

11. REGULATION: ZYKLISCHE ENZYMKASKADEN

11.1. REGULATION DURCH PROTEINPHOSPHORYLIERUNG

Reversible Proteinphosphorylierung ist der wohl wichtigste Mechanismus für die Kontrolle von Enzymaktivität. In Säugetierzellen sind mindestens 1/3 aller Proteine einfach oder mehrfach phosphoryliert. Proteinphosphorylierung wird von Proteinkinase katalysiert, Dephosphorylierung von Proteinphosphatasen. 5% aller Gene kodieren für Proteinkinase und Proteinphosphatasen. Die rund 5'000 bis 8'000 verschiedenen Proteinkinase und Proteinphosphatasen haben je unterschiedliche, zum Teil auch überlappende Spezifität für ihre jeweiligen Proteinsubstrate. Ein und dieselbe Proteinkinase kann mehrere, verschiedene Proteine phosphorylieren, und ein und dasselbe Protein kann von mehreren, verschiedenen Proteinkinase phosphoryliert werden. Ein Protein kann bis zu 20 verschiedene Phosphorylierungsstellen aufweisen, die von verschiedenen Proteinkinase (überlappend oder nicht) erkannt werden und in einer geordneten oder ungeordneten Reihenfolge phosphoryliert werden. Proteinkinase und Phosphatasen können selbst auch phosphoryliert werden, entweder von sich selbst (Autophosphorylierung, z.B. die Kinase A phosphoryliert A) oder von anderen Proteinkinase (z.B. die Kinase A phosphoryliert die Phosphatase B). Kinase, Phosphatasen und ihre Substrate bilden ein komplexes, sich selbst regulierendes und stabilisierendes Netzwerk. Die Verknüpfungen in diesem Netzwerk sind hierarchisch und lateral, divergent und konvergent. Über Sensoren/Rezeptoren (Subdomänen der Kinase und Phosphatasen oder Untereinheiten eines Rezeptor::Kinase-Komplexes) werden intrazelluläre und extrazelluläre "Messparameter" (Konzentration von intrazellulären und extrazellulären Botenstoffen/Hormonen, Licht, Temperatur, osmotischer Druck, Metaboliten, ATP/AMP, usw.) erfasst, deren Informationsgehalt integriert und komplexe Antworten gesteuert. Die Proteinkinase/Proteinphosphatasen-Netzwerke sind redundant, d.h., Ausfall einer oder auch mehrerer Komponenten hat oft keine sichtbaren Folgen. Durch die hohe Redundanz wird die zelluläre und organismische Regulation fehlertolerant. Redundanz und die komplexe Verknüpfung machen die experimentelle Charakterisierung dieser Systeme aber auch schwierig und für den Nichtspezialisten rasch unübersichtlich. Z.B. kann eine experimentell ausgelöste "Störung" (z.B. Mutation einer Kinase) völlig folgenlos sein, ganz verschiedene Störungen können alle denselben Effekt haben, eine bestimmte Störung kann sehr verschiedene Folgen gleichzeitig haben, oder eine Störung können vom "Kontext" abhängig, ganz unterschiedliche Folgen haben. Wegen ihrer teilweise pleiotropen Wirkung (Beeinflussung vieler Prozesse gleichzeitig) sind Kinase und Phosphatasen bevorzugte *Targets* für neuartige pharmakologische Wirkstoffe. Das Problem besteht darin, herauszufinden, welches die nicht redundanten Kinase und Phosphatasen sind, und ob allenfalls mehrere, verschiedene *Targets* gleichzeitig gehemmt werden müssen, um den gewünschten Effekt erzielen zu können.

11.2 STRUKTUR UND REAKTIVITÄT DER PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN

Folgende Aminosäurereste werden hauptsächlich phosphoryliert:

In Eukaryonten

Ser und Thr: Phosphorylierung bewirkt "allosterische" **Aktivierung oder Inaktivierung** des Enzyms (Veränderung von K_M [häufig], Hill-Koeffizient/ Kooperativität [häufig], k_{cat} [selten]).

Tyr: Phosphorylierung bewirkt "Veränderung" der Proteinoberfläche, welche die **Bildung von supramolekularen Komplexen** zwischen dem an Tyr phosphorylier-

ten Protein und anderen Proteinuntereinheiten ermöglicht. Diese Komplexe haben neue Aktivitäten, welche die Untereinheiten je allein nicht haben.

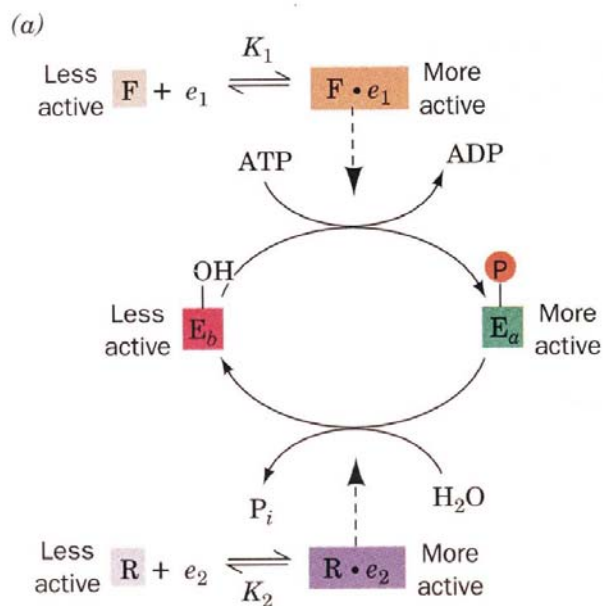
Es gibt eine klare Unterscheidung zwischen Tyr spezifischen und Ser und/oder Thr spezifischen Kinasen. P-Ser, P-Thr, P-Tyr sind stabil, hydrolysieren nicht spontan. Es braucht Phosphatasen, um die Phosphorylierung "rückgängig" zu machen. Die Mehrzahl der Phosphatasen sind ebenfalls entweder P-Tyr spezifisch oder P-Ser/ und/oder P-Thr spezifisch. Nur wenige Proteinphosphatasen sind für P-Ser UND P-Tyr spezifisch (unspezifisch bez. der Aminosäure, aber immer noch spezifisch bez. der Substrat-Proteine).

In Prokaryonten

His und Asp: His- und Aspartylphosphate sind kurzlebiger und hydrolysieren meist spontan (wenn auch mit unterschiedlichen Halbwertszeiten, je nach Struktur der Phosphorylierungsstelle). Es braucht also keine Phosphatasen. Der Grad der Phosphorylierung eines Proteins wird von der Aktivität der Kinasen bestimmt.

11.3. DAS BASIS-SCHALTELEMENT

Biologische Regelsysteme bestehen aus einer Serie (Kaskade) von Kinase/ Phosphatase-Schaltelementen.



Basisschaltelement: Die monozyklische Enzymkaskade:
Elemente: Proteinkinase, Proteinphosphatase, Enzymsubstrat

Das elementare Schaltelement umfasst drei Proteinkomponenten:

- Regulierbares **Ziel-Protein** (*Target*, Substrat), welches in zwei Formen vorkommt, phosphoryliert/nicht phosphoryliert. Diesen Formen habe unterschiedliche Funktionen, z.B. mehr aktiv/weniger aktiv; kooperativ (sigmoide Kinetik)/ nicht kooperativ (hyperbolische Kinetik).

- **Proteinkinase**, welche das Zielprotein phosphoryliert. Die Aktivität der Kinase wird selbst durch einen oder mehrere allosterische Effektoren und/oder Proteinphosphorylierung reguliert.
- **Proteinphosphatase**, welche das Zielprotein dephosphoryliert. Die Aktivität der Phosphatase wird durch allosterische Effektoren und/oder Proteinphosphorylierung reguliert.

Ein am selben Zielprotein wirksames Proteinkinase/phosphatasepaar ist in der Regel reziprok reguliert, d.h. Effektoren, die die Kinase aktivieren, hemmen die Phosphatase und umgekehrt.

11.4. DIE ZYKLISCHE ENZYMKASKADE

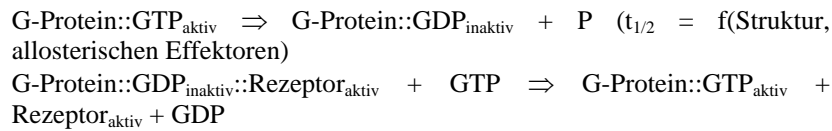
Mehrere (5-10, die Anzahl nimmt zu) elementare Schaltelemente können in Serie angeordnet sein, wobei Proteinkinasen und Phosphatasen selbst die regulierbaren Zielproteine sind.

Solche Enzymkaskaden haben folgende neuen Eigenschaften, welche ein elementares Schaltelement nicht oder nur beschränkt hat.

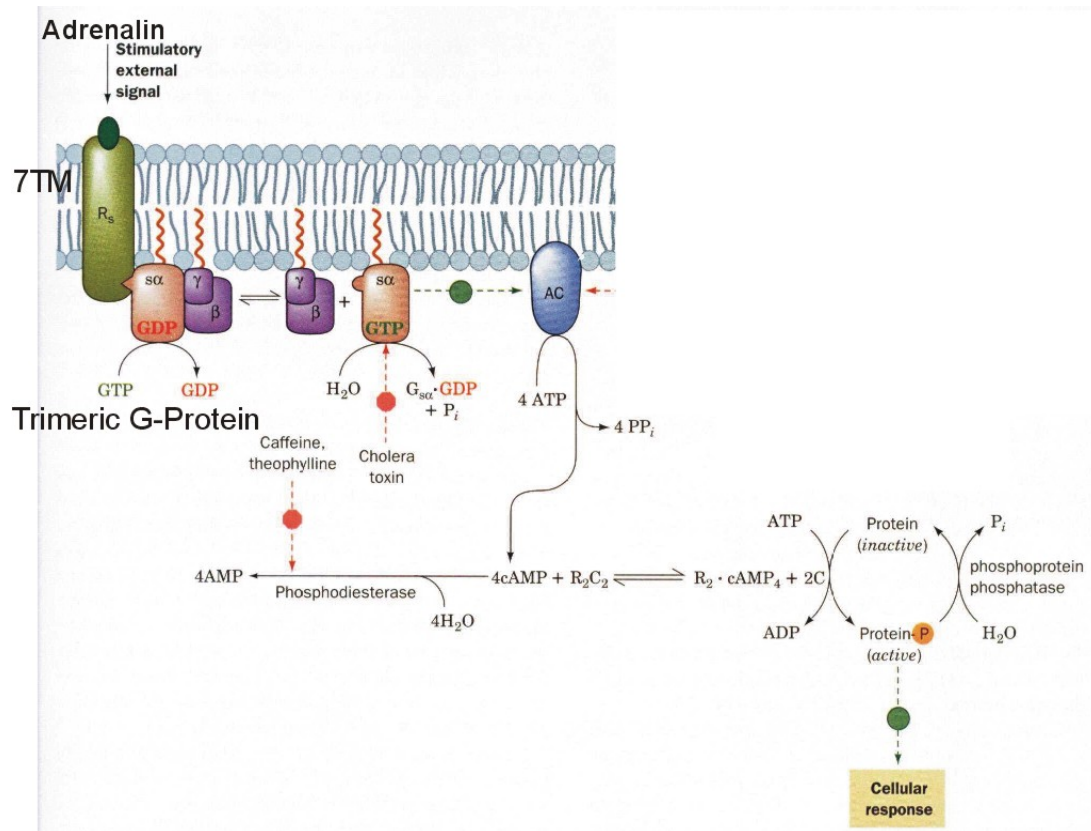
- **Signale** können **exponentiell verstärkt** werden. Weil eine Kinase gegenüber ihrem Zielprotein katalytisch wirkt, kann ein einziges Kinasemolekül viele Zielproteinmoleküle phosphorylieren (z.B. 1-50 pro sec). Es ist so möglich, dass 5-50 primäre Signalmoleküle (z.B. Hormone an der Oberfläche einer Zelle) 10^6 - 10^8 Zielmoleküle in der Zelle aktivieren können.
- Die Anzahl der *Signalinputs* kann vergrößert werden. Aus strukturellen Gründen kann die Aktivität ein und desselben Proteinhomooligomers von nicht mehr als 5-10 allosterischen Effektoren moduliert werden (die Oberfläche eines Proteins ist begrenzt und damit auch die Anzahl der Bindungsstellen (400-1200 $\text{Å}^2/\text{Ligand}$). Die Kinasen und Phosphatasen einer Kaskade können je von verschiedenen allosterischen Effektoren reguliert werden. Damit kann die **Gesamtzahl der Inputs** vergrößert werden, aus denen die **Kaskade** dann einen integrierten **Output berechnet**.

Das Prinzip der zyklischen Enzymkaskade wurde bei Untersuchungen der Regulation des Glykogenstoffwechsels erstmals "entdeckt" und formuliert. Es wurde dann gefunden, dass auch der Triglyzeridstoffwechsel über zyklische Enzymkaskaden reguliert wird, wobei gewisse Proteinkinasen/Phosphatasen beiden Schaltkreisen angehören. Zyklische Enzymkaskaden sind aber viel weiter verbreitet, sie kontrollieren z.B. den geordneten Ablauf der Zellteilung (Zellzyklus, Krebs), den Tag/Nachtrhythmus, Chemotaxis bei Bakterien, usw.

Beachte, dass es **neben** der **zyklischen Enzymkaskade** mit Proteinkinase/ Proteinphosphatase als Basiselement noch ein zweites universelles Schaltelement gibt, die sog. **G-Proteine**. Sie sind monomere und heterotrimere ($\alpha\beta\gamma$) GTP-bindende Proteine. Sie kommen in zwei Formen vor, komplexiert mit GTP und komplexiert mit GDP, welchen die funktionellen Zustände aktiv/inaktiv entsprechen. G-Proteine werden durch Komplexierung mit andern Proteinen (in der Regel mit Rezeptoren) aktiviert, d.h., in diesen Komplexen wird GDP gegen GTP ausgetauscht. Die **mit GTP komplexierte Form** der G-Proteine **entspricht der phosphorylierten Form** eines an Ser oder Thr phosphorylierten Proteins. Die mit GTP komplexierten, aktiven G-Proteine können nun andere Proteine allosterisch aktivieren. Die **G-Proteine haben GTP-ase-Aktivität**, d.h., sie inaktivieren sich selbst nach einem durch die Struktur der GTP-Bindungsstelle und von externen Faktoren bestimmten Zeit (msec/min). Es braucht also keine Phosphatasen, die zur Phosphatase analoge Funktion ist im G-Protein eingebaut.



Die den Glykogenstoffwechsel kontrollierenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren und die zyklische Enzymkaskade soll im Folgenden als ein besonders gut untersuchtes, aber immer noch nicht endgültig verstandenes Beispiel, näher beschrieben werden.



11.5. REZIPROKE REGULATION VON GLYKOGENSYNTHESE UND -ABBAU

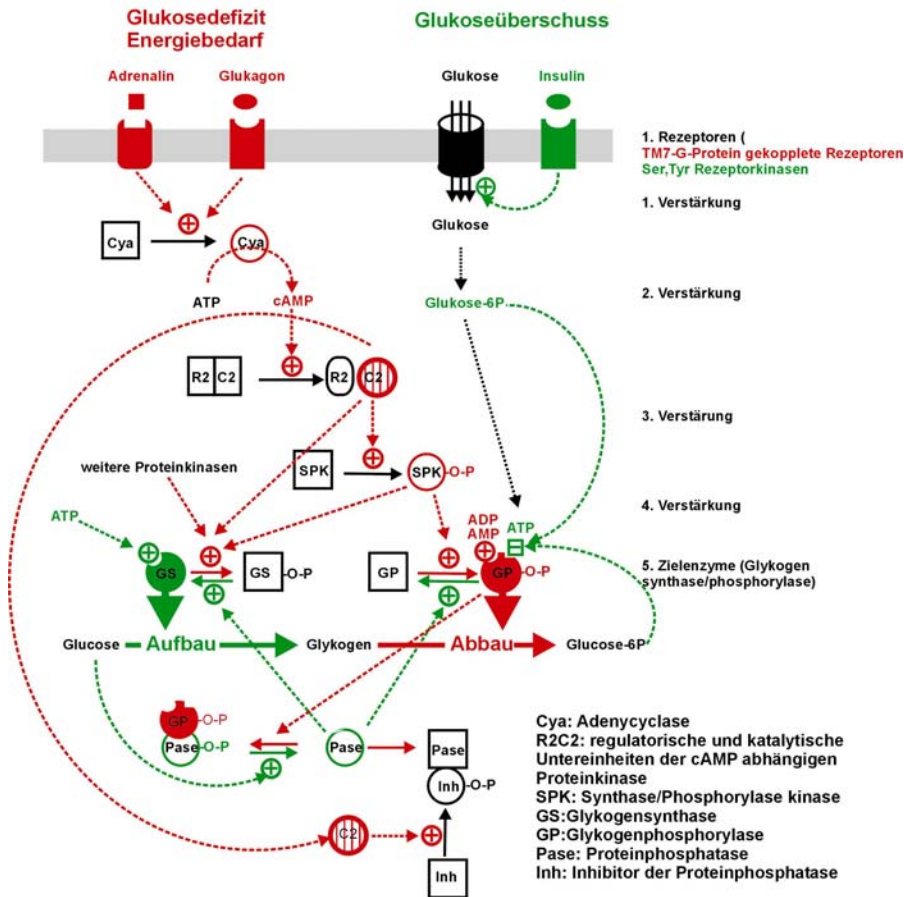
Bei der Kontrolle des Glykogenstoffwechsels stellen sich folgende "Probleme":

- Wie wird verhindert, dass Auf- und Abbaureaktionen gleichzeitig erfolgen? Diese Frage stellt sich immer, wenn Auf- und Abbaureaktion in derselben Zelle und im selben Kompartiment erfolgen.
- Wie werden die metabolischen Bedürfnisse der glykogenhaltigen Zelle mit den metabolischen Bedürfnissen des Organismus koordiniert? Wann wird Leberglykogen abgebaut, um Glukose für das Gehirn zur Verfügung zu stellen, wann wird Glykogen aufgebaut, um Glukose aus stärkereicher Mahlzeit für den späteren Bedarf zu speichern und die Blutzuckerkonzentration konstant zu halten?
- Wie bewirkt die innere Uhr, dass der Stoffwechsel nachts reduziert, aber am Morgen bereits vor Erwachen hochgefahren wird?
- Wie wird bei plötzlich einsetzender Muskelaktivität in der Muskelzelle zuerst der Glykogenabbau und dann rechtzeitig auch der Triglyzeridabbau angeschaltet?

- Wie werden die Glykogen- und Triglyzeridreserven in der Leber bzw. im Fettgewebe mobilisiert?

Der Glykogenstoffwechsel wird von intrazellulären und extrazellulären (organismischen) Faktoren reguliert.

Hormon-abhängige Kontrolle der Glykogenstoffwechsels zyklische Enzymkaskade



Intrazelluläre Faktoren

Wirken allosterisch und reziprok an den Zielenzymen Glykogensynthase und Glykogenphosphorylase. Die Konzentration der intrazellulären Faktoren ist grösser als die Konzentration der Zielenzyme. Signalverstärkung ist nicht nötig. Sättigung mit Liganden ist möglich. Der Grad der Sättigung hängt von der Affinität der allosterischen Bindungsstellen für die Liganden ab. Diese Affinität kann durch Phosphorylierung der Synthase und Phosphorylase moduliert werden. Integration der "allosterischen Signale" durch die Zielenzyme selbst

Produktion: Glukose, Glc-6P und hohe ATP-Konzentration hemmen die Glykogenphosphorylase und stimulieren die Glykogensynthase allosterisch. Es hat genügend ATP und Glc-1P für den Zellstoffwechsel, Überschuss-Glukose kann in Glykogen eingebaut werden.

Allosterische Aktivierung: AMP hat gegenteiligen Effekt von ATP. AMP signalisiert intrazelluläres "Glukosedefizit" (Regeneration von ATP ungenügend). Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration führt ebenfalls zu einer Aktivierung des Glykogenabbaus. Anstieg von Ca^{2+} ist auch verantwortlich für die Muskelkontraktion. Über Ca^{2+} erfolgt die Koordination zwischen Energie verbrauchender Muskelaktivität und Mobilisierung von Glukose aus Muskelglykogen.

Extrazelluläre Faktoren

Weil die Leber den ganzen Körper mit Glukose zu versorgen hat (Kontrolle des Blutzuckers), muss der Glykogenstoffwechsel auch durch extrazelluläre Signale kontrolliert werden.

Die Konzentration der extrazellulären Botenstoffe ist viel geringer als diejenige der intrazellulären Glykogensynthase/Phosphorylase. Die extrazellulären Effektoren dringen nicht in die Zelle ein. Sie müssen an Membranrezeptoren binden. Die Zahl der Membranrezeptoren ist ebenfalls viel kleiner als die Zahl der Synthase/ Phosphorylasmoleküle. Beachte, dass 40% aller Proteine, Membranproteine zu sein scheinen, dass das Volumen der Zellmembran (ohne Endoplasmatisches Retikulum) aber nur ca. 1-5% des Gesamtvolumens beträgt. Es hat wenig Platz für die vielen Membranproteintypen, diese kommen nur in relativ kleiner Anzahl pro Zelle vor.

Überlege: Zelle von 10 μm Durchmesser, ohne Vergrößerung der Oberfläche durch Auffaltung der Membran.

	Oberfläche	Volumen		% Protein
Zytoplasma		500 μm^3	100 %	Lösliche Proteine 60%
Membran (6 nm)	300-1000 μm^2	2-5 μm^3	0.5-1.0 %	Membranproteine 40%

Die extrazellulären Signale sind die Hormone Insulin, Glukagon und Adrenalin.

Insulin (ein Proteinormon, A- und B-Kette, 21 und 30 Aminosäuren, Synthese im endokrinen Pankreas, exokriner Pankreas produziert hydrolytische Enzyme der Verdauung, Proteasen, Lipasen und Glykosidasen) veranlasst die verstärkte **Glykogensynthese** in der Leber und im Muskel (dadurch wird die Glukosekonzentration im Blut gesenkt).

Glukagon (29 Aminosäuren, Synthese im endokrinen Pankreas) aktiviert den **Glykogenabbau in der Leber** (Blutglukose-Konzentration wird erhöht).

Adrenalin (aus Tyrosin abgeleitetes biogenes Amin, Synthese und Speicherung im Nebennierenmark, wird nach nervöser Stimulation aus Nebennierenmark ins Blut ausgeschüttet und via Blutbahn im Körper verteilt). Aktiviert den **Glykogenabbau im Muskel**. Adrenalinspiegel wird vom Nervensystem kontrolliert. Erlaubt z.B. den Muskel in Bereitschaft für erhöhte Aktivität zu setzen (vorsorgliche Erhöhung der Glc-6P-Konzentration).

Die reziproke Regulation des Glykogenstoffwechsels umfasst drei funktionelle Ebenen:

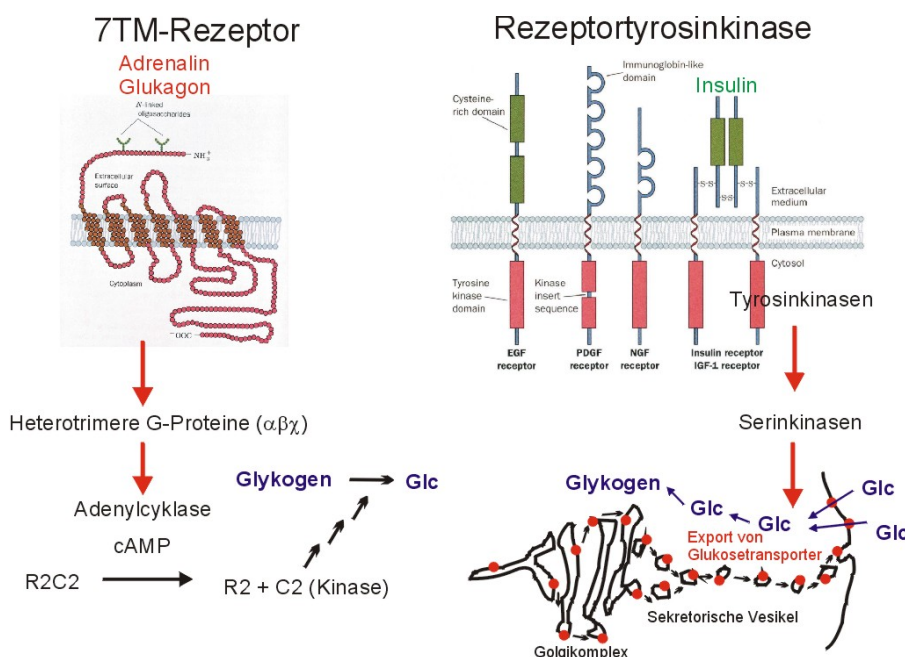
- Die Ebene der Rezeptoren und Sensoren: "Antennen" für intrazelluläre und extrazelluläre Signale.
- Die Ebene der Signalverstärkung und Signalintegration: Zyklische Enzymkaskaden.
- Die Ebene der durch Phosphorylierung und Bindung von allosterischen Effektoren regulierten Enzyme: Glykogenphosphorylase und Glykogensynthase.

11.5.1. Rezeptoren und Sensoren

Die **intrazellulären Sensoren** sind die Enzyme selbst (siehe unten) und einzelne Komponenten der zyklischen Enzymkaskade, welche durch intrazelluläre Faktoren (Edukte, Produkte) allosterisch reguliert werden. Ein ganz besonderer intrazellulärer Botenstoff ist das zyklische AMP (cAMP, siehe unten).

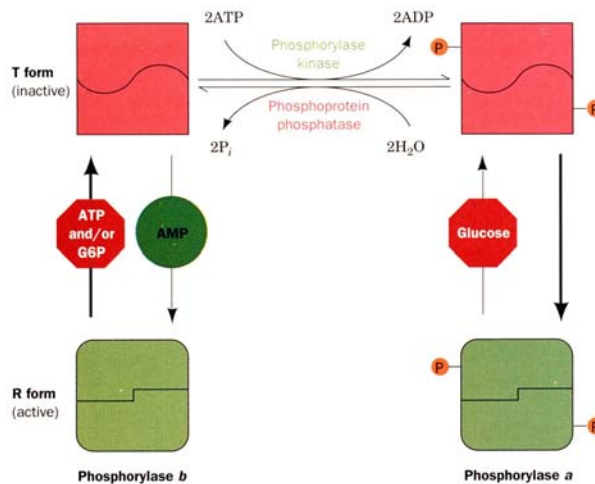
Membranrezeptoren erfassen die Konzentration der extrazellulären Faktoren: Adrenalin und Glukagon (stimulieren Glykogenabbau) und Insulin (stimuliert Glykogenaufbau).

- **Der Adrenalinrezeptor und der Glukagonrezeptor** gehören zur Superfamilie der **"7TM-G-Protein gekoppelten Rezeptoren"**. Diese Rezeptoren durchspannen die Membran siebenmal. Im Liganden gebundenen Zustand aktivieren sie heterotrimere GTP bindende Proteine (G-Proteine). Die **aktivierten G-Proteine** stimulieren ihrerseits die **Adenylatzyklase**, ein Enzym, welches die Synthese von **zyklischem AMP** (cAMP) aus ATP katalysiert. cAMP ist das "universelle", intrazelluläre Hungersignal (auch in Bakterien). cAMP aktiviert nun seinerseits die sog. cAMP abhängige Proteinkinase, die erste Komponente der **zyklischen Enzymkaskade**.
- Der **Insulinrezeptor** gehört zu einer ganz andern Superfamilie von Membranrezeptoren, den sog. **Rezeptor-Tyrosinkinasen**. Diese haben eine extrazelluläre Ligand (Hormon) bindende Domäne, eine einzige transmembrane Domäne und eine oder mehrere intrazelluläre Tyrosinkinase-Domänen. **Aktivierung** erfolgt durch vom extrazellulären Liganden induzierte **Dimerisierung**. Dadurch kommen die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen in direkten Kontakt und können sich gegenseitig phosphorylieren (Autophosphorylierung). Die P-Tyr binden und aktivieren nun zytoplasmatische Ser-Kinasen, die ersten Komponenten von zyklischen Enzymkaskaden. Diese Kaskaden enden aber nicht auf der Ebene der Enzyme des Glykogenstoffwechsels. Vielmehr regulieren sie die **Anzahl der Glukosetransporter in der Membran** und damit, über die **Aufnahme von Glukose**, die Konzentration von Glukose und Glukose-1-phosphat in den Leber- und Muskelzellen. Die intrazelluläre Glukose und Glukose-6-phosphat-Konzentration beeinflusst allosterisch die Aktivität der Glykogensynthase und Phosphorylase (siehe unten).



11.5.2. Glykogenphosphorylase und Glykogensynthase *Glykogenphosphorylase.*

Die Glykogenphosphorylase ist ein Homodimer, welches in zwei Zuständen, T (*tight*) inaktiv und R (*relaxed*) aktiv existiert (vgl. Phosphofruktokinase). Durch Phosphorylierung an **Ser-14** wird der Übergang von der T- zur R-Form erleichtert, d.h. das Gleichgewicht zur **aktiven R-Form** hin verschoben. Gleichzeitig wird die Empfindlichkeit für die intrazellulären, allosterischen Effektoren moduliert.



Die nicht phosphorylierte Form bindet vor allem die allosterischen Effektoren AMP und ATP. AMP und ATP kompetieren für dieselbe Bindungsstelle. Nur **AMP stabilisiert die R-Form** (es wirkt als Agonist). ATP hemmt die Bindung von AMP kompetitiv, hat sonst aber keinen Effekt (es wirkt als Antagonist), seine Wirkung, Stabilisierung der T-Form, ist also indirekt.

Die phosphorylierte Form bindet vor allem Glukose. Glukose stabilisiert die inaktive T-Form.

Glykogensynthase

Die Glykogensynthase enthält mindestens **neun verschiedene, phosphorylierbare Serinreste**, welche von mindestens **sechs verschiedenen Proteinkinasen** (Komponenten verschiedener zyklischen Enzymkaskaden) mit unterschiedlichen Spezifitäten für die 9 verschiedenen Serine phosphoryliert werden. Glykogen-Synthase wird durch Phosphorylierung **inaktiviert**.

Der **Adrenalin-Rezeptorkomplex** aktiviert via heterotrimeres G-Protein die Adenylatzyklen (1. Signalverstärkung).

Adenylatzyklase katalysiert die Synthese von cAMP, intrazelluläre Konzentration von cAMP ("Hungersignal") steigt an (2. Signalverstärkung).

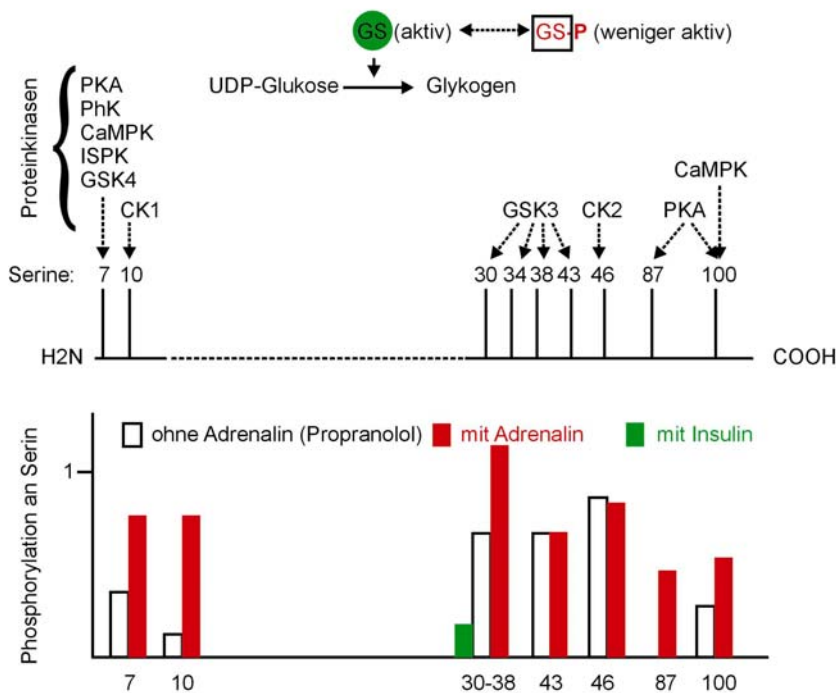
cAMP abhängige Proteinkinase (PKA). Die cAMP abhängig Proteinkinase ist ein **Heterotetramer (R₂C₂)** bestehend aus zwei katalytischen (C)- und zwei regulatorischen (R)-Untereinheiten. PKA wird von cAMP aktiviert. cAMP bindet an die R-Untereinheit und bewirkt die Dissoziation des R₂C₂-Komplexes. Nur die freien C-Untereinheiten haben Serinkinaseaktivität. Die C-Untereinheit der PKA

aktiviert (mindestens) drei verschiedene Substrate ("Signalausbreitung" und 3. Signalverstärkung):

- Glykogensynthese
- Phosphorylasekinase (SPK für Synthasephosphorylasekinase)
- Phosphataseinhibitor 1

Glykogensynthese wird durch Phosphorylierung (an mehreren Serinen) gehemmt. Glykogensynthese wird verlangsamt, weil Glukose anderswie gebraucht wird (Hungerzustand, Glykogenabbau).

Wirkung von Adrenalin und Insulin auf die Phosphorylierung von neun Serinresten der Glykogen Synthase (GS) aus Kaninchenmuskel



Cohen P (1993) Dissection of the protein phosphorylation cascades involved in insulin and growth factor action. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 63-67

Phosphorylasekinase (SPK für Synthasephosphorylasekinase). SPK ist ein **Heterotetramer** ($\alpha\beta\gamma\delta$). Die γ -Untereinheit hat Kinaseaktivität, die α -, β - und δ -Untereinheiten sind regulatorisch. SPK wird von der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert und aktiviert. Sie phosphoryliert ihrerseits die Glykogensynthase (an andern Serinen als die cAMP abhängige Proteinkinase) und hemmt diese noch mehr. Gleichzeitig phosphoryliert sie auch die **Glykogenphosphorylase**. Diese wird durch Phosphorylierung (an **Ser-14**) aktiviert (Gleichgewicht zum R-Zustand verschoben). Glykogen wird abgebaut, Glukose wird freigesetzt und steht für Muskelarbeit (Muskelglykogen) oder andere Organe (Leberglykogen) zur Verfügung. Dadurch, dass die Glykogenphosphorylase durch Phosphorylierung aktiviert, die Glykogensynthase inaktiviert wird, kommt es zur reziproken Regulation der beiden Enzyme.

Phosphataseinhibitor 1. Der Phosphataseinhibitor 1 wird von der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert und dadurch aktiviert. Der aktivierte Inhibitor bindet an die Phosphoproteinphosphatase 1 (siehe unten) und hemmt diese. Dadurch wird die Dephosphorylierung von Glykogensynthase, Glykogenphosphorylase und Phosphorylasekinase solange gehemmt, wie der Adrenalin- \Rightarrow cAMP-Stimulus anhält.

Es kann in Modellrechnungen gezeigt werden, dass mit ineinander "verschachtelten" zyklischen Enzymkaskaden, solche Zeitverzögerung (*time delays*) realisiert werden können (Systeme von gekoppelten, nicht linearen Differentialgleichungen, oszillierende Reaktionen, Enzymkinetik, geeignete Wahl der katalytischen Konstanten K_m , k_{cat} und Hillkoeffizient).

Phosphoproteinphosphatase 1 (PP1): Das Basiselement jeder zyklischen Enzymkaskade besteht aus einer Kinase und einer Phosphatase. Die Phosphatase macht die Wirkung der Kinase rückgängig. Die beiden Aktivitäten müssen zeitlich verzögert erfolgen. Interessanterweise ist PP1 weniger spezifisch und kann alle drei am Glykogenstoffwechsel beteiligten Proteine dephosphorylieren (Glykogensynthase, Glykogenphosphorylase und Phosphorylasekinase).

Der Phosphataseinhibitor und das Adaptor/Bindeprotein werden von einer anderen Phosphatase, der Phosphatase 2B, dephosphoryliert.

Die Aktivität der Proteinphosphatase 1 wird aber nicht durch Phosphorylierung, sondern durch drei andere Mechanismen kontrolliert:

- Allosterische Hemmung durch Phosphataseinhibitor (ein Protein, siehe unten).
- Rekrutierung an Wirkungsort (auf die Oberfläche der Glykogenkörner).
- Sequestrierung durch primäres Substrat (Phosphorylase).

Die phosphorylierte Form des Phosphataseinhibitors bildet mit PP1 einen Komplex, in dem PP1 inaktiv ist.

Beachte, dass alle am Glykogenstoffwechsel beteiligten Enzyme an die Oberfläche des unlöslichen Glykogens gebunden sind. Die Phosphoproteinphosphatase 1 (PP1) bindet nicht direkt an Glykogen, sondern über ein Adaptor/**Bindeprotein G**. Die Affinität des Bindeproteins G für PP1 wird durch Phosphorylierung moduliert und damit auch die Aktivität von PP1. Phosphorylierung von G durch die Insulin abhängige Kaskade aktiviert G und rekrutiert PP1 auf das Glykogenkorn. Phosphorylierung von G durch die cAMP (Adrenalin abhängige Kinase (R_2C_2)) hemmt G und erlaubt G, das "Stärkehorn" zu verlassen.

PP1 wird von der voll aktiven Phosphorylase (R-Form) gebunden (sequestriert "gefangen gehalten"). Erst wenn die Phosphorylase in die inaktive T-Form relaxiert, dissoziiert die Proteinphosphatase (PP1) und kann jetzt zur Glykogensynthese diffundieren. Das macht Sinn, solange die Phosphorylase aktiv ist, bleibt die Phosphatase gebunden. Damit wird zusätzlich dafür gesorgt, dass die Glykogensynthese erst aktiviert (dephosphoryliert) wird, wenn die Phosphorylase inaktiviert ist, dass Glykogenabbau und -aufbau also nicht gleichzeitig erfolgen können. Wir haben hier einen weiteren Zeitverzögerungsmechanismus, der auf der Sequestrierung beruht.