НЕЙРОХИМИЯ
т. 9, № 3, 1990

УДК 616.895

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗЫ И ЕНОЛАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

НАЗАРЯН К. Б., ЕГОРЯН Р. У., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН Армении, Ереван

Изучено взаимодействие фосфоглицератмутазы (ФГМ) и енолазы головного мозга быка в условиях, приближенных к физиологическим. Показано, что енолазная активность экстракта водорастворимых белков подавляется в присутствии очищенной ФГМ. При добавлении других гликолитических ферментов вместо ФГМ такой эффект не наблюдался.

Полученные результаты подтверждают предыдущие данные о комплексообразовании нейроспецифической енолазы и ФГМ.

В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о взаимодействии и взаиморегуляции гликолитических ферментов *in vitro* [1—3]. Для выявления подобных взаимодействий разработан ряд следующих подходов: определение флуоресценции анизотропии, аналитическое ультрацентрифугирование, кинетические методы и т. д. [4—7]. В результате этого выявлена способность к образованию надмолекулярных комплексов с новыми свойствами для пар: глицеральдегидфосфатдегидрогеназа—альдолаза, фосфоглицерат киназа—глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и других, очищенных из скелетных мышц и дрожжевых клеток [1, 8, 9]. Кроме того, в литературе имеются предположения об организации гликолитических ферментов в надмолекулярные структуры более высокого порядка, включающих кроме ферментов и другие элементы (мембраны, структуры цитоскелета) [10]. Способность к взаимодействию гликолитических ферментов головного мозга практически не изучена. Однако они, на наш взгляд, представляют в этом отношении значительный интерес, во-первых, потому, что мозговая ткань сильно зависит от аэробного гликолиза, который является практически единственным источником энергии. Следовательно, образование надмолекулярных комплексов с новыми свойствами регуляции гликолиза может иметь первостепенное значение для всего энергетического метаболизма ЦНС. Вторая причина заключается в том, что ряд гликолитических ферментов первой ткани имеет специализированные, мозгоспецифические изоферменты, например, альдолаза C_4, нейроспецифическая енолаза (НСЕ), которые, вероятно, отражают особенности этого метаболического пути в ЦНС [11, 12]. Поэтому

сравнительное изучение нейроспецифических форм и изоферментов, представленных в остальных тканях на возможность образования фермент-ферментных комплексов представляется нам весьма перспективным для понимания функциональной значимости обнаруженных *in vitro* взаимодействий. В настоящей работе, которая является продолжением недавно опубликованного сообщения об образовании комплексов между ФГМ и НСЕ [13], предпринята попытка изучить специфичность взаимодействия указанных ферментов в условиях, приближенных к физиологическим.

Материалы и методы

В работе использованы НСЕ, ФГМ из мозга быка, очищенные по методикам, описанным ранее [14, 15]. Экстракт водорастворимых белков получали гомогенизацией тканей головного мозга быка в соотношении 2 : 1 (объем/масса) в 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 с 0,14 М NaCl (буфер «А» и центрифугированием при 100000 g 30 мин. Использовали БСА, альдолазу и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (обе из мышц кролика) фирмы «Serva» (ФРГ), дрожжевую гексокиназу фирмы «Ferak» (ФРГ), 2-фосфоглицерат фирмы «Bochringer» (ФРГ). Енолазную активность в прямой реакции определяли на спектрофотометре М-40 («Carl Zeiss», ГДР) при 240 нм по приросту содержания продукта—фосфоенолпирувата [16]. Активность определяли в термостатированных при 37° кюветах объемом 0,6 мл. При тестировании проб, содержащих ФГМ или другие белки, до запуска реакции субстратом в течение 5 мин проводили инкубацию при 37°. Препараты ФГМ, альбумина, альдолазы и гексокиназы обладали менее 0,1% от енолазной У.А. Белок определяли по Bradford [17].

Результаты и обсуждение

В предыдущей работе нами показано, что НСЕ и ФГМ образуют комплекс, в результате чего енолазная активность подавляется по типу смешанного ингибирования [13]. Определение величины K_d, равной 10^{-5} М, показало, что подобное комплексообразование можно отнести к слабым взаимодействиям. Однако, учитывая высокую концентрацию гликолитических ферментов в клетке, примерно равную K_d комплекса НСЕ—ФГМ, весьма вероятно его существование *in vivo* [18]. Неактивный *in vitro* комплекс практически полностью восстанавливает енолазную активность в присутствии физиологических концентраций 2,3-бисфосфоглицерата—кофактора ФГМ.

Мы предположили, что и в условиях, приближенных к ситуации *in vivo* описанный эффект может иметь место, то есть подавление енолазной активности при инкубации экстракта водорастворимых белков с ФГМ является следствием образования комплекса НСЕ—ФГМ, а активность восстанавливается в присутствии 2,3-бисфосфоглицерата.

Величина У.А. енолазы в экстракте водорастворимых белков

равна 0,47 мкм $мг^{-1}$ $мин^{-1}$. Согласно литературным данным, НСЕ и нейронеспецифическая енолаза (ННЕ) содержатся в мозгу млекопитающих примерно в равных пропорциях, а общее количество енолазы составляет 3% от водорастворимых белков [12]. Поэтому нетрудно рассчитать, что в экстракте с содержанием белка 5 мг/мл суммарная концентрация НСЕ—ННЕ равна $2 \cdot 10^{-6}$ М. Как видно из рис. 1, *а*, енолазная активность экстракта подавляется в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$ и $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ М очищенной ФГМ на 5, 32 и 35% соответственно. После пропускания экстракта через колонку с сефадексом G-25, то есть отделения от него фракции низкомолекулярных соединений степень ингибирования почти не меняется и составляет 8, 28 и 35% (рис. 1, *б*), а при добавлении в среду 2,3-бисфосфоглицерата—кофактора фосфоглицератмутазной реакции 5, 9 и 39% (рис. 1 *в*).

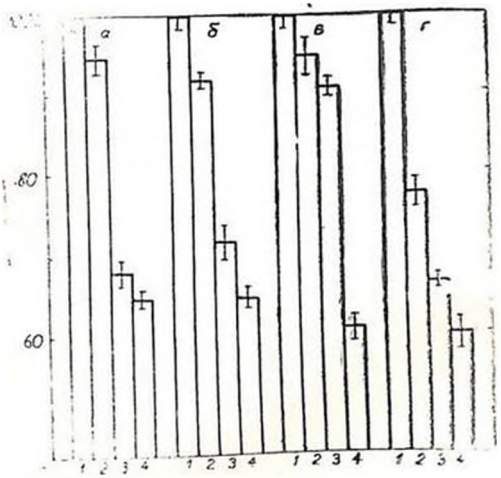

Рис. 1. Енолазная активность после инкубации с различными количествами очищенной фосфоглицератмутазы. У.А. без фосфоглицератмутазы принята за 100%. *а*—экстракт водорастворимых белков (5 мг/мл), *б*—экстракт водорастворимых белков после пропускания через колонку с сефадексом G-25, *в*—экстракт водорастворимых белков с добавлением 0,5 мМ 2,3-бисфосфоглицерата, *г*—0,1 мкМ нейроспецифической енолазы в буфере «А». *1*—гомогенат, *2*—*4*—гомогенат с добавлением $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ М соответственно, *5*—нейроспецифическая енолаза, *6*—*8*—нейроспецифическая енолаза с добавлением 10^{-5}, $2 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$ М фосфоглицератмутазы соответственно

Как показано ранее, в присутствии ФГМ подавляется активность только НСЕ, но не ННЕ [13]. Следовательно, концентрация енолазы, взаимодействующей с ФГМ в экстракте, равна приблизительно 10^{-6} М. Поэтому, инкубируя 10^{-6} М очищенной НСЕ с ФГМ, мы моделируем примерно аналогичные предыдущему эксперименту условия. При концентрациях ФГМ 10^{-5}, $2 \cdot 10^{-5}$ и $6 \cdot 10^{-5}$ М наблюдается подав-

ление начальной активности на 22, 33 и 40% соответственно (рис. 1 *г*). Из рисунка видно, что характер подавления активности для очищенной НСЕ отличается от вариантов, где в качестве источника енолазной активности использовался экстракт водорастворимых белков. В случае очищенной НСЕ активность заметно подавлялась уже при использовании 5-кратного избытка ФГМ, а в остальных случаях такое ингибирование наблюдалось лишь при 20-кратном добавлении ФГМ. Однако при применении больших избытков ФГМ процент подавления активности во всех случаях нивелируется. Это, вероятно, можно объяснить тем, что ФГМ обладает способностью связываться

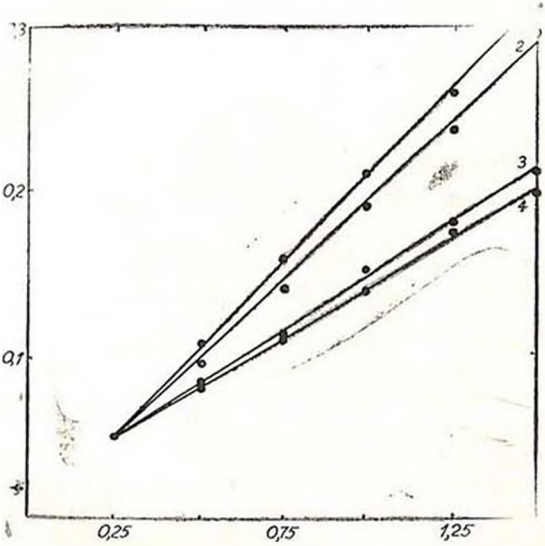

Рис. 2. Енолазная активность при разбавлениях экстрактов водорастворимых белков, содержащих различные количества фосфоглицератмутазы. По оси абсцисс—концентрация белка в кювете (в мг/600 мкл), по оси ординат—енолазная активность (в ΔD/мин). *1*—гомогенат, *2*—*4*—гомогенат с добавлением $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ М фосфоглицератмутазы соответственно

не только с НСЕ, но и с другими соединениями, присутствующими в экстракте. Поскольку использование водорастворимых белков, не содержащих низкомолекулярных соединений, существенно не меняет описанную картину, можно предположить, что ФГМ связывается с высокомолекулярными соединениями предположительно белковой природы. Добавление в среду 2,3-бисфосфоглицерата, который активирует ФГМ при первых двух использованных концентрациях снижает ее ингибирующее действие, но при большом избытке также наблюдается подавление енолазной активности.

Для проверки предположения о том, отражает ли образование комплекса НСЕ-ФГМ подавление активности НСЕ необходимо было исследовать и действие других гликолитических ферментов, а также БСА, имеющего величины ИЭТ и M_r, близкие к значениям таковых для ФГМ. Поэтому было изучено действие альдолазы, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, гексоназы и БСА на енолазную активность водорастворимых белков.

Таблица

Удельная активность енолазы в экстракте водорастворимых белков в присутствии различных концентраций гликолитических ферментов и БСА

Гомогенат (У. А. 0,47 · км мг$^{-1}$ мин$^{-1}$)	Концентрации ферментов М			
	0	2·10^{-5}	6·10^{-5}	10^{-4}
БСА	0,51	0,54	0,51	0,51
альдолаза	0,55	0,54	0,44	0,47
гексокиназа	0,49	0,51	0,42	0,49
глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназа	0,44	0,44	0,47	0,47
фосфоглицератмутаза	0,39	0,23	0,18	0,004

Как видно из таблицы, только внесение в среду ФГМ приводит к значительному подавлению енолазной активности. БСА и другие гликолитические ферменты—гексокиназа, альдолаза, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, близкие к ФГМ либо метаболически, либо по значениям ИЭТ и M_r, таким эффектом не обладают, то есть ингибирующее действие ФГМ на енолазную активность проявляет довольно узкую специфичность.

Необходимо указать, что данные по подавлению енолазной активности гомогената ФГМ и отсутствие каких-либо воздействий на активность енолазы при использовании других ферментов подтверждается и при применении в качестве источника енолазы очищенного препарата НСЕ, но не ННЕ.

Если полученные эффекты подавления активности обеспечиваются за счет образования слабых комплексов, то они должны диссоциировать уже при небольших разбавлениях. На рис. 2 представлены графики изменения активности енолазы при разбавлении экстрактов водорастворимых белков, содержащих различные количества ФГМ. Енолазная активность экстрактов, содержащих различные количества ФГМ, становится одинаковой уже при 6-кратном их разбавлении. Вероятно, это происходит потому, что при разбавлении образовавшийся комплекс диссоциирует с восстановлением подавленной енолазной активности и при 6-кратном разбавлении процент НСЕ, входящий в комплекс, настолько мал, что суммарная енолазная активность не отличается от таковой в экстракте, не содержащем ФГМ.

A RELATIONSHIP BETWEEN BRAIN PHOSPHOGLYCEROMUTASE AND ENOLASE

NAZARYAN-K. B., EGORYAN R. U., KAZARYAN B. A.

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian Republic, Yerevan

We have studied the interaction between phosphoglyceromutase (PGM) and enolase of bovine brain under conditions close to the physiological ones. The enolase activity decreased in water-soluble protein extracts in the presence of purified PGM. This effect has not been observed when other glycolytic enzymes were used instead of PGM. Our results confirm earlier data about the formation of complexes between neurospecific enolase and PGM.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tompa P., Bar J., Batke J.* Eur. J. Biochem., v. 159, p. 117—124, 1986.
2. *Friedrich P., Hajdu J.* Biochem. Soc. Trans, v. 15 (5), p. 973—977, 1987.
3. *Bernhard S. A., Srivastuva D. K.* Biochem. Soc. Trans, v. 15 (5), p. 977—982 . 1987.
4. *Hess B., Wurster B.* FEBS Lett., v. 9, p. 73, 1970.
5. *Ovadi J., Keleti T.* Eur. J. Biochem., v. 85, p. 157—161, 1978.
6. *Batke J., Asboth G., Lakatos S., Schmitt B., Cohen R.* Eur. J. Biochem., v. 107, p. 389—394, 1980.
7. *Harris S., Winzor D.* Biochem. et biophys. acta, v. 911, p. 121—126, 1987.
8. *Ovadi J.*—In Dynamics of Biochemical Systems (eds. S. Damjanovich, T. Keleti, L. Tron) v. 30, p. 247—264, Elsevier, Amsterdam; Akad. Kiado Budapest Symp. Biol. Hung., 1986.
9. *Batke J., Tompa P.*—In Dynamics of Biochemical Systems (eds. S. Damjanovich, T. Keleti, L. Tron), v. 30, p. 247—264), Elsevier, Amsterdam; Akad. Kiado Budapest Symp. Biol. Hung. 1986.
10. *Карасев В. А., Стефанов В. Е., Курганов Б. И.* Итоги науки и техники, Биол. химия. М., ВИНИТИ, с. 198, 1989.
11. *Thompson R. J.*, Biochem. Soc. Trans., v. 8 (5), p. 494—496, 1980.
12. *Zomzely-Neurath C. E.* Handbook of Neurochem. (ed. A. Lajtha), v. 4, p. 403—433, N. Y., Acad. Press, 1983.
13. *Batke J., Nazaryan K. B., Karapetian N. H.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 264 (2), p. 510—518, 1988.
14. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Нейрохимия, т. 4, № 4, с. 410—414, 1985.
15. *Назарян К. Б., Егорян Р. У., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 566—573, 1988.
16. *Baranovski T., Wolna E.* Meth. in Enzymology, v. 42, p. 335—338, N. Y., Acad. Press, 1975.
17. *Bradford M. E.* Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
18. *Ottaway J., Mowbray J.*—In Current Topics in Cell Regulation (eds. B. L. Horecker, R. Stadtman), v. 12, p. 107—208, Academic Press, New York, 1977.

Поступила 14. V. 1990