

# FEHÉRJÉK FOSZFORILÁCIÓS ÉS DEFOSZFORILÁCIÓS ÁTALAKULÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSA

GERGELY PÁL és BOT GYÖRGY

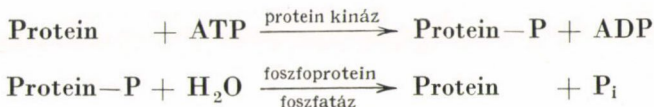
Debreceni Orvostudományi Egyetem Orvosi Vegytani Intézete

## Bevezetés

A sejt anyagcsere folyamataiban lejátszódó foszforilációs-defoszforilációs folyamatokra a glikolízis és glikogenolízis intermedierjeinek megismerése hívta fel a figyelmet. A glikogén, ill. a glukóz lebontása és szintézise kovalens foszfátot tartalmazó vegyületeken keresztül valósul meg. A fehérjék foszforilációja alatt a tartósan, hosszabb ideig megmaradó foszfát beépülését értjük. A foszfáttal alkotott kovalens kötés kialakulása és felbomlása az enzimfehérjékben rendszerint konformációs változásokat okoz, amelyek katalitikus képességüket ( $v_{\max}$ ,  $K_m$ ) vagy regulálhatóságukat nagymértékben befolyásolják.

A foszforilációs-defoszforilációs átalakításoknak kitett enzimek prototípusa a glikogén foszforiláz (EC 2.4.1.1). CORI és mtsai már 1938-ban leírták a foszforiláz két formáját, amikről később bebizonyosodott, hogy a foszforilált és a foszforilálatlan formákkal azonosak (KREBS és FISCHER 1956). Napjainkban már húsznál több olyan enzimet ismerünk, amelyeknek foszfo és defoszfo alakja van. Ezekről kitűnő áttekintést ad KREBS és BEAVO (1979) összefoglalója. Nem-enzimatikus fehérjék is szerepelhetnek a foszforilációs-defoszforilációs folyamatok szubsztrátjaként. Ide sorolhatók a hisztonok, a protaminok, a nem-hiszton jellegű magfehérjék, a riboszóma különböző fehérjéi, membránokhoz szorosan kötött fehérjék, továbbá a kontraktilis rendszer fehérjéi (troponin I és T, miozin könnyű lánc); csak néhány példát ragadva ki a nem-enzim jellegű fehérjék közül. Úgy tűnik, hogy a sejtnek nincs olyan része, amelyben a foszforiláción és defoszforiláción alapuló szabályozás ne játszódna le.

A fehérjék foszforilált és defoszforilált alakja szükségszerűvé teszi a foszforilálást katalizáló kinázok és a defoszforilálást végző foszfatázok, azaz az átalakító enzimek létezését is:



A foszforiláció rendszerint a fehérje meghatározott aminosav részletén (szerin-OH, ritkán treonin-OH csoporton) következik be. Általában az ATP

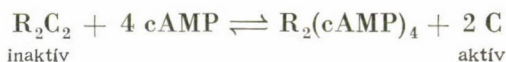
terminális foszfátja szerepel donorként, kivételes esetben GTP is megfelelő. Az átalakító enzimek tisztítása, specificitásuknak és kinetikájuknak a megismerése jelentős, mivel sok esetben ezen átalakító enzimek a reguláció kulcspontjai.

Ebben az összefoglalóban kizárólag az enzimek foszforilációs-defoszforilációs átalakulásait tekintjük át. Nem kívánunk teljességre törekedni, hiszen az utóbbi években több összefoglaló is jelent meg erről a területről (RUBIN és ROSEN 1975, NIMMO és COHEN 1977, COHEN 1978). Elsősorban a foszforilációs és defoszforilációs folyamatok szabályozási mechanizmusát ismertetjük. A DOTE Orvosi Vegytani Intézetben folyó kutatások erre a területre összpontosultak, így az összefoglaló saját eredményeinket és a szakirodalom ezzel kapcsolatos legújabb adatait tekinti át.

### Protein kinázok és szabályozásuk

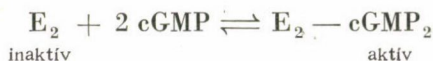
A sejtekben levő protein kinázok különböző regulátor molekulák jeleit alakítják át biológiai hatássá, foszfátot építve be a fehérjékbe. A ciklikus AMP (cAMP) volt az elsőként felismert regulátor molekula, amely specifikusan aktivált bizonyos kinázokat. Mai ismereteink szerint a cAMP, cGMP,  $Ca^{++}$ -ion és a kettősszálú RNS szabályozhatja a protein kinázok katalitikus aktivitását. A kettősszálú RNS aktiváló hatását a protein kinázra a transláció szabályozásában ismerték fel (OCHOA és DE HARO 1979). Ezen kívül számos olyan kinázt írtak le, amelyeknek aktivitása nem függ — mai ismereteink szerint — regulátor molekuláktól.

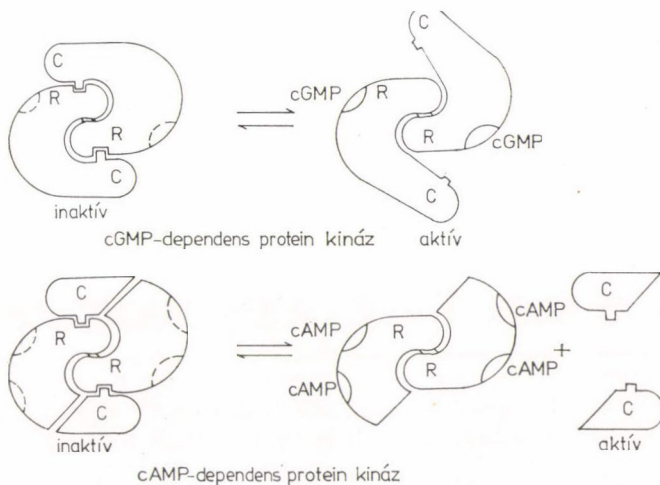
*Ciklikus nukleotid dependens protein kinázok.* A cAMP-dependens protein kinázok az alábbi módon aktiválódnak:



A különböző szövetekből előállított cAMP-dependens kinázok közös jellemzője, hogy két katalitikus (C) és két regulátor (R) alegységből állnak. Az aktiválás mechanizmusa valószínűleg az, hogy létrejön a holoenzim és cAMP komplexe, amelyről aztán ledisszociál a szabad katalitikus alegység (CHAU és mtsai 1978). Lehetséges, hogy már a C, R és cAMP terner komplexe is enzimatikusan aktív. Kétféle típusát írták le a cAMP-dependens protein kinázoknak, amelyeknek szubsztrátspecificitása ugyanaz, de intracelluláris lokalizációja és cAMP iránti affinitása eltérő (HOFFMANN és mtsai 1975, CORBIN és mtsai 1978). Az egyik típus R alegysége autofoszforiláció révén foszforilálódhat is, ezzel megnő cAMP iránti affinitása (EHRlichMAN és mtsai 1974).

A cGMP dependens protein kináz két azonos alegységből (E) álló inaktív dimer, amely cGMP hatására átalakul aktív dimerré:



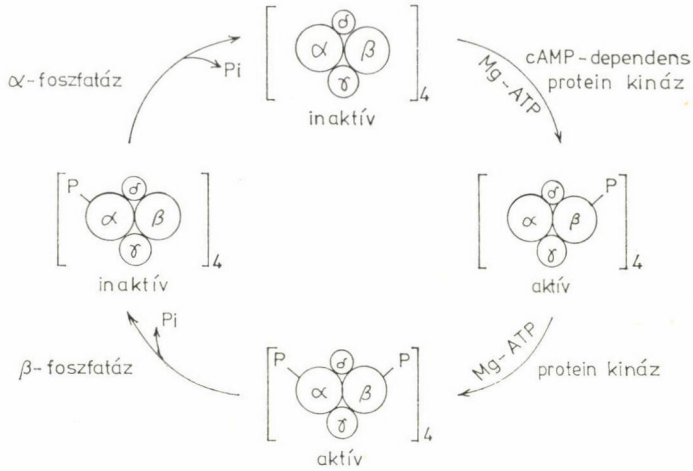


I. ábra. cAMP- ill. cGMP-dependens protein kinázok aktiválási mechanizmusa (GILL 1977 alapján)

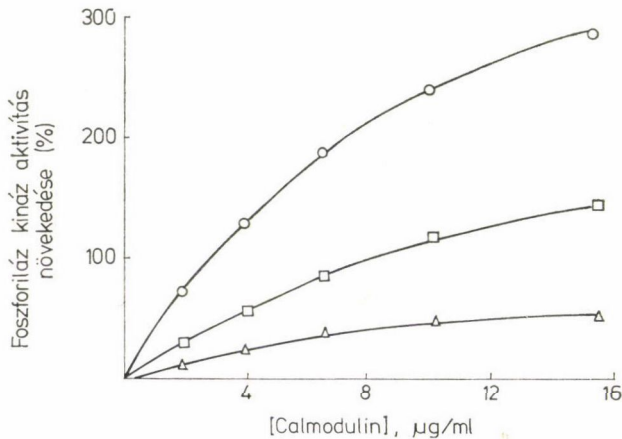
Kimutatták, hogy egyetlen alegység tartalmazza a cGMP kötőhelyet és az aktív centrumot, továbbá autofoszforiláció is szerepet játszhat az aktiválás szabályozásában (LINCOLN és mtsai 1978). A cAMP- és cGMP-dependens proteín kinázok aktiválási mechanizmusát foglalja össze az I. ábra.

**Ca<sup>++</sup> dependens proteín kinázok.** Ebbe a csoportba tartozik a foszforiláz kináz és a miozin könnyű láncának kináza. Közös vonásuk, hogy tartalmaznak egy specifikus Ca<sup>++</sup>-kötő fehérjét: a *calmodulint*. Napjainkban a calmodulin (Ca-dependens regulátor, foszfodieszteráz aktivátor) a kutatás előterébe került, jelentős szerepet játszik a Ca<sup>++</sup>-ion fiziológiai hatásának közvetítésében (GEISOW 1978, WAISMAN és mtsai 1978). Mindkét enzimfehérje csak Ca<sup>++</sup> jelenlétében aktív és meghatározott szubsztrátjaik vannak (foszforiláz-*b*, ill. a miozin 20 000 dalton tömegű könnyű lánc). Újabb adatok szerint más foszforproteinek foszforilációját is katalizálhatják (KREBS és BEAVO 1979), bár ezek nem feltétlenül jelentenek fiziológias szubsztrátot.

A foszforiláz kináz aktivitása foszforiláció-defoszforiláció útján szabályozódik (2. ábra). COHEN (1973, 1978), HAYAKAWA és mtsai (1973) kimutatták, hogy a foszforiláz kináz négy különböző alegysége közül az  $\alpha$  és  $\beta$  alegység foszforilálódik. A foszforiláció először a  $\beta$  alegységen következik be a cAMP-dependens proteín kináz hatására. A  $\beta$  alegységén foszforilált kináz már „aktivált” kináz, enzimaktivitása maximális. A  $\beta$  alegységbe épült foszfát lehasítása foszforprotein foszfatáz hatására csak akkor következhet be, ha a  $\beta$  alegységet követően az  $\alpha$  is foszforilálódik. A foszforilációnak ez a második helye az enzim aktivitását már nem befolyásolja, de lehetővé teszi a foszfatázok működését. Ezek hatásaként előbb a  $\beta$ , majd az  $\alpha$  alegységből hasad le a foszfátcsoport (COHEN és mtsai 1974, YEAMAN és COHEN 1975, COHEN 1978). A foszforiláz



2. ábra. A foszforiláz kináz szabályozása cAMP-dependens protein kinázzal,  $\alpha$ - és  $\beta$ -foszfo-protein foszfatázzal (COHEN 1978 alapján)



3. ábra. Calmodulin hatása a foszforiláz kináz aktivitására. Calmodulin aktivitás növelő hatása 1  $\mu\text{M}$  (○), 5  $\mu\text{M}$  (□) és 20  $\mu\text{M}$  (△)  $\text{Ca}^{++}$  jelenlétében (GERGELY és mtsai 1980)

kináz  $\gamma$  alegysége a katalitikus alegységgel (SKUSTER és GRAVES 1977),  $\delta$  alegysége a calmodulinnal azonos (COHEN és mtsai 1978).

A foszforiláz kináz ugyan tartalmaz calmodulint, aktivitása mégis fokozható calmodulin hozzáadására (3. ábra). Az aktivitás növekedése kis  $\text{Ca}^{++}$  koncentrációkban a legnagyobb. Kinetikai és kötődési vizsgálatokból kiderült, hogy a calmodulin növeli a foszforiláz kináz affinitását a  $\text{Ca}^{++}$ -ionhoz, továbbá a fehérje nem tartalmaz ekvimoláris mennyiségű calmodulint (GERGELY és mtsai 1980). Ezt erősíti meg egy másik laboratóriumi kísérlete is (COHEN és mtsai 1979). Így a foszforiláz kinázban a calmodulin nem tekinthető feltétlenül

alegységnek, hanem a kinázzal asszociálódó és a tisztítás során többé-kevésbé együttmaradó, szabályozó molekulának.

A miozin könnyű láncát foszforiláló kinázban a calmodulint, mint  $\text{Ca}^{++}$ -ionot megkötő alegységet azonosították (BARYLKO és mtsai 1978). Ennél az enzimmél is felvetették a foszforiláció szabályozó lehetőségét (ADELSTEIN és mtsai 1978). Úgy tűnik, hogy mindkét ebbe a csoportba tartozó protein kináz aktivitását reverzibilis kovalens módosítás és  $\text{Ca}^{++}$ -ion szabályozhatja.

### Foszfoprotein foszfatázok és szabályozásuk

A foszfatázok szerepe a fehérjékbe épült foszfátcsoport kihatása, ezzel a kovalens módosítás reverzibilissé tétele. Az utóbbi években az érdeklődés jelentősen megnőtt a foszfatázok iránt. Ezek a kutatások két területen hoztak lényegesen újat: (1) foszfatázok szerkezete és specifikusa, (2) a defoszforilációs reakciók szabályozása.

(1) Többféle módszerrel sikerült előállítani egy 33—35 000 dalton tömegű foszfatázt, amely a legkülönbözőbb foszfoproteinek defoszforilációját katalizálja (BRANDT és mtsai 1975, GRATECOS és mtsai 1977). Ezzel egyidejűleg más kutatócsoportok a legkülönbözőbb molekulásúlyú foszfatázokról adtak hírt. A preparátumokat különféle szövetekből állították elő, csak részben tisztított foszfatázokhoz jutva. Úgy tűnik, hogy a 33—35 000 dalton tömegű rész a katalitikus alegységgel lehet azonos, amely *in vivo* nem szabadon, hanem kötött állapotban fordul elő, más fehérjékkel nagyobb molekulásúlyú asszociátumokat alkotva. MELLGREN és mtsai (1979) beszámolnak egy 260 000 dalton tömegű „natív” foszfatázzal, amely tartalmazza a már korábban leírt katalitikus alegységet is. Endogén  $\text{Ca}^{++}$ -dependens proteázok kisebb molekulásúlyú formákká alakíthatják át. Ez utóbbi magyarázatot adhat az irodalomban közölt változatos molekulásúlyú formákra is.

(2) A defoszforilációs reakciók az enzim (foszfatáz) és a szubsztrát (foszfoprotein) szintjén szabályozhatók. A későbbiekben részletesen foglalkozunk a különböző szabályozási lehetőségekkel, itt csak a foszfatázra ható szabályozást ismertetjük.

A foszfoprotein foszfatázok közül legrészletesebben a foszforiláz-*a*-t defoszforiláló ún. *foszforiláz foszfatázt* tanulmányozták. Ennek katalitikus alegysége ( $M_r = 35\ 000$ ) erősen kötött kétértékű fémiónt (feltehetően  $\text{Mn}^{++}$ -t) tartalmaz. Eltávolítása kelátképzőkkel (EDTA, ATP, ADP,  $\text{PP}_i$  . . .) a foszfatáz aktivitás gátlódásához vezet (HSIAO és mtsai 1978). Hasonló mechanizmussal magyarázható a fluoridion gátló hatása is. A gátlás fémióntok hozzáadásával ( $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) megszüntethető (KHATRA és SODERLING 1978).

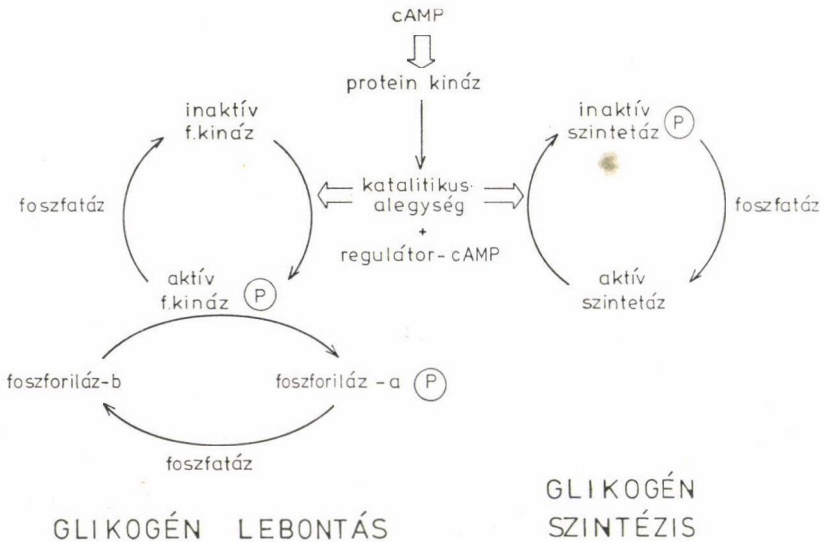
A foszfatázra hatva fejti ki reguláló hatását az *inhibitor-I* is. Ezt a 20 000 dalton tömegű, hőstabil fehérjét a cAMP-függő protein kináz reverzibilisen

foszforilálhatja egy treonin—OH csoporton. Csak foszforilált állapotban gátolja a foszfatázt. Vázizomban az inhibitor-1 koncentrációja elegendő ahhoz, hogy a foszfatáz szabályozásában (időleges gátlásában) szerepet játszasson (NIMMO és COHEN 1978). Az inhibitor-1 foszforilációját és ezzel gátlóképességének fokozódását *in vivo* is kimutatták (TÓTH és mtsai 1977). Ezeket az adatokat vázizom foszforiláz-foszfatázra közték, de hasonló regulációval lehet számolni más szövetekben is.

Megoldásra váró kérdés maradt a foszfoprotein foszfatázok szubsztrát-specifitása. Míg a 35 000 dalton tömegű katalitikus alegység sokféle foszfoprotein defoszforilációját katalizálja, addig a „natív” foszfatázok már specifikusabbak. Lehetséges, hogy az asszociálódó fehérjék biztosítják a szubsztrát-specifitást, fiziológiailag hatékonyabbá változtatva a katalitikus alegységet az egyes szubsztrátok iránt.

#### A glikogénanyagcsere szabályozása enzimfehérjék foszforilálásával és defoszforilálásával

A glikogénanyagcsere szabályozása kinázok és foszfatázok útján valósul meg. A glikogén metabolizmusát katalizáló enzimrendszert mutatja be a 4. ábra. Látható, hogy a lebontást katalizáló *foszforiláz* két formában fordul elő: foszforilált aktív (a) és defoszforilált inaktív (b). A szintézist elősegítő *glikogén szintetáz* foszfo formája az inaktív és defoszfo alakja a katalitikusan aktív.



4. ábra. A glikogén anyagcsere enzimrendszere

Így a glikogénanyagcsere a cAMP-dependens protein kináz által biztosított foszforilációs szabályozás alatt áll. Az ATP-ből hormonális hatásra (adrenalin, glukagon) képződő cAMP, aktiválva a protein kinázt, foszforilációs reakciósorozatot indít be. A cAMP-dependens protein kináz fontos szerepet játszik a glikogén szintézis és lebontás koordinálásában, mivel a glikogén szintetáz foszforilációjával a szintézis megállítását, a foszforiláz kináz foszforilációjával a foszforiláz- $b \rightarrow a$  átalakulást és ezzel a lebontást segíti elő. Ezen folyamatok során felerősödik a cAMP koncentráció emelésével kapott jel (*kaskád hatás*).

A glikogénanyagcsere enzimei, amelyek a sejt szolubilis frakciójához tartoznak, *in vivo* valószínűleg szoros egységben fordulnak elő (DOMBRÁDI és mtsai 1980). A fehérjemolekulák közötti asszociációt igazolták a frontál analízises gélszűrővel végzett kísérletek eredményei. Kimutattuk, hogy a foszforiláz és átalakító enzimei (foszforiláz kináz és foszfatáz) komplexet alkotnak az intracellulárisan előforduló fehérjekoncentrációkban. A komplex képződését befolyásolja a  $Ca^{++}$ -ion (GERGELY és mtsai 1975) és kimutathatók nyúl vázizom tömény kivonatában is (GERGELY és mtsai 1974).

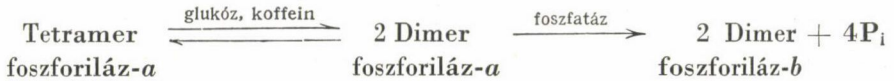
A glikogénlebontás (és -szintézis) sebességét nemcsak a foszforilációs reakciók határozzák meg, hanem a defoszforilációs folyamatok is. Így a szabályozásban szerepet játszanak a foszfoprotein foszfatázok is. A glikogén mobilizálása szempontjából különösen jelentős a foszforiláz- $a$  defoszforilációja (inaktiválása), mivel ez biztosíthatja a szövetekben képződött foszforiláz- $a$  „élettartamát” és ezzel a glikogénlebontás mértékét.

### A foszforiláz- $a$ defoszforilálásának szabályozása

#### *A foszforiláz- $a$ dimer $\rightleftharpoons$ tetramer egyensúlyának szerepe*

A foszforiláz foszfatáz (továbbiakban foszfatáz) szubsztrátja a foszforiláz- $a$  azonos alegységekből álló, katalitikusan aktív dimer, ill. kevésbé aktív tetramerként fordulhat elő. A dimer és tetramer alak egyensúlya a hőmérséklettől, a fehérjekoncentrációtól és a pH-tól függ (GRAVES és WANG 1972). A foszforiláz- $a$  defoszforilációja alacsony hőmérsékleten (15–23 °C) nem játszódik le, mivel a tetramer foszforiláz- $a$ -ra a foszfatáz nem hat, csak a dimer  $a$ -t képes defoszforilálni (BOT és DÓSA 1971, BOT és GERGELY 1972). Egyes ligandok (koffein, glukóz) jelenlétében azonban alacsony hőmérsékleten (15–23 °C) is defoszforilálódik a foszforiláz- $a$ . Szedimentációs vizsgálatokkal igazolták, hogy pl. a koffein a tetramer foszforiláz- $a$ -t dimerekre disszociálja és ezzel lehetővé teszi a defoszforilálást (BOT és mtsai 1977). Hasonló mechanizmussal magyarázható a glukóz és glikogén alacsony hőmérsékleten tapasztalt defoszforilációt gyorsító hatása. Magasabb hőmérsékleten ezek a ligandok nem fokozzák a defoszforiláció sebességét, mivel az egyensúly nagymértékben a dimer

foszforiláz-*a* irányába tolódik el. Ezek alapján a foszfatáz funkciója a következőképpen értelmezhető:

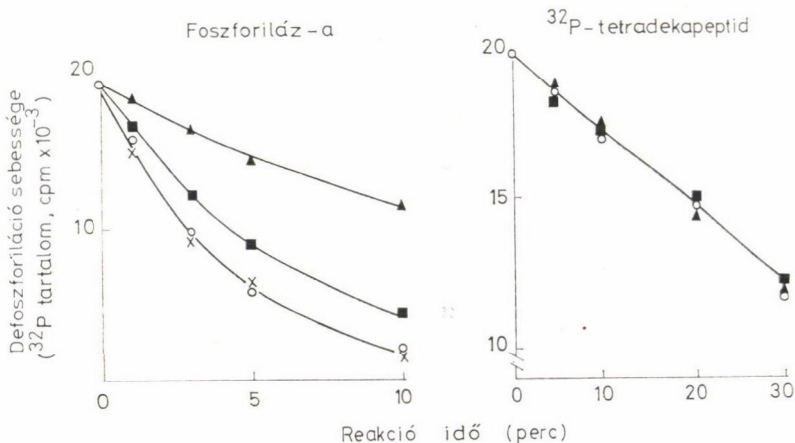


A foszforiláz-*a* asszociációs-disszociációs egyensúlya a poikilotherm állatokban szabályozó szerepet játszhat. BOT és GERGELY (1972) eredményei szerint a foszforiláz-*a* alacsony testhőmérsékleten *in vivo* is kerülhet tetramer állapotba.

### Ligandok hatása

A foszforiláz-*a* defoszforilálását különböző ligandok gátolhatják. Azokat tekintjük át, amelyek a szubsztrátra (foszforiláz-*a*-ra) hatva fejtik ki hatásukat és reguláló szerepük *in vivo* is lehetséges. A ligand ható helyének kutatásában nagy segítséget jelent a foszforiláz-*a*-ból előállítható foszfo-tetradekapeptid. Ez a foszforiláz N-terminális darabja (14 aminosav), amely tartalmazza a foszforilálható szerin-OH-ba épült foszfátot. A foszfatáz defoszforilálja a tetradekapeptidet is, bár közel százszor lassúbb sebességgel (a  $K_m$  viszont hasonló). Mivel a peptid konformációja ligand hatására már nem változik (MARTENSEN és mtsai 1973), így alkalmazásával kimutatható, hogy a ligand a foszforiláz-*a*-ra vagy a foszfatázra hat.

Az 5. ábra AMP és glukóz-6-foszfat hatását mutatja a foszforiláz-*a* és a  $^{32}P$ -tetradekapeptid defoszforilálására. Látható, hogy  $5 \cdot 10^{-6} M$  AMP jelentősen gátolja a foszforiláz-*a* defoszforilációját. A  $^{32}P$  kihatásának sebességét a tetra-



5. ábra. AMP és glukóz-6-foszfat hatása a foszfatáz reakcióra. Foszforiláz-*a* ill.  $^{32}P$ -tetradekapeptid defoszforilációja effektorok nélkül (○),  $5 \cdot 10^{-6} M$  AMP (▲),  $2 \cdot 10^{-3} M$  glukóz-6-foszfat (×) és  $5 \cdot 10^{-6} M$  AMP +  $2 \cdot 10^{-3} M$  glukóz-6-foszfat (■) jelenlétében



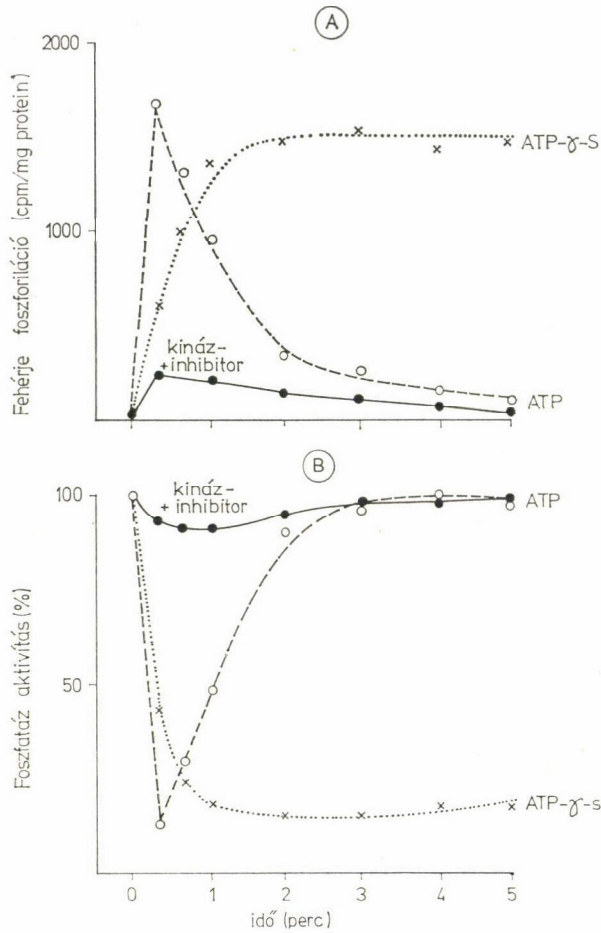
dekaeptidből még  $10^{-4}$  M AMP sem befolyásolja. Az AMP gátló hatását tehát a foszforilázhoz kapcsolódva fejtí ki. Az IMP is hasonló mechanizmussal, a szubsztráton hatva, gátolja a defoszforilációt.

1977-től kezdődően mind többet tudunk a foszforiláz szerkezetéről. Ezek eredményeképpen jobban ismerjük a fehérje kötőhelyeit, szerkezetüket és topográfiájukat. A ligandok hatásmechanizmusának tisztázása megindulhatott molekuláris szinten is. Az AMP gátlás mechanizmusát a következőkben foglalkhatjuk össze. A foszforiláz-*a*-ban a foszfátot tartalmazó szerin maradék és az ekörüli szekvenciariész — az N-terminálistól kb. 20 aminosav — befordul a molekulába, s a foszfát sókötést létesít két arginin oldallánccal (FLETTERICK és mtsai 1979). Ebben a helyzetben a foszfát kihatása foszfatázzal megfelelő sebességgel folyik. Ha ez a rész nincs ilyen kifeszített helyzetben, akkor a defoszforiláció sebessége nagyon lelassul. Ez történik a foszfo-tetradeka-peptidben is. Amikor a foszforiláz-*a*-hoz AMP kapcsolódik, újabb konformáció-változás játszódik le: a szerin foszfát „eltemetődik” a molekulában és hozzáférhetetlenné válik a foszfatáz számára.

A glukóz-6-foszfát nem befolyásolja a foszforiláz-*a* defoszforilációját (ld. 5. ábra), de jelentősen mérsékli a nukleotid-monofoszfátokkal okozott gátlást (BOT és DÓSA 1971, VARSÁNYI és BOT 1972, MARTENSEN és mtsai 1973). A mechanizmus érthetővé válik azzal, hogy az AMP, IMP és glukóz-6-foszfát a foszforiláz-*a* azonos kötőhelyéhez kapcsolódik (JOHNSON és mtsai 1978), tehát ezen ligandok közötti kompetícióról van szó. Bár a glukóz-6-foszfát kb. 50-szer gyengébben kötődik a foszforilázhoz, mint az AMP, nagy koncentráció feleslegben mégis leszoríthatja az AMP-t. A glukóz-6-foszfáton kívül a glukóz, koffein és inozin is mérsékli a nukleotidok okozta gátlást (Varsányi és Bot 1972, Bot és mtsai 1978). A mechanizmus még nem minden esetben tisztázott. A koffein esetében kettős hatásról van szó (Bot és mtsai 1977). A koffein — mint láttuk — dimerré alakítja át a foszforiláz-*a*-t és ezzel megfelelőbb szubsztrátjává válik a foszfatáznak. Az AMP gátlás megszüntetésében nem erről van szó, mivel az AMP alig befolyásolja a foszforiláz-*a* dimer  $\rightleftharpoons$  tetramer egyensúlyát. A koffein hatása a glukóz-6-foszfáttal sem hozható analógiába, mert a koffein nem az AMP kötőhelyhez kapcsolódik (DOMBRÁDI és mtsai 1979), hanem egy attól 40 Å-re levő jól definiált felszínhez. Feltehetően a koffein az AMP leszorítása nélkül indukál olyan konformáció-változást, amely a defoszforiláció sebességét növeli.

### *Fehérjék szerepe*

A glikogénanyagcsere szabályozásában szerepet játszó fehérjék foszforilációja és defoszforilációja az izomkivonatban is megfigyelhető. Kimutattuk, hogy a foszforilációs enzim-kaszád a kivonatban is működőképes: cAMP és Mg-ATP-vel aktív foszforiláz kináz, foszforiláz-*a* és inaktív glikogén szintetáz képződik (GERCELY és mtsai 1978). A 6. ábra radioaktív ATP-vel végzett



6. ábra. Fehérjék foszforilációja (A) és a foszfátáz aktivitás (B) közötti kapcsolat. Fehérjékbe épült  $^{32}\text{P}$ , ill. foszfátáz aktivitás változása [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (○---○), ATP- $\gamma$ -S (x...x), [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP +  $2 \mu\text{M}$  protein kináz inhibitor (●—●) hatására. A kísérletekben az ATP koncentrációja  $9 \cdot 10^{-4}$  volt. Az inkubációs elegy tartalmazott még  $10^{-6}$  M cAMP és  $3 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{Mg}^{++}$ -t is (GERGELY és mtsai 1978)

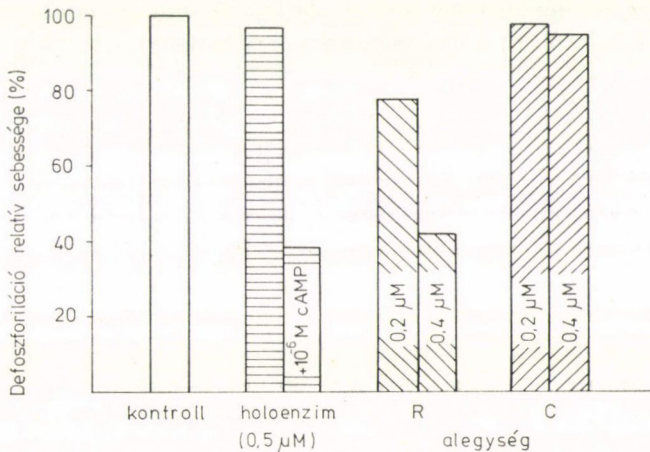
kísérleteinket tünteti fel. Az ábra A része a fehérjébe épült  $^{32}\text{P}$ -t, B része a kivonat foszfátáz aktivitását mutatja. Ciklikus AMP,  $\text{Mg}^{++}$  és [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP hatására gyors foszforilációs folyamat játszódik le. A fehérjébe épülő  $^{32}\text{P}$  másodpercek alatt maximumot ér el, majd fokozatosan csökken. A foszfátáz aktivitása a  $^{32}\text{P}$  beépülésével párhuzamosan csökken, majd visszatér eredeti értékére. Az izomkivonatban levő foszfátáz átmenetileg gátlódik.

Ha a kísérletet az ATP tiofoszfát analójával, az ATP- $\gamma$ -S-sel ismételjük meg, a fehérjék szerin-OH csoportjába tiofoszfát épül be. A tiofoszforilált fehérjék értékes tulajdonsága, hogy a tiofoszfát csoportot a foszfátáz nem képes kihalítani, így a fehérjék tartósan foszforilált formában maradnak (GRA-

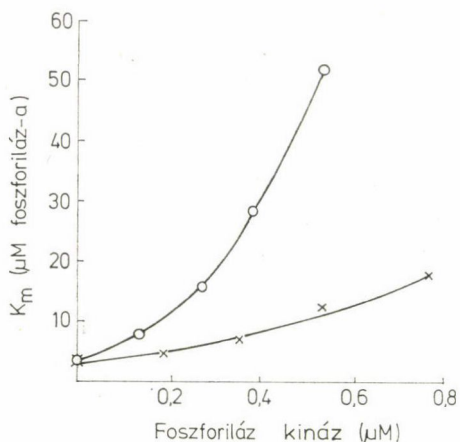
TECOS és FISCHER 1974, GERGELY és mtsai 1976). ATP- $\gamma$ -S alkalmazásával tehát a defoszforilációs folyamatok kiküszöbölhetők. A 6. ábrából látható, hogy a fehérjék tiofoszforilációja után a  $^{32}\text{P}$  beépülve marad a fehérjékben. A tiofoszforilációval párhuzamosan a foszfatáz aktivitása csökken és tartósan gátolt állapotba kerül. Feltételezhető, hogy a foszfatáz gátlódását valamilyen fehérje (vagy fehérjék) okozza. A foszfatáz gátlása átmeneti, ha a fehérje foszforilációja időleges és tartós, ha a fehérje rögzítődik foszforilált állapotában. Feltevésünket olyan kísérlettel támasztottuk alá, amelyben a protein kináz foszforiláló hatását ennek inhibitorával felfüggesztettük. A cAMP-dependens protein kinázról ismert, hogy katalitikus aktivitása specifikusan gátolható egy inhibitor fehérjével (ASHBY és WALSH 1974). A 6. ábrán feltüntettük az inhibitor jelenlétében végzett kísérleteket is. Látható, hogy alkalmazásával nagymértékben csökken a foszforiláció és a foszfatáz aktivitása nem gátódik, eredeti szintjén marad.

A foszfatáz reverzibilis gátlása tehát szoros összefüggést mutat egyes fehérjék foszforilációjával, amelyet a cAMP-dependens protein kináz katalizál. Ezt igazolni tudtuk izomban (GERGELY és mtsai 1978) és májban is (DOMBRÁDI és mtsai 1978). A gátlást számos fehérje foszforilálódása okozhatja, még akkor is, ha figyelembe vesszük, hogy a foszfatáz gátlódása a cAMP-dependens protein kináz hatásával van kapcsolatban.

Megvizsgáltuk a cAMP-dependens protein kináz gátló hatását (GERGELY és BOT 1977, 1978). Eredményeinket oszlopdiagram formájában mutatjuk be (7. ábra). A baloldali oszlop a foszforiláz-a defoszforilációjának sebességét tünteti fel effektorok nélkül. A cAMP-dependens protein kináz holoenzim, a defoszforiláció sebességét nem befolyásolja.  $10^{-6}$  M cAMP jelenlétében azon-



7. ábra. cAMP-dependens protein kináz hatása a foszforiláz-a defoszforilációjára. A defoszforiláció sebessége a kontroll (protein kináz nélküli) százalékában van feltüntetve (GERGELY és BOT 1977 alapján)



8. ábra. Inaktív (x) és aktív (o) foszforiláz kináz hatása a foszfatáz  $K_m$  értékére (GERGELY és BOT 1978 alapján)

ban már jelentősen gátlódik a defoszforiláció. Mivel a protein kináz gátló hatással csak cAMP jelenlétében rendelkezik, ezért a gátlás a disszociált enzimnek: a katalitikus (C) vagy a regulátor (R) alegységnek tulajdonítható. A protein kináz kétféle alegységét Blue-Dextran Sepharose affinitás kromatográfiával izoláltuk (GERGELY és BOT 1977) és megvizsgáltuk a tisztított, gélelektroforetikusan homogén alegységek hatását. A 7. ábrából látható, hogy csak az R alegység gátlja a defoszforilációt. Növelve mennyiségét a gátlás fokozódik. Ezzel szemben a C alegység még nagy mennyiségben sem mérsékli a defoszforiláció sebességét.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a cAMP-dependens protein kináz cAMP jelenlétében észlelt gátló hatása a szabadabbá váló R alegységnek tulajdonítható. Az R alegység a foszforiláz-a-ban létrehozott konformáció-változás útján gátol (GERGELY és BOT 1977).

A foszforiláz kináz is szerepet játszhat a foszfatáz szabályozásában. Korábban kimutattuk, hogy az inaktív foszforiláz kináz gátolja a foszforiláz-a defoszforilációját és a gátlás kompetitív (BOT és mtsai 1975a, 1975b). A 8. ábra bemutatja a foszfatáz affinitásának változását a foszforiláz-a iránt inaktív foszforiláz kináz jelenlétében. Az inaktív kináz gátló hatása viszont nem ad magyarázatot a foszfatáz átmeneti gátlására, mert ez a foszfatázt állandó gátlás alatt tartaná. Ismeretes, hogy a „flash activation” során, amikor a különböző enzimfehérjék foszforilálódnak, lejátszódik a foszforiláz kináz aktiválása is (YEAMAN és COHEN 1975, GERGELY és mtsai 1976). Ezért vizsgáltuk az aktív (foszforilált) kináz hatását is a foszfatáz reakcióra. Ezekhez a kísérletekhez tiofoszforilálással aktivált kinázt használtunk, mivel ezt a foszfatáz nem defoszforilálhatta, aktív állapota mindvégig megmaradt. A tiofoszforilált kináz is kompetitív módon gátolja a foszforiláz-a defoszforilációját. A

foszfátáz  $K_m$  változása a 8. ábrán látható. Az aktív foszforiláz kináz ötször nagyobb mértékben gátolja a foszfátázt, mint az inaktív. A Dixon szerinti inhibitor állandók  $0,55 \mu\text{M}$  az inaktív és  $0,1 \mu\text{M}$  az aktív kinázra (GERGELY és mtsai 1976, GERGELY és BOT 1978).

Ezek alapján a foszforiláz kináz gátló hatása reverzibilisnek tekinthető. Bár a kináz inaktív állapotában is gátolja a foszfátázt, ez a gátlás az aktív foszforiláz kináz képződésével jelentősen fokozódik. Nemcsak a tiofoszforilálással aktivált kináz, hanem a foszforilációval aktivált (*in vivo* keletkező forma) is gátolja a foszfátázt. Ezt tanulmányozva megállapítottuk, hogy az aktív foszforiláz kináz késlelteti a foszforiláz-*a* defoszforilációját. A foszfátáz először az aktív kinázt defoszforilálja és csak ezután indul meg a foszforiláz-*a* inaktiválása (GERGELY és mtsai 1976).

### Megbeszélés

A foszforiláz foszfátáz szabályozásában többféle fehérje és ligand játszhat szerepet. Az *in vivo* megvalósuló reguláció szempontjából azok lehetnek jelentősek, amelyeknek intracelluláris koncentrációja elegendő a foszfátáz gátlásához.

Az 1. táblázatban összefoglaltuk azokat az anyagokat, amelyek a szabályozásban szerepet játszhatnak. Mindhárom fehérje típusú gátlószer reverzibilisen gátolhatja a foszfátázt. A protein kináz esetében ezt a változó cAMP koncentráció biztosítja, mert csak a cAMP hatására disszociált R alegység gátol. A másik kettőnél a cAMP-dependens protein kináz által katalizált foszforiláció hozza létre a gátlószer hatásos, foszforilált alakját. Így közvetett formában a cAMP-nek is reguláló szerepe van. Mindhárom fehérje reverzibilisen gátolja a foszfátázt. A protein kináz gátló hatása feltehetően a legkisebb, mert  $K_i$  értéke nagyobb, mint intracelluláris koncentrációja. A foszforiláz kináz és az inhibi-

I. táblázat

Foszfoprotein foszfátáz *in vivo* szabályozásában szerepet játszó anyagok

Gátlószer	Intracelluláris koncentráció, $\mu\text{M}$	$K_i$ , $\mu\text{M}$
cAMP-dependens protein kináz	0,23	0,32
foszforiláz kináz	2,5	0,08
inhibitor-1	1,5	0,016
AMP	5–150	8
IMP	10–400	65
glukóz-6-foszfát	500–2000	—
glukóz	5500	—

tor-1 *in vivo* is hatásos gátlószerek, mivel mennyiségük elegendő akár teljes gátlás létrehozásához.

Kismolekulájú ligandok is szabályozhatják a foszfatáz; a nukleotidok intracelluláris koncentrációja elegendő a gátláshoz. A glukóz-6-foszfát és a glukóz pedig megfelelő mennyiségben lehet ahhoz, hogy a gátlást mérsékelje.

A foszfoprotein foszfatáz szabályozásának tehát két szintjét különböztethetjük meg. A *szabályozás első szintje* a foszfatáz gyors, teljes, de reverzibilis gátlását eredményezi. A gátlást a cAMP-dependens protein kináz és az általa foszforilált fehérjék okozzák. A *szabályozás második szintje* a ligandok általi okozott hatás. Ha a sejt energiaszegény állapotba jut (AMP, IMP halmozódik fel), akkor ezek gátolhatják a foszforiláz-*a* defoszforilációját és ezzel elősegítik az energianyerést szolgáló glikogén lebontását. Finomítja ezt a szabályozást a glukóz és a glukóz-6-foszfát, amelyek a nukleotidok okozta gátlást felfüggesztik. Ezért a glikogén csak akkor mobilizálódik, amikor az egyéb energiaszolgáltató készletek (glukóz, glukóz-6-foszfát) már elfogytak.

#### IRODALOM

1. ADELSTEIN, R. A., CONTI, M. A., HATHAWAY, D. R.: *J. Biol. Chem.* **253**, 8347—8350 (1978).
2. ASHBY, C. D., WALSH, D. A.: *Methods Enzymol.* **38C**, 350—358 (1974).
3. BARYLKO, B., KUZNICKI, J., DRABIKOWSKI, W.: *FEBS Lett.* **90**, 301—304 (1978).
4. BOT, G., DÓSA, I.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **6**, 73—87 (1971).
5. BOT, G., GERGELY, P.: *FEBS Lett.* **24**, 7—10 (1972).
6. BOT, G., VARSÁNYI, M., GERGELY, P.: *FEBS Lett.* **50**, 351—354 (1975a).
7. BOT, G., GERGELY, P., VARSÁNYI, M., VEREB, G.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **18**, 397—407 (1975b).
8. BOT, G., KOVÁCS, E., GERGELY, P.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **12**, 335—341 (1977).
9. BOT, G., KOVÁCS, E., PÓLYIK, E., GERGELY, P.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **13**, 189—192 (1978).
10. BRANDT, H., CAPULONG, Z. L., LEE, E. Y. C.: *J. Biol. Chem.* **250**, 8038—8044 (1975).
11. CHAU, V., ANDERSON, C., HUANG, C., HUANG, F. L.: *Fed. Proc.* **37**, (6) 1329 (1978).
12. COHEN, P.: *Eur. J. Biochem.* **34**, 1—14 (1973).
13. COHEN, P., ANTONOW, J. F., DAVISON, J., TAYLOR, C.: in *Metabolic Interconversion of Enzymes 1973*, Springer-Verlag, Berlin, p. 33—42 (1974).
14. COHEN, P.: in *Current Topics in Cellular Regulation*, Vol. 14, Acad. Press, New York, p. 117—196 (1978).
15. COHEN, P., BURCHELL, A., FOULKES, J. G., COHEN, P. T. W., VANAMAN, T. C., NAIRN, A. C.: *FEBS Lett.* **92**, 287—293 (1978).
16. COHEN, P., PICTON, C., KLEE, C. B.: *FEBS Lett.* **104**, 25—30 (1979).
17. CORBIN, J. D., SUGDEN, P. H., WEST, L., FLOCKHART, D. A., LINCOLN, T. M., MCCARTHY, D.: *J. Biol. Chem.* **253**, 3997—4003 (1978).
18. DOMBRÁDI, V., GERGELY, P., BOT, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **13**, 235—238 (1978).
19. DOMBRÁDI, V., VEREB, G., BOT, G.: *Int. J. Biochem.* **10**, 905—908 (1979).
20. DOMBRÁDI, V., GERGELY, P., BOT, G.: *Biosystems* **12**, 289—294 (1980).
21. EHRLICHMAN, J., ROSENFELD, R., ROSEN, O. M.: *J. Biol. Chem.* **249**, 5000—5003 (1974).
22. FLETTERICK, R. J., SPRANG, S., MADSEN, N. B.: *Can. J. Biochem.* **57**, 789—797 (1979).
23. GEISOW, M. J.: *Nature* **276**, 211—212 (1978).
24. GERGELY, P., VEREB, G., BOT, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 223—226 (1974).
25. GERGELY, P., VEREB, G., BOT, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **10**, 153—159 (1975).

26. GERGELY, P., VEREB, G., BOT, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 809—816 (1976).
27. GERGELY, P., BOT, G.: *FEBS Lett.* **82**, 269—272 (1977).
28. GERGELY, P., BOT, G.: *Biochem. Soc. Trans* **6**, 21—25 (1978).
29. GERGELY, P., DOMBRÁDI, V., BOT, G.: *FEBS Lett.* **93**, 239—241 (1978).
30. GERGELY, P., CASTLE, A. G., CRAWFORD, N.: *Biochim. Biophys. Acta* **612**, 50—55 (1980).
31. GILL, N.: *J. Cycl. Nucl. Res.* **3**, 153—162 (1977).
32. GRATECOS, D., FISCHER, E. H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 960—967 (1974).
33. GRATECOS, D., DETWILER, T., HURD, S., FISCHER, E. H.: *Biochemistry* **16**, 4812—4817 (1977).
34. HAYAKAWA, T., PERKINS, J. P., WALSH, D. A., KREBS, E. G.: *Biochemistry* **12**, 567—573 (1973).
35. HOFMANN, F., BEAVO, J. A., BECHTEL, P. J., KREBS, E. G.: *J. Biol. Chem.* **250**, 7795—7801 (1975).
36. HSIAO, K.-J., SANDBERG, A. R., LI, H.-C.: *J. Biol. Chem.* **253**, 6901—6907 (1978).
37. JOHNSON, L. N., WEBER, I. T., WILD, D. L., WILSON, K. S., YEATES, D. G. R.: *J. Mol. Biol.* **118**, 579—591 (1978).
38. KHATRA, B. S., SODERLING, T. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 647—654 (1978).
39. KREBS, E. G., FISCHER, E. H.: *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 150—157 (1956).
40. KREBS, E. G., BEAVO, J. A.: *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 923—959 (1979).
41. LINCOLN, T. M., FLOCKHART, D. A., CORBIN, J. D.: *J. Biol. Chem.* **253**, 6002—6009 (1978).
42. MARTENSEN, T. M., BROTHERTON, J. E., GRAVES, D. J.: *J. Biol. Chem.* **248**, 8329—8336 (1973).
43. MELLGREN, R. L., AYLWARD, J. H., KILLILEA, S. D., LEE, E. Y. C.: *J. Biol. Chem.* **254**, 648—652 (1979).
44. NIMMO, H. G., COHEN, P.: in *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 8, P. Greengard and G. A. Robinson, eds, Raven Press, New York, p. 145—266 (1977).
45. NIMMO, H. G., COHEN, P.: *Eur. J. Biochem.* **87**, 353—365 (1978).
- 45a. OCHOA, S., DE HARO, C.: *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 549—580 (1979).
46. RUBIN, C. S., ROSEN, O. M.: *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 831—887 (1975).
47. SKUSTER, J. R., GRAVES, D. J.: *Proc. FEBS Meet.* 11th, 1977 Abstract A1—6 060 (1977).
48. TÓTH, G., GERGELY, P., PARSADANIAN, H. K., BOT, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **12**, 389—398 (1977).
49. VARSÁNYI, M., BOT, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **8**, 23—31 (1973).
50. WAISMAN, D. M., SINGH, T. J., WANG, J. H.: *J. Biol. Chem.* **253**, 3387—3390 (1978).
51. YEAMAN, S. J., COHEN, P.: *Eur. J. Biochem.* **51**, 93—104 (1975).