



УДК 612.822.1:577.157

РАЗЛИЧИЯ В СТАБИЛЬНОСТИ  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  ИЗОФЕРМЕНТОВ  
ЕНОЛАЗЫ МОЗГА ПРИ ИНКУБАЦИИ  
С НЕЙТРАЛЬНЫМИ СОЛЯМИ

НАЗАРЯН К. Б., КАРАПЕТЯН Н. Г., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Показано, что нейроспецифический изофермент енолазы  $\gamma\gamma$  обладает большей по сравнению с нейронеспецифической  $\alpha\alpha$ -формой устойчивостью к инактивирующему действию солей одновалентных металлов в различных условиях, в том числе и близких к физиологическим. Установлено, что причиной инактивации ферментов является диссоциация димеров енолазы на мономеры.

Енолаза (2 фосфоглицерат лиаза КФ 4.2.1.11) в ЦНС млекопитающих представлена двумя гомодимерными изоферментами  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$ , являющимися продуктами различных генов.  $\gamma\gamma$  Енолаза (нейроспецифическая енолаза) в норме локализована исключительно в нейронах и некоторых клетках нейроэктодермального происхождения.  $\alpha\alpha$  Енолаза (нейронеспецифическая енолаза) обнаружена в основном в глиальных элементах. Она сходна с енолазой печени и других органов [1, 2]. Биологическая целесообразность существования в ЦНС иммунологически отличных двух изоферментов енолазы, один из которых уникален для НС, остается невыясненной.

Изучение физико-химических и каталитических свойств енолазы показало, что  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферменты имеют очень близкую молекулярную массу, одинаковый субъединичный состав, но сильно различаются по значению ИЭТ—7,0 и 5,2 соответственно [3, 4]. Величина К для субстратов—2 фосфоглицерата и фосфоенолпирувата, рН и температурный оптимумы катализируемой реакции существенно не отличаются [5]. Рядом авторов выявлена большая устойчивость  $\gamma\gamma$  енолазы к инактивирующему действию солей, температуры, давления [6—8]. Однако по какому механизму происходит инактивация и в чем причина большей устойчивости  $\gamma\gamma$  изофермента до настоящего времени не было известно. Кроме того, не ясно, имеют ли место установленные эффекты  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$ , поскольку они получены в условиях, далеких от физиологических.

Поэтому целью настоящей работы была попытка установить возможный механизм инактивации  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферментов енолазы нервной ткани при воздействии на них высоких концентраций солей одновалентных металлов, а также изучить действие указанных солей на устойчивость изоферментов в модельных условиях, близких к физиологическим.

Для получения  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферментов ендолазы использовали ткани головного мозга крупного рогатого скота. Очистку проводили по методике, описанной ранее [1]. Мозг очищали от сосудистых оболочек, гомогенизировали в 0,01 М трис-фосфатном буфере (рН 7,4) с 3 мМ  $MgSO_4$  (буфер «А»), центрифугировали 60 мин при 6000 г. Из экстракта водорастворимых белков получали фракцию (Р-60) при насыщении сульфатом аммония от 40 до 60%. ИОХ проводили на колонках с ДЭАЭ-ц (рН 7,4 и рН 5,3) КМ-целлюлозой (рН 6,5). Дальнейшую очистку проводили методом гель-фильтрации с сефадексом G-150 и препаративного электрофореза в блоке с ПААГ. Белок определяли по методу Lowry. Енолазную активность определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм, используя в качестве субстрата натриевую соль 2 фосфоглицериновой кислоты («Boeringer», ФРГ).

Гель-фильтрацию проводили в колонке  $1,5 \times 80$  см с сефадексом G-150 («Pharmacia», Швеция). Гель уравнивали 0,01 М трис-фосфатным буфером, рН 7,4. Для изучения действия солей на процесс диссоциации изоферментов готовили подобные колонки, уравнированные буферами: а) 0,01 М трис-фосфат, рН 7,4 с 1 М NaCl; б) 0,01 М трис-фосфат, рН 7,4 с 1 М LiCl. На колонку наносили 2 мл пробы, содержащей 1 мг фермента и 5 мг БСА в качестве маркера. Элюцию проводили соответствующим буфером со скоростью 8 мл/ч. Измеряли объем элюции белков с колонки. БСА выходит в определенном объеме, независимо от буфера, в то время как объем элюции ендолазы с колонки увеличивается в присутствии солей. Проводили также серию подобных экспериментов с 3 мМ  $MgSO_4$ .

Дифференциальные спектры измеряли на спектрофотометре Specord M-40 («Carl Zeiss», ГДР). Для компенсации поглощения буфера в раствора соли спектры снимали в системе из четырех кювет (две контрольные и две—для сравнения) с длиной оптического пути по 10 мм [10]. Перед измерениями проверяли равенство оптических плотностей кювет, заполняя их попарно раствором буфера. Исследуемые белковые растворы тщательно диализовали против буфера «А» и центрифугировали 30 мин при 22000 г. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм, соблюдая строгое равенство концентраций белка в обеих кюветах (0,3 мг/мл).

Дифференциальные спектры снимали после внесения в испытываемую белковую кювету 0,5 мл раствора NaCl так, чтобы конечная концентрация соли в кювете составляла 0,5 или 1 М. Для выравнивания концентраций белков во вторую кювету с ферментом добавляли 0,5 мл буфера, а для компенсации поглощения соли в контрольную кювету с буфером добавляли такой же объем раствора соли. Измерения проводили в кюветах, термостатированных при 37°. Полученные таким образом дифференциальные спектры для пары димер + соль—димер сравнивали с дифференциальными спектрами мономер—димер для обоих изоферментов. С целью получения мономеров (удаления  $Mg^{2+}$  к изоферментам ендолазы добавляли ЭДТА до концентрации 5 мМ (при этом поддерживали значение рН 7,4). Комплексы  $Mg^{2+}$ -ЭДТА удаляли посредством 8-дневного диализа при 4° с ежедневной сменой буфера (7 литров 0,01 М трис-фосфата, рН 7,4). Использовали пластиковую посуду и бидистиллированную воду. В пробах мономеров  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферментов ендолазы определяли остаточный  $Mg^{2+}$  [11]. Электрофорез мономеров проводили в 7,5%-ном

ПААГ в присутствии 1 мМ ЭДТА. Гели денситометрировали на спектрофотометре Spescord M-40, в белковых срезах определяли енолазную активность.

Величины  $K_{aa}$  и  $\gamma\gamma$  изоферментов определяли после ковалентного связывания с ними флуоресцентного красителя флуоресцентной изотиоцианата (ФИТЦ), который практически не влияет на енолазную активность. Затем определяли анизотропию флуоресценции меченых белков [12] различных концентраций в 50 мМ имидазол- $\text{HCl}$ , pH 7,3 с 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , после чего рассчитывали величину  $K_{уст}$ . Устойчивость указанных изоферментов в условиях, моделирующих физиологические, определяли после их инкубирования в среде с 0,01 М фосфатным буфером, pH 7,0, 0,15 М  $\text{KCl}$  при 38°. Содержание белка в среде было 10 мМ [13—15].

## Результаты и обсуждение

В предыдущей работе нами показано, что  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферменты енолазы головного мозга крупного рогатого скота обладают неодинаковой устойчивостью к инактивирующему воздействию высоких концентраций солей одновалентных металлов [8]. Наиболее сильные различия в большей устойчивости  $\gamma\gamma$  изофермента были выявлены при инкубации в растворах солей  $\text{NaCl}$  и  $\text{KCl}$  в диапазоне концентраций 0,8—1,2 М. Можно предположить, что эти различия объясняются неодинаковой степенью диссоциации димеров  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  в растворах с высокой ионной силой. Для проверки этого предположения в настоящей работе был использован метод гель-фильтрации на сефадексе G-150, уравновешенном 1 М раствором  $\text{NaCl}$  в 10 мМ трис-фосфатном буфере, pH 7,5 при 25°. Если при этом димер енолазы диссоциирует на мономеры, то есть равновесие типа димер  $\rightleftharpoons$  2 мономера смещается вправо, то наблюдается увеличение элюционного объема фермента. Другие эффекты типа конформационных изменений субъединиц фермента при этом ожидаются незначительные, так как показано, что мономер енолазы представляет собой плотно упакованную молекулу, которая не «разрыхляется» в растворе 1 М  $\text{NaCl}$ , а если даже подобное «разрыхление» имеет место [16], то это должно привести к уменьшению, а не увеличению объема элюции. Для более точного определения объема элюции в качестве «внутреннего» стандарта использовали раствор БСА, который как видно из рис. 1, а, не меняет объем элюции в присутствии 1 М  $\text{NaCl}$ . Как показано на рисунке, объем элюции  $\alpha\alpha$  енолазы в растворе 1 М  $\text{NaCl}$  увеличивается на 12 мл по сравнению с контролем. Это свидетельствует в пользу предположения о смещении равновесия  $\text{димер} \rightleftharpoons \alpha + \alpha$  вправо. В то же время объем элюции  $\gamma\gamma$  изофермента меняется лишь на 2,5 мл, то есть сдвиг равновесия  $\gamma\gamma \rightleftharpoons \gamma + \gamma$  выражен значительно слабее. В литературе существуют данные, указывающие на то, что димер енолазы стабилизируется  $\text{Mg}^{2+}$  [17], следовательно, если указанный эффект связан с диссоциацией димерной молекулы енолазы на мономеры, то добавление в среду  $\text{Mg}^{2+}$  должно уменьшить изменение объема элюции. Действительно, как видно из рис. 1, б, увеличение объема элюции при гель-фильтрации в колонке, содержащей кроме вышеуказанных ингредиентов 3 мМ  $\text{MgSO}_4$ , составляет всего 5 мл для  $\alpha\alpha$  изофермента, а у  $\gamma\gamma$  изофермента этот объем практически не меняется.

Как показано ранее, соли Li обладают наиболее сильным инактивирующим действием на оба изофермента енолазы, что обусловлено

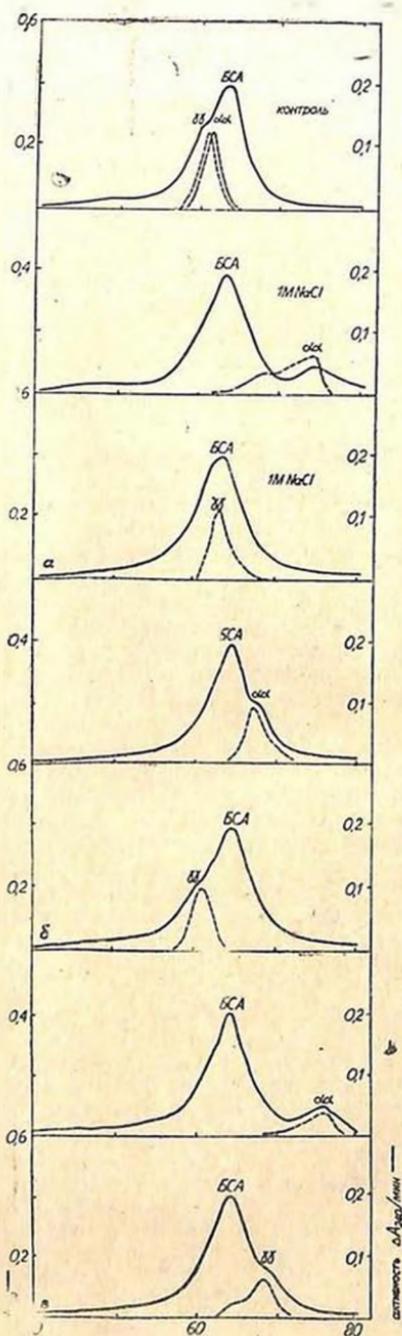


Рис. 1. Гель-фильтрация  $\alpha$  и  $\gamma$  изоферментов енолазы.  $a$ —в присутствии 1 M NaCl,  $b$ —1 M NaCl и  $3$  mM  $MgSO_4$ ,  $c$ —1 M LiCl. В контрольном варианте колонка не содержала соли. По оси абсцисс—объем элюции в мл

но, по всей видимости, особенностями его хаотропного действия [8]. Применение хлорида лития для проведения эксперимента, аналогичного вышеописанному, показало, что  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферменты инактивируются в значительно большей степени, чем при воздействии NaCl (рис. 1, в). Однако максимальная разница в сдвиге объема элюции между  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферментами наблюдается при использовании NaCl. Подобная картина была получена ранее при изучении действия этих солей на активность изоферментов енoлазы. Исходя из этой серии экспериментов, можно с определенной вероятностью утверждать, что мономеры  $\gamma\gamma$  енoлазы ассоциированы в димер более прочно, чем  $\alpha\alpha$  енoлазы, а это является причиной большей устойчивости первой.

Для подтверждения предположения о том, что причиной инактивации енoлазы является обратимая диссоциация димера, нами был применен метод дифференциальной спектроскопии, позволяющий непосредственно зарегистрировать изменение равновесия мономер—димер. Такая регистрация возможна только в случае наличия дифференциального спектра между мономером и димером изоферментов енoлазы. Для получения мономеров препараты  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферментов подвергали длительному диализу с ЭДТА для связывания  $Mg^{2+}$  который, по литературным данным, ответствен за стабилизацию димерной структуры [17]. Полученные таким образом  $\alpha$  и  $\gamma$  мономеры в паре с соответствующим димером  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  дают дифференциальные спектры в диапазоне длин волн 230—330 нм (рис. 2,

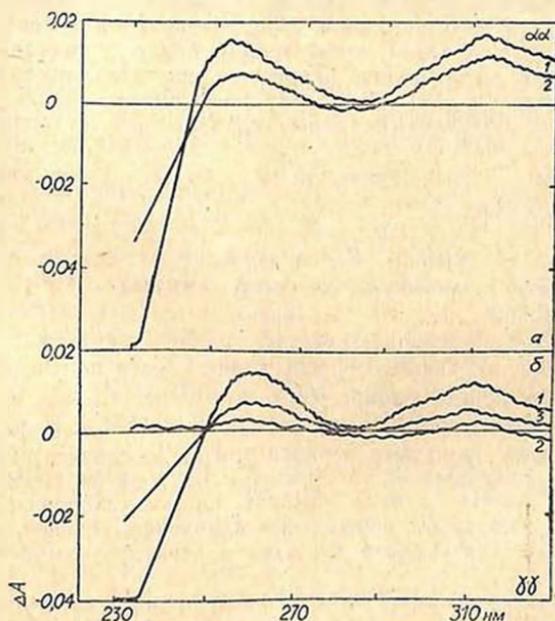


Рис. 2. Дифференциальные спектры изоферментов енoлазы. а: 1—димер  $\alpha\alpha$  против мономера  $\alpha$ , 2—димер  $\alpha\alpha$  против  $\alpha\alpha+0,5$  М NaCl; б: 1—димер  $\gamma\gamma$  против мономера  $\gamma$ , 2—димер  $\gamma\gamma$  против  $\gamma\gamma+0,5$  М NaCl, 3—димер  $\gamma\gamma$  против  $\gamma\gamma+1$  М NaCl

а, б). При этом максимумы дифференциальных спектров  $\alpha\alpha$  изофермента регистрировались при 253 и 311 нм, а минимум—при 282 нм; для  $\gamma\gamma$  изофермента максимумы наблюдались при 257 и 310 нм, а минимум—при 285 нм. Дифференциальные спектры димеров изоферментов, регистрируемые против соответствующих димеров, инкубированных в растворе  $\text{NaCl}$ , аналогичны дифференциальному спектру пары димер-мономер. Причем это сходство имеет концентрационную зависимость. Дифференциальный спектр  $\alpha\alpha$  енолазы появляется при инкубации в растворе 0,5 М  $\text{NaCl}$ , в то время как спектр  $\gamma\gamma$  енолазы в этих условиях имеет менее выраженные экстремумы, что свидетельствует о более сильном смещении равновесия димер  $\rightleftharpoons$  2 мономера в сторону образования мономера для  $\gamma\gamma$  енолазы. Для  $\gamma\gamma$  изофермента заметный дифференциальный спектр появляется лишь при увеличении концентрации  $\text{NaCl}$  до 1 М (рис. 4, б). Полученный эффект диссоциации димеров енолазы на мономеры, наблюдаемый через появление дифференциальных спектров качественно очень близок к эффекту изменения объемов элюции при гель-фильтрации на сефадексе G-150. Таким образом, при помощи двух независимых методов удалось показать более прочную ассоциацию  $\gamma\gamma$  енолазы в димер по сравнению с  $\alpha\alpha$  енолазой тканей головного мозга. Об этом также свидетельствуют изученные нами методом анизотропии флуоресценции величины  $K_d$   $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферментов. Ферменты метили ФИТЦ при концентрации 20—40 мМ и разбавляли буфером, пока интенсивность флуоресценции образцов была определяемой. Измеряли изменение анизотропии флуоресценции. При разбавлении меченых ферментов, то есть с уменьшением концентрации белка в кювете, наблюдалось уменьшение анизотропии флуоресценции, что свидетельствует о диссоциации молекул [18]. Поскольку изоферменты енолазы являются димерами, то полученные данные сравнились с теоретическими для равновесия типа димер  $\rightleftharpoons$  2 мономера. Расчеты показали, что димер  $\alpha\alpha$  енолазы имеет значительно более низкую стабильность  $K_d \cdot 3 \cdot 10^{-4}$  М в амидоацетатном буфере в присутствии 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Димер  $\gamma\gamma$  енолазы в тех же условиях обладает высокой стабильностью и имеет  $K_d \cdot 3 \cdot 10^{-6}$  М (рис. 3). Когда эксперимент повторяли в присутствии 50 мМ ЭДТА, молекулы которого связывали  $\text{Mg}^{2+}$  в среде, то процесс диссоциации димеров енолазы на мономеры наблюдался при более высоких концентрациях фермента. Так, для  $\gamma\gamma$  енолазы  $K_d$  стала равна  $10^{-6}$  М. Поскольку эти данные были получены без применения высоких концентраций солей, возможно, что они в некоторой степени отражают ситуацию *in vivo*. Если учесть, что физиологическая концентрация енолазы в нервной клетке составляет величину порядка  $10^{-6}$  М, то очевидно, что при этом  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  изоферменты находятся большей частью в виде димеров. Однако полученные данные показали, что достаточно небольшого изменения условий, чтобы заметная часть  $\alpha\alpha$  изофермента перешла в неактивное мономерное состояние.

Чтобы выяснить, имеет ли место диссоциация изоферментов енолазы на неактивные мономеры в физиологических условиях, был проделан следующий модельный эксперимент. Изоферменты енолазы в концентрации  $10^{-6}$  М инкубировали в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,0 с 0,15 М  $\text{KCl}$  при температуре 38°. Максимальное время инкубации в этом растворе составляло 5 суток, так как время полужизни большинства белков  $\text{НС}$  не превышает этого срока. Как видно из рис.

$\gamma\gamma$  изофермент при таких условиях инкубации сохраняет свою первоначальную активность, в то время как  $\alpha\alpha$  изофермент практически полностью инактивируется. Исходя из этого эксперимента, можно предположить, что и в физиологических условиях в нейронах и в нейроглии  $\gamma\gamma$  енoлаза обладает большей устойчивостью к инактивации, которая, вероятно, происходит по уже изученному механизму диссоциации на ферментативно неактивные мономеры.

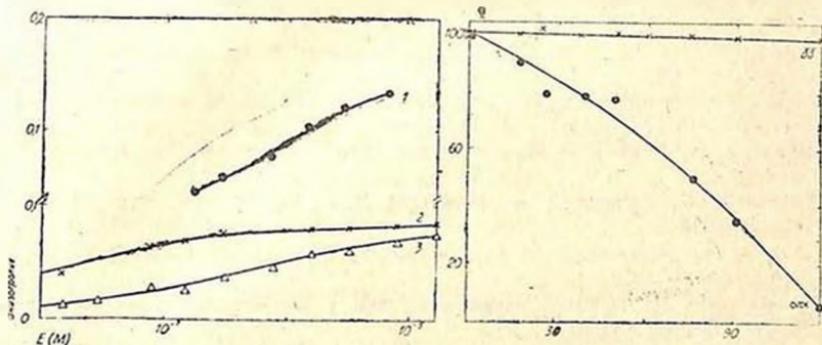


Рис. 3. Зависимость анизотропии флуоресценции чешеных ФИТЦ изоферментов енoлазы от концентрации фермента. 1— $\alpha\alpha$  в присутствии 3 мМ  $MgCl_2$ , 2— $\gamma\gamma$  в присутствии 3 мМ  $MgCl_2$ , 3— $\gamma\gamma$  в присутствии 3 мМ  $MgCl_2$  + 50 мМ ЭДТА в ионизованном буфере, рН 7,3 при 20°. Величина  $K_d$  димер  $\rightarrow$  2 мономеров для случаев 1, 2, 3 равны  $3 \cdot 10^{-6}$ ,  $3 \cdot 10^{-6}$ ,  $3 \cdot 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  М соответственно

Рис. 4. Енoлазная активность  $\alpha\alpha$  и  $\gamma\gamma$  (в %) изоферментов при инкубации в присутствии физиологической концентрации  $KCl$ . По оси абсцисс—время инкубации, ч

Таким образом, можно утверждать, что  $\gamma\gamma$  изофермент енoлазы является более устойчивым не только к воздействию высокой ионной силы, но и в условиях, близких к физиологическим.  $\alpha\alpha$  Изофермент является более лабильным и имеет величину  $K_d$  на два порядка выше, чем  $\gamma\gamma$  изофермент. Какие биологические преимущества дает это качество нейронеспецифической енoлазы, с определенностью утверждать трудно. Во всяком случае, это одно из значительных функциональных различий  $\gamma\gamma$  енoлазы, в некоторой степени объясняющее причину ее существования в ЦНС.

## DIFFERENCES IN STABILITY OF $\alpha\alpha$ - AND $\gamma\gamma$ -ENOLASE ISOZYMES OF THE BRAIN DURING INCUBATION WITH NEUTRAL SALTS

NAZARYAN K. B., KARAPETYAN N. G., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenia, Yerevan

$\gamma\gamma$ -Enolase, a neurospecific isozyme, has a higher stability (as compared with the  $\alpha\alpha$ -form, a non-neuronospecific enzyme) to the inactivating effect of monovalent metal ions under various conditions including conditions similar to the physiological ones. The inactivation is due to dissociation of dimeric enzymes into monomers.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Schmechel D. E.* Lab Invest., v. 52, p. 239—42, 1985.
2. *Zotzely-Neurath C. E.* —In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Laittha), v. 4, p. 403—433, N. Y., Plenum Press, 1983.
3. *Marangos P. J., Zotzely-Neurath C. E., Goodwin F. K. J.* Neurochem., v. 28, p. 1097—1107, 1977.
4. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Нейрохимия, т. 4, с. 410—414, 1985.
5. *Marangos P. J., Zis A. P., Clark R. L., Goodwin F. K.* Brain Res., v. 150, p. 117—134, 1978.
6. *Kornblatt I., Kornblatt J., Hui Von Hoa G.* Eur. J. Biochem., v. 128, p. 577—581, 1982.
7. *Marangos P. J., Parma A. M., Goodwin F. K. J.* Neurochem., v. 31, p. 727—732, 1978.
8. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Укр. биохим. журн., т. 58, с. 72—76, 1986.
9. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. *Волькенштейн М. В.* Итоги науки и техники, серия «Молекулярная биология», с. 216—285, М., МИНИТИ, 1973.
11. *Tabata M., Aito T., Totani N., Murachi T.* Clin. Chem., v. 31, p. 703—705, 1985.
12. *Лакович Д.* —В кн.: Основы флуоресцентной спектроскопии, с. 156—160, М., Мир, 1986.
13. *Csaba L., Paschen W., Hossman K.-A.* Brain Res., v. 269, p. 334—337, 1983.
14. *Немечек С.* Введение в нейробиологию, Прага, Авнценум, 1978.
15. *Иванов К. П.* Биоэнергетика и температурный гомеостазис, с. 65—98, Л., Наука, 1972.
16. *Gawronski T. H., Westhead E. W.* Biochem., v. 8, p. 4261—4270, 1969.
17. *Brewer I. M., Weber G. J.* Biol. Chem., v. 241, 2550—2557, 1966.
18. *Tompa P., Bär J., Batke J.* Eur. J. Biochem., v. 159, 117—124, 1986.

Поступила 14.II.1990