

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.174.5

©Коллектив авторов

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПИРУВАТКИНАЗЫ С ИЗАТИНОМ И ДЕПРЕНИЛОМ

*О.А. Бунеева<sup>1</sup>, О.В. Гнеденко<sup>1</sup>, М.В. Медведева<sup>2</sup>, Ю.Д. Иванов<sup>1</sup>,  
В. Гловер<sup>3</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: Olga.Buneeva@ibmc.msk.ru

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

<sup>3</sup>Имперский колледж Лондона, Хаммерсмит, London, W12 0NN, Великобритания

Ключевой фермент гликолиза пируваткиназа с умеренным сродством связывает [<sup>3</sup>H]изатин ( $K_D \sim 10$  мкМ). Этот процесс тормозят АТР ( $IC_{50}$  25 мкМ) и депренил ( $IC_{50}$  5 мкМ). Взаимодействие пируваткиназы с изатином и его ингибирование АТР и депренилом подтверждено в независимых экспериментах с использованием оптического биосенсора и иммобилизованного аналога изатина (аминоизатин). Другой фермент – креатинкиназа – изатин не связывает. Это свидетельствует о специфичности взаимодействия пируваткиназы с изатином. Предполагается, что связывание пируваткиназы с изатином отражает негликолитические функции этого фермента, данные о которых постепенно накапливаются в литературе

**Ключевые слова:** изатин, изатинсвязывающие белки, депренил, пируваткиназа, ферменты гликолиза, негликолитические функции.

**ВВЕДЕНИЕ.** Пируваткиназа (ПК, КФ 2.7.1.40) – важный регуляторный фермент гликолиза, который катализирует перенос фосфорильной группы с фосфоенолпирувата на ADP в реакции субстратного фосфорилирования:



У млекопитающих обнаружено четыре изоформы фермента, отличающиеся по кинетическим и др. свойствам. ПК мышц представлена М1 изоферментом (М1-ПК) – гетеротетрамером с молекулярной массой 59 кДа [1,2]. Экспрессия М1-ПК обнаружена также и в мозге [2,3].

В последнее время накапливается все больше данных в пользу того, что ряду регуляторных ферментов гликолиза свойственны дополнительные функции, прямо не связанные с участием в данном метаболическом пути. Например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) может специфически взаимодействовать с различными РНК *in vivo* и *in vitro* [4-5] и расщеплять некоторые из них [5]. По мнению ряда авторов, сверхэкспрессия этого фермента и его последующая транслокация в ядро могут иметь важное значение как для развития апоптоза, так и для этиологии некоторых нейродегенеративных

заболеваний [6-7]. По данным опытов *in vitro*, пируваткиназа является фактором дестабилизации микротрубочек [8] и может связываться и с тубулином [9].

Недавно мы показали, что изатин – эндогенный индол, обнаруженный в тканях и биологических жидкостях животных и человека [10-11], – эффективно взаимодействует с ГАФД [12] и другим ферментом цитозоля – глицерофосфатдегидрогеназой [13]. В предварительных экспериментах также обнаружено, что ряд белков цитоскелета связывается с аналогом изатина, иммобилизованным на сефарозе (Бунеева и др., готовится к публикации).

В отношении ГАФД изатин проявлял свойства частичного агониста депренила – селективного ингибитора моноаминоксидазы (МАО) Б, – нейропротекторные свойства которого связывают с торможением ГАФД-зависимых механизмов апоптоза [6, 7, 14, 15].

Целью настоящей работы было изучение возможного взаимодействия ПК с изатином и влияния депренила и АТР на этот процесс.

**МЕТОДИКА.** 5-Аминоизатин был синтезирован и предоставлен B.L. Goodwin (Госпиталь королевы Шарлотты и Челси, Лондон), [ $^3\text{H}$ ]изатин (26 Ки/ммоль) – “Amersham” (Англия). Пируваткиназу выделяли из мышц кролика по методу Scopes and Stoter [16]. В экспериментах использовали 3 различных препарата ПК. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, препараты ферментов были практически гомогенны и представлены одной полосой. Очищенный фермент хранили в растворе сульфата аммония при +4°C. (-)Депренил и другие реактивы приобретены у “Sigma-Aldrich” (Россия).

Условия иммобилизации 5-аминоизатина на кювете оптического биосенсора IAsys и ход определения изатин-связывающей активности подробно изложены в предыдущих работах [12-13, 17].

Связывание [ $^3\text{H}$ ]изатина с ПК исследовали в 10 мМ Нерес-КОН буфере, pH 7,2, содержащем 200 мМ сахарозу, используя при анализе по методу Скэтчарда диапазон концентраций [ $^3\text{H}$ ]изатина от 10 до 200 нМ [12].

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В координатах Скэтчарда связывание пируваткиназы с [ $^3\text{H}$ ]изатином характеризуется прямой линией (рис. 1), что свидетельствует о существовании однотипных участков связывания этого лиганда на молекуле данного фермента.

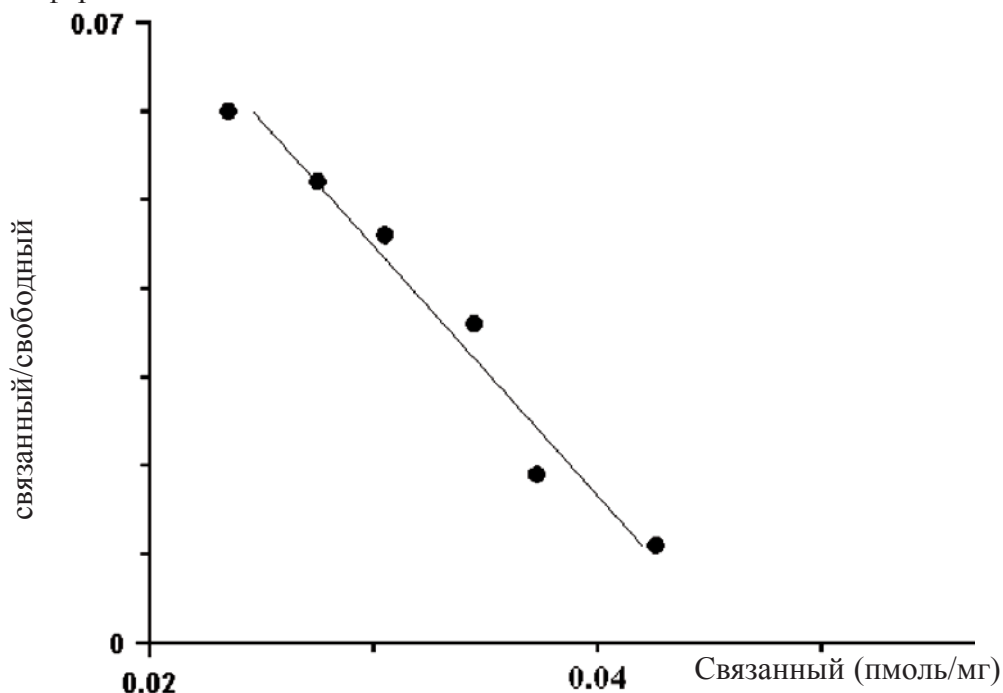


Рисунок 1.

График Скэтчарда для связывания пируваткиназы мышц с [ $^3\text{H}$ ]изатином.

Величина  $K_d \sim 10$  мкМ находится в верхнем диапазоне физиологических концентраций изатина [10, 11, 18]. Для другого фермента данного класса – креатинфосфокиназы (КФ) – специфическое концентрационно-зависимое связывание [ $^3\text{H}$ ]изатина обнаружено не было (данные не приведены).

При использовании концентрации [ $^3\text{H}$ ]изатина (20 нМ), соответствующей нижнему диапазону физиологических концентраций этого регулятора, его связывание с пируваткиной тормозили АТР ( $\text{IC}_{50}$  25 мкМ) (рис. 2) и депренил ( $\text{IC}_{50}$  5 мкМ) (рис. 3).

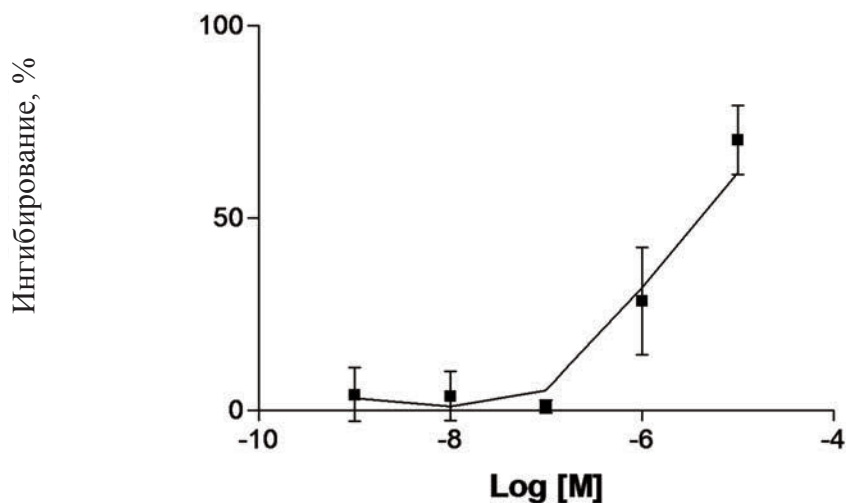


Рисунок 2.

Влияние депренила на связывание пируваткиназы с 10 мкМ [ $^3\text{H}$ ]изатином.

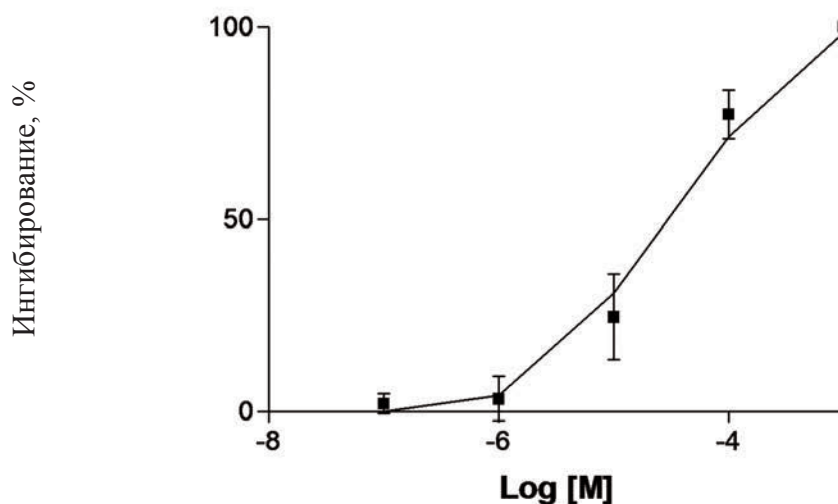


Рисунок 3.

Влияние АТР на связывание пируваткиназы с 10 мкМ [ $^3\text{H}$ ]изатином.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИЗАТИНА И ДЕПРЕНИЛА С ПИРУВАТКИНАЗОЙ

Взаимодействие пируваткиназы с изатином и его ингибирование АТР и депренилом подтверждено в независимых экспериментах с использованием оптического биосенсора и иммобилизованного аналога изатина (аминоизатин) (рис. 4).

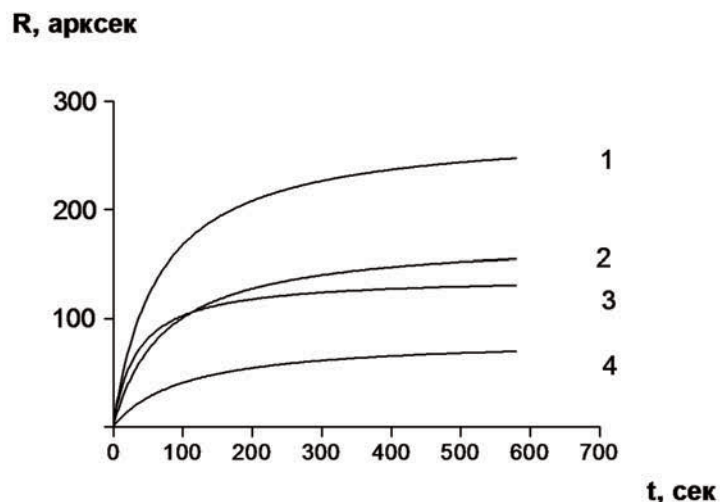


Рисунок 4.

Влияние 0,1 мМ изатина (2), 0,1 мМ депренила (3) и 1 мМ АТР (4) на связывание пируваткиназы мышц кролика с иммобилизованным аналогом изатина (1).

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Изатин (индолдион-2,3) – эндогенный биологический регулятор, обнаруженный V. Glover и M. Sandler в 1988 г. [10, 11, 18]. При введении *in vivo* он обладает широким спектром биологической активности, конкретные механизмы реализации которой все еще нуждаются в детальном изучении. Неравномерное распределение эндогенного изатина и изатин-связывающих белков в различных субклеточных фракциях и отделах центральной нервной системы [17-20] свидетельствует о важной, но все еще малоизученной биологической роли этого соединения. На сегодняшний день подробно изучен механизм взаимодействия изатина с моноаминоксидазами (МАО) как *in vitro* [21], включая кристаллы фермента с этим веществом [22, 23], так и *in vivo* [11]. Охарактеризован в общих чертах механизм регуляции изатином *in vivo*, *in situ* и *in vitro* рецепторов натрийуретических пептидов [10, 11, 19, 24-26] и связанных с ними процессов [27-28]. Получены данные о том, что изатин проникает в тромбоциты человека при помощи серотонинового транспортера [29] и, следовательно, может взаимодействовать как с мембранными, так и с растворимыми белками-мишенями. На сегодняшний день выявлено несколько растворимых белков, взаимодействующих с изатином *in vitro* [12, 13, 29]. Значение этого взаимодействия, подтвержденного независимыми методами радиолигандного и биосенсорного анализа, очевидно, не связано с “классическими” функциями этих белков. Так, связывание изатина с ГАФД мало влияет на гликолитическую активность этого фермента, но снижает его РНКазную активность [12]. Это позволяет предположить, что взаимодействие изатина с ГАФД может регулировать клеточные функции этого белка, не связанные с гликолизом и имеющие отношение к процессам нейродегенерации и апоптоза [6, 7]. *In vitro* изатин действует на ГАФД подобно известному нейропротекторному препарату депренилу, что позволяет рассматривать изатин в качестве эндогенного частичного агониста этого фармакологического препарата [12].

В экспериментах с пируваткиназой депренил также тормозил связывание фермента с изатином. Причем его действие проявлялось при более низких концентрациях, чем АТР. Хотя и значение  $K_d$  для [ $^3H$ ]изатина (пируваткиназа - 10 мкМ, ГАФД - 3,1 мкМ [12]), и величины  $IC_{50}$  (пируваткиназа - 5 мкМ, ГАФД - 13 нМ [12]) для торможения этого связывания депренилом были существенно выше в случае пируваткиназы, следует отметить, что они сопоставимы с концентрациями депренила, обнаруженными в плазме крови при однократном введении высоких терапевтических доз этого препарата [30]. Поэтому потенциальная возможность взаимодействия пируваткиназы с изатином и депренилом и АТР *in vivo* будет определяться локальными концентрациями этих лигандов в данный конкретный момент времени.

Становится все более очевидным, что пируваткиназа является не “просто” регуляторным ферментом гликолиза. Пируваткиназа служит фактором регуляции белков цитоскелета [8, 9], устойчивости глиальных клеток к гипоксии [31]. Вполне возможно, что взаимодействие этого фермента с изатином и нейропротекторным препаратом депренилом также отражает важные ранее неизвестные функции этого гликолитического фермента.

Авторы признательны Н.Г. Пановой за участие в начальном этапе данной работы.

Данная работа осуществлена при финансовой поддержке The Wellcome Trust (072381/Z/03) и РФФИ (N 00-04-48244 и 06-04-48355).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kayne F.J., Price N.C. (1973) Arch. Biochem. Biophys., **159**, 292-296.
2. Tsutsumi H., Tani K., Fujii H., Miwa S. (1988) Genomics., **2**, 86-89.
3. Yamada K., Noguchi T. (1999) Biochem. J., **337**, 1-11.
4. Nagy E., Rigby W.F. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 2755-2763.
5. Evguenieva-Hackenberg E., Schiltz E., Klug G. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 46145-46150.
6. Tatton W., Chalmers-Redman R., Tatton N. (2003) J. Neural Transm., **110**, 509-515.
7. Berry M.D. (2004) J. Psychiatry Neurosci., **29**, 337-345.
8. Vértessy B.G., Bánkfalvi D., Kovács J., Löw P., Lehotzky A., Ovádi J. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **254**, 420-435.
9. Kovács J., Löw P., Pacz A., Horvath I., Olah J., Ovádi J. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 7126-7130.
10. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) Stress, **8**(3), 175-183.
11. Medvedev A.E., Glover V. (2004) Neurotoxicology, **25**, 185-192.
12. Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Fedchenko V., Medvedeva M., Ivanov Yu., Glover V., Sandler M. (2006) J. Neural Transm. 2006, Suppl.
13. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Панова Н.Г., Медведева М.В., Иванов Ю.Д., Медведев А.Е. (2003) Биомед. химия, **49**, 627-631.
14. Carlile G.W., Chalmers-Redman R.M.E., Tatton N.A., Pong A., Borden K.L.B., Tatton W.G. (2000) Mol. Pharmacol., **57**, 2-12.
15. Kragten E., Lalande I., Zimmermann K., Roggo S., Schindler P., Muller D., van Oostrum J., Waldmeier P., Furst P. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 5821-5828.
16. Scopes R.K., Stoter A. (1982) Methods Enzymol., **90** (Pt E), 479-490.
17. 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.
18. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) Biochem. Pharmacol., **52**, 385-391.

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИЗАТИНА И ДЕПРЕНИЛА С ПИРУВАТКИНАЗОЙ

19. *Medvedev A., Crumeyrolle-Arias M., Cardona A., Sandler M., Glover V.* (2005) *Brain Res.*, **1042**, 119–124
20. *Crumeyrolle-Arias M., Medvedev A., Cardona A., Barritault D., Glover V.* (2003) *J. Neurochem.*, **84**, 618–620.
21. *Veselovsky A.V., Ivanov A.S., Medvedev A.E.* (2004) *Neurotoxicology*, **25**, 37–46.
22. *Hubalek F., Binda C., Khalil A., Li M., Mattevi A., Castagnoli N., Edmondson D.E.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 15761–15766.
23. *Binda C., Li M., Hubalek F., Restelli N., Edmondson D.E., Mattevi A.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9750–9755.
24. *Medvedev A.E., Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Tsvetkova T.A., Sandler M., Glover V.* (2001) *Life Sci.*, **69**, 1783–1790.
25. *Telegdy G., Adamik A., Glover V.* (2000) *Brain Res. Bull.*, **53**, 367–370.
26. *Pataki I., Adamik A., Telegdy G.* (2000) *Peptides*, **21**, 373–377.
27. *Lonardo G., Cerbai E., Casini S., Giunti G., Bonacchi M., Battaglia F., Fiorani B., Stefano P.L., Sani G., Mugelli A.* (2004) *Cardiovasc. Res.*, **63**, 528–536.
28. *Potter D.E., Russell K.R., Manhiani M.* (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 548–553.
29. *Medvedev A., Byssygina O., Pyatakova N., Glover V., Severina I.S.* (2002) *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 763–766.
30. *Melega W.P., Cho A.K., Schmitz D., Kuczenski R., Segal D.S.* (1999) *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **288**, 752–758.
31. *Shimizu T., Uehara T., Nomura Y.* (2004) *J. Neurochem.*, **91**, 167–175.

Поступила: 28. 04. 2006.

## INTERACTION OF PYRUVATE KINASE WITH ISATIN AND DEPRENYL

*O.A. Buneeva<sup>1</sup>, O.V. Gnedenko<sup>1</sup>, M.V. Medvedeva<sup>2</sup>, Yu.D. Ivanov<sup>1</sup>, V. Glover<sup>3</sup>, A.E. Medvedev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, Russia; fax: 7-495-245-0857; e-mail: Olga.Buneeva@ibmc.msk.ru

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

<sup>3</sup>Imperial College London, IRDB, Hammersmith Campus, Du Cane Road, London, W12 0NN, UK

The glycolytic enzyme, pyruvate kinase, exhibits moderate affinity [<sup>3</sup>H]isatin binding ( $K_D \sim 10 \mu\text{M}$ ), which is inhibited by ATP ( $\text{IC}_{50} 25 \mu\text{M}$ ) and deprenyl ( $\text{IC}_{50} 5 \mu\text{M}$ ). Interaction of pyruvate kinase with isatin and its inhibition by ATP and deprenyl has also been confirmed using an independent biosensor technique and immobilized isatin analogue, aminoisatin. This effect has some specificity because the enzyme, creatine phosphokinase, does not exhibit specific isatin-binding. It is suggested that interaction of pyruvate kinase with isatin may reflect some non-glycolytic functions of this enzyme.

**Key words:** isatin, deprenyl, isatin-binding proteins, pyruvate kinase, non-glycolytic functions.