

A FOSZFORILÁZ ÉS A FOSZFORILÁZT ÁTALAKÍTÓ ENZIMEK SZUPRAMOLEKULÁRIS SZERVEZŐDÉSE

BOT GYÖRGY, GERGELY PÁL, VARSÁNYI MAGDOLNA és VEREB GYÖRGY

Debreceni Orvostudományi Egyetem Orvosi Vegytani Intézete

1. Bevezetés

Eddigi ismereteink szerint az enzimaktivitás szabályozásának két alapvető mechanizmusa különböztethető meg: az egyik szabályozó ligandok (aktivátorok és inhibitorok) megkötésén, a másik az enzimek enzimek által katalizált kovalens módosításán alapszik.

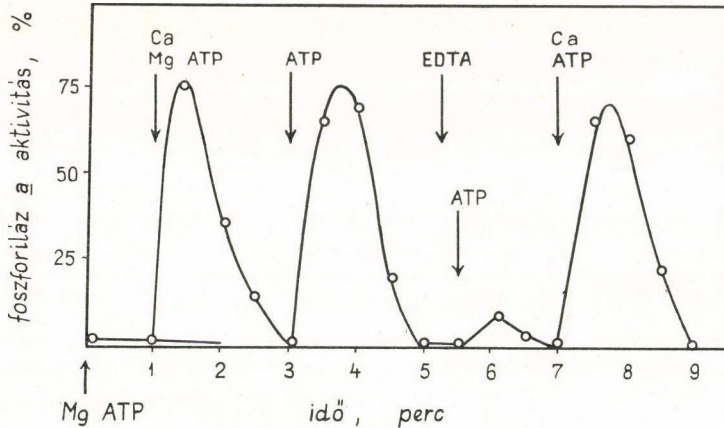
A glikogént mobilizáló foszforiláz (EC. 2.4.1.1.) szabályozásában mindkét mechanizmus megtalálható. Ennek az enzimnek az aktiválása vagy AMP-vel történik allostérikusan, vagy foszforiláció útján bekövetkező kovalens módosítással. Az aktív forma inhibitorokkal allostérikusan gátolható, illetve defoszforilációval inaktíválható. A foszfát beépülését a foszforiláz-kináz, kihatását a foszforiláz-foszfátáz enzim végzi. A foszforilálatlan és a foszforilált alak, (foszforiláz *b* és foszforiláz *a*) aktivitásának effektorokkal történő szabályozása, valamint az átalakítást katalizáló enzimek sajátosságai már jól ismertek (GRAVES, WANG, 1972).

Megmagyarázatlan maradt azonban néhány fiziológiai jelenség a glikogén mobilizációjával kapcsolatban. Így pl. a foszforiláz *b* aktivitása *in vivo* legalább két nagyságrenddel kisebb, mint *in vitro* (az izomban levő AMP és ATP koncentráció szimulálása esetén). Emiatt olyan integrált enzimrendszerek után kutattak, amelyek magasabb organizáltságuk révén a sejten belül előforduló „natív” enzimek tulajdonságait jobban megőrzik és az előző jelenségre is magyarázatot adnak.

Sikerült nyúlizomból olyan glikogénpartikulákat izolálni — három különböző eljárással is —, amelyek a glikogén mellett a glikogént lebontó és szintetizáló enzimeket is tartalmazzák protein-glikogén komplex formájában (MEYER et al. 1970). A háromféle izolálási lehetőség arra mutatott, hogy a nyert fehérje-glikogén komplex nem műtermék, hanem a sejt strukturális-funkcionális egysége.

Ez a protein-glikogén komplex Ca^{2+} , Mg^{2+} és ATP hatására gyors enzimatiszta változásokkal reagált (1. ábra).

A partikulában levő foszforiláz aktiválódása és inaktíválódása az élő izomhoz hasonló sebességgel játszódott le. Az aktiváláshoz ugyanakkora



1. ábra. Ca^{++} , Mg^{++} és ATP hatása a protein-glikogén komplex foszforiláz aktivitására

Ca^{2+} koncentráció (2×10^{-6} M) volt szükséges, mint amekkora az izomban kontrakció alkalmával felszabadul. Ez a Ca^{2+} koncentráció egy nagyságrenddel nagyobb, mint amennyi a tiszta enzimet aktiválni képes. Jellemzi ezt a komplex rendszert az is, hogy benne a foszforiláz csak részlegesen foszforilálódik — az *in vivo* viszonyokhoz hasonlóan. A komplexben képződő hibrid foszforiláz inhibitorokkal szemben (glukóz-6-foszfát) érzékeny marad, s ebben ismét különbözik az *in vitro* létrehozható, teljesen foszforilált foszforiláz *a*-tól, amely inhibitorokkal szemben érzéketlen.

A protein-glikogén komplexben levő koncentrált enzimek egymásra olyan kölcsönhatást gyakorolnak, amely felhígított állapotban, illetve az izolált enzimekben nem észlelhető. Így például a foszforiláz *a*-t defoszforiláló foszfatázt valamilyen fehérje—fehérje kölcsönhatás szabályozhatja a protein-glikogén komplex koncentrált oldatában. Ennek az új regulációnak három alapvető megnyilvánulását figyelték meg: egyrészt a foszfatáz gátlódik a komplexben lejátszódó foszforiláció ideje alatt; másrészt a foszfatáz affinitása csökken a szubsztrátként alkalmazott foszforiláz *a* iránt; harmadszor a foszfatáz AMP-vel és IMP-vel való gátolhatósága megszűnik a komplexben. Mindhárom effektus elmarad, ha a glikogén-protein komplex szuszpenziót nagymértékben felhígítják, tehát a proteinek egymásra gyakorolt kölcsönhatásának megszüntetésével.

A komplexben levő többi enzim közül a foszforiláz *b* is alapvető változást szenved a fehérjék kölcsönhatása következtében. Amíg a partikulák hígított szuszpenziójában a foszforiláz *b* AMP-vel nagymértékben aktiválható — a tiszta foszforiláz *b*-hez hasonlóan —, addig a protein-glikogén komplex tömény szuszpenziójában az AMP aktiváló hatása nem érvényesül, vagy legalábbis nagymértékben mérséklődik.

Az újabb szakirodalom már glikolitikus enzimek közötti komplexképződésről is említést tesz (CLARKE és MASTERS, 1973, FÖLDI et al., 1973.) Ezek a beszámolók azonban arra szorítkoznak, hogy fizikai-kémiai módszerekkel kimutassák a különböző enzimek asszociálódását, de nem térnek ki az enzimek katalitikus tulajdonságainak eközben végbemenő változásaira, tehát nem tárgyalják a szupramolekuláris szerveződésnek a regulációra gyakorolt hatását. A debreceni Orvosi Vegytani Intézetben végzett kutatások elsősorban erre irányultak.

2. Fehérje kölcsönhatás a foszforiláz-foszfátáz és a foszforiláz-kináz között

Kísérleteink az előzőekben ismertetett megfigyelések alapján indultak el azzal a munkahipotézissel, hogy a foszforiláz-kináz lehet azon fehérjék egyike, amely a foszfátáz reakció gátlását okozza a glikogén partikulákban (kölcsönhatásba lépve a jelenlevő foszforiláz-kinázzal).

Vizsgálatainkhoz nyúl vázizomból előállított foszforiláz *b*-t (KREBS, FISCHER, 1962), nagymértékben tisztított „nemaktivált” foszforiláz-kinázt (DELANGE et al. 1968), és ^{32}P -vel jelzett foszforiláz *a*-t használtunk. Foszforiláz *a*-t foszforiláz *b*-ből állítottunk elő foszforiláz-kináz és gamma jelzett ATP segítségével KREBS és mtsai módszere szerint (KREBS et al. 1964). A foszforiláz *a*-t háromszori átkristályosítás után használtuk fel.

Foszforiláz-foszfátáz preparátumként Sephadex G—25 oszlopon gélfiltrált nyúl izomhomogenizátumot használtunk, amelyből a foszforiláz-kinázt előzetesen eltávolítottuk a homogenizátum pH 6,1-re való beállítása és az izelektromos csapadék centrifugálása útján.

Először a foszforiláz-kináznak a foszfátáz reakcióra kifejtett hatását tanulmányoztuk a szubsztrátul szolgáló foszforiláz *a* koncentrációjának változtatása mellett (2. ábra).

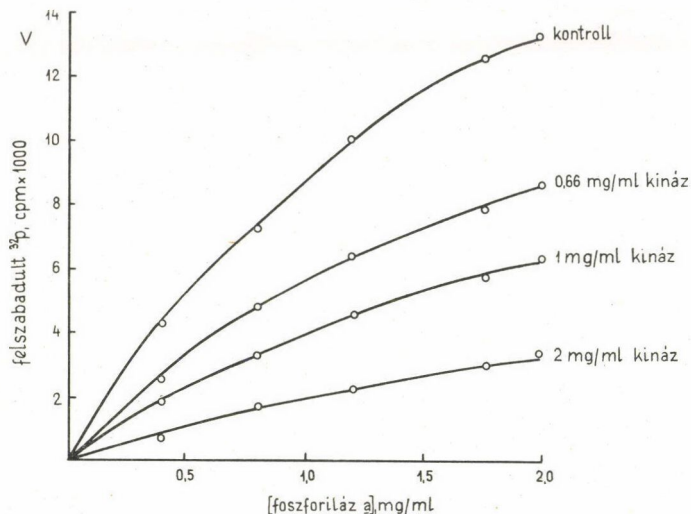
A 2. ábra a foszfátáz enzim szubsztrát-telítési görbéjét tünteti fel kináz távollétében és háromféle koncentrációjú kináz jelenlétében. A foszfátáz aktivitását a ^{32}P -vel jelzett foszforiláz *a*-ból kihasadó izotóp foszfát meghatározásával mértük.

Az ábrából látható, hogy a nem-aktivált kináz gátolja a foszfátáz aktivitását. A gátlás mértéke a kináz koncentrációjától függ. A gátlás jellegének megállapítására az eredményeket Lineweaver és Burk szerint is ábrázoltuk (3. ábra).

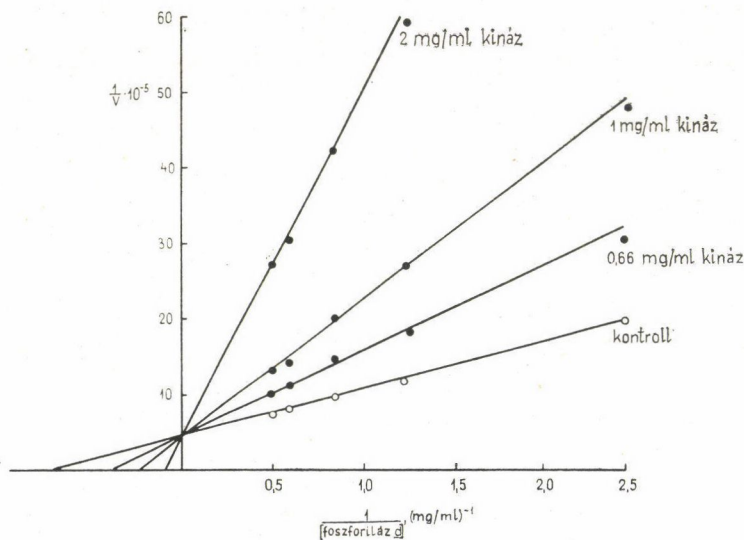
A 3. ábrából látható, hogy a kináz koncentrációjától függően nagymértékben csökkenti a foszfátáz foszforiláz *a* iránti affinitását, de nem befolyásolja a foszfátáz reakció V_{\max} értékét.

A nem-aktivált kináz által okozott gátlás tehát kompetitív a foszforiláz *a*-val szemben.

A foszfátáz K_m értékének kináz koncentrációtól való függését a 4. ábrán tüntettük fel.

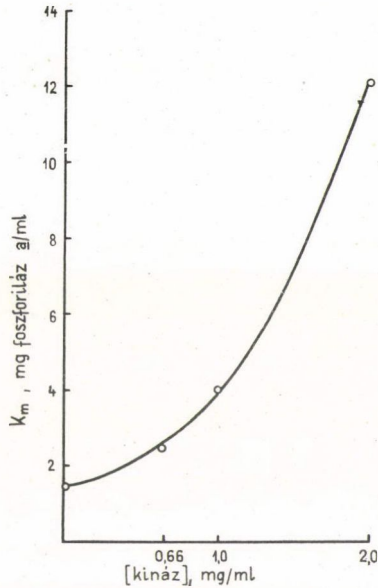


2. ábra. Foszforiláz-kináz hatása a foszforiláz α defoszforilálására



3. ábra. A foszforiláz-kináz foszfatázt gátló hatása LINEWEAVER—BURK szerint

Az ábrából látható, hogy a kináz koncentrációjának növelésével fokozódó mértékben nő a foszfatáz foszforiláz α iránti K_m értéke. Az alkalmazott legnagyobb kináz koncentráció mellett (2 mg/ml) az emelkedés mintegy 11-szeres. Eredményeink jó összhangban vannak HASCHKE és mtsai (1972) megfigyelésével, amely szerint a glikogén partikulák tömény szuszpenziójá-



4. ábra. A foszforiláz-kináz hatása a foszfatáz K_m értékére

ban a foszfatáz K_m értéke a foszforiláz a iránt jelentősen (mintegy 15-ször) nagyobb, mint a szuszpenzió 100-szoros hígításában, a tömény rendszerben fellépő fehérje kölcsönhatás következtében.

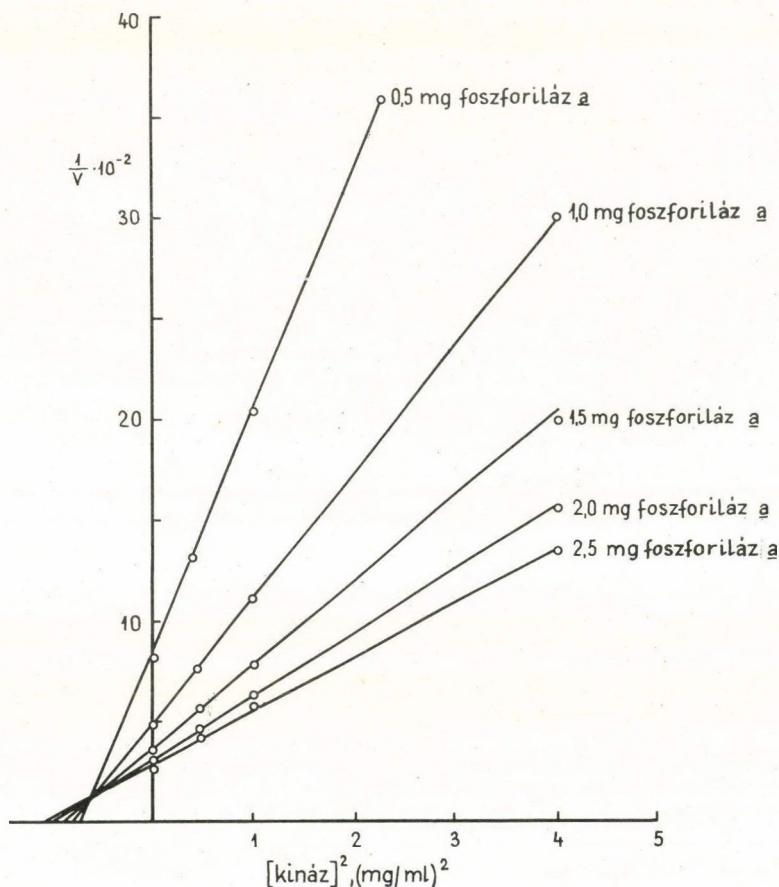
A foszfatáz reakcióra kifejtett gátló hatás jellemzésére meghatároztuk az inhibitor állandó értékét is. Ennek érdekében a reakciósebesség reciprok értékét a kináz koncentráció függvényében ábrázoltuk Dixon szerint. Azonban nem egyeneseket, hanem hiperbolákat kaptunk, s így módon a K_i értéke nem volt meghatározható. Ha azonban a reakciósebesség reciprok értékét az inhibitor koncentráció négyzetével szemben tüntetjük fel, akkor már egyenesekhez jutottunk (5. ábra).

Az 5. ábrából látható, hogy az egyenesek egy metszéspontban találkoznak s ebből a K_i értéke 0,77 mg/ml kináznak felel meg.

Eredményeink alapján tehát úgy tűnik, hogy a nem-aktivált kináz a foszfatáz aktivitását fehérje—fehérje kölcsönhatás révén szabályozza úgy, hogy a foszforiláz a -val vetélkedik a foszfatáz felületén.

3. A foszforiláz, foszforiláz-kináz és foszforiláz-foszfatáz komplexképzésének kimutatása frontál gélfiltrálással

Az előző fejezetben közölt vizsgálataink szerint a foszforiláz rendszer enzimei között fehérje—fehérje kölcsönhatás jön létre *in vitro*. Mivel a proteinglikogén partikulák izolálása izomhomogenizátumból valószínűvé tette, hogy



5. ábra. A foszforiláz-kináz K_i értékének meghatározása

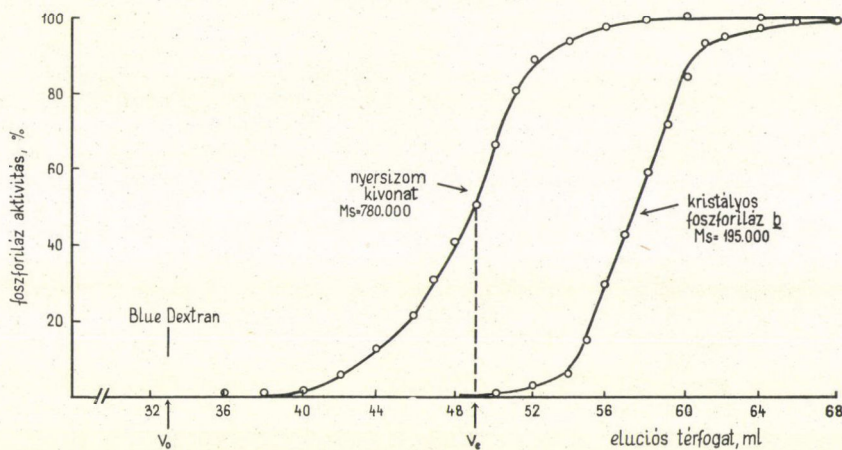
a fehérje—fehérje kölcsönhatás a sejtben *in vivo* is megvalósul, további vizsgálatainkkal a foszforiláz és a foszforilázt átalakító enzimek komplexképződését a sejt viszonyaihoz közel álló, tömény izomhomogenizátumban kívántuk kimutatni.

Fehérje asszociátumok (fehérje komplexek) tömény homogenizátumban való kimutatására alkalmas eljárás a frontál gélfiltrálás (CHIANCONE *et al.*, 1968 és FÖLDI *et al.*, 1973), mivel ez a módszer lehetővé teszi a fehérjék molekulásúlyának meghatározását a szövethomogenizátum nagyobb mértékű tisztítása és hígítása nélkül is. Ez azért jelentős, mert a tisztítás és hígítás a komplexek széteséséhez vezethet.

Kísérleteinkben frontál gélfiltrálásra Sepharose 2B oszlopokat használtunk, amelyeket szobahőmérsékleten 100 mM szacharóz — 20 mM glicerofoszfát (pH 6,8) oldattal ekvilibráltunk. Homogenizátumot friss nyúlizomból

1-szeres térfogatú szacharóz-glicerofoszfát (pH 6,8) pufferrel készítettünk, amely centrifugálás, 30°-on végzett hőkezelés és újabb centrifugálás után alkalmas frontál gélfiltrálásra. Az oszlopról lejövő eluátumot frakciókba gyűjtöttük és az egyes frakciókban az enzimek mennyiségét aktivitásuk alapján határoztuk meg (foszforiláz-kináz aktivitást BROSTRÖM és mtsai szerint (1971), foszforiláz *b* és foszfatáz aktivitást a már ismertetett módon mértünk).

Nyúlizom homogenizátum frontál gélfiltrációjának eredményét és az összehasonlításként végzett kristályos foszforiláz *b* gélfiltrációját a 6. ábrán tüntettük fel.



6. ábra. Nyúlizom homogenizátum és kristályos foszforiláz *b* frontál gélfiltrálása
o---o foszforiláz *b* aktivitás

Az ábrából látható, hogy a nyers izomhomogenizátumban levő foszforiláz *b* a gélfiltrálás során már azokban a frakciókban megjelenik, amelyekben a foszforiláznál jóval nagyobb molekulásúlyú anyagok eluálódhatnak. A kristályos foszforiláz *b* oldatával végzett kontroll gélfiltrálás alkalmával az aktivitás jóval későbbi frakciókban, nagyobb elúciós térfogat átfolyása után jelenik meg.

A gélfiltrálási görbék inflexiós pontja, illetve az ebből számított elúciós térfogat (V_e), valamint holt térfogat (V_0) alapján meghatározható az eluált fehérjék látszólagos molekulásúlya (FISCHER, 1969). A nyers izomhomogenizátumban levő foszforiláz 780 000 molekulásúlyú komplexnek bizonyult, míg a kristályos foszforiláz *b* az irodalmi értékkel megegyező 195 000 molekulásúlyt mutatott (DEVINCENZI, HEDRICK, 1967).

Az izomhomogenizátumban észlelt magas molekulásúlyú komplexekről feltehető volt, hogy az a foszforiláz *b*-nek foszforiláz-kinázzal és foszforiláz-foszfatázzal alkotott asszociátuma. Feltevésünk igazolására a nyers izomhomogenizátumból eltávolítottuk a foszforiláz *b* mellől a foszforiláz-kinázt és

a foszfatázt. A kináz pH 6,1-en, a foszfatáz pH 5,1-en választható le izoelektromos csapadék formájában és centrifugálással elkülöníthető, míg a foszforiláz *b* a felülúszóban marad. Ilyen módon két külön frakcióban távolítottuk el előbb a kinázt, ezt követően a foszfatázt, s mindkét felülúszóval frontál gélfiltrációt végeztünk s meghatároztuk a foszforiláz *b* látszólagos molekulásúlyát (1. táblázat).

1. táblázat

A foszforiláz-kináz és foszfatáz eltávolításának hatása az izomhomogenizátum foszforiláz *b* komplexére

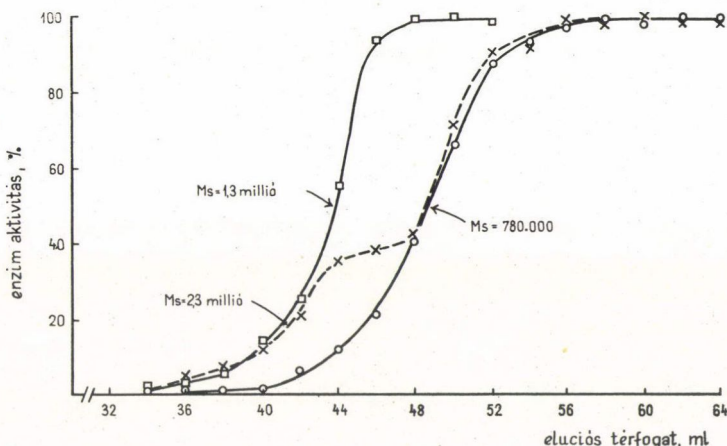
	Foszforiláz <i>b</i> látszólagos molekulásúlya
nyers izomhomogenizátum	780 000
pH 6,1 felülúszó	300 000
pH 5,1 felülúszó	185 000
kristályos foszforiláz <i>b</i>	195 000

A táblázat adatai szerint a nyers homogenizátumban komplex alakban levő foszforiláz *b* látszólagos molekulásúlya a kináz eltávolításával nagy mértékben csökken, ezt követően a foszfatáz kicsapása már csak kisebb molekulásúly csökkenést okoz. Ezen két enzim leválasztása után (ami természetesen sok más fehérje eltávolítását is jelenti) a foszforiláz *b* látszólagos molekulásúlya a kristályos enzimmel megegyezővé válik.

A komplex megbontása alapján kapott eredményeink valószínűsítették azt a feltevésünket, hogy a nyers izomhomogenizátumban a foszforiláz *b* a foszforiláz-kinázzal és a foszforiláz-foszfatázzal alkot komplexet és ennek következtében jelenik meg aktivitása a nagy molekulásúlyú frakciókban. Feltevésünk további megerősítésére a nyers izomhomogenizátum frontál gélfiltrálását megismételve az egyes frakciókban nemcsak foszforiláz, hanem foszforiláz-kináz és foszforiláz-foszfatáz aktivitást is mértünk (7. ábra).

Amint a 7. ábra mutatja azok a frakciók, amelyek foszforiláz *b*-t tartalmaznak foszforiláz-kináz és foszfatáz aktivitással is rendelkeznek. A foszforiláz *b* magas molekulásúlya (780 000) elsősorban a nagy molekulásúlyú foszforiláz-kinázzal való komplexalkotásnak tulajdonítható. Az ábrán látható frontálanálízis szerint a foszforiláz-kináz egy része még nem tartalmaz foszforiláz *b*-t, enélkül eluálódik. Megfigyelhető, hogy a foszforiláz-kináz elúciójával párhuzamosan a foszforiláz-foszfatáz is megjelenik, ami a kináz és foszfatáz kölcsönhatására mutat. Ennek az elúció kezdetén megjelenő asszociátumnak magas molekulásúlya (kb. 2,3 millió) valószínűleg glikogén jelenlétének tulajdonítható.

Mivel eredményeink szerint az izomhomogenizátumban a foszforiláz és a foszforilázt átalakító enzimek egymáshoz kapcsolódva, komplexet alkotva



7. ábra. Foszforiláz-kináz, foszfatáz és foszforiláz *b* kimutatása nyúlizom kivonat frontál gélfiltrálása során

● — ● foszforiláz *b*; × — — × foszforiláz-kináz; □ — □ foszfatáz aktivitás

fordulnak elő, érdemesnek látszott megvizsgálni, hogy ezen enzimek tisztított formában is képesek-e komplex alkotására.

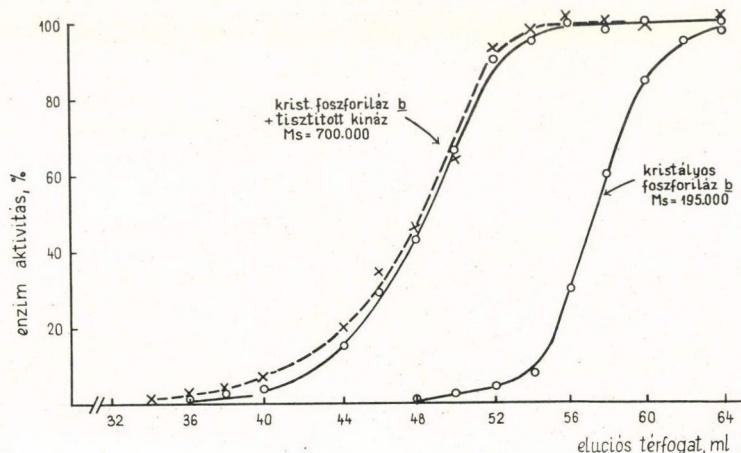
Kristályos foszforiláz *b* és nagy mértékben tisztított foszforiláz-kináz preparátumot az eddig használt izomhomogenizátumhoz hasonló koncentrációban kevertünk össze és a keveréket frontál gélfiltrálással tanulmányoztuk összevetve a tiszta foszforiláz *b* elúciójával (8. ábra).

A 8. ábrából látható, hogy a foszforiláz *b* a keverékből is a kinázzal együtt eluálódik. A komplexnek az inflexiós pontból, illetve az elúciós térfogtból számított látszólagos molekulásúlya ez alkalommal is jóval nagyobb-nak bizonyult (kb. 700 000), mint a tiszta foszforiláz *b* molekulásúlya. Eszerint a tisztított enzimek is képesek kölcsönhatásba lépni egymással, azaz protein—protein komplexet alkotni. Ebben már nem játszhat szerepet a glikogén, mivel a preparátumok nem tartalmazták kimutatható mennyiségben.

Érdekessége a tisztított preparátumokkal végzett kísérletnek az is, hogy a kináz és a foszforiláz *b* minden frakcióban együtt jelenik meg, valamint az, hogy hiányzik a kináz magas molekulásújú asszociátuma. Lehetséges, hogy a kináz ezen tulajdonságát vagy az enzim preparálása során vagy a glikogén eltávolítása következtében veszti el.

4. Következtetések

Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a glikogén mobilizáció kules enzime, a foszforiláz, és az aktiválását és inaktiválását katalizáló enzimek kölcsönhatásba léphetnek egymással az intracellulárisan előforduló magas



8. ábra. Foszforiláz-kináz és foszforiláz *b* preparátumok keverékének frontál gélfiltrálása
 o——o foszforiláz *b*; ×——× foszforiláz-kináz aktivitás

koncentrációk mellett. Ezen kölcsönhatások következtében nagy molekulájú komplexek képződnek és így a sejten belül az egymást átalakító enzimek kompartmentalizációja következhet be, noha a sejt szolubilis frakcióját alkotják. Ezeknek az enzimfehérjéknek egymásra gyakorolt kölcsönhatása újabb regulációs lehetőségeket rejt magában. Így pl. a foszforiláz-kináz foszfatáz aktivitást gátló hatása szabályozó szerepet játszhat a foszforiláz *a* foszforiláz *b*-ből való képződése során, amennyiben meggátolja a foszforiláz *a* idő előtti elbomlását. Kérdéses azonban, hogyan szűnik meg a foszfatáz gátoltsága az izom stimulálását követően.

Valószínűnek látszik, hogy a glikogénanyagcsere más enzimei is, elsősorban a glikogénszintetáz és átalakító enzimei, ehhez hasonló komplexek alkotásában vehetnek részt. Ezek az új fehérje—fehérje kölcsönhatáson alapuló rendszerek feltehetően jelentős szerepet játszanak a sejt anyagcserejének szabályozásában.

IRODALOM

- BROSTRÖM, C. O., HUNKELER, F. C., KREBS, E. G.: *J. Biol. Chem.* **246**, 1961 (1971).
 CHIANCONE, E., GILBERT, L. N., GILBERT, G. A., KELLETT, G. L.: *J. Biol. Chem.* **243**, 1212 (1968).
 CLARKE, F. M., MASTERS, C. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **327**, 223 (1973).
 DELANGE, R. J., KEMP, R. G., RILEY, W. D., COOPER, R. A., KREBS, E. G.: *J. Biol. Chem.* **243**, 2200 (1968).
 DEVINCENZI, D. L., HEDRICK, J. L.: *Biochemistry* **6**, 3489 (1967).
 FISCHER, L.: in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Work, T. S., Work, E. Eds, North-Holland Publishing Company, Amsterdam p. 199 (1969).
 FÖLDI, J., SZABOLCSI, G., FRIEDRICH, P.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **8**, 263 (1973).

- GRAVES, D. J., WANG, J. H.: *The Enzymes*, Vol. 7., ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York p. 435 (1972).
- HASCHKE, R. H., GRÄTZ, K. W., HEILMEYER, M. G.: *J. Biol. Chem.* **247**, 5351 (1972).
- KREBS, E. G., FISCHER, E. H.: in *Methods in Enzymology*, Vol. 5, S. P. Colowick and N. D. Kaplan, eds., Academic Press, New York p. 373 (1962).
- KREBS, E. G., LOVE, D. S., BRATVOLD, E. E., TRAYSER, K. A., MEYER, W. G., FISCHER, E. H.: *Biochemistry* **3**, 741 (1964).
- MEYER, F., HEILMEYER, M. G., HASCHKE, R. H., FISCHER, E. H.: *J. Biol. Chem.* **245**, 6642 (1970).