

УДК 577.616.038

Н. Л. Федорко, ст. викл., С. А. Петров, д-р біол. наук, проф.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна e-mail: nfedorko@mail.ru

ВЗАЄМОДІЯ КОФЕРМЕНТІВ 2-ОКСОГЛУТАРАТДЕГІДРОГЕНАЗИ НА РІВНІ МУЛЬТИЕНЗИМНОГО КОМПЛЕКСУ ТА В МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ

Досліджено механізми коферментної регуляції мультиензимного 2-оксоглютаратдегідрогеназного комплексу. Показана стимулююча роль ліпоевої кислоти і КоА на досліджуваній фермент у мітохондріях печінки. На рівні очищеного ферменту визначено різке стимулювання його активності в присутності п'яти функціонально пов'язаних коферментів.

Отримані дані можуть слугувати доказом існування реконструкції комплексу з коферментів та апоферментів.

Ключові слова: 2-оксоглютаратдегідрогеназа, коферменти, мітохондрії, мультиензимний комплекс.

Будова і механізм дії дегідрогеназ 2-оксокислот вивчалися багатьма дослідниками, але питання, які стосуються регуляції активності, біосинтезу і реконструкції цих ферментів, залишаються відкритими. Серед різноманітних механізмів регуляції активності поліферментних комплексів особливу увагу надають вітамінно-коферментній регуляції. На кафедрі біохімії Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова в ряді досліджень [1—6] була показана стимуляція активності піруватдегідрогеназного (КФ 1.2.4.1) і 2-оксоглютаратдегідрогеназного (КФ 1.2.4.2) комплексів на рівні тканин і мітохондрій після парентерального введення функціонально пов'язаних вітамінів, а також після внесення відповідних коферментів в інкубаційне середовище.

Результати експериментів дозволили сформулювати гіпотезу про біосинтез субодиниць поліферментних ансамблів дегідрогеназ 2-оксокислот на рибосомах та їх реконструкцію на мітохондріальних мембранах за участю п'яти коферментів: ТПФ, НАД, ФАД, ліпоевої кислоти і КоА [5]. Цей процес, спряжений з особливостями транспорту і метаболізму коферментних вітамінів, залежить від енергетичного обміну і від специфіки самої тканини.

В зв'язку з цим ми поставили завдання вивчити активність 2-оксоглютаратдегідрогенази в мітохондріях печінки щурів, а також на рівні частково очищеного ферменту за наявності *in vitro* окремих функціонально пов'язаних коферментів та їх суміші, збалансованій в "2-оксоглютаратдегідрогеназному" співвідношенні.

Матеріали і методи

Дослідження виконано на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар вагою 180—200 г. Мітохондрії печінки виділяли за методом Джонсона і Ларді [9], після цього їх ресуспендували в 0,25 М сахарозі з доданням ізотонічного розчину калій фосфатного буфера із розрахунку: мітохондрії з 1 г тканини — в 4 мл. Вміст проб використовували для визначення білка методом Лоурі [10]. 0,4 мл суспензії вносили в інкубаційне середовище Габлера [11], що містило коферменти. Їх мілімолярні співвідношення в суміші були такими: ТПФ — 0,015, НАД⁺ — 0,6, КоА — 0,375, ліпоева кислота (ЛК) — 0,225, ФМН — 0,075.

Інша група тварин була поділена на дві підгрупи: першій вводили ¹⁴С-тіамін у дозі 1,5 мкмоль/кг, другій — ¹⁴С-тіамін разом з функціонально пов'язаними вітамінами. Співвідношення вітамінів у введених тваринам суміші в мкмоль/кг були такими: тіамін — 1,5, ФМН — 7,5, пантотенат-Са — 37,5, ЛК — 22,5, нікотинамід (НА) — 60. Підрахування радіоактивності здійснювали на радіаційному лічильнику "Протока" загальноприйнятим методом.

Активність ферменту виражали у мікромольх відновленого ферриціаніду на мітохондрії з 1 г тканини за 30 хв інкубації.

Виділення і очищення 2-оксоглутаратдегідрогенази провадили за методом Роше і Кейт [12]. Активність очищеного ферменту визначали тестом Варбурга [13], додаючи в середовище інкубації окремі коферменти, їх попарні поєднання та суміш всіх коферментів.

Результати досліджень

При доданні *in vitro* до мітохондрій окремих коферментів і їх суміші в співвідношенні, що характерне для дегідрогеназ 2-оксокислот, ми визначили, що виражений стимулюючий ефект на 2-оксоглутаратдегідрогеназний комплекс (2-ОГДК) спостерігався при доданні КоА і ЛК — на 77 % та 23 % відповідно, а суміш коферментів збільшувала активність ферменту майже в 2 рази. ТПФ, НАД і ФМН не впливали на 2-оксоглутаратдегідрогеназну активність в мітохондріях печінки, що, очевидно, можна пояснити досить міцним зв'язком цих коферментів з відповідними апоферментами, а також їх високим вмістом у мітохондріях. Необхідно зазначити, що як 2-ОГДК, так і ПДК потребують для реконструкції та реалізації дії однакових коферментів, а також мають дуже подібні апоферменти, що передбачає факт конкуренції коферментів на окремих стадіях окиснення 2-оксокислот (рис. 1).

За виділення ферментного комплексу із мітохондрій визначали його активність та вміст у ньому мічених метаболітів тіаміну на окремих етапах очистки. Активність 2-ОГДК після введення тваринам ¹⁴С-тіаміну збільшувалася по мірі його очищення: у субкомплексі (ПДК + 2-ОГДК) — на 210 %, а в очищеному 2-ОГДК — на 328 % у порівнянні з мітохондріальною фракцією (рис. 2).

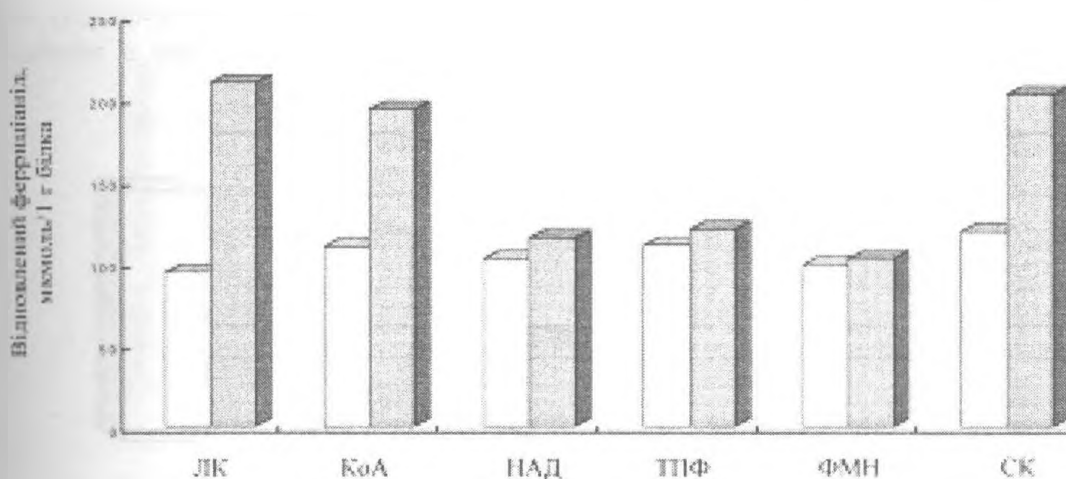


Рис. 1. Окиснення α -кетоглутарату мітохондріями з 1 г печінки статевозрілих щурів за наявності коферментів *in vitro*:

ЛК — ліпоєва кислота, СК — суміш коферментів, □ — контроль, ■ — дослід

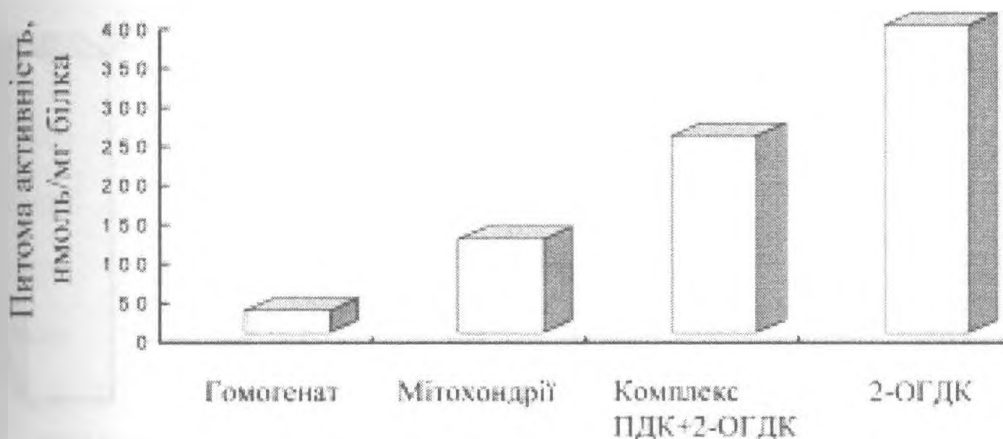


Рис. 2. Активність 2-ОГДК після внутрішньом'язового введення щурам ^{14}C -тіаміну в дозі 1,5 мкмоль/кг

Встановлено синхронне збільшення вмісту мічених метаболітів тіаміну в розрахунку на 1 мг білка по мірі очищення ферментного комплексу. Так, у субкомплексі (ПДК + 2-ОГДК) вміст мічених метаболітів тіаміну був на 208 %, а в очищеному 2-ОГДК — на 250 % більшим у порівнянні з мітохондріальною фракцією (рис. 3).

Після введення другій групі тварин ^{14}C -тіаміну сумісно з функціонально пов'язаними вітамінами ми також констатували збільшення активності 2-ОГДК в процесі виділення ферментного комплексу. В субкомплексі (ПДК + 2-ОГДК) і в очищеному 2-ОГДК активність була вищою на 209 % і 257 % відповідно порівняно з мітохондріальною фракцією (рис. 4). Сумарний вміст мічених метаболітів тіаміну

при цьому також збільшувався: у субкомплексі (ПДК + 2-ОГДК) — на 166 %, а в очищеному 2-ОГДК — на 222 % порівняно з мітохондріальною фракцією (рис. 5).

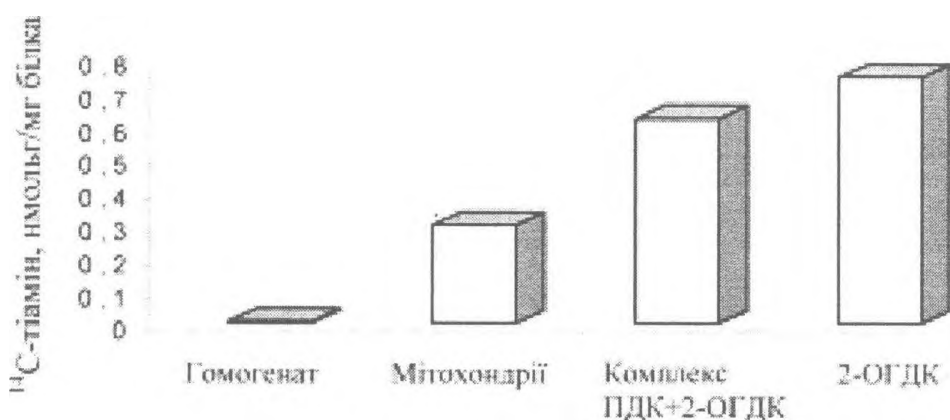


Рис. 3. Вміст мічених метаболітів тіаміну в мітохондріях та частково очищеному 2-ОГДК після внутрішньом'язового введення щурам ^{14}C -тіаміну в дозі 1,5 мкмоль/кг



Рис. 4. Активність 2-ОГДК після внутрішньом'язового введення щурам ^{14}C -тіаміну сумісно з функціонально пов'язаними вітамінами

Таким чином, дані цього експерименту відзеркалюють факт зростання питомої активності 2-оксоглутаратдегідрогенази паралельно зі збільшенням вмісту суми мічених метаболітів тіаміну по мірі виділення і очищення ферментного комплексу як після введення міченого тіаміну окремо, так і після сумісного його введення з функціонально пов'язаними вітамінами.

Важливо зазначити, що за введення ^{14}C -тіаміну сумісно з функціонально пов'язаними вітамінами як вміст мітки, так і рівень 2-оксоглутаратдегідрогеназної активності по мірі очищення ферменту зростали більш помітно, ніж у випадку введення одного ^{14}C -тіаміну.



Рис. 5. Вміст мічених метаболітів тіаміну в мітохондріях , а також в частково очищеному 2-ОГДК після внутрішньом'язового введення щурам ¹⁴C-тіаміну сумісно з функціонально пов'язаними вітамінами

Було з'ясовано вплив кожного з досліджуваних коферментів на активність очищеного 2-ОГДК (рис. 6).

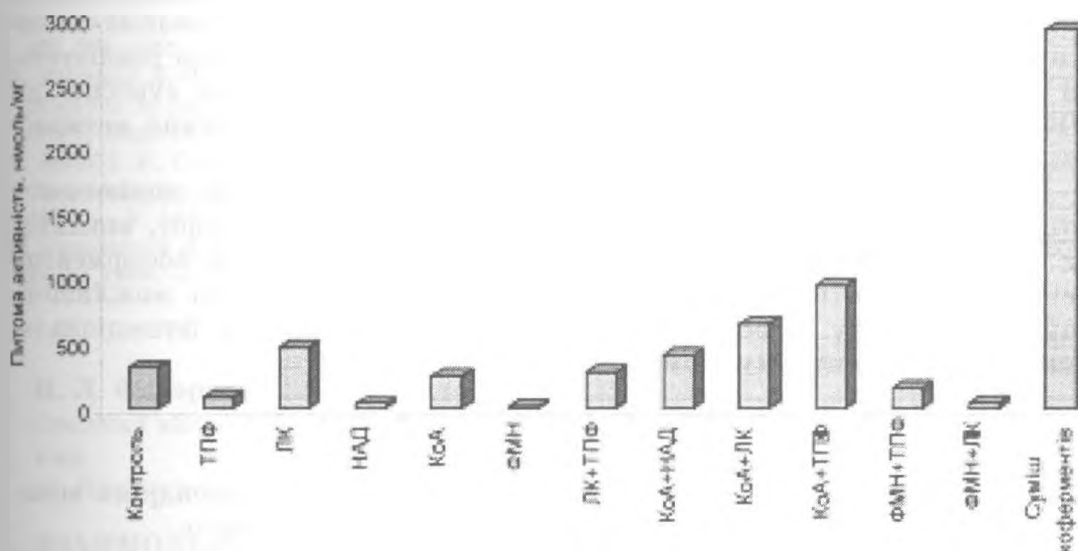


Рис. 6. Активність 2-ОГДК, виділеного з печінки дорослих щурів, після додання коферментів, окремих їх поєднань та загальної суміші *in vitro*

Додання *in vitro* окремих коферментів у середовище інкубації призводило до помітного збільшення ферментативної активності тільки у випадку ЛК (на 150 %), а ТПФ, НАД і ФМН навіть пригнічували активність ферменту.

При доданні в середовище інкубації коферментів попарно у різних варіантах найбільш ефективними комбінаціями були: КоА+ТПФ, КоА+ЛК, КоА+НАД. В цих випадках збільшення активності ферменту відносно контролю відповідно складало: 304 %, 208 % і 130 %.

Поєднання ФМН з ТПФ та ФМН з ЛК пригнічували активність ферменту на 52 % і 11 % відповідно.

Суміш коферментів, доданих у співвідношенні, властивому для дегідрогеназ 2-оксокислот, збільшувала активність 2-ОГДК більш ніж у 10 разів.

Отримані дані відзеркалюють, на наш погляд, різноспрямованість дії окремих коферментів на активність очищеного ферментного комплексу і можуть свідчити про часткову втрату окремих коферментів по ходу виділення ферментного комплексу. Інші коферменти — такі як ТПФ, НАД, ФАД — міцно зв'язані з субодиницями ферментного комплексу і додаткове додання їх до комплексу може призводити до дисбалансу коферментної регуляції і в результаті до зниження активності 2-ОГДК.

Особливої уваги заслуговує ЛК, додання якої у середовище стимулює активність ферменту. Останнє не можна пояснювати лише компенсацією можливих втрат коферменту за виділення ферментного комплексу. Більш істотним є те, що специфічне розташування ЛК у комплексі є надзвичайно важливим для функціонування трансцетилазного і ліпоїлдегідрогеназного компонентів. При цьому ЛК відіграє ключову роль у коферментному типі регулювання досліджуваного мультиензимного комплексу. Очевидно, ця роль реалізується на рівні трансцетилазного компоненту, оскільки за сумісної дії ЛК і КоА спостерігається більш виразний ефект збільшення активності ферментного комплексу.

Суміш всіх функціонально пов'язаних коферментів, що додаються у співвідношеннях, характерних для дегідрогеназ 2-оксокислот, викликала найбільший ефект. Цей факт свідчить не тільки про коферментну регуляцію мультиензимного комплексу, але й вказує на можливість сприяння з боку коферментів реасоціації субодиниць у функціональному поліферментному комплексі.

Висновки:

1. Стимулюючий ефект на активність 2-ОГДК у мітохондріях виявляли КоА, ЛК та суміш досліджуваних коферментів.
2. На рівні частково очищеного 2-ОГДК виявляється багатократний стимулюючий ефект суміші коферментів і менш істотне стимулювання за наявності у середовищі ЛК та двохкомпонентних добавок, що містять ЛК чи КоА.
3. Отримані дані свідчать про існування феномену реконструкції мультиензимного 2-ОГДК та про участь у цьому процесі функціонально пов'язаних коферментів.

Література

1. Дьяченко Л. Ф. Онтогенетические особенности окисления пирувата митохондриями при витаминной и субстратно-гормональной индукции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Одесский государственный университет им. И. И. Мечникова. — Одесса, 1968. — 21 с.
2. Новикова З. Ф. Влияние функционально связанных витаминов на динамику окисления α -кетокислот митохондриями печени крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Одесский государственный университет им. И. И. Мечникова. — Одесса, 1972. — 19 с.
3. Петров С. А. Особенности взаимодействия функционально связанных витаминов в организме мидий, кефали и крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Белорусский государственный университет. — Минск, 1979. — 23 с.
4. Ву Ван Ань. Взаимодействие коферментных пируватдегидрогеназе витаминов в животном организме: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Одесский государственный университет им. И. И. Мечникова. — Одесса, 1971. — 22 с.
5. Розанов А. Я. Локалізація біосинтезу субодиниць дегідрогеназ α -кетокислот у гепатоцитах та перерозподіл їх з коферментами в мітохондріях // V Укр. біохім. з'їзд (м. Івано-Франківськ, вересень 1987). — Київ, 1987. — С. 135.
6. Карпов Л. М., Полеся Т. Л. Действие функционально связанных витаминов и их коферментных форм на активность дегидрогеназ 2-оксокислот в органах мышей // Укр. биохим. журн. — 1989. — Т. 61, № 4. — С. 82—87.
7. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex / Bowker-Kinley M. M., Davis W. I., Wu P. et al. // *Biochem. J.* — 1998. — V. 329, № 1. — P. 191—196.
8. Formation of functional heterodimers by isozymes 1 and 2 of pyruvate dehydrogenase kinase / Bulatnikov I., Popov K. M. // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2003. — V. 1645, № 2. — P. 183—192.
9. Jonson D., Lardy H. *Methods in enzymology* // New York. — 1967. — V. 10. — P. 94—102.
10. Lowry O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J. Biol. Chem.* — 1951, 265, 1951.
11. Kiessling K.-H., Lundquist C. G. Thiamin diphosphate in growing tissues. III. Pyruvate oxidation in liver mitochondria from young and from thiamin diphosphate deficient adult rats // *Experim. Cell. Res.* — 1962. — V. 26, № 1. — P. 189—197.
12. Roche I. E., Cate R. J. Purification of porcine liver pyruvate dehydrogenase complex and characterization of its catalytic and regulatory properties // *Arch. of Biochem. and Biophys.* — 1977. — V. 183. — P. 664—667.
13. Покровский А. А., Арчаков А. И. // *Современные методы в биохимии.* — М.: Медицина. — 1968. — С. 5.

Н. Л. Федорко, С. А. Петров

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОФЕРМЕНТОВ 2-ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА УРОВНЕ МУЛЬТИЭНЗИМНОГО КОМПЛЕКСА И В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

Резюме

В работе исследованы механизмы коферментной регуляции мультиэнзимного 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса. Показана стимулирующая роль липоевой кислоты и КоА на исследуемый фермент в митохондриях печени. На уровне

очищенного фермента установлено резкое стимулирование его активности в присутствии пяти функционально связанных коферментов.

Полученные данные могут служить свидетельством существования феномена реконструкции комплекса из коферментов и апоферментов.

Ключевые слова: 2-оксоглутаратдегидрогеназа, коферменты, митохондрии, мультиэнзимный комплекс.

N. L. Fedorko, S. A. Petrov

Odessa Mechnikov National University, Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya st., 2, 65026, Odessa, Ukraine

2-OXOGLUTARATE COENZYMES INTERACTION ON THE MULTIENZYME COMPLEX LEVEL AND IN THE LIVER MITOCHONDRIA

Summary

2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex regulation mechanisms have been studied. The lipoic acid and the CoA stimulation role on the studied enzyme in the liver mitochondria was shown. The strong activity stimulation of enzyme in the presence of five functionally bounded coenzymes was established.

The obtained data may be the evidence of the complex reconstruction phenomenon from the coenzymes and the apoenzyme proteins.

Keywords: 2-oxoglutarate dehydrogenase, coenzymes, mitochondria, multienzyme complex.