



УДК 577.152.241*1.042

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЫШЕЧНОЙ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ *b*
С РИБОФЛАВИНОМ, ЕГО ТЕТРААЦЕТИЛПРОИЗВОДНЫМ
И ИХ АНАЛОГАМИКлинов С. В., Кургузов В. И., Чеботарева Н. А.,
Жилина Т. А., Литвак Ж. И., Глебова Г. Д.,Березовский В. М.

Научно-производственное объединение «Витамины», Москва

Изучено взаимодействие гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика с рибофлавином, 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавином и их аналогами, содержащими различные заместители в положениях 6, 8 и 8α. Методом скоростной седиментации определена константа диссоциации комплекса фермента с рибофлавином, равная 12,5 мкМ (рН 6,8; 20° С). Обнаружено, что рибофлавин и его производные ингибируют гликогенфосфорилазу *b*. Значения концентрации «полунасыщения» для ингибиторов возрастают в ряду: рибофлавин (18 мкМ), 8-метокси(нор)рибофлавин (23 мкМ), 8α-бром-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (40 мкМ), 6-бромрибофлавин (40 мкМ), 8α-гидроксирибофлавин (60 мкМ), 8-гидрокси(нор)рибофлавин (90 мкМ), 8α-(γ-карбокситриопропиламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (90 мкМ), 8α-[*n*-(5-этил-1,3,4-тиодиазол-2-илсульфамидо)фениламино]-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (100 мкМ), 8α-(*L*-метионино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (120 мкМ), 8α-[*n*-(тиазол-2-илсульфамидо)фениламино]-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (140 мкМ), 8α-(*n*-сульфамидофениламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (180 мкМ), 8α-(*n*-карбокситриопропиламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (210 мкМ), 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (250 мкМ), 8α-(*L*-гомосерино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (340 мкМ), 8α-(*L*-глутамо)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (360 мкМ). Существование комплексов гликогенфосфорилазы *b* с рибофлавином и его аналогами доказано методами абсолютной и разностной спектрофотометрии.

Взаимодействие гликогенфосфорилазы (КФ 2.4.1.1) из скелетных мышц кролика с природными флавинами явилось предметом ряда исследований [1—4]. Авторами работы [1] было обнаружено, что рибофлавин, FMN и FAD — высокоэффективные ингибиторы гликогенфосфорилазы *a* — фосфорилированной формы фермента. Связывание FMN и гликогенфосфорилазы *a* протекает с образованием интеркалятивного комплекса флавина с остатками Туг-612 и Phe-285, которые расположены в аллостерическом ингибиторном центре фермента [2]. FMN, FAD и их производные являются также ингибиторами гликогенфосфорилазы *b* — дефосфорилированной формы фермента [3, 4]. Ингибирующее действие FMN на гликогенфосфорилазу *b* проявляется в снижении предельной скорости ферментативной реакции и увеличении концентрации «полунасыщения» для АМР [3]. Введение различных заместителей в положение 8 изоаллоксазиновой части молекул FMN и FAD, а также в положение 6 изоаллоксазинового остатка FMN приводит к увеличению концентрации флавина, необходимой для двукратного уменьшения скорости ферментативной реакции. Связывание FMN и FAD с гликогенфосфорилазой *b* вызывает изменение спектральных свойств изоаллоксазинового хромофора [3, 4]. Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика с рибофлавином, 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавином и их 6- и 8-замещенными производными.

Связывание рибофлавина гликогенфосфорилазой *b* было изучено методом скоростной седиментации с помощью абсорбционной фотоэлектрической сканирующей системы. Типичная картина седиментации смеси рибофлавина с ферментом представлена на рис. 1а. Регистрацию оптической плотности проводили при длине волны, соответствующей максимуму по-

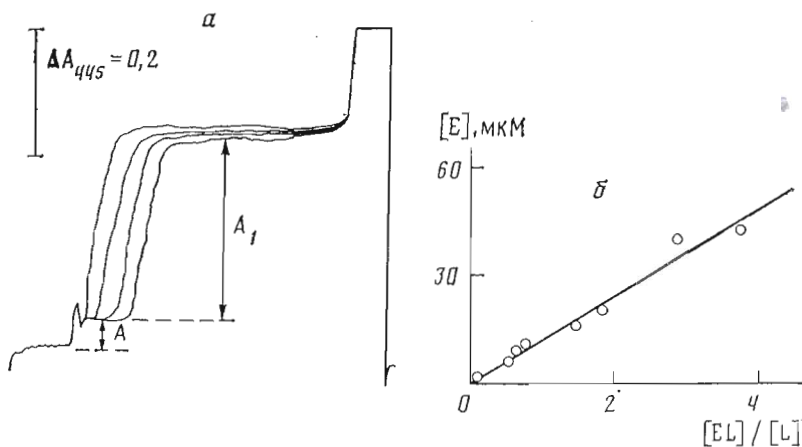


Рис. 1

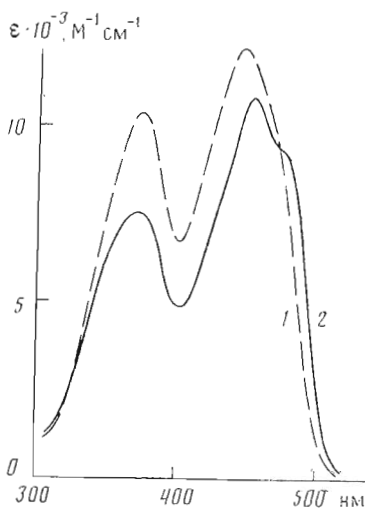


Рис. 2

Рис. 1. Связывание рибофлавина гликогенфосфорилазой *b*. *a* — седиментация комплекса рибофлавина (23 мкМ) с ферментом (61 мкМ в расчете на мономер). Направление седиментации слева направо. Время седиментации: 4, 10, 16 и 22 мин; *б* — линейная анаморфоза данных по связыванию. $[E]_0 = 3-64$ мкМ

Рис. 2. Спектр оптического поглощения свободного рибофлавина (1) и рибофлавина, связанного гликогенфосфорилазой *b* (2)

глощения рибофлавина (445 нм). В изученных условиях лиганд практически не седиментирует, и наблюдаемая граница седиментации связана с движением комплекса фермента с рибофлавином. Высота границы седиментации (A_1) соответствует оптической плотности связанного лиганда, а высота остаточного плато у мениска (A) — оптической плотности свободного лиганда. Микроскопическую константу диссоциации (K) комплекса гликогенфосфорилазы *b* с рибофлавином рассчитывали графически, предполагая стехиометрию комплекса равной 1 : 1, по формуле

$$[E] = K[EL]/[L], \quad (1)$$

где $[E]$ — равновесная концентрация гликогенфосфорилазы *b* в расчете на мономер, $[L]$ и $[EL]$ — равновесные концентрации свободного и связанного лигандов. Величину $[EL]$ рассчитывали как разность между общей концентрацией лиганда $[L]_0$ и $[L]$, а величину $[E]$ — как разность между общей концентрацией фермента в расчете на мономер $[E]_0$ и величиной $[EL]$. Расчет $[L]$ проводили на основании значений оптического поглощения, регистрируемого к определенному моменту времени в области остаточного плато у мениска (A) в ячейке, содержащей смесь лиганда и фермента, и оптического поглощения на том же радиальном расстоянии в контрольной ячейке (без фермента) (A_0). Поскольку величина $[L]_0$ известна, то

$$[L] = [L]_0 A / A_0. \quad (2)$$

Такой способ расчета позволяет избежать ошибок, связанных с радиаль-

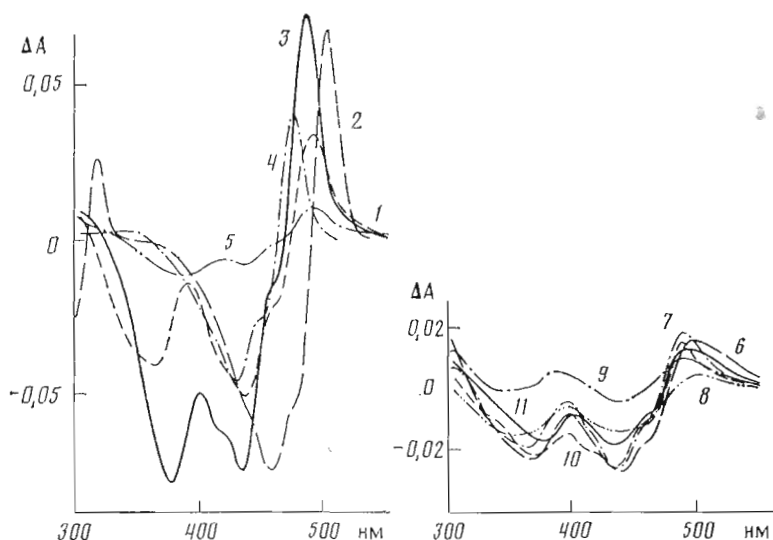


Рис. 3. Разностные спектры оптического поглощения смеси гликогенфосфорилазы *b* (42 мкМ в расчете на мономер) с флавидами (в скобках приведена концентрация флавида, мкМ): 1 — 8 α -гидроксирибофлавин (74), 2 — 8-гидрокси(нор)рибофлавин (29), 3 — рибофлавин (54), 4 — 8-метокси(нор)рибофлавин (23), 5 — 6-бромрибофлавин (17), 6 — 8 α -(*n*-карбоксофениламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (100), 7 — 8 α -бром-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (33), 8 — 8 α -(*n*-сульфамидофениламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (35), 9 — 8 α -(*L*-глутамино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (88), 10 — 8 α -(γ -карбоксопропиламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (56), 11 — 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин (70)

пым разбавлением. Линейный характер зависимости $[E]$ от $[EL]/[L]$ (рис. 16) можно рассматривать как подтверждение того, что одна молекула рибофлавина связывается на субъединице гликогенфосфорилазы *b*. Величина K , рассчитанная из наклона прямой, оказалась равной $12,5 \pm \pm 0,5$ мкМ.

Спектр оптического поглощения рибофлавина заметно изменяется в присутствии гликогенфосфорилазы *b* (рис. 2). Для использованных концентраций флавида (50 мкМ) и фермента (407 мкМ в расчете на мономер) степень насыщения рибофлавина белком составляет 97% (рассчитана на основании измеренной константы диссоциации комплекса). Таким образом, наблюдаемый спектр оптического поглощения рибофлавина в присутствии фермента практически полностью соответствует спектру оптического поглощения рибофлавина, связанного гликогенфосфорилазой *b*. При связывании с белком значительно уменьшается интенсивность полос поглощения рибофлавина при 445 и 374 нм, полоса поглощения 374 нм смещается на 3 нм в сторону меньших длин волн, полоса поглощения 445 нм смещается на 6 нм в сторону больших длин волн, появляется заметное плечо в области 470 нм. Оптическое поглощение пиридоксаль-5'-фосфата, простетической группы, по-видимому, не изменяется при взаимодействии фермента с рибофлавином, поскольку поглощение смеси флавида с ферментом в области 310–350 нм практически совпадает с суммарным поглощением индивидуальных компонентов смеси. Изменение спектральных свойств рибофлавина, по-видимому, обусловлено уменьшением полярности микроокружения флавида при связывании с белком.

Разностный спектр оптического поглощения системы гликогенфосфорилаза *b* — рибофлавин (рис. 3, 3) имеет положительный пик при 487 нм и два отрицательных пика при 435 и 378 нм (кроме того, наблюдаются «плечи» при 420 и 460 нм). Появление положительного пика при 487 нм обусловлено батохромным сдвигом первой полосы поглощения рибофлавина при связывании с ферментом. Разностные спектры смесей гликогенфосфорилазы *b* с 8 α -гидрокси-, 8-гидрокси(нор)- и 6-бромрибофлавинами (рис. 3, 1, 2, 5) сходны с соответствующими спектрами смесей фермен-

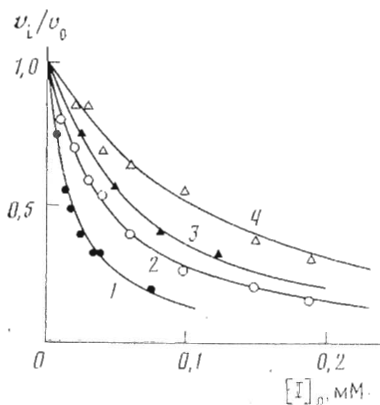


Рис. 4. Зависимость относительной скорости реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой *b* в присутствии 0,1 мМ АМР, от концентрации рибофлавина (1), 8α-бром-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина (2), 8α-гидроксирибофлавина (3) и 8α-[*n*-(5-этил-1,ω,4-тиодиазол-2-илсульфамидо)фениламино]-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина (4). Точки — экспериментальные данные, сплошные кривые рассчитаны с использованием средних значений параметров уравнения Хилла, приведенных в таблице

та и производных FMN с идентичными модификациями [3]. Изменение спектральных свойств флавинов при смешивании с ферментом (рис. 3, 1—11) свидетельствует об образовании комплексов гликогенфосфорилазы *b* с рибофлавином, его тетраацетилпроизводным и их аналогами.

Ингибирование гликогенфосфорилазы *b* в присутствии рибофлавина и его производных проявляется в снижении каталитической активности, индуцируемой АМР (рис. 4). Обратимость ингибирования гликогенфосфорилазы *b* флавинами следует из того, что предварительное смешивание раствора фермента с концентрированным раствором ингибитора не приводит к изменению степени ингибирования 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. [5]):

$$\lg \left(\frac{v_0}{v_i} - 1 \right) = h \lg [I]_0 - h \lg [I]_{0,5}, \quad (3)$$

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 $v_i = v_0/2$, h — коэффициент Хилла. Параметры уравнения (3) и стандартные ошибки параметров определяли с использованием метода наименьших квадратов. Ингибирующее действие рибофлавина, 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина и большей части их аналогов характеризуется положительной кинетической кооперативностью (таблица), что свидетельствует о существовании положительных кооперативных взаимодействий между центрами связывания рибофлавина и его производных в димерной молекуле гликогенфосфорилазы *b*. Введение заместителей в положения 6 и 8 незначительно влияет на величину коэффициента Хилла, но заметно ухудшает связывание флавинов с гликогенфосфорилазой *b*, что проявляется в увеличении $[I]_{0,5}$ (таблица). Максимальное изменение сродства в ряду рибофлавина и его 8-замещенных производных наблюдается при переходе от рибофлавина к 8-гидроксирибофлавинолу: величина $[I]_{0,5}$ для этого аналога в 5 раз выше соответствующей величины для рибофлавина. Сходные изменения величины $[I]_{0,5}$ наблюдаются для 8-замещенных производных FMN [3]. Ацетилирование рибитильных гидроксильных групп рибофлавина мало влияет на значение коэффициента Хилла, но значительно ухудшает связывание флавинов с гликогенфосфорилазой *b*: величина $[I]_{0,5}$ для тетраацетилпроизводного в 13 раз превышает соответствующую величину для рибофлавина. Введение остатков *L*-гомосерина и *L*-глутаминовой кислоты в 8α-положение 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина приводит к дальнейшему ухудшению сродства флавинов к ферменту, в то время как введение остатков *L*-метионина, γ-аминомасляной и *n*-аминобензойной кислот, а также различных сульфаниламидных групп вызывает некоторое ослабление эффек-

Параметры уравнения Хилла для ингибирования гликогенфосфорилазы β рибофлавином и его производными

Ингибитор	h	$^1I_{0,5}$, мкМ
Рибофлавин	1,09±0,03	18±2
8-Метокси (нор) рибофлавин	1,16±0,05	23±4
6-Бромрибофлавин	0,9±0,2	40±10
8 α -Гидроксирибофлавин	1,18±0,05	60±10
8-Гидроксн (нор) рибофлавин	1,3±0,2	90±20
2',3',4',5'-Тетраацетилрибофлавин	1,4±0,1	250±30
8 α -Бром-2',3',4',5'-Тетраацетилрибофлавин	1,07±0,01	40±2
8 α -(γ -Карбоксипропиламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,06±0,04	90±20
8 α [<i>n</i> -(5-Этил-1,3,4-тиодиазол-2-илсульфамидо)фениламино]-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,17±0,05	100±20
8 α -(<i>L</i> -Метионино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,0±0,2	120±20
8 α -[<i>n</i> -(Тиазол-2-илсульфамидо)фениламино]-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,1±0,2	140±30
8 α -(<i>n</i> -Сульфамидофениламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,24±0,05	180±30
8 α -(<i>n</i> -Карбоксифениламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,26±0,04	210±30
8 α -(<i>L</i> -Гомосерино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,2±0,2	340±40
8 α -(<i>L</i> -Глутамо)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин	1,37±0,06	360±40

та ацетилирования гидроксильных групп рибитильного остатка рибофлавина. Максимальная компенсация эффекта ослабления сродства рибофлавина при его тетраацетилировании наблюдается при введении атома Br в 8 α -положение: величина $[I]_{0,5}$ для 8 α -бром-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина в 6 раз ниже соответствующей величины для 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина. Таким образом, модификация молекулы рибофлавина как по изоаллоксазиновой, так и по рибитильной части приводит к значительно изменению сродства гликогенфосфорилазы β к флавиону.

Физиологическое значение взаимодействия рибофлавина с гликогенфосфорилазой может состоять в том, что витамин В₂ выступает в роли регулятора процессов метаболизма гликогена. Повышенное содержание гликогена при избыточном поступлении рибофлавина [6] может быть обусловлено замедлением фосфорилаза гликогена вследствие ингибирования гликогенфосфорилазы, в то время как ослабление ингибирующего действия рибофлавина может приводить к уменьшению содержания гликогена, которое наблюдается при экспериментальном арибофлавинозе [7].

Экспериментальная часть

В работе использовали динатриевую соль аденозин-5'-монофосфорной кислоты и дикальциевую соль глюкозо-1-фосфорной кислоты (Reanal, Венгрия), рибофлавин и остальные реактивы отечественного производства. 6-Бромрибофлавин синтезировали по методике, описанной в работе [8], 8-метокси(нор)- и 8-гидроксн(нор)рибофлавины — по [9], 8 α -гидроксирибофлавин — по [10], 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин — по [11], 8 α -бром-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавин — по [12], 8 α -(*L*-метионино)-, 8 α -(*L*-гомосерино)-, 8 α -(*L*-глутамо)-, 8 α -(γ -карбоксипропиламино)- и 8 α -(*n*-карбоксифениламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавины — по [13], 8 α -(*n*-сульфамидофениламино)-, 8 α -[*n*-(тиазол-2-илсульфамидо)фениламино]- и 8 α -[*n*-(5-этил-1,3,4-тиодиазол-2-илсульфамидо)фениламино]-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавины — согласно [14]. Концентрации флавинов определяли спектрофотометрически с использованием следующих значений молярных коэффициентов поглощения: $\epsilon_{445}=1,23 \cdot 10^4$ M⁻¹см⁻¹ для рибофлавина [15], $\epsilon_{441}=2,49 \cdot 10^4$ M⁻¹см⁻¹ для 8-метокси(нор)рибофлавина [15], $\epsilon_{441}=2,49 \cdot 10^4$ M⁻¹см⁻¹ для 8-гидроксн(нор)рибофлавина [9], $\epsilon_{445}=9,7 \cdot 10^3$ M⁻¹см⁻¹ для 6-бромрибофлавина [16]. Молярные коэффициенты поглощения 8 α -гидроксирибофлавина, 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина и его 8 α -замещенных производных при 445 нм полагали равными соответствующему коэффициенту для рибофлавина. Выделение, приготовление растворов и определение концентрации гликогенфосфорилазы β из скелетных мышц кролика, а также очистка и основные характеристики гликогена из печени свиньи описаны в работе [3]. Все эксперименты проводили в 0,05 M глицилглициновом буфере, рН 6,8, в присутствии 0,2 мМ EDTA.

Седиментационные исследования комплексообразования гликогенфосфорилазы *b* с рибофлавином проводили в аналитической ультрацентрифуге Spinco, модель E (Beckman, Австрия), оборудованной абсорбционной оптической системой и фотоэлектрическим сканирующим устройством, мультиплексором, монохроматором и дополнительным двухкоординатным самописцем NE-230 (EMG, ВНР). В опытах по скоростной седиментации использовали четырехканальный ротор An-F, T₁ и двухсекторные ячейки с угловыми вкладышами (12 мм, № 306493). Скорость вращения ротора составляла 60 000 об/мин. В каждом опыте использовали три ячейки, две из которых содержали смесь лиганда с ферментом, а третья ячейка (контрольная) содержала только лиганд в той же самой концентрации, что и в остальных ячейках. Седиментацию регистрировали по оптическому поглощению рибофлавина. После оседания комплекса фермент-лиганд на дно ячейки концентрацию оставшегося лиганда принимали равной равновесной концентрации свободного лиганда. Опыты проводили при 20° С в присутствии 0,1 М KCl.

Абсолютный спектр оптического поглощения рибофлавина в смеси с гликогенфосфорилазой *b* регистрировали с использованием спектрофотометра Cary-219 (Varian) в присутствии 0,1 М KCl при 20° С. В измерительную кювету помещали смесь растворов фермента и рибофлавина, а в кювету сравнения — раствор фермента с той же концентрацией.

Разностные спектры смесей гликогенфосфорилазы *b* с рибофлавином и его производными регистрировали по четырехкюветной схеме с использованием спектрофотометра Cary-219 при 30° С в присутствии 0,3 М KCl. В ячейку образца помещали две кюветы, содержащие смесь растворов фермента и флавина в соотношении 1:1 по объему; в ячейку сравнения помещали кюветы с раствором фермента и с раствором флавина. Длины оптического пути этих четырех кювет (5 мм) различались не более чем на 0,1%. В случае рибофлавина и 8-гидрокси(нор)рибофлавина вносили поправку на изменение спектральных характеристик флавина при двукратном разбавлении раствора.

Ферментативную реакцию проводили в направлении наращивания полисахаридных цепей гликогена в присутствии 0,1 мМ АМР, 4 мМ глюкозо-1-фосфата, 1,0 г/л гликогена и 0,3 М KCl при 30° С. Каталитическую активность гликогенфосфорилазы *b* определяли турбидиметрическим методом, описанным в работе [17], с использованием спектрофотометра Cary-219. Скорость ферментативной реакции в присутствии флавинов определяли при длине волны, соответствующей относительно небольшому значению оптического поглощения флавина: 310 нм для рибофлавина, 8-метокси(нор)-, 6-бром-, 8 α -гидроксирибофлавина, 2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина, 320 нм для 8 α -бром-, 8 α -(*L*-метниоино)-, 8 α -(*L*-гомосерино)-, 8 α -(*L*-глутамо)-, 8 α -(γ -карбоксипропиламино)- и 8 α -(*n*-карбоксифениламино)-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина, 350 нм для 8-гидрокси(нор)рибофлавина, 550 нм для 8 α -(*n*-сульфамидофениламино)-, 8 α -[*n*-(тиазол-2-илсульфамидо)фениламино]- и 8 α -[*n*-(5-этил-1,3,4-тиодиазол-2-илсульфамидо)фениламино]-2',3',4',5'-тетраацетилрибофлавина. Относительная ошибка определения скорости ферментативной реакции составляла 3% во всех опытах, за исключением экспериментов при 550 нм, где она равнялась 4%. Ферментативную реакцию запускали добавлением 50 мкг гликогенфосфорилазы *b* 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kasvinsky P. J., Shechosky S., Fletterick R. J. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 24. P. 9102—9106.
2. Sprang S., Fletterick R., Stern M., Yang D., Madsen N., Sturtevant J. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 9. P. 2036—2048.
3. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Глебова Г. Д., Пекель Н. Д., Березовский В. М. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 9. С. 1161—1170.
4. Клинов С. В., Чеботарева Н. А., Курганов Б. И., Литвак Ж. И., Жилина Т. А., Пекель Н. Д., Березовский В. М. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 196—204.
5. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука. 1978. С. 43.
6. Koch R. // Intern. Z. Vitamin-Forsch. 1950. V. 22. № 2. S. 136—145.
7. Масленникова Е. М. // Вопр. питания. 1956. Т. 15. № 1. С. 3—9.
8. Литвак Ж. И., Березовский В. М. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 556—561.
9. Глебова Г. Д., Кириллова Н. И., Березовский В. М. // Журн. общ. химии. 1979. Т. 49. Вып. 8. С. 1884—1895.
10. Жилина Т. А., Шейман Б. М., Мельникова Л. М., Березовский В. М. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 8. С. 1103—1106.
11. McCormick D. B. // J. Heterocycl. Chem. 1970. V. 7. № 2. P. 447—450.
12. Walker W. P., Singer T. P., Ghisla S., Hemmerich P. // Eur. J. Biochem. 1972. V. 26. № 2. P. 279—289.
13. Тульчинская Л. С., Жилина Т. А., Степанов А. И., Березовский В. М. // Журн. общ. химии. 1975. Т. 45. Вып. 4. С. 928—932.
14. Рудиг Э. А., Жилина Т. А., Нецадим Г. Н., Кирина Н. С., Тульчинская Л. С., Полякова Н. А., Березовский В. М. // Хим.-фарм. журн. 1978. Т. 12. № 1. С. 52—57.

15. Березовский В. М. Химия витаминов. М.: Пищ. пром-сть, 1973. С. 548—552.
 16. Steenamp D. J., Kenney W. C., Singer T. P. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 8. P. 2812—2817.
 17. Сугрובה Н. П., Лисовская Н. П., Курганов В. И. // Биохимия. 1982. Т. 47. Вып. 11. С. 1883—1888.

Поступила в редакцию
8.II.1988

THE INTERACTION OF MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE
b WITH RIBOFLAVIN, ITS TETRAACETYL DERIVATIVE
 AND THEIR ANALOGUES

KLINOV S. V., KURGANOV B. I., CHEBOTAREVA N. A., ZHILINA T. A.,
 LITVAK ZR. I., GLEBOVA G. D., BEREZOVSKII V. M.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

The interaction of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b* with riboflavin, 2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin and their analogues, containing different substituents in the positions 6, 8 and 8 α , has been studied. Dissociation constant for the complex of the enzyme and riboflavin was determined to be 12,5 μ M (pH 6,8; 20° C) by sedimentation velocity method. Riboflavin and its analogues have been found to inhibit glycogen phosphorylase *b*. The inhibitor half-saturation concentration values increase in the following order: riboflavin (18 μ M), 8-methoxy(nor)riboflavin (23 μ M), 8 α -bromo-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (40 μ M), 6-bromoriboflavin (40 μ M), 8 α -hydroxyriboflavin (60 μ M), 8-hydroxy(nor)riboflavin (90 μ M), 8 α -(γ -carboxypropylamino)-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (90 μ M), 8 α -[*p*-(5-ethyl-1,3,4-thiodiazol-2-ylsulfamido)phenylamino]-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (100 μ M), 8 α -(*L*-methionyno)-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (120 μ M), 8 α -[*p*-(thiazol-2-ylsulfamido)phenylamino]-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (140 μ M), 8 α -(*p*-sulfamidophenylamino)-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (180 μ M), 8 α -(*p*-carboxyphenylamino)-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (210 μ M), 2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (250 μ M), 8 α -(*L*-homoserino)-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (340 μ M), 8 α -(*L*-glutamo)-2',3',4',5'-tetraacetylriboflavin (360 μ M). The existence of glycogen phosphorylase *b* complexes with riboflavin and its analogues has been proved by methods of absolute and difference spectrophotometry.