



УДК 577. 152.241\*1.042

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЫШЕЧНОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ Б С МЕТОТРЕКСАТОМ, ФОЛИЕВОЙ И ФОЛИНОВОЙ КИСЛОТАМИ

*Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Шейман Б. М.,  
Биринберг Е. М., Курганов Б. И., Рудакова И. П.**Научно-производственное объединение «Витамины», Москва*

Изучено взаимодействие гликогенфосфоорилазы Б из скелетных мышц кролика с метотрексатом, фолиевой и фолиновой кислотами. Методом седиментации определена микроскопическая константа диссоциации комплекса гликогенфосфоорилазы Б с метотрексатом, которая оказалась равной 0,43 мМ (рН 6,8; 20° С, 0,1 М КСl). Показано, что субъединица гликогенфосфоорилазы Б имеет два центра связывания метотрексата. Установлено, что АМР и FMN снижают сродство фермента к метотрексату, а гликоген не оказывает влияния на связывание метотрексата с ферментом. Обнаружено, что метотрексат, фолиевая и фолиновая кислоты — ингибиторы гликогенфосфоорилазы Б. Ингибирование является обратимым и характеризуется положительной кинетической кооперативностью (коэффициент Хилла превышает единицу). Значения концентраций птеринов, необходимых для двукратного уменьшения скорости ферментативной реакции, возрастают в ряду фолиевая кислота, метотрексат, фолиновая кислота (0,65; 1,01 и 3,7 мМ соответственно). При совместном действии модификаторов на гликогенфосфоорилазу Б проявляется антагонизм между метотрексатом, фолиевой и фолиновой кислотами, с одной стороны, и АМР и FMN — с другой.

Гликогенфосфоорилаза (КФ 2.4.1.1) из скелетных мышц кролика — фермент, состоящий из двух идентичных субъединиц. Один из способов регуляции активности фермента состоит в ферментативном фосфорилировании остатка Ser<sup>14</sup>. Дефосфорилированная форма фермента (Б) в отличие от фосфорилированной (А) требует присутствия активатора АМР для проявления каталитической активности. Методом рентгенструктурного анализа установлено, что субъединица гликогенфосфоорилазы имеет два центра связывания гетероциклических соединений [1—5]: нуклеотидный активаторный центр, расположенный на расстоянии 3,0—3,3 нм от каталитического центра фермента в области контакта мономеров в димерной молекуле гликогенфосфоорилазы, и нуклеотидный ингибиторный центр, который находится на расстоянии 1,0—1,2 нм от каталитического центра фермента [6, 7]. Связывание АМР и IMP происходит в обоих нуклеотидных центрах: связывание АМР и IMP в активаторном центре приводит к активации фермента [6, 7], а связывание этих лигандов в ингибиторном центре — к ингибированию фермента [5—8]. Ингибирование гликогенфосфоорилазы А некоторыми пуриновыми соединениями (аденин, аденозин, инозин, кофеин), а также FMN обусловлено связыванием молекулы ингибитора в ингибиторном центре [6, 9], в то время как другие ингибиторы пуринового ряда (теофиллин, АТР) связываются в обоих нуклеотидных центрах фермента [6]. Ингибирующее действие АТР и NADH на гликогенфосфоорилазу Б обусловлено связыванием молекул ингибитора в обоих нуклеотидных центрах фермента [7]. Связывание FMN с гликогенфосфоорилазой Б также приводит к ингибированию фермента [8]. Физиологическое значение модуляции каталитической активности гликогенфосфоорилазы Б биогенными эффекторами, по-видимому, состоит в регуляции фосфорилиза гликогена [6, 8, 10].

Ингибиторами гликогенфосфоорилазы А являются также птерины: биоптерин, ксантоптерин и фолиевая кислота. Константа ингибирования для фолиевой кислоты незначительно отличается от соответствующей величины для метилированных оксипуринов (кофеин, теофиллин). Ксантоптерин и биоптерин обладают меньшим сродством к гликогенфосфоорилазе А по сравнению с фолиевой кислотой [11].

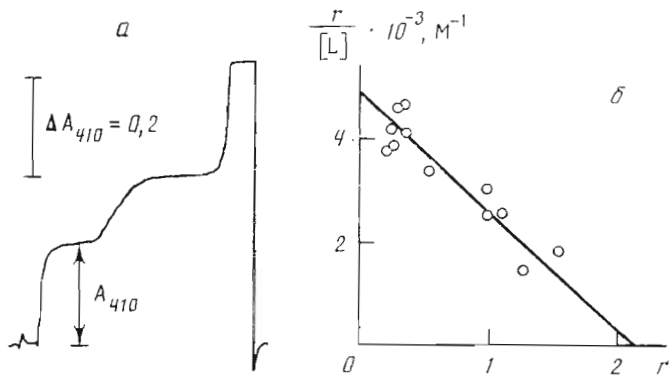


Рис. 1. Связывание метотрексата гликогенфосфорилазой Б: а — седиментация комплекса фермента (94 мкМ) с метотрексатом (100 мкМ). Время седиментации после достижения максимальной скорости вращения ротора (60 000 об/мин) 30 мин. Направление седиментации слева направо. б — линейная анаморфоза данных по связыванию (в координатах Скэтчарда). Концентрацию метотрексата варьировали в интервале 80–1000 мкМ, концентрацию фермента — в интервале 24–148 мкМ

Представлялось интересным изучить влияние фолиевой кислоты и других птериновых соединений на каталитическую активность гликогенфосфорилазы Б, а также исследовать стехиометрию и прочность комплекса фермента с птерином. Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия мышечной гликогенфосфорилазы Б с фолиевой кислотой, ее антиметаболитом (метотрексатом) и ее коферментной формой (фолиновой кислотой). Метотрексат и фолиновая кислота являются 4-амино-4-дезоксигидро-10-метильным и 5-формил-5,6,7,8-тетрагидропроизводными фолиевой кислоты соответственно.

Связывание метотрексата гликогенфосфорилазой Б изучено методом седиментации в аналитической ультрацентрифуге с использованием абсорбционной оптики. За процессом седиментации следили по поглощению метотрексата в области 360–490 нм, где поглощением фермента можно пренебречь. Свободный метотрексат практически не седиментирует. Поэтому наблюдаемая граница седиментации смеси гликогенфосфорилазы Б с метотрексатом (рис. 1а) связана с движением комплекса фермент — метотрексат, а остаточное плато у мениска соответствует поглощению свободного лиганда. Для определения микроскопической концентрации диссоциации ( $K$ ) комплекса фермент — метотрексат и числа центров связывания лиганда в субъединице фермента ( $n$ ) мы использовали линейную анаморфозу, соответствующую уравнению Скэтчарда:

$$\frac{r}{[L]} = \frac{n}{K} - \frac{1}{K} r, \quad (1)$$

где  $r$  — число молей связанного метотрексата на 1 моль субъединиц фермента;  $[L]$  — равновесная концентрация свободного лиганда (рис. 1б). Прямая проведена по методу наименьших квадратов. Значения  $K$  и  $r$  определены равными  $(0,43 \pm 0,08)$  мМ и  $(2,1 \pm 0,4)$  соответственно. Наличие двух метотрексатсвязывающих центров в одной субъединице гликогенфосфорилазы Б, по-видимому, обусловлено связыванием птерина в обоих нуклеотидных центрах фермента. Липейный характер зависимости (1) указывает на практически одинаковое сродство обоих центров к метотрексату.

Для оценки влияния аллостерических лигандов гликогенфосфорилазы Б на сродство фермента к метотрексату нами было изучено связывание метотрексата с ферментом в присутствии FMN, гликогена и АМР (табл. 1). Высокомолекулярный субстрат, гликоген, практически не оказывает влияния на связывание метотрексата с ферментом. Это указывает на отсутствие взаимодействия между центрами связывания метотрексата

**Влияние аллостерических лигандов на  
связывание метотрексата  
гликогенфосфорилазой Б**

Аллостерический лиганд	Концентрация связанного метотрексата, мкМ
—	15±0,5
Гликоген	14±0,5
Гликоген + АМР	7,2±1,0
FMN	4,3±1,0

*Примечание.* Концентрации реагентов: метотрексат — 100 мкМ, фермент — 57 мкМ, FMN — 68 мкМ, АМР — 1 мМ, гликоген — 4,5 мг/мл.

и гликогена в димерной молекуле гликогенфосфорилазы Б. Влияние АМР на связывание метотрексата гликогенфосфорилазой Б изучено в условиях, исключающих индуцируемую АМР ассоциацию димерных молекул фермента с образованием тетрамерных молекул гликогенфосфорилазы Б, а именно в присутствии 4,5 мг/мл гликогена. Совместное присутствие АМР и гликогена приводит к двукратному уменьшению концентрации связанного метотрексата (табл. 1). Трехкратное уменьшение концентрации связанного метотрексата наблюдается в присутствии FMN (табл. 1). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о снижении сродства фермента к метотрексату в присутствии АМР и FMN.

Снижение сродства фермента к метотрексату в присутствии АМР, по-видимому, можно объяснить, во-первых, возможной конкуренцией между АМР и метотрексатом за активаторный центр связывания, во-вторых, взаимодействием двух аллостерических центров гликогенфосфорилазы Б, в результате которого связывание АМР в активаторном центре может ослабить связывание метотрексата в ингибиторном центре (последнее объяснение согласуется с известными данными по взаимодействию кофеина, связывающегося в ингибиторном центре гликогенфосфорилазы Б и АМР [12]).

Так как по нашим данным [8] субъединица гликогенфосфорилазы Б содержит один FMN-связывающий центр, а по данным рентгеноструктурного анализа [9] FMN связывается в ингибиторном центре фермента, снижение связывания метотрексата гликогенфосфорилазой Б в присутствии FMN может быть следствием конкуренции этих лигандов за ингибиторный центр фермента.

*Ингибирование гликогенфосфорилазы Б метотрексатом, фолиевой и фолиновой кислотами* впервые исследовано в настоящей работе. Нами изучено влияние метотрексата на характер зависимости начальной стационарной скорости ферментативной реакции ( $v$ ), катализируемой гликогенфосфорилазой Б, от концентрации АМР (рис. 2). Колоколообразный характер зависимости  $v$  от [АМР] обусловлен активацией гликогенфосфорилазы Б при относительно низких концентрациях АМР и ингибированием фермента при более высоких концентрациях АМР. Активирующее и ингибирующее действие АМР на гликогенфосфорилазу Б характеризуются положительной гомотропной кинетической кооперативностью. Коэффициенты Хилла для активации ( $h_a$ ) и для ингибирования ( $h_i$ ) превышают единицу (табл. 2). Значения коэффициентов Хилла определяли разностным методом, предложенным в работе [13]. Для расчета концентраций «полунасыщения» ( $[A]_{0,5}$  и  $[I]_{0,5}$ ), предельной скорости для восходящей ветви при  $[A]_0 \rightarrow \infty$  ( $V_\infty$ ) и предельной скорости для нисходящей ветви при  $[A]_0 \rightarrow 0$  ( $V_0$ ) экспериментальные данные линеаризовали в координатах  $\{v/[A]_0^{h_a}; v\}$  или  $\{v/[I]_0^{h_i}; v\}$ . Полученные значения  $V_\infty$  и  $V_0$  практически не отличаются друг от друга при одинаковой концентрации метотрексата. При увеличении концентрации метотрексата происходит уменьшение величин  $V_\infty$ ,  $V_0$ ,  $h_a$  и  $h_i$ , в то время как величина  $[A]_{0,5}$  воз-

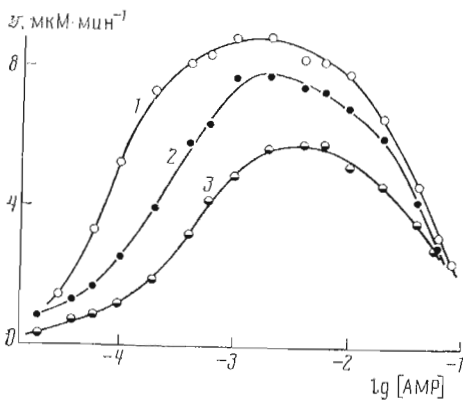


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость начальной стационарной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б, от молярной концентрации АМР в отсутствие (1) и в присутствии 0,95 (2) и 2,85 мМ (3) метотрексата

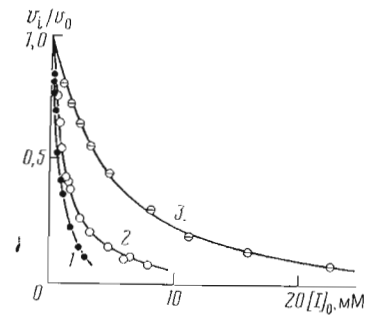


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость относительной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б в присутствии 0,1 мМ АМР, от концентрации ингибитора: фолиевой кислоты (1), метотрексата (2) и фолиновой кислоты (3)

растает, а величина  $[I]_{0,5}$  незначительно отличается от исходного значения. Снижение величины  $V_{\infty}$ , соответствующей скорости реакции в условиях насыщения активаторных центров фермента АМР, означает образование тройного комплекса, включающего фермент, АМР и метотрексат. Повышение величины  $[A]_{0,5}$  в присутствии метотрексата свидетельствует о конкурентных взаимоотношениях метотрексата и АМР при связывании с ферментом.

Изучение реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б, в присутствии метотрексата и других птериновых соединений (рис. 3) позволяет утверждать, что фолиевая и фолиновая кислоты, так же как и метотрексат, являются ингибиторами гликогенфосфорилазы Б. Ингибирующее действие птеринов обратимо, поскольку предварительное смешивание исходных растворов фермента и птерина не приводит к изменению степени ингибирования фермента по сравнению со смешиванием исходного раствора фермента с разбавленным в 49 раз раствором птерина (при условии равенства конечных концентраций фермента и птерина). Ингибирующее действие метотрексата, фолиевой и фолиновой кислот на гликогенфосфорилазу Б в присутствии 0,1 мМ АМР характеризуется положительной гомотропной кинетической кооперативностью (табл. 3). Значения коэффициентов Хилла для различных птериновых соединений мало отличаются друг от друга, в то время как величина  $[I]_{0,5}$  для фолиновой кислоты почти в 6 раз превышает значение  $[I]_{0,5}$  для фолиевой кислоты. Ингибирующее действие кальциевой соли фолиновой кислоты характеризуется следующими параметрами:  $h_1 = 1,35 \pm 0,03$  и  $[I]_{0,5} = 4,65 \pm 0,08$  мМ. Некоторое ослабление ингибирующего действия фолиновой кислоты при использовании ее кальциевой соли, по-видимому, обусловлено антагонизмом между ионами кальция и фолиновой кислотой при их совместном действии на гликогенфосфорилазу Б. Специально было установлено, что при добавлении  $\text{CaCl}_2$  до конечной концентрации 8 мМ происходит некоторое повышение скорости ферментативной реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой Б.

Ингибирующее действие птериновых соединений на гликогенфосфорилазу Б в присутствии аллостерических эффекторов, АМР и FMN, также является кооперативным (табл. 3). Присутствие 1 мМ АМР приводит к увеличению коэффициентов Хилла для метотрексата и фолиевой кислоты и к уменьшению величины  $h_1$  для фолиновой кислоты. Добавление 84 мкМ FMN вызывает повышение величины коэффициента Хилла для метотрексата и фолиновой кислоты, но не влияет на величину  $h_1$  для фолиевой кислоты. Добавление 84 мкМ FMN в присутствии 1 мМ АМР

Влияние метотрексата на параметры уравнения Хилла для активации ингибирования мышечной гликогенфосфорилазы Б под действием АМР

Концентрация метотрексата, мМ	$V_{\infty}$	$h_a$	$[A]_{0,5}$ , мкМ	$V_0$	$h_i$	$[I]_{0,5}$ , мкМ
0	1,57±0,06	1,59±0,08	83,9±0,5	1,51±0,08	1,47±0,10	42,2±0,4
0,95	1,5±0,2	1,20±0,09	198±4	1,4±0,2	1,2±0,1	39±2
2,85	1,06±0,02	1,2±0,1	336±9	1,08±0,02	1,2±0,1	48±2

Таблица 3

Влияние АМР и FMN на параметры уравнения Хилла для ингибирования мышечной гликогенфосфорилазы Б птеринами  
В скобках указаны значения стандартных ошибок

Птерин	0,1 мМ АМР		1,0 мМ АМР		0,1 мМ АМР и 84 мкМ FMN		1,0 мМ АМР и 84 мкМ FMN	
	$h_i$	$[I]_{0,5}$ , мМ	$h_i$	$[I]_{0,5}$ , мМ	$h_i$	$[I]_{0,5}$ , мМ	$h_i$	$[I]_{0,5}$ , мМ
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)
Фолиевая кислота	1,25 (0,02)	0,65 (0,01)	1,58 (0,01)	1,64 (0,02)	1,29 (0,01)	1,64 (0,02)	1,46 (0,02)	1,60 (0,02)
Фолиновая кислота	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)

приводит к увеличению коэффициентов Хилла для метотрексата и фолиевой кислоты, но к уменьшению значения параметра  $h_i$  для фолиновой кислоты. Для всех птериновых соединений наблюдается значительное увеличение параметра  $[I]_{0,5}$  в присутствии 1 мМ АМР, 84 мкМ FMN и их сочетания. Это указывает на антагонизм между птеринами, с одной стороны, и АМР и FMN — с другой.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии взаимодействия между гликогенфосфорилазой Б и птериновыми соединениями. Взаимодействие фермента с птеринами ослабляется в присутствии аллостерических лигандов АМР и FMN.

### Экспериментальная часть

Выделение и приготовление растворов гликогенфосфорилазы Б из скелетных мышц кролика, а также очистка и основные характеристики гликогена из печени свиньи описаны в работе [8]. Концентрацию гликогенфосфорилазы Б определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции, равного  $1,32 \text{ (г/л)}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [14]. Метотрексат, FMN, фолиевую кислоту и кальциевую соль фолиновой кислоты (научно-производственное объединение «Витамины») использовали без дополнительной очистки. Фолиновую кислоту получали добавлением муравьиной кислоты к раствору фолината кальция по методу, описанному в работе [15]. Концентрации птеринов определяли спектрофотометрически с использованием следующих величин молярного поглощения ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ):  $\epsilon_{316} = 7,2 \cdot 10^3$  для фолиевой кислоты [16],  $\epsilon_{285} = 3,72 \cdot 10^4$  для фолиновой кислоты [17],  $\epsilon_{370} = 6,9 \cdot 10^3$  для метотрексата. Последняя величина была рассчитана исходя из  $\epsilon_{370} = 7,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для раствора метотрексата в 0,1 М NaOH [16] и соотношения величин поглощения при 370 нм, равного 1,03, для эквимоллярных растворов метотрексата в 0,1 М NaOH и в 0,05 М глицилглициновом буфере, pH 6,8, который применялся в опытах с ферментом. В работе использовали динатриевую соль адепозин-5'-монофосфорной кислоты и дикальциевую соль глюкозо-1-монофосфорной кислоты (Reanal, Венгрия), остальные реактивы — производства «Союзреактив» марки х.ч. и ч.д.а. Все растворы использовали в течение одного дня.

Седиментационные исследования проводили на аналитической ультрацентрифуге Spinco E, оборудованной абсорбционной оптической системой, фотоэлектрическим сканирующим устройством, монохроматором, мультиплексором (Beckman, Австрия) и двухкоординатным самописцем NE-230 (EMG, Венгрия). В опытах использовали четырехкапельный ро-

тор An-F, Ti и двухсекторные ячейки с угольными 12-мм вкладышами (№ 306, 493). Скорость вращения ротора 60 000 об/мин. В опыте использовали три ячейки, две из которых содержали смесь метотрексата с ферментом, а третья (контрольная) содержала только метотрексат в той же концентрации, что и в остальных ячейках. Седиментацию регистрировали по поглощению лиганда. После оседания комплекса фермента с метотрексатом на дно ячейки концентрация оставшегося лиганда в области плато у мениска принималась равной равновесной концентрации свободного лиганда ( $[L]$ ). Величину ее рассчитывали на основании значений оптического поглощения ( $A$ ), регистрируемого к определенному моменту времени в области остаточного плато у мениска, в ячейке, содержащей смесь фермента с метотрексатом, и оптического поглощения лиганда ( $A_0$ ) на том же радиальном расстоянии в контрольной ячейке. Поскольку величина  $[L]_0$  известна, то  $[L] = [L]_0 \cdot A/A_0$ . Такой способ расчета  $[L]$  позволяет избежать ошибок, связанных с радиальным разбавлением. Концентрацию связанного лиганда  $[EL]$  определяли как разность между величинами  $[L]_0$  и  $[L]$ , а величину  $r$  — как отношение  $[EL]/[E]_0$ , где  $[E]_0$  — общая молярная концентрация фермента в расчете на мономер. Молекулярную массу мономера фермента принимали равной 97 400 [18]. Все седиментационные опыты проводили в присутствии 0,1 М KCl при 20° С.

Седиментационное изучение влияния FMN на связывание метотрексата ферментом проводили с регистрацией оптической плотности на нескольких (не менее пяти) длинах волн в области 360–490 нм, поскольку спектры поглощения метотрексата и FMN перекрываются. Для расчета концентрации свободных FMN и метотрексата (MTX) использовали систему уравнений:

$$\left. \begin{aligned} A_1 &= \varepsilon_1^{\text{FMN}}[\text{FMN}] + \varepsilon_1^{\text{MTX}}[\text{MTX}] \\ A_2 &= \varepsilon_2^{\text{FMN}}[\text{FMN}] + \varepsilon_2^{\text{MTX}}[\text{MTX}] \end{aligned} \right\}, \quad (2)$$

где  $A$  — величина оптического поглощения, соответствующая суммарному поглощению свободных FMN и метотрексата,  $[\text{FMN}]$  и  $[\text{MTX}]$  — концентрации свободных FMN и метотрексата,  $\varepsilon^{\text{FMN}}$  и  $\varepsilon^{\text{MTX}}$  — молярные коэффициенты поглощения для FMN и MTX, которые определяли экспериментально для каждой длины волны,  $l$  — длина оптического пути в ячейке. Значения  $[\text{FMN}]$  и  $[\text{MTX}]$  рассчитывали на основании оптического поглощения при разных длинах волн и усредняли. Во избежание артефактов в каждой серии из двух опытов использовали дополнительные контроли.

В типичном эксперименте одна ячейка содержала MTX, вторая — FMN, третья — смесь фермента и FMN, четвертая — смесь фермента и MTX, а пятая и шестая — смесь гликогенфосфорилазы Б с FMN и MTX. При такой постановке опыта концентрации свободных лигандов ( $[\text{FMN}]$  и  $[\text{MTX}]$ ) в третьей и четвертой ячейках можно рассчитать двумя способами: 1) используя коэффициенты молярного поглощения, по формуле  $A = \varepsilon l [L]$ ; 2) по формуле  $[L] = [L]_0 \cdot A/A_0$  на основании сравнения оптических плотностей в области плато у мениска в контрольной ячейке и в ячейке, содержащей смесь фермента с лигандом. Оба способа расчета дают согласующиеся результаты. В полной системе, содержащей фермент, FMN и MTX, концентрации свободных лигандов рассчитывали согласно системе уравнений (2).

Ферментативную реакцию проводили в направлении синтеза гликогена в присутствии 4 мМ глюкозо-1-фосфата и 1,0 г/л гликогена при 30° С. Ионную силу всех растворов доводили до 0,3 М с помощью KCl; расчет величины вклада AMP и глюкозо-1-фосфата в суммарную ионную силу раствора описан в работе [8]. Каталитическую активность гликогенфосфорилазы Б определяли турбидиметрическим методом, описанным в работе [19], при 500 нм. Относительная ошибка определения скорости ферментативной реакции составляла 4%. Ферментативную реакцию запускали добавлением 50 мкг гликогенфосфорилазы Б к реакционной смеси, конечный объем которой составлял 2,5 мл. Специально было показано, что

порядок добавления компонентов не влияет на величину начальной скорости ферментативной реакции. Все эксперименты с гликогенфосфорилазой B проводили в 0,05 M глицилглициновом буфере, pH 6,8, в присутствии 0,2 mM EDTA.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Wang J. H., Kwok S.-C., Wirch E., Suzuki I. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1970. V. 40. № 6. P. 1340-1347.
2. Ho H. C., Wang J. H. // *Biochemistry*. 1973. V. 12. № 23. P. 4750-4755.
3. Morange M., Garcia Blanco F., Vandebunder B., Buc H. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 65. № 2. P. 553-563.
4. Fletterick R. J., Sygusch J., Semple H., Madsen N. B. // *J. Biol. Chem.* 1976. V. 251. № 19. P. 6142-6146.
5. Johnson L. N., Stura E. A., Wilson K. S., Sansom M. S. P., Weber J. T. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 134. № 3. P. 639-653.
6. Kasvinsky P. J., Madsen N. B., Sygusch J., Fletterick R. J. // *J. Biol. Chem.*, 1978. V. 253. № 9. P. 3343-3351.
7. Stura E. A., Zanotti G., Babu Y. S., Sansom M. S. P., Stuart D. J., Wilson K. S., Johnson L. N. // *J. Mol. Biol.* 1983. V. 170. № 2. P. 529-565.
8. Каинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Лурвак Ж. И., Жилина Т. А., Глебова Г. Д., Пекель Н. Д., Березовский В. М. // *Биоорганич. химия*. 1984. Т. 10. № 9. С. 1161-1170.
9. Sprang S., Fletterick R., Stern M., Yang D., Madsen N. B., Sturtevant J. // *Biochemistry*. 1982. V. 21. № 9. P. 2036-2048.
10. Morgan H. E., Parmeggiani A. // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 239. № 8. P. 2440-2445.
11. Kasvinsky P. J., Shechosky S., Fletterick R. J. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. № 24. P. 9102-9106.
12. Madsen N. B., Shechosky S., Fletterick R. J. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. № 19. P. 4460-4465.
13. Силонова Г. В., Ливанова И. Б., Курганов Б. И. // *Молекуляр. биология*. 1969. Т. 3. Вып. 5. С. 768-784.
14. Buc H., Ulmann A., Goldberg M., Buc H. // *Biochimie*. 1971. B. 53. № 3. S. 283-289.
15. Roth B., Hultquist M. E., Fahrenbach M. J., Cosulich D. B., Broquist H. P., Brockman J. A., Jr., Smith J. M., Jr., Parker R. P., Stokstad E. L. R., Jakes T. H. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1952. V. 74. № 13. P. 3247-3252.
16. Blakley R. L. *The biochemistry of folic acid and related pteridines*. Amsterdam: North-Holland publishing company, 1969. P. 91-95.
17. Uyeda K., Rabinowitz J. C. // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. № 4. P. 1701-1710.
18. Titani K., Koide A., Hermann J., Ericsson L. H., Kumar S., Wade R. D., Walsh K. A., Neurath H., Fischer E. H. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. № 11. P. 4762-4766.
19. Сугрובה Н. П., Лисовская Н. П., Курганов Б. И. // *Биохимия*. 1982. Т. 47. Вып. 11. С. 1883-1888.

Поступила в редакцию  
29.IX.1986

После доработки  
15.XII.1986

#### THE INTERACTION OF MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE *b* WITH METHOTREXATE, FOLIC AND FOLINIC ACIDS

KLINOV S. V., CHEBOTAREVA N. A., SHEIMAN B. M., BIRINBERG E. M.,  
KURGANOV B. I., RUDAKOVA I. P.

*Scientific-Industrial Association «Vitamins», Moscow*

The interaction of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b* with methotrexate, folic and folinic acids has been studied. Microscopic dissociation constant for the glycogen phosphorylase *b* - methotrexate complex determined by analytical ultracentrifugation is 0,43 mM. A subunit of glycogen phosphorylase *b* is shown to have two sites for methotrexate binding. AMP and FMN diminish the affinity of glycogen phosphorylase *b* to methotrexate, whereas glycogen does not influence the methotrexate binding to the enzyme. Methotrexate, folic and folinic acids are found to be inhibitors of the muscle glycogen phosphorylase *b*. The inhibition is reversible and characterized by positive kinetic cooperativity (the Hill coefficient exceeds one unity). The value of the pterin concentration causing two-fold diminishing of the enzymatic reaction rate increased in the order: folic acid (0,65 mM), methotrexate (1,01 mM), folinic acid (3,7 mM). The antagonism between methotrexate, folic and folinic acids, on the one hand, and AMP and FMN, on the other, is revealed for their combined action