УДК 577.174.5
©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЭНДОГЕННЫМ НЕЙРОПРОТЕКТОРОМ ИЗАТИНОМ

О.А. Бунеева[1], О.В. Гнеденко[1], М.В. Медведева[2], А.С. Иванов[1], А.Е. Медведев[1]*

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул. 10; эл. почта: professor57@yandex.ru
[2]МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (ГАФД) – классическому редокс-чувствительному ферменту гликолиза – свойственны различные негликолитические функции, которые считаются особенно важными для прогрессии ряда нейродегенеративных заболеваний. ГАФД связывает изатин (индол-дион-2,3) - эндогенный индол, часто используемый в качестве важного структурного элемента в многочисленных органических соединениях, проявляющих разнообразные фармакологические (в том числе нейропротекторные) активности. В данном исследовании мы изучали особенности связывания интактной и мягко окисленной ГАФД с иммобилизованным изатином, которые анализировали при помощи технологии поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance; SPR). Мягкое окисление ГАФД 70 мкМ H_2O_2 увеличивало диссоциацию комплекса ГАФД-изатин. Поскольку ГАФД рассматривается в качестве потенциальной мишени для различных нейропротекторов, это свидетельствует в пользу того, что редокс состояние этого белка определяет его чувствительность к нейропротекторам, а окислительный стресс, характерный для различных нейродегенеративных расстройств, может значительно уменьшить фармакологическую эффективность таких соединений.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, изатин, лиганд-рецепторные взаимодействия, поверхностный плазмонный резонанс, оптический биосенсор

DOI: 10.18097/PBMC20166202160

ВВЕДЕНИЕ

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД; КФ 1.2.1.12) – классический фермент гликолиза – привлекает внимание исследователей как белок, которому свойственны различные (пато)биологические активности (см. обзоры [1, 2]) и который является потенциально привлекательной мишенью нейропротекторных лекарственных препаратов [3-5].

В недавно проведённых протеомных исследованиях [6, 7] ГАФД была обнаружена среди белков мозга, специфически связывающихся с изатином (индол-дионом-2,3) – эндогенным индолом, обладающим широким спектром биологических и фармакологических активностей (см. обзоры [8-11]). Изатин часто используется в качестве важного структурного элемента в многочисленных органических соединениях, проявляющих разнообразные фармакологические (в том числе нейропротекторные) активности, такие как ингибирование апоптоза [12, 13] и антиконвульсантное действие [11]. Некоторые аналоги изатина представляют определенный интерес в качестве потенциальных препаратов для лечения таких заболеваний центральной нервной системы, как болезнь Паркинсона и старческая деменция [12]. Всё это свидетельствует о том, что взаимодействие изатин-связывающих белков с цитоскелетом и склонными к агрегации белками может иметь важное значение в плане развития нейродегенеративных расстройств [7]. С учётом известной изатин-связывающей активности [6, 7], ГАФД представляет собой удобную модель для анализа такого рода взаимодействий с изатином.

В данной работе мы исследовали связывание интактной и мягко окисленной ГАФД с иммобилизованным изатином при помощи оптического биосенсора, работающего по принципу поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance; SPR).

Результаты этого исследования свидетельствуют о том, что редокс состояние ГАФД определяет чувствительность этого белка к нейропротекторным препаратам, а окислительный стресс, характерный для различных нейродегенеративных расстройств, может значительно уменьшить фармакологическую эффективность таких соединений.

МЕТОДИКА

Реактивы и оборудование

HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергент P20, 10 мМ HEPES (pH 7,4)); набор реагентов для ковалентной иммобилизации лиганда за аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl, N-гидроксисукцинимид, 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5)) были получены от “GE Healthcare” (США).

5-Аминоизатин был синтезирован при помощи стандартных методов [14]. Препарат ГАФД, выделенный из мышц кролика, как описано в [15], был электрофоретически гомогенен и обладал удельной

* - адресат для переписки

активностью 110-140 мкмоль/мин на 1 мг белка. Выделенный фермент хранили в суспензии в сульфате аммония (насыщение 0,9) при 4°C не более двух недель с момента выделения. Остальные реактивы были получены от "Sigma-Aldrich" (США).

Мягкое окисление ГАФД осуществляли, как описано Schmalhausen и соавторами [16], инкубируя ферментный препарат с 70 мкМ H_2O_2 в течение 30 мин при 20°C в 50 мМ калий фосфатном буфере (pH 7,4). Активность ГАФД измеряли спектрофотометрически при 340 нм по скорости образования NADH в реакции NAD^+-зависимого окисления глицеральдегид-3-фосфата [16].

Исследование взаимодействия ГАФД с аналогом изатина, иммобилизованным на карбоксиметилдекстрановой поверхности оптического чипа

Взаимодействие ГАФД с иммобилизованным 5-аминоизатином исследовали, используя оптические SPR-биосенсоры Biacore 3000 и Biacore T100 ("GE Healthcare") и программное обеспечение работы прибора Biacore Control ("GE Healthcare"). Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 ("GE Healthcare"), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана. Молекулярные взаимодействия регистрировали в виде сенсограмм, представляющих зависимость сигнала биосенсора (в резонансных ед. RU) от времени. Взаимодействия оценивали, вычитая значение сигнала контрольного канала (не содержащего иммобилизованный аналог изатина) из данных, полученных с использованием канала с иммобилизованным 5-аминоизатином. Ковалентную иммобилизацию 5-аминоизатина на поверхности оптического чипа (рис. 1) проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [7].

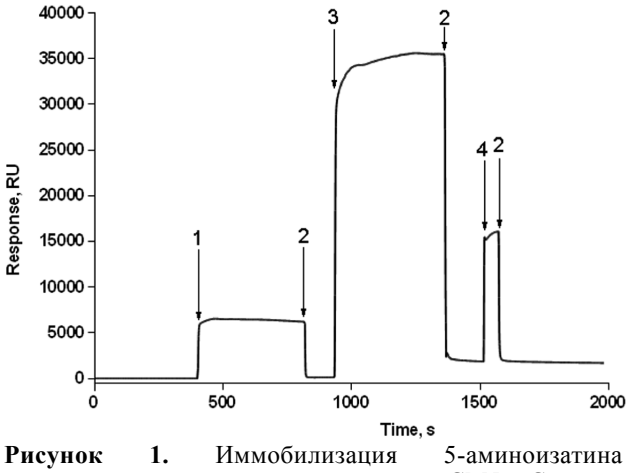

Рисунок 1. Иммобилизация 5-аминоизатина на поверхности оптического чипа CM5. Стрелки показывают инжекцию: 1 - EDC/NHS; 2 - HBS-EP; 3 - 31 мМ 5-аминоизатина в 20 мМ натрий боратном буфере, pH 8,5, содержащем 28% DMSO; 4 - 1 М этаноламин, pH 8,5.

Взаимодействие ГАФД с иммобилизованным изатином исследовали, инжектируя различные концентрации нативной или окисленной ГАФД, растворенной в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,4 (рабочий буфер), при скорости потока 5 мкл/мин в течение 5 мин. Перед повторным использованием поверхность чипа регенерировали промывкой 6 М гуанидинхлоридом в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин.

Полученные результаты анализировали с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 ("GE Healthcare"). Равновесную константу диссоциации ($K_D = 1/K_A$) рассчитывали в рамках одноцентровой модели связывания согласно уравнению (1):

$$R_{eq} = (R_{max} \times C \times K_A)/(1 + C \times K_A), \qquad (1)$$

где R_{max} – максимальный регистрируемый сигнал биосенсора, C – концентрация ГАФД, Req – равновесный сигнал биосенсора при данной концентрации белка, K_A – равновесная константа ассоциации.

Статистическую значимость различий оценивали, используя критерий Стьюдента t для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инжекция препарата очищенной ГАФД в канал оптического биосенсора с иммобилизованным 5-аминоизатином приводила к появлению чёткого сигнала биосенсора, который зависел от концентрации добавленного белка (рис. 2).

В соответствии с данными предыдущих исследований [16] окисление ГАФД 70 мкМ H_2O_2 приводило к резкому снижению каталитической активности этого фермента (со 110 мкмоль/мин на 1 мг белка до 6,4 мкмоль/мин на 1 мг белка). Окисление ГАФД приводило также к увеличению K_D комплекса этого белка с иммобилизованным аналогом изатина с 2,2±0,62 мкМ до 8,9±1,9 мкМ (n=5) ($p<0,01$). Последнее свидетельствует о том, что окисление ГАФД снижает не только каталитическую активность этого фермента, но и его сродство к изатину.

Окисленная ГАФД обнаружена в различных структурах мозга больных с болезнью Альцгеймера (см., например, [17]), а окислительная модификация этого и других ферментов рассматривается в качестве важного фактора, провоцирующего нарушения энергетического обмена в мозге. Хотя для выяснения последствий сниженного сродства ГАФД к (потенциальным) нейропротекторным препаратам необходимы дальнейшие исследования, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что изатин является частичным агонистом известного нейропротектора депренила [3], который связывается с ГАФД и препятствует транслокации этого белка в ядро и развитию апоптоза [18, 19].

В этом контексте снижение связывания нейропротекторной молекулы (изатина) с окисленной ГАФД не сможет препятствовать транслокации этого белка в ядро и индукции апоптоза. Однако это предположение нуждается в прямой экспериментальной проверке.

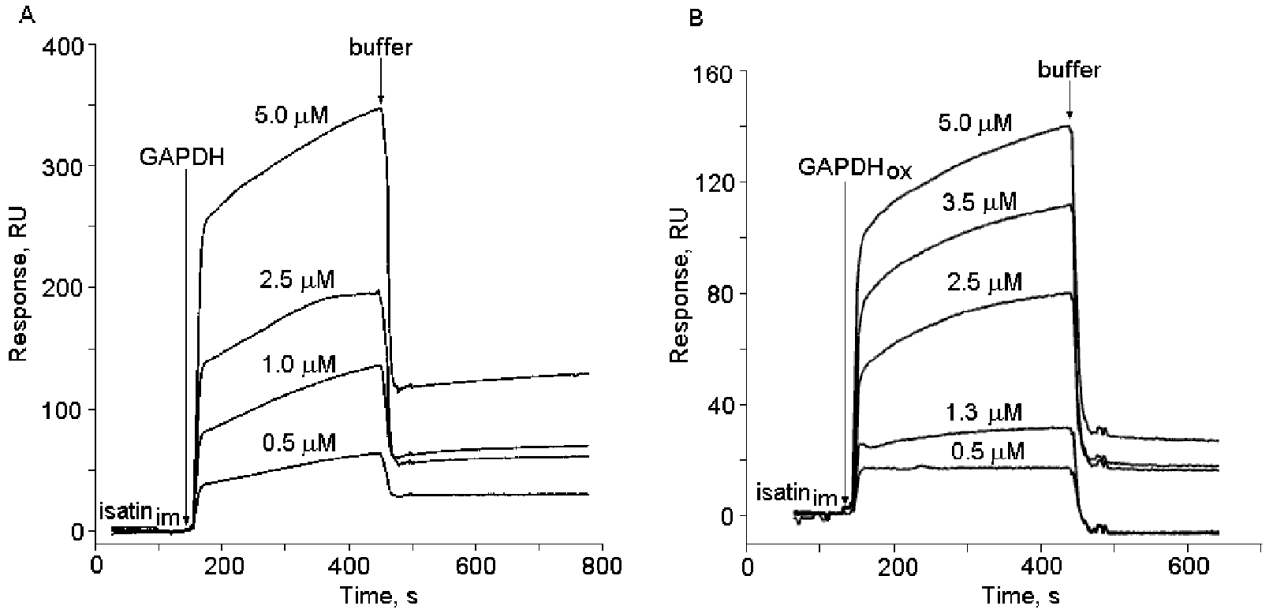

Рисунок 2. Типичные сенсограммы связывания нативной (A) и окисленной (B) ГАФД с иммобилизованным 5-аминоизатином.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 г.г. и частично поддержана грантом РФФИ №12-04-005942-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Chuang D.M., Hough C., Senatorov V.V.* (2005)Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **45**, 269-290.
2. *Butterfield D.A., Hardas S.S., Bader Lange M.L.* (2010) J. Alzheimers Dis., **20**, 369-393.
3. *Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Fedchenko V., Medvedeva M., Ivanov Yu., Glover V., Sandler M.* (2006) J. Neural. Transm., **Suppl. 71**, 195-203.
4. *Ishitani R., Tajima H., Takata H., Tsuchiya K., Kuwae T., Yamada M., Takahashi H., Tatton N.A., Katsube N.* (2003) Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, **27**, 291-301.
5. *Tatton W., Chalmers-Redman R., Tatton N.* (2003) J. Neural Transm., **110**, 509-515.
6. *Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M-C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A.* (2009) J. Neurosci. Res., **87**, 2763-2772.
7. *Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A. Medvedev A., Archakov A.* (2010) Proteomics, **10**, 23-37.
8. *Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V.* (1996) Biochem. Pharmacol., **52**, 385-391.
9. *Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V.* (2005) Stress, **8**, 175-183.
10. *Medvedev A., Buneeva O., Glover V.* (2007) Biologics, **1**, 151-162.
11. *Pandeya S.N., Smitha S., Jyoti M., Sridhar S.K.* (2005) Acta Pharm., **55**, 27-46.
12. *Lee D., Long S.A., Murray J.H., Adams J.L., Nuttall M.E., Nadeau D.P., Kikly K., Winkler J.D., Sung C-M., Ryan M.D., Levy M.A., Keller P.M., De Wolf W.E. Jr.*, (2001) J. Med. Chem., **44**, 2015-2026.
13. *Chapman J.G., Magee W.P., Stukenbrok H.A., Beckius G.E., Milici A.J., Tracey W.R.* (2002) Eur. J. Pharmacol., **456**, 59-68.
14. *Medvedev A.E., Goodwin D.L., Sandler M., Glover V.* (1999) Biochem. Pharmacol., **57**, 913-915.
15. *Scopes R.K., Stoter A.* (1982) Methods Enzymol., **90**, (Pt E), 479-490.
16. *Schmalhausen E.V., Nagradova N.K., Boschi-Muller S., Branlant G., Muronetz V.I.* (1999) FEBS Lett., **452**, 219-222.
17. *Sultana R., Butterfield D.A.* (2013) J. Alzheimers Dis., **33**, S243–S251
18. *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.
19. *Kusner L.L., Sarthy V.P., Mohr S.* (2004) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **45**, 1553-1561.

Поступила: 14. 11. 2014.
Принята к печати: 20. 01. 2015.

OXIDATIVE MODIFICATION OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE INFLUENCES ITS INTERACTION WITH ENDOGENOUS NEUROPROTECTOR ISATIN

O.A. Buneeva[1], O.V. Gnedenko[1], M.V. Medvedeva[2], A.S. Ivanov[1], A.E. Medvedev[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: professor57@yandex.ru
[2]Moscow State University, Moscow, Russia

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a classical glycolytic redox sensitive enzyme, exhibits various non-glycolytic functions, which are considered to be especially important for progression of various neurodegenerative diseases. GAPDH binds isatin (indole-dione-2,3), an endogenous indole often used as a parent component in numerous derivatives demonstrating diverse pharmacological (including neuroprotector) activities. In this study we have investigated binding of intact and mildly oxidized GAPDH to immobilized isatin, using an optical biosensor technique, employing surface plasmon resonance (SPR), and the effect of isatin as a probe for this binding. Mild GAPDH oxidation by 70 μM H_2O_2 increased enzyme dissociation from immobilized isatin. Since GAPDH is considered as a putative target for various neuroprotector agents, this suggests that its redox state determines sensitivity to neuroprotective agents, and oxidative stress typical for various neurodegenerative disorders may significantly reduce pharmacological effectiveness of such compounds.

Key words: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isatin, ligand-protein interaction, surface plasmon resonance optical biosensor