 FMN уменьшает сродство гликогенфосфорилазы Б к флавину. Например, сродство 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN к гликогенфосфорилазе Б примерно в 19 раз меньше, чем у FMN [5]. Рибофлавин и FAD обладают одинаковым сродством к гликогенфосфорилазе А [2].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия гликогенфосфорилазы Б из скелетных мышц кролика с FAD и его 8-замещенными производными: 8-диметиламино(нор)-FAD, 8 α -окси-FAD и 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD. Флавины, содержащие диметиламиногруппу в положении 8 изоаллоксазинового кольца, в положении 8 α — окси- и цистеинильную группы, выделены из некоторых живых организмов [6].

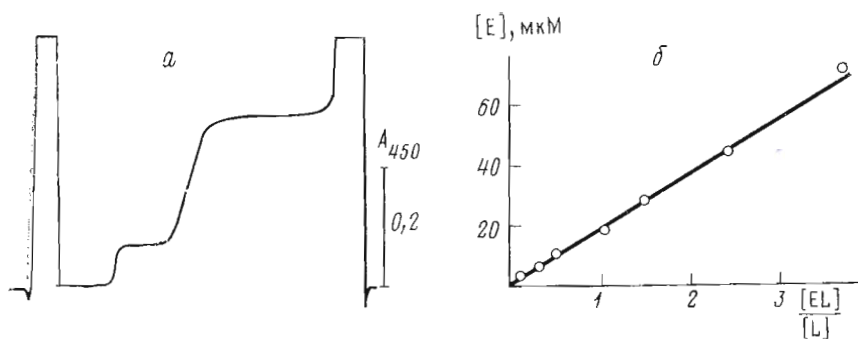


Рис. 1. Использование скоростной седиментации (60 000 об/мин) для изучения связывания FAD (22,8 мкМ) с гликогенфосфорилазой Б: а – седиментация комплекса фермента (90 мкМ) с FAD (направление седиментации слева направо, время опыта 17 мин); б – линейная анаморфоза данных по связыванию, полученных при варьировании общей концентрации фермента (6–90 мкМ) и постоянной начальной концентрации лиганда

Для оценки прочности связывания FAD гликогенфосфорилазой Б были использованы методы скоростной и равновесной седиментации в аналитической ультрацентрифуге. Типичная картина скоростной седиментации смеси гликогенфосфорилазы Б с FAD представлена на рис. 1а. Регистрацию оптического поглощения проводили при длине волны, соответствующей максимуму поглощения FAD (450 нм). В изученных условиях FAD практически не седиментирует и наблюдаемое изменение положения границы седиментации связано с движением гликогенфосфорилазы Б, содержащей связанный FAD. Высота остаточного плато соответствует поглощению свободного FAD. Микроскопическую константу диссоциации комплекса гликогенфосфорилазы Б с FAD рассчитывали графически, используя уравнение, соответствующее случаю, когда каждая из двух субъединиц фермента содержит один FAD-связывающий центр:

$$[E] = K \frac{[EL]}{[L]}, \quad (1)$$

где $[E]$ – равновесная концентрация гликогенфосфорилазы Б в расчете на мономер, $[L]$ и $[EL]$ – равновесные концентрации свободного и связанного лиганда соответственно. Величину $[EL]$ рассчитывали как разность между общей концентрацией FAD ($[L]_0$) и $[L]$, а величину $[E]$ – как разность между общей концентрацией фермента в расчете на мономер и $[EL]$. Расчет $[L]_0$ и $[L]$ проводили на основании значений оптического поглощения, регистрируемого к определенному моменту времени на одном и том же радиальном расстоянии в контрольной ячейке (без фермента) и в ячейке, содержащей лиганд и фермент. Построенная на основании экспериментальных данных зависимость $[E]$ от $[EL]/[L]$ представлена на рис. 1б. Линейный характер зависимости $[E]$ от $[EL]/[L]$ можно рассматривать как подтверждение того, что одна субъединица фермента связывает одну молекулу FAD. Величина константы диссоциации, рассчитанная из наклона прямой, оказалась равной $18 \pm 0,7$ мкМ.

Определение константы диссоциации комплекса фермент – лиганд методом равновесной седиментации дает более надежные значения, поскольку при достижении седиментационного равновесия отсутствует транспорт вещества в центробежном поле [7]. Кроме того, в этом методе используются относительно низкие скорости вращения ротора и, следовательно, отсутствуют значительные градиенты давления, которые могут оказывать влияние на положение химического равновесия.

Равновесное распределение фермента контролировали в отдельной ячейке с регистрацией оптического поглощения при длине волны 301 нм (начальная концентрация фермента 24,5 мкМ; рис. 2а). Оптическое поглощение FAD (начальная концентрация 24,1 мкМ) в присутствии фермента регистрировали при длине волны 472 нм (рис. 2б), при которой

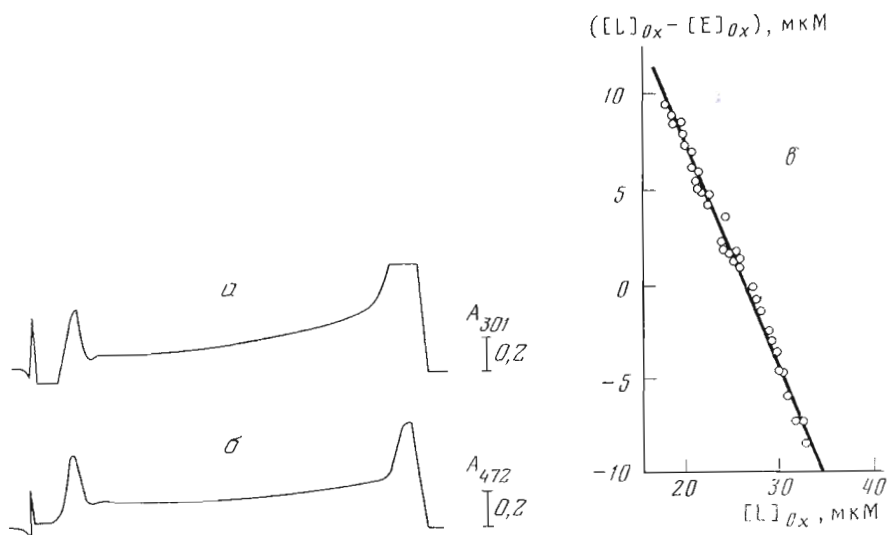


Рис. 2. Использование равновесной седиментации (9000 об/мин, 1 ч) для изучения связывания FAD (24,1 мкМ) с гликогенфосфорилазой Б (24,5 мкМ): а — равновесная седиментограмма фермента (регистрация оптического поглощения при длине волны 301 нм); б — равновесная седиментограмма FAD в присутствии фермента (регистрация при длине волны 472 нм); в — линейная анаморфоза, построенная в соответствии с уравнением (5)

величины коэффициента молярного поглощения свободного и связанного лиганда равны ($\epsilon_{472} = 0,93 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); фермент практически не поглощает при этой длине волны. Вдоль радиуса ячейки перераспределяется только связанный FAD, в то время как концентрация свободного лиганда, $[L]$, постоянна на всех расстояниях вдоль ячейки. Общая концентрация лиганда и общая концентрация фермента на выбранном радиальном расстоянии x ($[L]_{0x}$ и $[E]_{0x}$ соответственно) связаны следующими соотношениями с концентрацией связанного лиганда, $[EL]_x$, концентрацией свободного лиганда, $[L]$, и концентрацией свободного фермента, $[E]_x$:

$$[L]_{0x} = [L] + [EL]_x, \quad (2)$$

$$[E]_{0x} = [E]_x + [EL]_x. \quad (3)$$

Для величин $[L]$, $[E]_x$ и $[EL]_x$ справедливо следующее соотношение (в предположении образования комплекса со стехиометрией типа одна молекула лиганда на одну субъединицу фермента):

$$K = \frac{[L][E]_x}{[EL]_x}. \quad (4)$$

Для расчета константы диссоциации K может быть использована линейная анаморфоза:

$$[L]_{0x} - [E]_{0x} = (K + [L]) - \frac{K}{[L]} [L]_{0x}. \quad (5)$$

Величины $[L]_{0x}$ при различных значениях x находим из седиментационного распределения FAD в присутствии фермента (из кривых, подобных той, которая представлена на рис. 2б). Далее мы принимаем, что фермент, находящийся в комплексе с FAD, распределяется точно так же, как и свободный фермент. Поэтому для расчета величин $[E]_{0x}$ мы использовали кривую седиментационного равновесия для свободной гликогенфосфорилазы Б (рис. 2а), взятой в той же концентрации, что и в ячейке, содержащей фермент с лигандом. Линейная анаморфоза, построенная на основании экспериментальных данных, представлена на рис. 2в. Параметры прямой определяли по методу наименьших квадратов. Величина константы диссоциации комплекса гликогенфосфорилаза Б—FAD (K) и равновес-

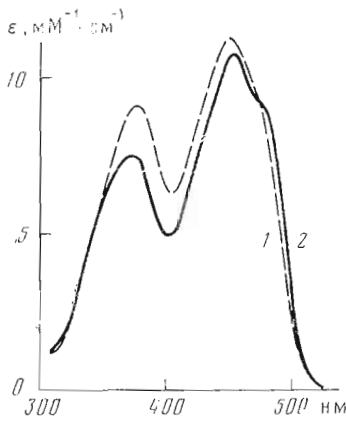


Рис. 3

Рис. 3. Спектр оптического поглощения свободного FAD (1) и FAD в комплексе с гликогенфосфорилазой Б (2)

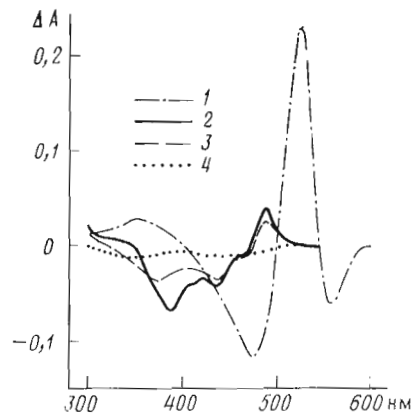


Рис. 4

Рис. 4. Разностные спектры оптического поглощения смеси гликогенфосфорилазы Б (42 мкМ) с FAD и его аналогами (в скобках приведена концентрация в мкМ): 1 — 8-диметиламино(нор)-FAD (68); 2 — FAD (100); 3 — 8α-окси-FAD (30); 4 — 8α-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD (68)

ная концентрация свободного лиганда, $[L]$, определены равными $18,1 \pm 0,2$ и $14,6 \pm 0,2$ мкМ соответственно. Таким образом, оба седиментационных метода дают совпадающие значения величины K . Сопоставляя найденное значение константы диссоциации комплекса FAD с найденной нами ранее константой диссоциации комплекса гликогенфосфорилазы Б с FMN (5,9 мкМ), можно сделать вывод, что сродство фермента к динуклеотидной коферментной форме витамина B₂ в 3 раза меньше, чем к мононуклеотидной.

Спектр оптического поглощения FAD изменяется в присутствии гликогенфосфорилазы Б (рис. 3). При использованных концентрациях флавина (50 мкМ) и фермента (407 мкМ) степень насыщения FAD белком составляет 95% (расчитано на основании измеренной константы диссоциации комплекса). Поэтому наблюдаемый спектр оптического поглощения практически полностью соответствует спектру оптического поглощения связанного FAD. При связывании с белком снижается интенсивность полос поглощения FAD 375 и 450 нм, полоса поглощения FAD 375 нм смещается на 4 нм в сторону меньших длин волн, полоса поглощения 450 нм смещается на 2 нм в сторону больших длин волн, появляется заметное плечо в области 472 нм (табл. 1). Оптическое поглощение пиридоксаль-5'-фосфата, протестической группы гликогенфосфорилазы Б, по-видимому, не изменяется при связывании фермента с FAD, поскольку поглощение смеси FAD с ферментом в области 310–350 нм практически совпадает с суммарным поглощением индивидуальных компонентов смеси. Спектральные характеристики флавинов, связанных гликогенфосфорилазой Б, практически полностью совпадают (табл. 1). Это свидетельствует о том, что микроокружение изоаллоксазиновых колец FMN и FAD характеризуется примерно одинаковой гидрофобностью.

Разностный спектр оптического поглощения системы гликогенфосфорилаза Б + FAD (рис. 4) характеризуется наличием положительного пика при 487 нм и отрицательных пиков при 387 и 436 нм (кроме того, имеются плечи при 460 и 410 нм). Появление положительного пика при 487 нм обусловлено батохромным сдвигом первой полосы поглощения FAD при связывании с ферментом. Аналогичный характер имеет разностный спектр оптического поглощения системы гликогенфосфорилаза Б + FMN [5]. Разностные спектры смесей гликогенфосфорилазы Б с 8α-окси-, 8-диметиламино(нор)- и 8α-(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD сходны с разностными спектрами смесей фермента с соответствующими флавинами — аналогами FMN [5]. Изменение спектральных характеристик FAD и его

Изменение спектральных характеристик FMN и FAD при связывании гликогенфосфорилазой Б

Флавин	Спектральная характеристика	Свободный флавин (см. [8])	Флавин, связанный гликогенфосфорилазой Б
FMN	$\lambda_{\text{макс.}} \text{ нм}$ $\epsilon \cdot 10^{-3}, \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	445; 373 12,5; 10,4	471(пл); 453; 371 9,6; 11,0; 7,7
FAD	$\lambda_{\text{макс.}} \text{ нм}$ $\epsilon \cdot 10^{-3}, \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	450; 375 11,3; 9,3	472(пл); 452; 371 9,3; 10,8; 7,7

Таблица 2

Параметры уравнения Хилла для ингибирования гликогенфосфорилазы Б FAD и его аналогами (в сравнении с FMN и его аналогами [5])

Ингибитор	n_H	$[I]_{0,5}, \text{ мкМ}$
FAD	$1,37 \pm 0,02$	$43,8 \pm 0,4$
8 α -Окси-FAD	$1,5 \pm 0,3$	60 ± 10
8-Диметиламино(нор)-FAD	$0,99 \pm 0,04$	69 ± 2
8 α -(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD	$0,94 \pm 0,09$	106 ± 6
FMN	$1,31 \pm 0,04$	$13,5 \pm 0,6$
8 α -Окси-FMN	$1,30 \pm 0,06$	30 ± 1
8-Диметиламино(нор)-FMN	$1,15 \pm 0,07$	33 ± 2
8 α -(N-Ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN	$1,24 \pm 0,24$	260 ± 40

аналогов при связывании с гликогенфосфорилазой Б обусловлено, по-видимому, изменением микроокружения флавина при переходе в связанное состояние.

Взаимодействие FAD с гликогенфосфорилазой Б в отсутствие AMP не приводит к активации фермента: каталитическая активность гликогенфосфорилазы Б в присутствии 254 мкМ FAD не превышает 0,3% активности фермента в присутствии 0,1 мМ AMP. В присутствии аналогов FAD каталитическая активность гликогенфосфорилазы Б практически равна нулю. Эти данные свидетельствуют о том, что флавиновая часть FAD практически полностью элиминирует способность аденозин-5'-монофосфатной части FAD к активации гликогенфосфорилазы Б.

В настоящей работе впервые исследовано ингибирование гликогенфосфорилазы Б под действием FAD и его аналогов. FAD, 8 α -окси-, 8-диметиламино(нор)- и 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD снижают каталитическую активность гликогенфосфорилазы Б, индуцируемую AMP (рис. 5). Для проверки обратимости действия ингибиторов гликогенфосфорилазу Б инкубировали в течение различных промежутков времени (до 30 мин) с FAD и его аналогами, концентрации которых превышали в 3 раза максимальные концентрации, используемые для изучения их влияния на каталитическую активность гликогенфосфорилазы Б (концентрация флавина изменялась в интервале от 137 мкМ в случае 8 α -окси-FAD до 760 мкМ в случае FAD). Значения скорости ферментативной реакции, полученные после 25-кратного разбавления смеси фермента с FAD 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 FAD и его аналогами. Зависимость скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б, от концентрации флавина (рис. 5) удовлетворительно описывается уравнением Хилла, в котором предельное значение v при $[I]_0 \rightarrow \infty$ принимается равным нулю [9]. Значения коэффициентов Хилла и величин $[I]_{0,5}$ для FAD и его производных представлены в табл. 2. Величина n_H для FAD превышает единицу ($n_H = 1,37 \pm 0,02$), что указывает на существование положительных кооперативных взаимодействий между нуклеотидными ингибиторными центрами, занимаемыми FAD, в димерной молекуле гли-

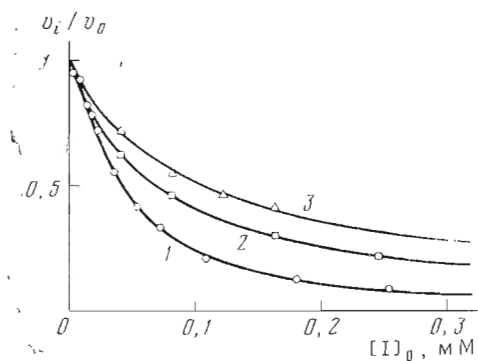


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость относительной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б, от концентрации ингибитора: FAD (1), 8-диметиламино(нор)-FAD (2), 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD (3). Точки — экспериментальные данные, сплошные кривые рассчитаны с использованием усредненных значений параметров уравнения Хилла (см. табл. 2)

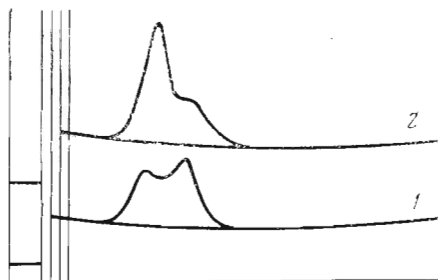


Рис. 6

Рис. 6. Шлирен-седиментограмма гликогенфосфорилазы Б (79,5 мкМ) в отсутствие (1) и в присутствии 165 мкМ FAD (2). Направление седиментации слева направо. Время седиментации 20 мин

когенфосфорилазы Б. Введение 8-диметиламиногруппы в положение 8 изоаллоксазинового кольца и N-ацетил-L-цистеин-S-ильной группы в положение 8 α вызывает исчезновение положительных кооперативных взаимодействий между центрами связывания флавина: величина n_H практически не отличается от единицы.

Введение заместителей в положение 8 изоаллоксазинового кольца FAD ухудшает связывание флавина с гликогенфосфорилазой Б, что проявляется в увеличении $[I]_{0,5}$ (табл. 2). Максимальное изменение сродства в ряду FAD и его аналогов наблюдается при переходе от FAD к 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD: величина $[I]_{0,5}$ для этого аналога почти в 2,5 раза больше величины $[I]_{0,5}$ для FAD. В ряду FMN и его аналогов максимальное увеличение $[I]_{0,5}$ по отношению к $[I]_{0,5}$ для FMN наблюдается для 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN. Однако в этом случае величина $[I]_{0,5}$ для аналога более чем в 19 раз превышает $[I]_{0,5}$ для FMN [5]. В случае 8 α -окси- и 8-диметиламинофлавинов относительное увеличение $[I]_{0,5}$ в ряду аналогов FMN проявляется в большей степени, чем в ряду аналогов FAD. Таким образом, сродство FAD к гликогенфосфорилазе Б менее чувствительно по сравнению с FMN к модификации изоаллоксазиновой части молекулы флавина по положению 8.

Наблюдаемые изменения сродства флавинов к гликогенфосфорилазе Б могут быть объяснены на основании следующей гипотетической модели. Можно полагать, что FAD и его аналоги так же, как и NADH, сохраняют свернутую конформацию при связывании в нуклеотидном ингибиторном центре гликогенфосфорилазы Б и адениновая часть флавина взаимодействует с аминокислотными остатками белка. Последнее предположение согласуется с фактом, что величина $[I]_{0,5}$ для 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD примерно в 2,5 раза меньше соответствующей величины для 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FMN. В рамках предложенной модели меньшее сродство гликогенфосфорилазы Б к FAD по сравнению с FMN объясняется заметным ослаблением контактов изоаллоксазинового кольца с белком при переходе от мононуклеотида к динуклеотиду, которое не полностью компенсируется появлением контактов белка с адениновой частью FAD. Предполагаемое ослабление контактов флавиновой части FAD позволяет объяснить пониженную специфичность нуклеотидного ингибиторного центра гликогенфосфорилазы Б в ряду аналогов FAD.

Нами было изучено также влияние FAD на ассоциацию гликогенфосфорилазы Б, индуцируемую AMP. Предварительно было показано, что в отличие от AMP FAD не вызывает ассоциации фермента. При достаточ-

но высоких концентрациях белка (79,5 мкМ) в присутствии 1,0 мМ АМР значительная доля фермента представлена тетрамерной формой (нижняя кривая на рис. 6; коэффициент седиментации тетрамерной формы составляет 12 S). Небольшой пик, седиментирующий с меньшей скоростью, соответствует димерной форме фермента. При внесении в систему FAD (165 мкМ) преобладающей становится димерная форма (коэффициент седиментации равен 8 S; верхняя кривая). Таким образом, FAD (подобно FMN) препятствует проявлению ассоциирующего действия АМР. Отчасти это объясняется тем, что FAD вызывает снижение средства фермента к АМР.

Экспериментальная часть

Выделение, приготовление растворов и определение концентрации гликогенфосфорилазы Б из скелетных мышц кролика, а также очистка и основные характеристики гликогена из печени свиньи описаны в предыдущей работе [5]. Синтетический FAD производства НПО «Витамины» очищали хроматографией на сефадексе G-25 (мелкий) [10]. 8 α -Окси-, 8-диметиламино(пор)- и 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD были синтезированы методами, описанными в работах [11–13] соответственно. Концентрации флавинов определяли спектрофотометрически с использованием следующих величин молярного поглощения: $\epsilon_{450}=1,13 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для FAD [8], $\epsilon_{505}=3,11 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для 8-диметиламино(пор)-FAD [14]. Величины молярного поглощения 8 α -окси- и 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD при 450 нм полагали равными величине молярного поглощения FAD при этой длине волны. В работе использовали динатриевую соль адензин-5'-монофосфорной кислоты и дикалиевую соль глюкозо-1-монофосфорной кислоты производства Reanal (Венгрия), остальные реактивы — производства «Союзреактив» марки х.ч. и ч.д.а.

Все эксперименты проводили в 0,05 М глицилглициновом буфере, рН 6,8, в присутствии 0,2 мМ EDTA.

Седиментационные исследования проводили на аналитической ультрацентрифуге Spinco, модель E, снабженной абсорбционной оптической системой, фотоэлектрическим сканирующим устройством и двухкоординатным самонисцем (EMG, NE-230). Эксперименты по связыванию проводили в присутствии 0,1 М KCl при 20° С.

В опытах по скоростной седиментации использовали четырехканальный ротор An-F Ti и двухсекторные ячейки с угольными, 12-мм вкладышами (№ 306493). Скорость вращения ротора составляла 60 000 об/мин, продолжительность опытов — до 1 ч. В одной ячейке находился раствор FAD, а в двух других — раствор FAD, содержащий гликогенфосфорилазу Б в разных концентрациях (общую концентрацию фермента в расчете на мономер варьировали в интервале 6–90 мкМ).

Опыты по равновесной седиментации проводили с использованием абсорбционной оптики и фотоэлектрического сканирующего устройства при скорости вращения ротора 9000 об/мин. Продолжительность опыта составляла 10 ч. В опыте использовали шестиканальный ротор An-G Ti и односекторные ячейки с 12-мм угольными вкладышами (№ 331344). Оптическое поглощение регистрировали по двухлучевой системе; в контрольной ячейке находился буферный раствор. Одна из ячеек содержала гликогенфосфорилазу Б, вторая — FAD, третья и четвертая — смесь фермента и FAD. В каждую ячейку заливали по 0,1 мл раствора, что соответствовало столбу жидкости высотой 1,5 мм согласно геометрии ячейки [15]. Во всех ячейках столбы жидкости были одинаковы (расхождение не более 0,3%). В ячейке, содержащей FAD, не обнаружено перераспределения лиганда на протяжении опыта.

Ассоциацию гликогенфосфорилазы Б изучали с помощью шлирен-оптики при 17° С в присутствии 0,1 М KCl и 1,0 мМ АМР. В опытах использовали двухканальный ротор An-D и односекторные ячейки с 12-мм вкладышами из алюминия (№ 334628). Скорость вращения ротора составляла 56 000 об/мин.

Абсолютный спектр оптического поглощения FAD, связанного гликогенфосфорилазой Б в присутствии 0,1 М КСl при 20° С, определяли по двухкюветной разностной схеме с использовавшем спектрофотометра Cary-219 (Varian). В кювету образца помещали смесь растворов флавина и белка (конечная концентрация — 50 мкМ FAD и 407 мкМ гликогенфосфорилазы Б в расчете на мономер), в кювету сравнения — раствор белка с такой же концентрацией, что и в кювете образца. *Абсолютный спектр FMN*, связанного гликогенфосфорилазой Б, получен по методу, описанному в работе [5]; концентрация FMN составляла 76 мкМ, фермента — 407 мкМ; степень насыщения флавина белком — 98%.

Разностные спектры комплексов гликогенфосфорилазы Б с FAD и его аналогами регистрировали по четырехкюветной схеме в присутствии 0,3 М КСl при 30° С. В ячейку образца помещали две кюветы с длиной оптического пути 0,5 см, заполненные смесью растворов фермента и флавина в соотношении 1:1 по объему; в ячейку сравнения помещали одну 0,5-см кювету с раствором фермента и такую же кювету с раствором флавина. Длина оптического пути этих четырех кювет отличалась не более чем на 0,1%. В разностные спектры гликогенфосфорилазы Б с FAD и 8-диметиламино(пор)-FAD вносили поправку на изменение оптического поглощения флавина при двукратном разбавлении раствора.

Ферментативную реакцию проводили в направлении синтеза гликогена в присутствии 0,1 мМ АМР, 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 КСl; расчет величины вклада глюкозо-1-фосфата в суммарную ионную силу раствора описан в предыдущей работе [5]. Каталитическую активность гликогенфосфорилазы Б определяли турбидиметрическим методом, описанным в работе [16], при 310 нм. Относительная ошибка определения скорости ферментативной реакции составляла 3%. Ферментативную активность в присутствии 8-диметиламино(пор)- и 8 α -(N-ацетил-L-цистеин-S-ил)-FAD определяли при 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.

Авторы выражают благодарность В. Я. Черняку и Н. Н. Магретовой за помощь в проведении опытов по равновесной седиментации и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kasvinsky P. J., Madsen N. B., Sygusch J., Fletterick R. J. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 9, p. 3343–3351.
2. Kasvinsky P. J., Shechosky S., Fletterick R. J. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 24, p. 9102–9106.
3. Sprang S., Fletterick R., Stern M., Yang D., Madsen N. B., Sturtevant J. Biochemistry, 1982, v. 21, № 9, p. 2036–2048.
4. Stura E. A., Zanotti G., Babu Y. S., Sansom M. S. P., Stuart D. J., Wilson K. S., Johnson L. N., Van de Werve G. J. Mol. Biol., 1983, v. 170, № 2, p. 529–565.
5. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Глебова Г. Д., Пекель Н. Д., Березовский В. М. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 9, с. 1161–1170.
6. Березовский В. М., Жилина Т. А. Химия природн. соедин., 1979, № 3, с. 255–275.
7. Steinberg I. Z., Schachman H. K. Biochemistry, 1966, v. 5, № 12, p. 3728–3747.
8. Березовский В. М. Химия витаминов. М.: Пищевая пром-сть, 1973, с. 548–552.
9. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978, с. 42–45.
10. Хомугова Е. Д., Шапиро Т. А., Мезенцева М. В., Березовский В. М. Хим.-фарм. журн., 1967, № 1, с. 11–15.
11. Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Березовский В. М. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1536–1541.
12. Литвак Ж. И., Березовский В. М. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 47–55.
13. Жилина Т. А., Березовский В. М. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 11, с. 1565–1571.
14. Kasai S., Miura R., Matsui K. Bull. Chem. Soc. Japan, 1975, v. 48, № 10, p. 2877–2880.
15. Черняк В. Я. В кн.: Физико-химические методы в молекулярной биологии. М.: Изд-во МГУ, 1978, с. 88.
16. Сугробова Н. П., Лисовская Н. П., Курганов Б. И. Биохимия, 1982, т. 47, вып. 11, с. 1883–1888.

Поступила в редакцию
11.VII.1984

THE INTERACTION OF MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE b WITH
FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE AND ITS ANALOGUES

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

BEREZOVSKII V. M.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

The inhibition of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b by FAD and its analogues with substitutes in the position 8 has been studied. The value of half-saturation, $[I]_{0.5}$, for inhibitors increases in the following order: FAD (44 μM), 8 α -hydroxy-FAD (60 μM), 8-dimethylamino(nor)-FAD (69 μM), 8 α -(N-acetyl-L-cystein-S-yl)-FAD (106 μM). From the comparison of these values with those obtained earlier for FMN analogues, it follows that in the case of FAD the half-saturation value is less sensitive to modification of the position 8 in the flavin isoalloxazine ring. The existence of the glycogen phosphorylase b FAD-complex has been proved by the spectrophotometry and sedimentation methods. The positions of maxima of optical absorption of the enzyme-bound FAD in the 300–500 nm region are identical with corresponding positions for FMN. FAD has been shown to hinder the AMP-induced transition of dimeric form of the enzyme to tetrameric one.