

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.174.5

©Коллектив авторов

### ГЛИЦЕРОЛ-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА - ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ЦИТОЗОЛЯ

О.А.Бунеева<sup>1</sup>, О.В.Гнеденко<sup>1</sup>, Н.Г.Панова<sup>1</sup>, М.В.Медведева<sup>2</sup>, Ю.Д.Иванов<sup>1</sup>,  
А.Е.Медведев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121 Москва,  
Погодинская ул. 10, тел. 245-05-09, факс 245-0857,  
эл. почта: medvedev@ibmh.msk.su

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Изатин - низкомолекулярный эндогенный непептидный регулятор, обнаруженный практически во всех органах, тканях и биологических жидкостях животных и человека. Хотя изатин-связывающие белки обнаружены в мембранной и растворимой фракциях клеток, идентифицировано всего несколько мишеней действия изатина (моноаминоксидаза, А-подтип рецепторов натрийуретических пептидов и растворимая NO-стимулируемая гуанилатциклаза), которые не могут объяснить всей биологической активности, свойственной этому соединению. Высоко очищенная глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (ГФДГ) из мышц кролика эффективно взаимодействует с аналогом изатина, иммобилизованным на кювете оптического биосенсора. Этот эффект специфичен: другой высоко очищенный NAD-зависимый фермент цитозоля скелетных мышц - лактатдегидрогеназа, не взаимодействует с иммобилизованным изатином. Отмывка кюветы буфером не вызывает полной диссоциации комплексов ГФДГ-изатин. Последнее свидетельствует в пользу нескольких типов взаимодействия этого фермента с изатином, включая т.н. прочное связывание. Низкая (10 мкМ) и высокая (100 мкМ) концентрации изатина оказывают различные эффекты на активность ГФДГ: первая значительно повышает кажущуюся  $K_m$  для NAD, вторая одновременно с некоторым повышением  $K_m$  снижает кажущуюся  $V_{max}$ .

**Ключевые слова:** изатин, изатин-связывающие белки, цитозоль, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа

**ВВЕДЕНИЕ.** Изатин - низкомолекулярный эндогенный индол, обнаруженный во всех исследованных органах, тканях и биологических жидкостях животных и человека [1-3].

*In vitro* основными мишенями физиологических концентраций изатина (< 10 мкМ) являются моноаминоксидаза (МАО) Б, А-рецепторы натрийуретических пептидов и растворимая NO-стимулируемая гуанилатциклаза тромбоцитов человека [1-5]. При более высокой концентрации (соответствующей верхнему физиологическому диапазону - 10 мкМ) изатин тормозит (на 20-40%) связывание

лигандов с рецепторами некоторых подтипов медиаторных аминокислот, не влияя на рецепторы многих гормонов и нейромедиаторов [2,5]. Однако выявленные мишени действия изатина не могут объяснить всей биологической активности, свойственной этому соединению *in vivo*.

Недавно с использованием меченого тритием изатина выявлено неравномерное связывание этого регулятора в различных отделах мозга крысы *in situ* [6]. Анализ мембранной и растворимой фракций мозга, сердца, почек и печени крысы, проведенный с помощью иммобилизованного на поверхности дна карбоксиметилдекстрановой кюветы оптического биосенсора IAsys аналога изатина, выявил неравномерное распределение изатин-связывающих белков. При этом форма кинетических кривых взаимодействия исследованных фракций с иммобилизованным аналогом изатина в исследованных органах была различной, что может быть следствием разного качественного и/или количественного состава изатин-связывающих белков исследованных тканей [7]. Все это свидетельствует о существовании множественных изатин-связывающих белков, большинство из которых остаются неидентифицированными.

Поскольку одним из нескольких изатин-связывающих белков цитозоля, известных на сегодняшний день, оказался NAD-зависимый фермент гликолиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) [8], в настоящей работе исследовали взаимодействие с иммобилизованным на кювете оптического биосенсора аналогом изатина других NAD-зависимых дегидрогеназ цитозоля - глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали NAD производства "Reanal" (Венгрия), DEAE-целлюлозу и сефадекс производства "Pharmacia" (Швеция), динатриевую соль DL-глицерол-3-фосфата ("Sigma", США). 5-аминоизатин был любезно предоставлен профессором V. Glover (Imperial College, Лондон). Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

Условия иммобилизации 5-аминоизатина на карбоксиметилдекстрановой кювете оптического биосенсора (IAsys Affinity Sensors, UK) и протокол определения изатин-связывающей активности подробно изложены в предыдущей работе [7]. Кинетические параметры реакции рассчитывали с помощью программного обеспечения к прибору (IAsys software, FASTfit). Для вычисления констант скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и диссоциации ( $k_{off}$ ) комплекса ГФДГ-изатин экспериментальные кривые были аппроксимированы экспоненциальным уравнением:

$$R = R_0 + R_1[1 - \exp(-ft)],$$

где  $f = k_{on}C + k_{off}$ ,  $R$  - смещение резонансного угла, регистрируемое прибором,  $t$  - время,  $R_0$  - сигнал прибора при  $t=0$ ,  $R_1$  - сигнал прибора при  $t=\infty$  (в равновесном состоянии) относительно сигнала при  $t=0$ ,  $C$  - концентрация лиганда в растворе [11].

Глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (удельная активность препарата 10 мкмоль/мин на 1 мг белка) и лактатдегидрогеназу (удельная активность 175 мкмоль/мин на 1 мг белка) выделяли из мышц кролика стандартными методами [9,10]. В экспериментах использовали 2 препарата ГФДГ. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, препараты ферментов были практически гомогенны и представлены одной полосой.

Активность ГФДГ измеряли при комнатной температуре (+18°C), регистрируя восстановление NAD при 340 нм. Среда измерения (конечный объем 3 мл) содержала 42 мМ пироглицилатный буфер pH 9,0, 1,8 мМ глицерол-3-фосфат, 20 мМ гидразин. Изатин добавляли в кювету спектрофотометра непосредственно перед измерением. Результаты обрабатывали с помощью стандартных программ регрессионного анализа.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Добавление препаратов ГФДГ в кювету биосенсора приводило к появлению характерного ответа, свидетельствующего о комплексообразовании между ферментом и иммобилизованным 5-аминоизатином (рис. 1). Величина специфического ответа, определяемая по разнице в связывании

# ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ЦИТОЗОЛЯ

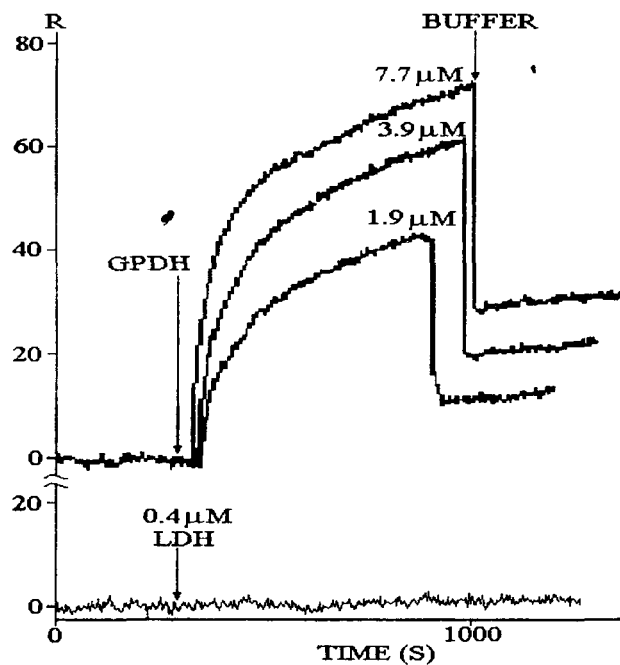


Рисунок 1.

Взаимодействие глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (GPDH) и лактатдегидрогеназы (LDH) с иммобилизованным аналогом изатина. Показано специфическое связывание ГФДГ. Образование комплексов ЛДГ с иммобилизованным изатином не было зарегистрировано и сенсограммы при добавлении ЛДГ в кювету с и без иммобилизованного 5-аминоизатина были идентичны. Молярные концентрации обоих ферментов рассчитывали, используя молекулярные массы димера ГФДГ и тетрамера ЛДГ.

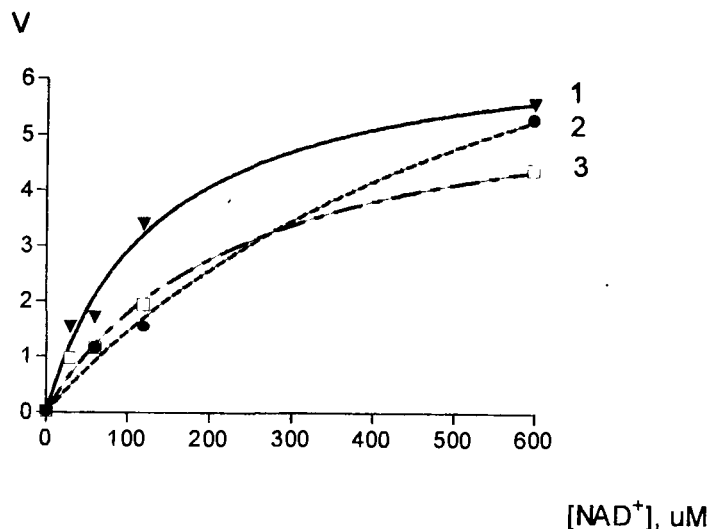


Рисунок 2.

Влияние 10 мкМ (2) и 100 мкМ (3) изатина на активность глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. (1 - контроль, представлены средние значения для двух препаратов фермента).

ГФДГ в кювете с и без иммобилизованного 5-аминоизатина, возрастала с увеличением количества добавленного фермента. Последующая замена раствора в кювете на рабочий буфер не вызвала полной диссоциации образующихся

комплексов фермент-изатин. Доля таких прочносвязанных комплексов возрастала с увеличением концентрации белка (рис. 1). Рассчитанные для прочно-связанного компонента кинетические константы скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и диссоциации комплекса ( $k_{off}$ ) ГФДГ-изатин составляли, соответственно,  $(6,6 \pm 0,3) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  и  $(4,2 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ . Величина константы диссоциации  $K_d = 6,4 \pm 0,3 \text{ мкМ}$  согласуется с данными литературы о взаимодействии других ферментов с низкомолекулярными лигандами, которое исследовали схожими методами (плазмонный резонанс) [12,13].

Добавление другого NAD-зависимого фермента цитозоля - ЛДГ - не вызывало появления ответа биосенсора, характерного для комплексообразования, и замена раствора в кювете на рабочий буфер приводила к полному удалению ЛДГ. Все это свидетельствует о том, что ЛДГ не взаимодействует с иммобилизованным аналогом изатина.

Изатин тормозит активность ГФДГ. Его эффект по-разному проявляется при низких и высоких концентрациях. При концентрации 10 мкМ, соответствующей верхнему физиологическому пределу для ряда тканей, изатин существенно увеличивает кажущуюся  $K_m$  для NAD (рис. 2). При более высокой концентрации (100 мкМ) изатина, помимо некоторого увеличения кажущейся  $K_m$  для NAD, происходит и небольшое снижение  $V_{max}$ .

Значение регуляции ГФДГ изатином пока неясно. По аналогии с ГАФД, другим изатин-связывающим белком, который играет важную роль в нейропротекторных эффектах депренила и других пропаргиламинов, связанных со снижением синтеза про- и усилением синтеза антиапоптотических белков [14], можно предположить существование подобного регуляторного потенциала и у ГФДГ. Правомерность такой гипотезы будет проверена в дальнейших исследованиях.

Данная работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 03-04-48244 и 01-04-48245) и Благотворительного Фонда содействия отечественной медицине.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391.
2. Гловер В., Медведев А.Е., Сандлер М. (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 515-521.
3. Sandler M., Medvedev A.E., Panova N.G., Matta S., Glover V. (2000) In: Milestones in monoamine oxidase research: discovery of (-)deprenyl (K.Magyar and E.S.Visi eds.) Meditcina Publishing House Co., Budapest, pp. 237-251.
4. Medvedev A.E., Sandler M., Glover V. (1998) *Life Sci.*, **62**, 2391-2398.
5. Glover V., Medvedev A., Sandler M. (1995) *Life Sci.*, **57**, 2073-2079.
6. Crumeyrolle-Arias M., Medvedev A., Cardona A., Barritault D., Glover V. (2003) *J. Neurochem.*, **84**, 618-620.
7. Иванов Ю.Д., Панова Н.Г., Гнеденко О.В., Бунеева О.А., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 73-83.
8. Panova N.G., Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Ivanov Yu.D., Glover V., Sandler M., Medvedev A.E. (2000) 9th Amine Oxidase Workshop. The millennium meeting, Barcelona p. 60.
9. Fondy T. P., Levin L., Sollohub S. J., Ross Ch. R. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3148-3160.
10. Scopes R.K. (1977) *Biochem. J.*, **161**, 253-263.
11. Yeung D., Gill A., Maule C.H., Davies R.J. (1995) *Trends in Anal. Chem.*, **14**, 49-56.
12. Shaw M.A., Ostar E.M., Goldman Y.E. (2003) *Biochemistry*, **42**, 6128-6135

---

#### ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ЦИТОЗОЛЯ

---

13. Koh D.W., Patel C.N., Ramsinghani S., Slama J.T., Oliveira M.A., Jacobson M.K. (2003) *Biochemistry*, **42**, 4855-4863.
14. Tatton W., Chalmers-Redman R., Tatton N. (2003) *J. Neural Transm.*, **110**, 509-515.

Поступила 12.08.2003

#### GLYCEROL-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IS A CYTOSOLIC ISATIN-BINDING PROTEIN

*O. A. Buneeva<sup>1</sup>, O.V.Gnedenko<sup>1</sup>, N.G.Panova<sup>1</sup>, M.V.Medvedeva<sup>2</sup>, Yu.D.Ivanov<sup>1</sup>, A.E.Medvedev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; fax: 245-0857, e-mail: medvedev@ibmh.msk.su

<sup>2</sup>Moscow State University, Moscow, Russia

Isatin is an endogenous indole widely distributed in mammalian tissues and body fluids. The presence of isatin-binding proteins has been recognised in particulate and soluble fractions of various organs and tissues. However, identified targets of isatin action (monoamine oxidase, natriuretic peptide receptor type A and soluble NO-stimulated guanylate cyclase) cannot account for all biological activity of this compound. Highly purified glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) from rabbit muscle effectively interacts with the isatin analogue immobilised on the cuvette of IAsys optical biosensor. This effect was specific because the other NAD-dependent cytosolic enzyme purified from rabbit muscle, lactate dehydrogenase failed to interact with the immobilised isatin analogue. Replacement of the cuvette medium for washing buffer did not cause total dissociation of GPDH-isatin complexes. This suggests involvement of several types of enzyme-isatin interaction including tight binding. Low (10  $\mu$ M) and high (100  $\mu$ M) concentrations of isatin caused different effects on GPDH activity: the former significantly increased apparent  $K_m$  for NAD, whereas the latter decreased apparent  $V_{max}$  and increased  $K_m$ .

**Key words:** isatin, isatin-binding proteins, cytosol, glycerol-3-phosphate dehydrogenase.