



УДК 616.895.8

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗЫ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

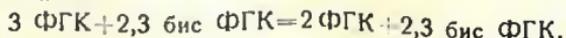
НАЗАРЯН К. Б., ЕГОРЯН Р. У., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Очистка фосфоглицератмутазы (ФГМ) из головного мозга крупного рогатого скота состояла из следующих стадий: экстракции водорастворимых белков, дробного осаждения сульфатом аммония, хроматографии на карбоксиметил и ДЭАЭ-ц и сефадексе G-150. Очищенный препарат ФГМ при электрофорезе в ПААГ с ДДС-Na мигрировал в виде одной мажорной полосы величиной  $M_r$  25 кД. ИЭТ находится в зоне рН 4,3. рН оптимум равен рН 7,0. Определены  $K_m$  данного фермента для 3-фосфоглицериновой кислоты (3 ФГК), 2,3 бис и 2-фосфоглицериновой кислоты (2 ФГК).

Проведенные исследования показали, что ФГМ головного мозга иммунологически не идентична ферменту из других тканей, что, вероятно, может свидетельствовать о ее органоспецифичности в нервной ткани.

2,3-бис фосфоглицератзависимая ФГМ (КФ 2.7.5.3)—гликолитический фермент, присутствующий во всех тканях животных и ответственный за катализ реакции:



происходящий по механизму типа «пинг-понг» [1].

Электрофоретический профиль ФГМ в различных тканях человека и животных состоит из трех димерных изоферментов ММ, МВ, ВВ [2, 3]. Во всех фетальных тканях ФГМ представлена В субъединицей и следовательно, ВВ изоферментом. В процессе онтогенеза в скелетных мышцах и миокарде он заменяется ММ и МВ изоферментами [4]. В ЦНС ФГМ представлена изоферментом с субъединичным составом ВВ типа. Сердечная мышца млекопитающих содержит все три формы ФГМ и поэтому служит зачастую источником их выделения [5]. Однако, если для ММ и МВ форм выход фермента составляет не менее 20%, то ВВ форма очищена с выходом 1—3%. Очевидно, что сердечная мышца не является подходящим объектом для очистки мозговой ВВ формы ФГМ. Более того, ФГМ головного мозга является одним из наименее изученных гликолитических ферментов и до сих пор не очищен из нервной ткани. По литературным данным, из тканей головного мозга свиньи, кошки и человека выделены лишь грубо очищенные фракции, содержащие ФГМ активность [6, 7].

Особый интерес, на наш взгляд, представляет изучение иммунологической органоспецифичности ФГМ головного мозга, поскольку такие метаболически близкие ферменты энергетического обмена, как ендолаза, альдолаза и креатинкиназа в ЦНС представлены нейроспецифическими изоферментами. В этом аспекте ФГМ и ее изоферменты совершенно не изучены.

Целью настоящей работы было очистить ФГМ из головного мозга крупного рогатого скота, изучить ее основные физико-химические, каталитические и иммунологические характеристики и сравнить полученные результаты с литературными данными по изоферментам ФГМ из других тканей.

### Материалы и методы

Фермент выделяли из головного мозга крупного рогатого скота. После гомогенизации ткани в 0,005 М трис-НСl рН 7,5 с 0,001 М MgCl<sub>2</sub> (буфере «А», соотношение ткань/буфер—1:3, вес/объем), центрифугировали 60 мин при 6000 г. К экстракту водорастворимых белков добавляли сухой сульфат аммония до 55%-ного насыщения, центрифугировали при тех же условиях и к супернатанту добавляли сульфат аммония до 70%-ного насыщения. Высаживающуюся при этом фракцию, содержащую практически всю ФГМ активность («Р-70»), использовали для дальнейшей очистки фермента, которая состояла из хроматографии на карбоксиметил-ц ДЭАЭ-ц (СМ-32 и ДЕ-32 «Whatman», Англия) и сефадекса G-150 («Pharmacia», Швеция).

ФГМ активность в прямой реакции определяли спектрофотометрически в сопряженной системе с ендолазой по приросту поглощающего при 240 нм фосфоенолпирувата. Инкубационная среда содержала 0,08 М триэтаноламинного буфера, рН 7,6 с 0,001 М MgCl<sub>2</sub>, 0,01 М 3 ФГК, 0,00012 М 2,3-бис ФГК, 10 ед. ендолазы и 10—100 мкг ферментного белка, объем пробы 500 мкл. Для определения активности в обратной реакции использовали сопряженную систему с 3-фосфоглицераткиназой и глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназой. Инкубационная среда состояла из 0,08 М триэтаноламинного буфера, рН 7,6 с 0,001 М MgCl<sub>2</sub>, 0,00012 М 2,3-бис ФГК, 0,03 М АТР, 0,0013 М NADH, 0,0001—0,001 М 2 ФГК, по 10 ед. 3-фосфоглицераткиназы и глицеральдегиддегидрогеназы. Скорость реакции определяли спектрофотометрически по убыли NADH при длине волны 340 нм. Белок определяли по Bradford [8], аналитический электрофорез проводили по Davis [9]. Величину M<sub>r</sub> определяли электрофорезом в 10%-ном ПААГ с ДДС-Na и гель-фильтрацией на сефадексе G-150, а ИЭТ—фокусированием в тонком слое 5%-ного ПААГ с амфолинами диапазона рН 3,5—10 и 3,5—5 («ЛКВ»). K<sub>m</sub> для 3 ФГК, 2,3-бис ФГК и 2 ФГК определяли методом Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах [10].

Для определения рН оптимума ФГМ реакции использовали 0,05 М трис-НСl, 0,0035 М MgCl<sub>2</sub> рН 7,0, 8,0 и 9,0, 0,05 М трис-фосфат с 0,0035 М MgCl<sub>2</sub>, рН 7,0 и 8,0 и 0,05 М имидазоль-НСl, 0,0035 М MgCl<sub>2</sub>, рН 7,0 и 8,0 буфера.

При определении термостабильности ФГМ фермент инкубировали 15 мин при разных температурах в диапазоне 30—70° и после этого измеряли активность.

Енолазную активность в препарате очищенной ФГМ определяли по методу Baranowski, Wolna [11], 2,3-бис фосфоглицератфосфатазную — по Ramon, Jose [12], а  $P_i$  — по Tausshy и соавт. [13].

Определение иммунологической специфичности проводили, используя антисыворотку, полученную к очищенному препарату ФГМ. Для получения антисыворотки проводили иммунизацию кроликов самцов: подкожно им вводили 0,25 мл белкового раствора (1 мг/мл) с 0,25 мл полного адьюванта Фрейда. Для второй (через 8 дней) и последующих (через 14 дней) инъекций использовали то же количество белка с неполным адьювантом. Всего было проведено 5 инъекций. Кровь брали на 8-й день после последней инъекции из краевой ушной вены. Реакцию двойной иммунодиффузии проводили по Гусеву [14] в геле 1%-ного агара.

Преципитирующую способность анти-ФГМ антисыворотки тестировали следующим образом: в гомогенате головного мозга крупного рогатого скота, приготовленного на буфере 0,005 М трис-НСl, рН 7,0 с 0,001 М  $MgCl_2$  определяли активность ФГМ, затем к различным количествам гомогената добавляли аликваты антисыворотки (100 мкл), инкубировали 1 ч при 37° и оставляли на ночь при 4°, после добавления полиэтиленгликоля ( $M_r$  6 кД) до конечной концентрации 7% оставляли 10 мин при 4° и центрифугировали 1 ч при 22000 г, затем определяли ферментативную активность в супернатанте. Вышеописанным методом определяли степень подавления активности ФГМ в гомогенатах сердца, мышцы и печени крупного рогатого скота.

### Результаты и обсуждение

При фракционировании на КМ-ц обессоленной диализом против буфера «А» фракции «Р-70» ФГМ активность не связывалась с матриксом колонки и полностью выходила в первом пике (рис. 1, а). Затем сконцентрированную ультрафильтрацией на фильтре РМ-10 («Diaflo», Голландия) белковую фракцию наносили на колонку с ДЭАЭ-ц (рис. 1, б) и связавшиеся белки элюировали 0—0,5 М линейным градиентом NaCl, приготовленным на буфере «А». Активность ФГМ, содержащуюся во втором пике связавшихся белков, обессоливали, сгущали и наносили на колонку с сефадексом G-150 (рис. 1, в), уравновешенную 0,01 М трис-фосфатным буфером, рН 7,5 с 0,15 М NaCl и 0,01%  $NaN_3$ . С нее активность ФГМ выходила в объеме, соответствующем величине  $M_r$  50 кД. На всех стадиях очистки фракции, содержащие ФГМ, элюировали в виде единственного пика, что свидетельствует об отсутствии в ткани головного мозга нескольких ее изоферментов или множественных форм. Это согласуется с литературными данными о существовании в ЦНС одного изофермента ФГМ [2—5]. Процедуру очистки иллюстрирует табл. 1, из которой видно, что фермент очищен более чем в 140 раз и У. А. конечного препарата равна 150 мкМ·мг белка<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup>. Как очищенная ФГМ, так и препараты, полученные на различных стадиях очистки, не связываются

с сепарозой-6В-СL-цибахроновой синей-ФЗГА в отличие от данных Bartrons, Carreras [5], показавших связывание всех трех изоферментов из сердечной мышцы свиньи с сепарозой-4В, конъюгированной с голубым декстраном. Подобное различие, вероятно, может объясняться как видо- или органоспецифичностью фермента, так и различиями в структуре аффинных матриц.

Таблица 1

Очистка фосфолицератмутазы из головного мозга крупного рогатого скота

Стадия очистки	Объем (мл)	Общий белок (мг)	Общая активность (чкМ/мин)	У. А. (мкМ, мг/мин)	Выход по активности	Степень очистки
Гомогенат	1500	18000	19440	1,03	100	—
"Р-70"	65	1950	10625	5,4	54,6	5
КМ-ц	100	500	8405	16,8	43,2	15,5
ДЭАЭ-ц	11	91	7250	79,6	37,3	73,7
G-150	15	32	5011	156,6	25,7	145

Величина  $M_r$  фермента, определенная электрофорезом в ПААГ с ДДС-Na, была равна 25 кД, что в сочетании со значением в 50 кД, полученным методом гель-фильтрации, свидетельствует о димерной структуре ФГМ и находится в хорошем соответствии с данными Bartrons, Carreras [5] и Hass и соавт. [15]. ИЭТ очищенного нами препарата находится при pH 4,3, что незначительно отличается от величины, полученной Bartrons, Carreras [5] для ВВ изофермента из сердца свиньи (pH 4.7).

Таблица 2

Значение  $K_m$  для ВВ изофермента фосфолицератмутазы, выделенной нами из головного мозга и его сравнение с литературными данными для других тканей

ВВ изофермент	$K_m$ (M)		
	3-фосфоглицериновая кислота	2,3-бис фосфоглицериновая кислота	2-фосфоглицериновая кислота
Головной мозг крупного рогатого скота	$2,2 \cdot 10^{-1}$ $10^{-1}$ [5]	$1,3 \cdot 10^{-5}$ $4 \cdot 10^{-7}$ [5]	$2,8 \cdot 10^{-1}$
Сердце свиньи	$2,7 \cdot 10^{-1}$ [1]	—	—
Почки свиньи	—	—	—
Эритроциты человека	$2,0 \cdot 10^{-1}$ [20]	—	—

При электрофорезе и изофокусировании белок мигрирует в виде одной мажорной полосы и нескольких минорных. Однако ФГМ активностью обладает только основной белковый компонент (рис. 2). pH оптимум фермента находится при значении pH 7, причем это значение не меняется при использовании имидазольного и трис-HCl буфера, он обладает довольно большой температурной устойчивостью: при 15-минутной инкубации он инактивируется на 50% при температуре 60° (рис. 3). Из литературных данных явствует, что ФГМ является бифункциональным фермен-

том, обладающим кроме основной и 2,3-бис фосфоглицерат фосфатазисй активностью [5, 16]. Как показывают наши исследования, ФГМ головного мозга также не является исключением. 2,3-бис фосфоглицерат фосфатазная активность в очищенном препарате ФГМ равна  $0,0015 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

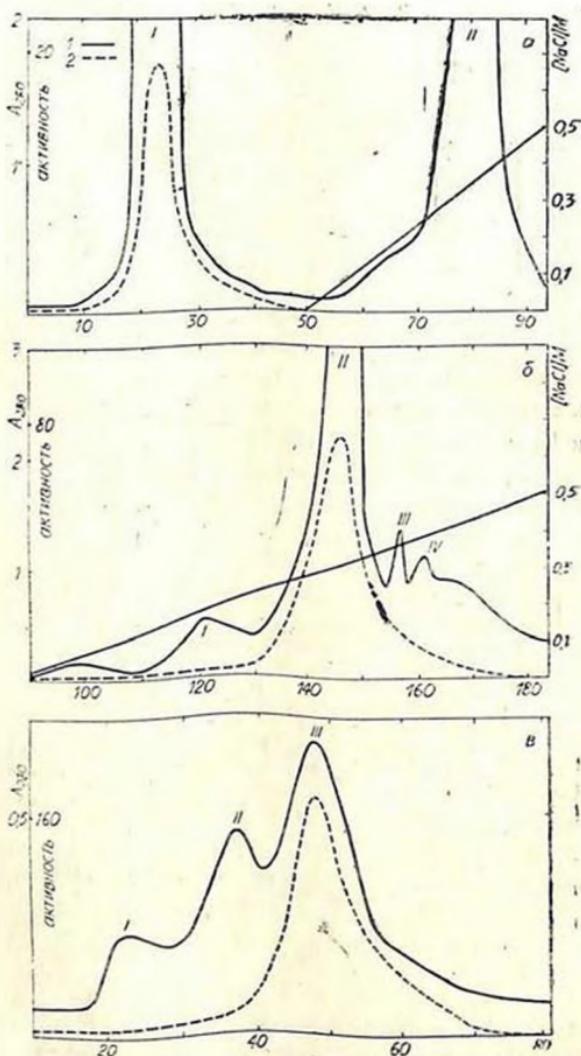


Рис. 1. Хроматографическое разделение белков фракции «Р-70» на колонках: а—с КМ-ц; б—с ДЭАЭ-ц; в—с сефадексом G-150. 1—поглощение при 280 нм, 2—фосфоглицератмутанга активность. По оси абсцисс—номера фракции. По оси ординат слева—поглощение при 280 нм и фосфоглицератмутанга активность в  $\text{мкМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ , справа—концентрация NaCl

Из других сопутствующих ферментативных активностей нас интересовало наличие в препарате метаболически близкой енолазной активности. Оказалось, что препарат ФГМ содержит также около 0,01% енолазной активности, но она целиком связана с одним из минорных компонентов в препарате, о котором упоминалось выше.

Значение  $K_m$  для субстратов ФГМ в прямой и обратной реакции не отличаются существенно от таковых для ферментов, выделенных из других источников, в то время как  $K_m$  для 2,3 бис ФГК на два порядка выше, чем для фермента, выделенного из сердца свиньи (табл. 2).

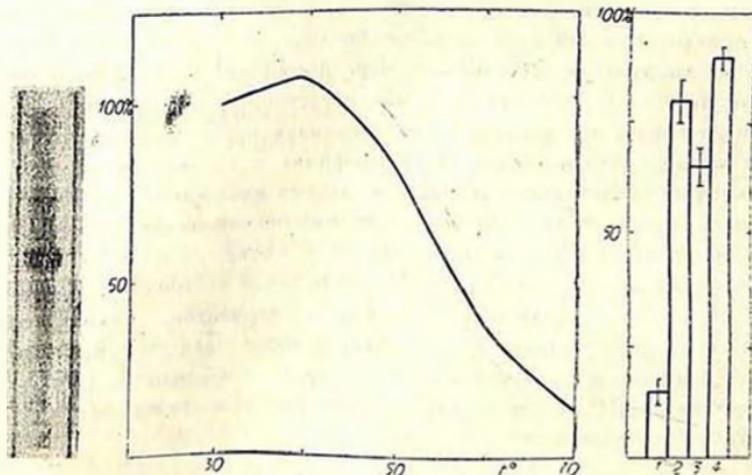


Рис. 2. Электрофореграмма очищенного белка в ПААГ в денатурирующих условиях

Рис. 3. Влияние температуры на активность фосфолицератмутазы. По оси ординат—ферментативная активность в %, по оси абсцисс—температура

Рис. 4. Подавление активности фосфолицератмутазы специфической антисывороткой в экстрактах следующих тканей крупного рогатого скота: 1—мозг, 2—скелетная мышца, 3—сердце, 4—печень. По оси ординат—ферментативная активность в %

Изучение инактивирующего действия *n*-хлормеркурий бензоата выявило большую устойчивость ВВ изофермента по сравнению с ММ и МВ изоферментами, что соответствует литературным данным [3]. Таким образом, сопоставление полученных в настоящей работе результатов по изучению основных физико-химических и каталитических свойств ВВ изофермента ФГМ из нервной ткани крупного рогатого скота с результатами ряда авторов [3—5] не выявили существенных различий.

При иммунологическом исследовании преципитирующей способности антисыворотки к очищенному препарату ВВ изофермента ФГМ головного мозга было обнаружено следующее. Ранее нами было показано, что эта антисыворотка имеет значительно более низкий титр при тестировании ее с экстрактами печени, сердца, мышц и семенников крупного рога-

того скота [17]. Поэтому в настоящей работе была протестирована ее преципитирующая способность на ФГМ активность в экстрактах различных тканей. Антисыворотка к ФГМ преципитирует из экстракта белков головного мозга около 85% активности. Из белкового же экстракта печени, скелетных мышц и сердца преципитирует 20, 30 и 10% соответственно (рис. 4). Это свидетельствует об иммунологической идентичности ФГМ головного мозга ферменту из других тканей, что, вероятно, может быть обусловлено органоспецифичностью ФГМ в нервной ткани. Если ВВ изофермент ФГМ головного мозга обладает определенной органоспецифичностью, то можно утверждать, что гликолиз в ЦНС на отрезке метаболизма триозофосфатов, а точнее в последовательности превращений: 3-фосфоглицериновая кислота → 2-фосфоглицериновая кислота → фосфоенопируват → пируват в значительной мере обеспечен органоспецифическими изоферментами. Действительно, как известно, γγ изофермент енолазы — нейроспецифическая енолаза, локализованная практически исключительно в нейронах, иммунологически специфична и отличается по некоторым функциональным характеристикам от других изоферментов [19]. M<sub>2</sub> изофермент пируваткиназы также имеет иммунологические и функциональные различия от M<sub>1</sub> и L изоферментов, а также отличается от M<sub>2</sub> изофермента из других тканей [19]. Наличие такой метаболически последовательной триады органоспецифических изоферментов, весьма вероятно, имеет свое функциональное значение, которое предстоит выяснить. Это может привести к формированию представлений об особой специализации гликолиза в ЦНС либо на стадии метаболизма триозофосфатов, либо всего метаболического пути в целом.

## PURIFICATION AND CHARACTERISTICS OF PHOSPHOGLYCEROMUTASE FROM CATTLE BRAIN

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

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

Purification of phosphoglyceromutase (PGM) from cattle brain consists of the following steps: extraction of water soluble proteins, fractional precipitation by ammonium sulfate, chromatography on carboxymethyl and DEAE-celluloses and G-150 Sephadex. The purified PGM preparation, when electrophoresed in SDS-PAAG, migrated as a single major band having M<sub>r</sub> of 25 kD and IEP in the region of pH 4.3. The pH optimum of the enzyme was 7.0. We determined K<sub>m</sub> of this enzyme for phosphoglyceric acid (3-PGA), 3-diphosphoglyceric acid (2,3-bis-PGA) and 2-phosphoglyceric acid (2-PGA). Brain PGM immunologically is non-identical to the enzyme from other tissues suggesting that PGM of the nerve tissue may be an organ-specific enzyme.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Grisolia S., Carreras J.* Meth. in Enzymology, N. Y., Acad. Press, v. 42, p. 435—437, 1975.
2. *Mezquita J., Carreras J.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 70B, p. 237—245, 1981.
3. *Carreras J., Boach J., Mezquita J.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 71B, p. 57—63, 1982.
4. *Mezquita J., Bartrons R., Pons G., Carreras J.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 70B, p. 247—255, 1981.
5. *Bartrons R., Carreras J.* Biochem. et biophys. acta, v. 708, p. 167—177, 1982.
6. *Carreras J., Bartrons R., Rosch J., Pons G.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 70B, p. 477—485, 1981.
7. *Pons G., Berrocal F., Tauler A., Carreras J.* Comp. and Biochem. Physiol., v. 80B, № 3, p. 551—556, 1985.
8. *Bradford M. E.* Anal Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
9. *Davis B. J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, p. 404—427, 1964.
10. *Дуксон М., Узбе Э.* Ферменты, М., Мир, 1982.
11. *Baranovski T., Wolna E.* Meth. in Enzymology, N. Y., Acad. Press, v. 42, p. 335—338, 1975.
12. *Ramon B., Jose C.* Biochem. et biophys. acta., v. 708, p. 167—177, 1982.
13. *Tausshy E., Shorr H. H. J.* Biol. Chem., v. 202, p. 675, 1953.
14. *Гусев А. И.*—В кн.: Иммунохимический анализ. (под ред. Л. А. Зильбера), с. 99—119, М., Медицина, 1968.
15. *Huss L. F., Sheibley R. H., Kappel W. K., Miller K. B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 72, № 3, p. 976—983, 1976.
16. *Rose Z. B.* Adv. Enzyme, v. 51, p. 211—253, 1980.
17. *Назарян К. Б., Егоян Р. У., Казарян Б. А.* II Республиканская конференция, посвященная проблемам физико-химической биологии, с. 69, Ереван, 1986.
18. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Укр. биохим. журн. т. 58(4), с. 72—76, 1986.
19. *Willis-Totle S., Dyson R. D., Newburgh R. W., Gardenus J. M. J.* Neurochem v. 27, p. 1355—1366, 1976.
20. *Huss L. F., Miller K. B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 95, N. 1, p. 132—139, 1980.

Поступила 17. IV 1985