

УДК 612.82+577.15

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕКТИНА LPM<sub>1</sub> С Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗой  
МИКРОСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

КОШОРИДЗЕ Н. Н., АДАМИА М. Ю., АЛЕКСИДЗЕ Н. Г., РАПАВА Э. А.

Тбилисский государственный университет

Показано, что лектин LPM<sub>1</sub> из грузинского сорта фасоли оказывает стимулирующее влияние на активность Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗы микросом головного мозга крыс и актомиозина мышц лягушки. Стимулирующий эффект в большей степени проявляется при концентрации Ca<sup>2+</sup> 1,5 мМ и рН 7,4—7,8, то есть при таких условиях, когда максимально проявляется лиганд-рецепторное взаимодействие. Методом агглютинации трихенизированных кроличьих эритроцитов установлено связывание лектина с актомиозином и фракцией микросом.

Данные кинетического анализа о влиянии лектина на Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗную активность показали, что лектин имеет специфический центр связывания и отличается по месту локализации от активного центра фермента.

Изменение распределения кальция в нервной ткани имеет важное значение в проявлении функции нервных клеток [1]. Транспорт ионов кальция осуществляется клеточными каналами и активным транспортом с участием Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗы мембран, среди которых особое место занимает микросомная Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАза, наиболее близкая по своим физико-химическим показателям к Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАзе саркоплазматического ретикулума [2].

Из данных литературы известно, что ряд АТРАЗ проявляет чувствительность к растительным лектинам [3—5], оказывая стимулирующее влияние на транспорт Ca<sup>2+</sup> [6—8]. При этом отсутствуют указания о влиянии лектинов на энергетическое обеспечение активного транспорта кальция с участием Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗы микросом мозга. Исходя из вышесказанного, мы предприняли исследование по изучению влияния ранее выделенного нами лектина LPM<sub>1</sub> из семян грузинского сорта фасоли [9] на Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗную активность микросом головного мозга крыс и актомиозина мышц лягушки.

Материалы и методы

Микросомную фракцию головного мозга белых беспородных крыс получали по методу Skou [10]. Исследовали активность транспортной Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТРАЗы [11] и по разности активностей суммарной

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы рассчитывали  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазную активность. Исследования проводили в инкубационной среде, содержащей в конечной концентрации (в мМ):  $\text{CaCl}$ —1,  $\text{MgCl}$ —2,5, АТФ—2,5, трис- $\text{HCl}$ —40 (рН—7,7).

Растительный лектин  $\text{LPM}_{40-80}$ , характеризующийся высокой магглютинирующей и митогенной активностями, выделяли из семян грузинского сорта фисоли (*Phaseolus vulgaris* L. var. *oblongo-ovatus* subvar. *ochrolepis*; *vinoso-variegatus* A. Kob) по описанию ранее метода [9].

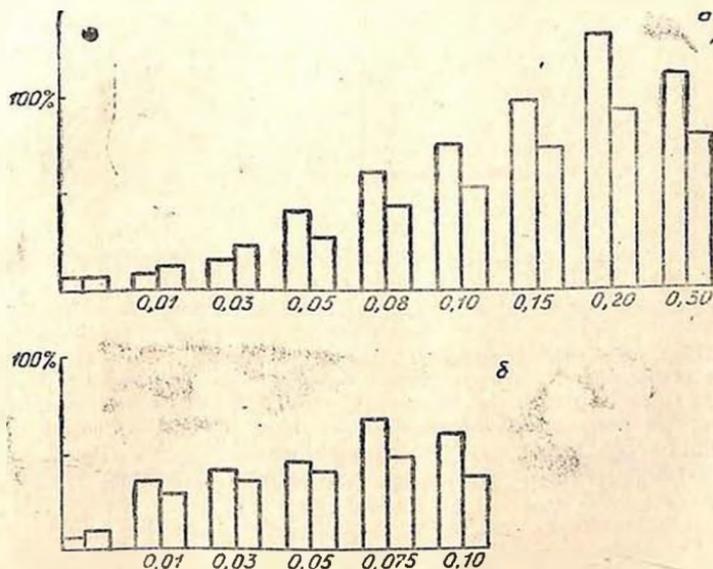
### Результаты и обсуждение

В первой серии опытов исследовали влияние лектина  $\text{LPM}_{40-80}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазные активности микросомной фракции головного мозга крысы в зависимости от его концентрации.

Установлено, что лектин  $\text{LPM}_{40-80}$  стимулирует  $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазные активности в строгой зависимости от его концентрации. При низких концентрациях препарата (0,01 мг/мл—0,03 мг/мл) в большей степени обнаруживается активирование  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы, а при высоких концентрациях (0,05 мг/мл—0,20 мг/мл)  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы. Активность ферментов при концентрации лектина 0,2 мг/мл возрастает соответственно на 90 и 130% по отношению к контролю, принятому за 100% (рис. 1, а).

Стимулирующий эффект лектина  $\text{LPM}_{40-80}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазу микросом можно объяснить, с одной стороны, связыванием лектина с рецепторами мембран микросом и последующим изменением их структурной организации, с другой—непосредственным связыванием лектина с ферментом. С целью выяснения данного вопроса мы исследовали влияние  $\text{LPM}_{40-80}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную активность ферментного препарата актомиозина из мышц лягушки (рис. 1, б) и установили, что аналогично данным, полученным на микросомах, лектин  $\text{LPM}_{40-80}$  также оказывает стимулирующее действие на активность актомиозиновой  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы, что служит основанием для объяснения последнего взаимодействия лектина с рецепторами белковой молекулы фермента. При этом не исключена возможность повышения активности фермента и путем конформационных перестроек мембран микросом, одним из доказательств которого, по-видимому, может послужить факт усиления активностей  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы микросом при повышении концентрации лектина, когда создаются условия для индуцированной перестройки организации рецепторов и фермента в мембране, способствующие оптимизации лиганд (лектин)-рецепторного взаимодействия. Экспериментальным подтверждением этого предположения явились опыты с агглютинацией кроличьих трипсинозирванных эритроцитов, проведенной до и после предварительной инкубации лектина с актомиозином (табл. 1) и микросомной фракцией (табл. 2).

Показано, что как актомиозин, так и микросомная фракция сами по себе не вызывают гемагглютинации трипсилизированных кроличьих эритроцитов (табл. 1, Е, табл. 2, Е), подавляя тем не менее лектиновую активность  $LPM_{10-80}$  в зависимости от концентрации примененных факторов. Торможение активности лектина при титрации его



1 2

Рис. 1. а—Влияние разных концентраций лектина  $LPM_{10-80}$  на  $Ca^{2+}$ - и  $Mg^{2+}$ -АТРазные активности микросомальной фракции головного мозга белых крыс. Активность фермента выражена в % по отношению к контролю, принятому за 100%. 1— $Ca^{2+}$ -АТРаза, 2— $Mg^{2+}$ -АТРаза. По оси абсцисс—концентрация лектина в мг/мл. б—Влияние разных концентраций лектина  $LPM_{10-80}$  на  $Ca^{2+}$ - и  $Mg^{2+}$ -АТРазные активности актомиозина мышц лягушки. Активность выражена в % по отношению к контролю, принятому за 100%. 1— $Ca^{2+}$ -АТРаза, 2— $Mg^{2+}$ -АТРаза. По оси абсцисс—концентрация лектина в мг/мл.

раствора на фоне постоянной концентрации актомиозина и микросомной фракции проявляется с конца титрационных лунок планшета (табл. 1, В; 2, В). При титрации же актомиозина и микросом в условиях постоянной концентрации лектина, напротив, подавление агглютинации обнаруживается лишь в начальной стадии титрации (табл. 1, С; табл. 2).

Имея в виду важное значение концентрации  $Ca^{2+}$  и водородных ионов в связывании лектина с рецепторами [7, 8, 12], мы провели специальные исследования по изучению  $LPM_{10-80}$  на  $Ca^{2+}$ -,  $Mg^{2+}$ -АТРазные активности в зависимости от наличия в среде инкубации разных концентраций  $Ca^{2+}$  и водородных ионов (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазная активность в условиях оптимальной концентрации лектина  $\text{LPM}_{10-80}$  (0,20 мг/мл) достигает своего максимума при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  1,5 мМ, являющейся оптимальной и для лектин-рецепторного взаимодействия.

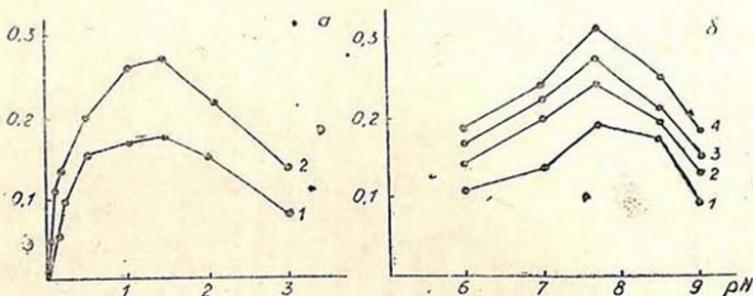


Рис. 2. а—Влияние лектина на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТРазную активность в зависимости от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . Концентрация лектина—0,2 мг/мл. 1— $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза, 2— $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза+лектин. По оси абсцисс концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в мМ. По оси ординат—активность фермента в мкМ Pi /мг белка/мин. б—Влияние лектина  $\text{LPM}_{10-80}$  (0,2 мг/мл) на  $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазную активность микросомальной фракции головного мозга белых крыс в зависимости от pH. 1— $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, 2— $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза+лектин, 3— $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза, 4— $\text{Ca}^{2+}$ -АТРаза+лектин. По оси ординат—активность фермента в мкМ Pi/мг белка/мин

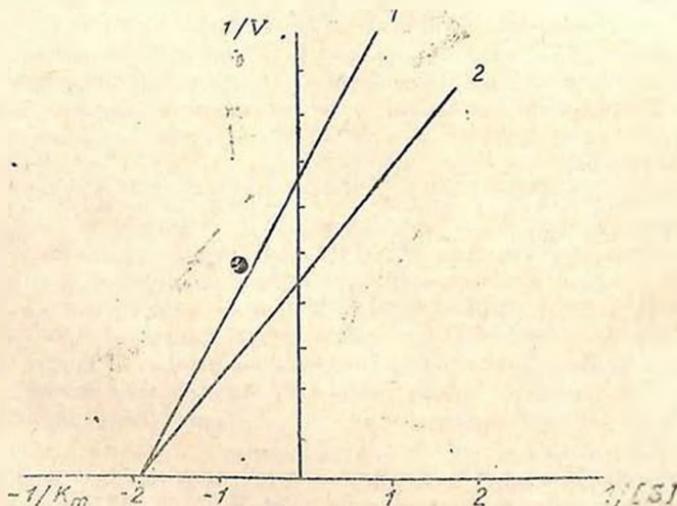


Рис. 3. Кинетическая характеристика влияния лектина  $\text{LPM}_{10-80}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРазную активность микросомальной фракции головного мозга крыс. 1— $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза, 2— $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРаза+лектин. По оси абсцисс—обратная величина концентрации субстрата— $10^{-3}$  М.

Аналогичная закономерность была прослежена и в отношении реакции инкубационной среды (рис. 2, а). Максимальный стимулирующий эффект лектина на  $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазные активности проявляется в пределах рН 7,4—7,8, то есть при концентрации водородных ионов, являющейся оптимальной и для связывания лектина с соответствующими рецепторами. Таким образом, выясняется, что эффект лектина  $\text{LPM}_{10-10}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную активность осуществляется посредством его связывания с ферментным препаратом актомиозина и микросом.

Таблица 1

Влияние актомиозина мышцы лягушки на гемагглютинирующую активность лектина  $\text{LPM}_{10-10}$  трисенсибилизированных кроличьих эритроцитов (ТКЭ)

Варианты опытов	Нумерация ячеек планшета											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
В	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Д	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Е	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. А—контроль (50 мкл ТКЭ+150 мкл агглютинирующий буфер); В—титруется лектин (20 мкг), концентрация актомиозина постоянна (115 мкг/200 мкл); С—титруется актомиозин (115 мкг), концентрация лектина постоянна (20 мкг/200 мкл); Д—титруется лектин (20 мкг)+ТКЭ (50 мкл/200 мкл); Е—титруется актомиозин (115 мкг)+ТКЭ (50 мкл/200 мкл); "+" и "—" отражают наличие и отсутствие эффекта агглютинации соответственно.

Таблица 2

Влияние белков микросомальной фракции головного мозга крыс на гемагглютинирующий эффект лектина  $\text{LPM}_{10-10}$

Вариант опытов	Нумерация ячеек планшетов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
В	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Д	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Е	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. А—контроль (50 мкл ТКЭ+150 мкл агглютинирующий буфер); В—титруется лектин (20 мкг), концентрация микросом постоянна (300 мкг/200 мкл); С—титруется фракция микросом (300 мкг), концентрация лектина постоянна (20 мкг/200 мкл); Д—титруется лектин (20 мкг)+ТКЭ (50 мкл/200 мкл); Е—титруется фракция микросом (300 мкг)+ТКЭ (50 мкл/200 мкл); "+" и "—" наличие и отсутствие эффекта агглютинации соответственно.

С целью выяснения места связывания лектина с  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазой, ответственного за осуществление его модуляторной функции, был проведён кинетический анализ влияния лектина  $\text{LPM}_{10-80}$  на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазную активность микросом (рис. 3). При этом удалось продемонстрировать, что присутствие лектина изменяет лишь величину  $V$   $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы, оставляя постоянной ( $0,55 \cdot 10^{-3}$  М) величину  $K_m$ . Это послужило основанием для заключения, что связывание лектина происходит не в активном центре фермента, а за его пределами. Если принять во внимание структурное расположение  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы в мембранах [13], то более вероятным участком связывания, по всей вероятности, является рецепторная область интегрального белка микросом, что и вызывает структурную реорганизацию, способствующую усилению активности  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы микросом.

#### INTERACTION OF LECTIN $\text{LPM}_{10-80}$ WITH $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase OF RATS BRAIN MICROSOMES

KOSHORIDZE N. I., ADAMIA M. I., ALEKSIDZE N. G., RAPAUA E. A.

Tbilisi State University

The stimulatory effect of lectin  $\text{LPM}_{10-80}$  (*Phaseolus vulgaris* L. var. oblongo-ovatus subvar ochroleucus vinoso-variegatus A. Kob) on  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of rats brain microsomes and frog muscle actomyosin has been shown. This effect is intensively revealed at the 1.5 mM concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and pH 7,7—7,8, conditions that are optimal for the ligand-receptor interaction too. By the hemagglutination method the binding of lectin to microsome and actomyosin has been detected. The kinetic analysis of lectin  $\text{LPM}_{10-80}$  stimulatory effect on the  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity permitted to conclude that the  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase has a specific binding centre for lectins and it differs from the disposition of the enzyme active centre.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Carvalho A. P.* Handbook of Neurochemistry, v. 1, p. 69—116, 1982.
2. *De Meis L., Rubin Atschul B. M., Machado R. D.* J. Biol. Chem., v. 245, p. 1883—1889, 1970.
3. *Королев Н. П.* Функции лектинов в клетке. Итоги науки и техники. М. т. 1, 1984.
4. *Averdunk R., Günther T.* Immunobiol., v. 157, p. 132—144, 1980.
5. *Horejsi V., Chaloupecka O., Kocourek J.* Biochim. et biophys. acta, v. 539, p. 287—293, 1978.
6. *Allwood G., Asherson G., Davey J.* Immunol., v. 21, p. 509—511, 1971.
7. *Brown J., Hunt R.* Int. Rev. Cytol., v. 52, p. 277—349, 1978.
8. *Kay J.* Exper. Cell. Res., v. 68, p. 11—16, 1971.

9. Рапава Э. А., Алексидзе Г. И., Кекенадзе Л. В., Алексидзе Н. Г. Сообщ. АН СССР, т. 134, с. 177—180, 1989.
10. Skou J. C. Biochim. et biophys. acta, v. 23, p. 394—399, 1957.
11. Fiske S., Subbarow J. J. Biol. Chem., v. 66, p. 375—380, 1925.
12. Луцки М. Д., Панасюк Е. И., Луцки А. Д. Лекции, Львов, «Вища школа», 1984.
13. Болдырев А. А., Мельгунов В. И. Транспортные АТФазы, Итоги науки и техники. Серия Биофизика, т. 17, М., 1985.

Поступила 12. III 1991