



УДК 577.152.241*1.042

ИНГИБИРОВАНИЕ МЫШЕЧНОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ *b*
5-МЕТИЛТЕТРАГИДРОФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ, 3'-ХЛОР-
И 3',5'-ДИХЛОРМЕТОТРЕКСАТАМИКлинов С. В., Курганов В. И., Шейман В. М.,
Горелик Е. Ш.-Б., Виринберг Е. М., Рудакова И. П.

Научно-производственное объединение «Витамины», Москва

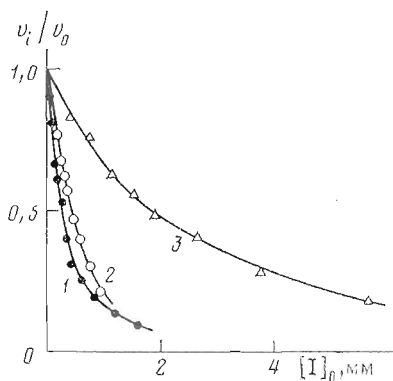
Изучено ингибирование гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислотой, 3'-хлор- и 3',5'-дихлорметотрексатами. Ингибирование обратимо и характеризуется положительной кинетической кооперативностью (коэффициент Хилла превышает единицу). Значения концентраций птеринов, необходимых для двукратного уменьшения скорости ферментативной реакции, возрастают в ряду 3',5'-дихлорметотрексат, 3'-хлорметотрексат, 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота (0,24; 0,40 и 1,87 мМ соответственно). Сопоставление концентраций «полунасыщения» для изученных соединений с соответствующими величинами для метотрексата и фолиевой кислоты свидетельствует о том, что сродство птериновых соединений к гликогенфосфорилазе *b* зависит от природы заместителей как в птеридиновой, так и в *n*-аминобензойной частях молекулы птерина. При совместном действии модификаторов на гликогенфосфорилазу *b* проявляется антагонизм между 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислотой, 3'-хлор- и 3',5'-дихлорметотрексатами, с одной стороны, и АМР и FMN — с другой.

Гликогенфосфорилаза (КФ 2.4.1.1) катализирует реакцию фосфорилаза гликогена, в результате которой от макромолекулы полисахарида отщепляется один глюкозильный остаток в форме глюкозо-1-фосфата. Дефосфорилированная форма фермента (гликогенфосфорилаза *b*) проявляет каталитическую активность только в присутствии аллостерического активатора АМР. Фосфорилированная форма фермента (гликогенфосфорилаза *a*) обладает каталитической активностью и в отсутствие АМР [1]. Обе формы фермента проявляют чувствительность к ингибированию природными гетероциклическими соединениями, в том числе фолиевой кислотой и некоторыми другими соединениями птеринового ряда [2, 3]. В частности, ингибиторами гликогенфосфорилазы *a* являются ксантоптерин и биоптерин [2], а гликогенфосфорилазу *b* ингибируют метотрексат и 5-формил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота [3]. Поэтому представлялось интересным изучение 3'-хлор- и 3',5'-дихлорметотрексатов и 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты с целью выяснения вклада заместителей в птеридиновой и *n*-аминобензойной частях молекулы птерина в его ингибиторные свойства в отношении гликогенфосфорилазы *b*.

Ингибирование гликогенфосфорилазы *b* в присутствии 3'-хлор-, 3',5'-дихлорметотрексатов и 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты проявляется в снижении каталитической активности фермента, индуцируемой АМР (рисунок). Обратимость ингибирования гликогенфосфорилазы *b* птеринами следует из того, что предварительное смешивание раствора фермента с концентрированным раствором ингибитора не приводит к изменению степени ингибирования фермента по сравнению со смешиванием раствора фермента с разбавленным раствором ингибитора (при условии равенства конечных концентраций фермента и ингибитора). Количественный анализ ингибирования проводили с использованием следующей линейной формы уравнения Хилла (см. [4]):

$$\lg \left(\frac{v_0}{v_i} - 1 \right) = h \lg [I]_0 - h \lg [I]_{0,5} \quad (1)$$

Зависимость относительной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой *b* в присутствии 0,1 мМ АМР, от концентрации 3',5'-дихлорметотрексата (1), 3'-хлорметотрексата (2) и 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты (3)



где v_0 и v_i — начальные скорости ферментативной реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно, $[I]_0$ — общая концентрация ингибитора, $[I]_{0,5}$ — значение $[I]_0$, при котором $v_i/v_0=0,5$, h — коэффициент Хилла. Параметры уравнения (1) и их стандартные ошибки определяли с использованием метода наименьших квадратов. Ингибирование гликогенфосфорилазы *b* 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислотой, 3'-хлор- и 3',5'-дихлорметотрексатами характеризуется положительной кинетической кооперативностью (таблица). Это указывает на существование положительных кооперативных взаимодействий между центрами связывания птеринов в димерной молекуле гликогенфосфорилазы *b*. Значения коэффициентов Хилла для различных птериновых соединений мало отличаются друг от друга, в то время как величина $[I]_{0,5}$ для 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты в присутствии 0,1 мМ АМР в 7 раз превышает соответствующую величину для 3',5'-дихлорметотрексата. Сравнение величин $[I]_{0,5}$ для метотрексата [3], 3'-хлор- и 3',5'-дихлорметотрексатов свидетельствует о том, что введение одного или двух атомов хлора в *n*-аминобензойную часть молекулы метотрексата приводит к значительному уменьшению концентрации «полунасыщения» (в 2,5 и 4 раза соответственно). Сопоставление величин $[I]_{0,5}$ для 5-формил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой [3] и 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислот указывает на то, что замена формильной группы в положении 5 птеридиновой части молекулы тетрагидрофолиевой кислоты на метильную группу приводит к двукратному уменьшению концентрации «полунасыщения». Таким об-

Влияние АМР и FMN на параметры уравнения Хилла для ингибирования мышечной гликогенфосфорилазы *b* птеринами

Птерин	0,1 мМ АМР		1,0 мМ АМР		0,1 мМ АМР + + 84 мкМ FMN		1,0 мМ АМР + + 84 мкМ FMN	
	h	$[I]_{0,5}$, мМ	h	$[I]_{0,5}$, мМ	h	$[I]_{0,5}$, мМ	h	$[I]_{0,5}$, мМ
3'-Хлорметотрексат	1,45± ±0,03	0,40± ±0,01	1,13± ±0,01	1,13± ±0,01	1,50± ±0,06	0,94± ±0,03	1,36± ±0,02	1,47± ±0,02
3',5'-Дихлорметотрексат	1,24± ±0,01	0,24± ±0,04	1,44± ±0,03	0,82± ±0,02	1,39± ±0,06	0,74± ±0,02	1,18± ±0,01	0,89± ±0,01
5-Метил-5,6,7,8-тетра- гидрофолиевая кис- лота	1,19± ±0,07	1,87± ±0,01	1,48± ±0,05	4,5± ±0,2	1,23± ±0,06	2,8± ±0,2	1,3± ±0,2	3,9± ±0,6
Метотрексат *	1,17± ±0,01	1,01± ±0,01	1,68± ±0,05	2,41± ±0,05	1,41± ±0,05	2,55± ±0,08	1,30± ±0,01	3,01± ±0,03
5-Формил-5,6,7,8-тетра- гидрофолиевая кис- лота *	1,31± ±0,02	3,70± ±0,05	1,14± ±0,02	7,7± ±0,1	1,41± ±0,01	8,20± ±0,05	1,08± ±0,01	9,5± ±0,1

* По данным работы [3].

разом, сродство птериновых соединений к гликогенфосфорилазе *b* зависит от природы заместителей как в птеридиновой, так и в *n*-аминобензойной частях молекулы птерина.

Влияние аллостерического активатора АМР и аллостерического ингибитора FMN на ингибирование гликогенфосфорилазы *b* 3'-хлор-, 3',5'-дихлорметотрексатами и 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислотой проявляется в изменении параметров уравнения Хилла (таблица). Присутствие 1,0 мМ АМР приводит к увеличению коэффициентов Хилла для 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты и 3',5'-дихлорметотрексата, но к уменьшению величины *h* для 3'-хлорметотрексата. Добавление 84 мкМ FMN мало влияет на величину коэффициентов Хилла для этих соединений. Для всех птеринов наблюдается значительное увеличение параметра $[I]_{0,5}$ в присутствии 1,0 мМ АМР, 84 мкМ FMN и их сочетания. Это свидетельствует об уменьшении сродства гликогенфосфорилазы *b* к птеринам в присутствии аллостерических эффекторов АМР и FMN. Таким образом, при совместном действии модификаторов на гликогенфосфорилазу *b* наблюдается антагонизм между 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислотой, 3'-хлор- и 3',5'-дихлорметотрексатами, с одной стороны, и АМР и FMN — с другой.

Экспериментальная часть

Выделение и приготовление растворов гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика, а также очистка и основные характеристики гликогена из печени свиньи описаны в работе [5]. Концентрацию гликогенфосфорилазы *b* определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием удельного коэффициента поглощения, равного $1,32 \text{ (г/л)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [6]. Бариевую соль 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты синтезировали по методу, описанному в работе [7], и далее использовали для получения 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты по методу, описанному в работе [8]. 3'-Хлор- и 3',5'-дихлорметотрексаты получены по методикам, описанным в работе [9]. Концентрации птеринов определяли спектрофотометрически с использованием следующих величин коэффициента молярного поглощения ($\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$): $\epsilon_{290} = 31,7 \cdot 10^3$ для 5-метил-5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты [10], $\epsilon_{370} = 7,3 \cdot 10^3$ для 3'-хлорметотрексата и $\epsilon_{370} = 7,4 \cdot 10^3$ для 3',5'-дихлорметотрексата. Последние величины были рассчитаны исходя из $\epsilon_{370} = 7,5 \cdot 10^3$ и $7,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для растворов 3'-хлор- и 3',5'-дихлорметотрексатов соответственно в 0,1 М NaOH [11] и соотношений величин оптического поглощения при 370 нм, равных 1,03, для эквимольных растворов обоих хлорпроизводных метотрексата в 0,1 М NaOH и в 0,05 М глицилглициновом буфере, pH 6,8, который применяли в опытах с ферментом. В работе использовали динатриевую соль аденозин-5'-монофосфорной кислоты и дикалиевую соль глюкозо-1-фосфорной кислоты (Reanal, Венгрия), FMN (НПО «Витамины»), остальные реактивы — производства «Союзреактив» марки х.ч. и ч.д.а. Все растворы использовали в течение одного дня.

Каталитическую активность гликогенфосфорилазы *b* определяли турбидиметрическим методом, описанным в работе [12], при 500 нм. Ферментативную реакцию проводили в направлении наращивания полисахаридных цепей гликогена в присутствии 4 мМ глюкозо-1-фосфата, 1 г/л гликогена и 0,3 М KCl при 30° С. Реакцию запускали добавлением 50 мкг гликогенфосфорилазы *b* к реакционной смеси, конечный объем которой составлял 2,5 мл. Относительная ошибка определения скорости ферментативной реакции составляла 4%. Специально было показано, что порядок добавления компонентов не влияет на величину начальной скорости ферментативной реакции. Все эксперименты проводили в 0,05 М глицилглициновом буфере, pH 6,8, в присутствии 0,2 мМ EDTA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graves D. J., Wang J. H. // The Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1972. V. 7. P. 435–482.
2. Kasvinsky P. J., Shechosky S., Fletterick R. J. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 24. P. 9102–9106.
3. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Шейман Б. М., Биринберг Е. М., Курганов Б. И., Рудакова И. П. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 7. С. 908–914.
4. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. С. 43.
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. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1161–1170.
6. Vuc M. H., Ulmann A., Goldberg M., Vuc H. // Biochimie. 1971. V. 53. № 3. S. 283–289.
7. Горелик Е. Ш.-Б., Биринберг Е. М., Рудакова И. П., Велицкий Г. А. // Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. Материалы III Всесоюзного совещания. Черногоровка. 1987. С. 17–19.
8. Roth B., Hultquist M. E., Fahrenbach M. J., Cosulich D. B., Broquist H. P., Brock-

- man J. A., Jr., Smith J. M., Jr., Parker R. P., Stockstad E. L. R., Jukes T. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. № 13. P. 3247-3252.
9. Martinelli J. E., Chaykovsky M. // J. Org. Chem. 1980. V. 45. № 3. P. 527-529.
10. Gupta V. S., Huennekens F. M. // Arch. Biochem. and Biophys. 1967. V. 120. № 3. P. 712-718.
11. Angier R. B., Curran W. V. // J. Amer. Chem. Soc. 1959. V. 81. № 11. P. 2814-2818.
12. Сурророва Н. П., Лисовская Н. П., Курганов Б. И. // Биохимия. 1982. Т. 47. Вып. 11. С. 1883-1888.

Поступила в редакцию
17.II.1988

**THE INHIBITION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE *b*
BY 5-METHYLTETRAHYDROFOLIC ACID, 3'-CHLORO- AND
3',5'-DICHLOROMETHOTREXATES**

**KLINOV S. V., KURGANOV B. I., SHEIMAN B. M., GORELIK E. Sh.-B.,
BIRINBERG E. M., RUDAKOVA I. P.**

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

Inhibition of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b* by 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, 3'-chloro- and 3',5'-dichloromethotrexates has been studied. The inhibition is reversible and characterized by positive kinetic cooperativity (Hill coefficient exceeds 1). The values of pterin concentration causing two-fold diminishing of the enzymatic reaction rate increased in the order: 3',5'-dichloromethotrexate, 3'-chloromethotrexate, 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (0.24, 0.40 and 1.87 mM, respectively). Comparison of «half-saturation» concentrations for the above compounds and for methotrexate and folinic acid shows that pterin affinity to glycogen phosphorylase *b* is affected by substituents both in pteridine and in *p*-aminobenzoic moieties of the pterin molecule. The antagonism between 5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, 3'-chloro- and 3',5'-dichloromethotrexates, on the one hand, and AMP and FMN, on the other, is revealed for combined action of modifiers on glycogen phosphorylase *b*.