

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.895.8

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЗГОВОЙ ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗЫ
С ИЗОФЕРМЕНТАМИ ЕНОЛАЗЫ

КАРАПЕТЯН Н. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Гликолиз как древний и консервативный путь получения энергии катализируется индивидуальными ферментами, хотя в последние годы большое внимание уделяется изучению взаимодействия между ними, как это, в частности, установили Ovadi и Keleti на примере альдолазы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из мышц кролика [1]. Mc Gregor и соавт. показали факт взаимодействия альдолазы из печени кролика с фруктозо-1,6-бисфосфатазой [2]. Имеются данные о способности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы взаимодействовать не только с альдолазой, но и с другими ферментами, например, транскетотазой из дрожжей [3] и цитоплазматической аспартатаминотрансферазой из мышц кролика [4]. Вместе с тем, сведения о функциональной значимости взаимодействия очищенных ферментов гликолиза между собой или с другими ферментами метаболизма весьма скудны и нуждаются в дальнейшем пополнении.

Учитывая главенствующую распорядительную роль ЦНС в регуляции и интеграции биохимических процессов целостного организма, представляется актуальным изучение особенностей процесса комплексобразования ферментов в головном мозгу. Выявление и всестороннее исследование принципов взаимодействия этих белков может пролить свет на современное понимание ряда функциональных назначений нервной ткани. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение взаимодействия между фосфоглицератмутазой (ФГМ; мозговой изофермент, иммунологически отличающийся от других форм) и изоферментами енолазы: нейроспецифическим — $\gamma\gamma$, глияльным, печеночным (встречающимся и в других тканях) — $\alpha\alpha$, мышечным — $\beta\beta$. В работе исследовалось также взаимодействие ФГМ с дрожжевой енолазой.

ФГМ, а также $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ -изоферменты енолазы были выделены из тканей головного мозга быка и очищены по описанной ранее методике [5, 6]. Использовались также коммерческие препараты $\beta\beta$ -изофермен-

та енoлазы из мышцы кролика и дрожжей («Sigma», США), отличающиеся своей электрофоретической гомогенностью в системе Леммли [7]. Определение специфической активности очищенных препаратов α -енолазы, γ -енолазы и мугазы проводили в 50 мкМ имидазольном буфере в присутствии 3 мМ $MgCl_2$ при 25° и pH 7,3; она составляла 50,45 и 200 ед/мг соответственно.

Способность к ассоциации и диссоциации комплекса енoлаза-мугаза изучалась методом анизотропии флуоресценции. Для этого один из ферментов подвергали предварительной 30-минутной инкубации с флуоресцентным красителем флуоресценции изотиоцианатом (ФИТЦ) в концентрации 20—40 мМ, ковалентно связывающимся с белком и практически не меняющим его ферментативной активности [8], затем до и после добавления второго фермента определяли анизотропию флуоресценции меченого белка.

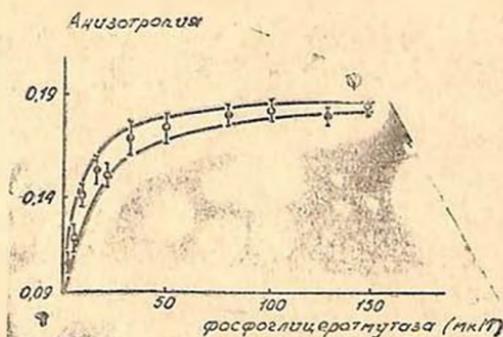


Рис. 1. Титрование меченой ФИТЦ γ -енолазы ФГМ.
○ — в отсутствие, ● — в присутствии 2-фосфоглицерата

К меченой ФИТЦ γ -енолазе в конечной концентрации 1 мкМ добавляли различные концентрации ФГМ и спустя 20 мин, когда система уравнивалась, определяли анизотропию флуоресценции. С целью выявления возможного влияния общего субстрата изученных ферментов на процесс комплексообразования (рис. 1) подобное титрование проводилось и в присутствии 500 мкМ 2-фосфоглицерата, формы кривых которого свидетельствуют о реализации этого процесса, хотя и не представлялось возможным выявить различия в экспериментах с наличием и отсутствием насыщающей концентрации 2-фосфоглицерата в связи с их нахождением в пределах ошибки измерений.

В следующей серии исследований к 4 мкМ меченой ФИТЦ γ -енолазы добавляли 165 мкМ ФГМ и в течение 20 мин вели наблюдения за повышением анизотропии флуоресценции, то есть за образованием комплекса енoлаза-ФГМ. Последующее 20-кратное разбавление смеси буфером характеризовалось диссоциацией комплекса с понижением анизотропии флуоресценции: до $K_d = 40$ мкМ (рис. 2, а).

При проведении кинетических исследований по изучению процесса комплексообразования, было установлено увеличение K γ -ено-

лазы от 70 до 100 мкМ в присутствии 7,4 мкМ ФГМ, что свидетельствует об ингибирующем эффекте комплекса ФГМ — 2-фосфоглицерат — енолаза на активность енолазы в реакции 2-фосфоглицерат — фосфоенолпируват.

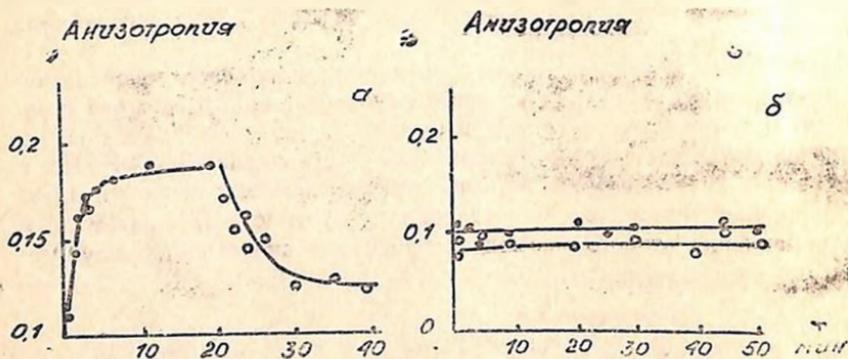


Рис. 2. Анизотропия флуоресценции образования и диссоциации комплекса енолаза-ФГМ. а — α енолаза, б — $\alpha\alpha$ (○) и $\beta\beta$ (●) енолазы. По оси абсцисс обозначено время (мин)

Для выявления специфичности данного взаимодействия подобные исследования проводили также с мечеными ФИТЦ $\alpha\alpha$ и $\beta\beta$ изоферментами енолазы (в конечной концентрации 1 мкМ). В присутствии различных концентраций ФГМ (0—100 мкМ) в течение 50 мин. измеряли анизотропию флуоресценции ферментов. Однако, как видно из рис. 2, б, в этих экспериментах не было выявлено сколько-нибудь заметных изменений анизотропии флуоресценции, что, очевидно, можно объяснить отсутствием взаимодействия между ФГМ и $\alpha\alpha$ или $\beta\beta$ изоферментами енолазы. Эти данные позволяют предположить наличие в нейронах головного мозга особых систем регуляции гликолиза, что может иметь свою специфику и осуществляться не только ключевыми ферментами, но и образованием комплексов между мозгоспецифическими белками этого важнейшего метаболического пути.

При изучении взаимодействия различных концентраций ФГМ из мозга быка с добавленной к ней меченой ФИТЦ дрожжевой енолазой (1,5 мкМ) наблюдалось повышение анизотропии флуоресценции (рис. 3, а). В случае добавления к меченой ФИТЦ дрожжевой енолазе в той же концентрации 40 мкМ ФГМ в течение 20 мин имело место повышение анизотропии флуоресценции, свидетельствовавшее о происшедшем комплексообразовании ферментов (рис. 3, б). 10-кратное разбавление этой смеси буфером позволило регистрировать понижение анизотропии флуоресценции, характерное для диссоциации комплекса, оказавшегося, однако, менее стабильным, чем комплекс ФГМ—НСЕ ($K=4,7 \cdot 10^{-4}$ М). О реальности существования подобного взаимодействия в дрожжевой клетке можно судить лишь при проведении дальнейших специальных исследований.

В экспериментах с добавлением к меченой ФИТЦ ФГМ изоферментов енoлазы наблюдалось проявление аналогичной закономерности.

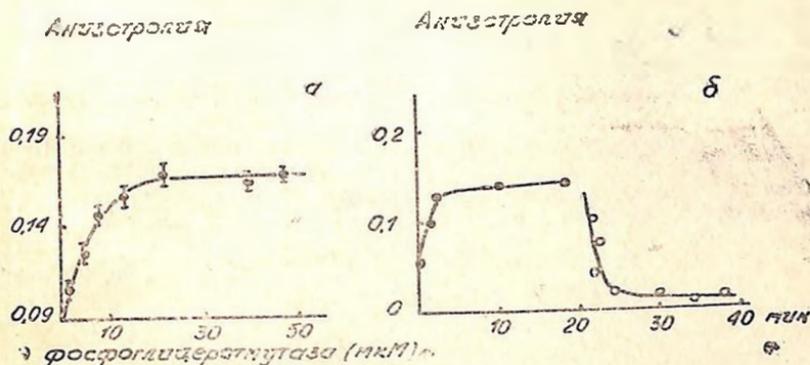


Рис. 3. а — Титрование меченой ФИТЦ дрожжевой енoлазы ФГМ.
б — Анизотропия флуоресценции образования и диссоциации комплекса дрожжевая енoлаза-ФИТЦ

Результаты проведенных наблюдений *in vitro* позволяют предположить об их важном физиологическом значении, что может проявиться *in vivo* в более отчетливой форме при наличии в исследуемых биологических системах высокой общей концентрации белка, ограниченного количества свободной воды и, конечно же, организующей роли элементов внутриклеточной структуры, имеющих регуляторное значение.

Следует заметить также, что настоящее исследование в известной степени раскрывает новые представления физиологического значения фактора ферментного комплексообразования в реакциях гликолиза, что может получить особое звучание в понимании метаболических путей регуляции этого важнейшего мозгового процесса.

INTERACTION OF BRAIN PHOSPHOGLYCERATE MUTASE WITH THE ENOLASE ISOZYMES

KARAPETIAN N. G.

Institute of Molecular Biology, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

The method of fluorescence anisotropy showed complex formation between the phosphoglycerate mutase and the neurospecific enolase— $\gamma\gamma$. K_d of the complex is $4 \cdot 10^{-5}$ M. The interaction is specific, because the same complexes have not been determined in the experiments with the phosphoglycerate mutase and the liver $\alpha\alpha$ or the muscle $\beta\beta$ enolases.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Ovadi J., Keleti T.* Eur. J. Biochem., v. 85, p. 157—161, 1978.
2. *Mc Gregor J. S., Singh V. N., Davoust S., Melloni E., Potremoli S., Horecker B. L.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 77, p. 3389—3392, 1980.
3. *Kochetov G. A., Niktushkina L. I., Chernov N. N.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 40, p. 873—879, 1970.
4. *Ovadi J., et al.* Eur. J. Biochem., v. 90, p. 499—503, 1978.
5. *Назарян К. Б., Егорян Р. У., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 566—573, 1983.
6. *Назарян К. Б., Карапетян Н. Г., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 4, № 4, с. 410—414, 1985.
7. *Laztali U. K.* Na uce, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
8. *Tompa P., Var J., H., Vatke J.* Eur. J. Biochem., v. 159, p. 117—124, 1986.

Поступила 18. VII. 1991