

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НАДФ-ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫСЫ

© 2001 г. Т.И. Рахманова, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов, А.В. Семенихина, Л.В. Матасова

Воронежский государственный университет

Путем очистки с помощью дифференциального центрифугирования, гель-фильтрации на сефадексе G-25, ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-хроматографии на сефадексе G-150 получен ферментный препарат митохондриальной НАДФ-ИДГ с удельной активностью 16,5 ед. на мг белка. Значения K_m по изоцитрату, НАДФ, Mn^{2+} , Mg^{2+} составляют 0,06 ммоль/л, 0,06 ммоль/л, 0,27 ммоль/л, 0,33 ммоль/л, соответственно. Показано, что 2-оксоглутарат и сукцинат ингибируют активность НАДФ-ИДГ конкурентно по отношению к изоцитрату (K_i 0,38 ммоль/л и 0,56 ммоль/л, соответственно). В регуляции активности фермента могут принимать участие интермедиаты азотного (глутамин, аргинин, глицин) и углеводного обмена (глюкоза, глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, фосфоенолпируват, а-3-фосфоглицериновая кислота). Глутамат, валин не влияют на ферментативную активность. Предполагается, что выявленные регуляторные свойства митохондриальной НАДФ-ИДГ могут способствовать координации и интеграции процессов углеродного и азотного метаболизма.

ВВЕДЕНИЕ

Изоцитратдегидрогеназа (ИДГ) – фермент, имеющий две формы коферментной специфичности: НАДФ-ИДГ (КФ 1.1.1.41) и НАДФ-ИДГ (КФ. 1.1.1.42) и катализирующий реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата до 2-оксоглутарата.

В ряде работ были изучены каталитические свойства фермента из тканей животных [1, 2], растений [3, 4] и микроорганизмов [5, 6]. Известно, НАДФ-ИДГ – фермент цикла Кребса, локализован в митохондриях и является одним из пунктов контроля функционирования ЦТК и таким образом, принимает самое непосредственное участие в регуляции синтеза АТР [7]. Активность НАДФ-ИДГ в тканях животных связана как с митохондриальной, так и с цитоплазматической фракциями [7]. Считают, что физиологической ролью митохондриальной НАДФ-ИДГ является, с одной стороны, контроль скорости протекания гликолиза путем изменения уровня цитрата, а с другой стороны, участие в регуляции трансгидрогеназной реакции, в результате которой поддерживается необходимый уровень НАД⁺/НАДН и НАДФ⁺/НАДФН, что в свою очередь, оказывает влияние на энергетическую направленность ЦТК [8]. Известно, что функцией цитоплазматической НАДФ-ИДГ является генерирование НАДФН, который используется в различных биосинтетических реакциях. Отмечается также важная роль данной реакции в синтезе 2-оксоглутарата, выполняющего функции предшественника глутамата и основ-

ного акцептора азота в реакциях переаминирования. Предполагается, что с помощью НАДФ-ИДГ может осуществляться регуляция и координация углеродного и азотного метаболизма в живой клетке [9]. Несмотря на то, что НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крысы являлась предметом изучения в ряде работ, такой аспект функционирования фермента как участие в регуляции и координации углеродного и азотного метаболизма остаётся мало изученным. В этой связи в настоящей работе проведены исследования каталитических и регуляторных свойств митохондриальной формы НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крысы для выяснения механизмов, способствующих регуляции функционирования процессов углеродного и азотного метаболизма на уровне ИДГ-реакции, представляющей собой точку пересечения этих важнейших метаболических путей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали белых крыс самцов (*Rattus rattus* L.), массой 250-300г. Печень извлекали под кетаминным наркозом после многократного перфузирования ледяным физиологическим раствором. Активность фермента определяли спектрофотометрически на СФ-26 при 340 нм в среде следующего состава: 0,05 моль/л трис-НСl-буфер (рН 7,6), содержащий 1,5 ммоль/л изоцитрата, 2 ммоль/л $MnCl_2$, 0,1 ммоль/л НАДФ. О скорости ИДГ-реакции судили по возрастанию оптической плотности опытных образцов в результате восстановления НАДФ в ходе катализируемого ферментом превращения изоцитрата в 2-ок-

Очистка митохондриальной НАДФ-изоцитратдегидрогеназы из гепатоцитов крыс

| Стадия очистки | Объем фракции, мл | Активность, ФЕ | Количество белка, мг | Удельная активность, ФЕ/мг белка | Выход, % | Степень очистки |
|----------------|-------------------|----------------|----------------------|----------------------------------|----------|-----------------|
| Гомогенат | 2.4 | 1.80±0.090 | 10.20±0.510 | 0.176±0.009 | (100) | (1.00) |
| Сефадекс G-25 | 5.9 | 1.64±0.080 | 7.40±0.370 | 0.220±0.011 | 91.10 | 1.26 |
| ДЭАЭ-целлюлоза | 9.2 | 0.97±0.050 | 0.17±0.009 | 5.700±0.285 | 53.85 | 32.40 |
| Сефадекс G-150 | 4.3 | 0.33±0.060 | 0.02±0.001 | 16.500±0.825 | 18.70 | 93.70 |

Примечание: в табл. 1,2 обсуждаются статистически достоверные отличия при P<0,05

соглутарат. За единицу активности (ФЕ) принимали количество фермента, катализирующее образование 1мкмоль продукта реакции за 1мин при 25°C. Содержание белка определяли по методу Lowry (1951).

Очистка митохондриальной НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крыс включала несколько этапов.

1. Разделение сублеточных фракций методом дифференциального центрифугирования [10]. Навеску ткани печени гомогенизировали в 4-х кратном объеме среды выделения следующего состава 0,05моль/л трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 0,5ммоль/л изоцитрата, 1ммоль/л ЭДТА, 0,25ммоль/л сахарозы, 1% β-меркаптоэтанол. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Осадок, содер-

жащий в основном клеточные стенки, отбрасывали. Надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 13000g в течение 15 мин. Осадок, содержащий в основном митохондрии, отмывали и ресуспендировали в той же среде выделения. Полученный таким образом осадок растворяли в среде следующего состава: 0,05моль/л трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 0,5ммоль/л изоцитрата, 1ммоль/л ЭДТА, 20% глицерин, 1% β-меркаптоэтанол. Митохондрии разрушали осмотическим шоком в гомогенизаторе Поттера, для более полной солюбилизации использовали тритон Х-100 (0,1%). Дальнейшая очистка митохондриальной НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крыс включала несколько этапов.

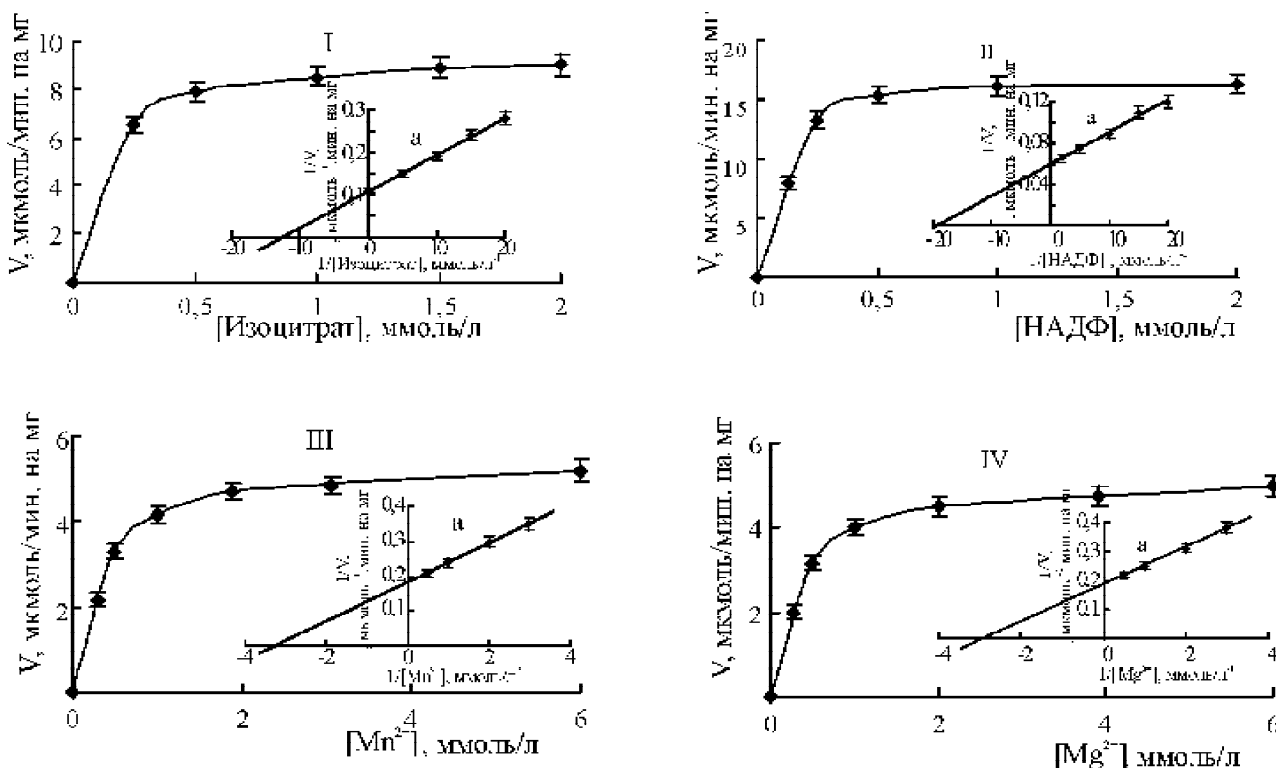


Рис. 1. Зависимость скорости реакции, катализируемой НАДФ-изоцитратдегидрогеназой из митохондриальной фракции гепатоцитов крыс, от концентрации изоцитрата (I), НАДФ (II), ионов Mn²⁺ (III), Mg²⁺ (IV); та же зависимость в двойных обратных координатах (а)

2. *Обессоливание на сефадексе G-25.* Освобождение белковой смеси от низкомолекулярных примесей осуществляли с помощью гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 (1,5 × 20 см). В качестве элюирующей среды использовали 0,01 М трис-НСI-буфер (рН 7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ MnCl₂, 0,1 мМ ЭДТА, 0,05 мМ β-меркаптоэтанол. Фракции, обладающие максимальной ферментативной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки.

3. *Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе.* Обессоленный раствор фермента наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (1,2 × 13 см), уравновешенную элюирующей средой такого же состава, как у буфера, применяемого для уравновешивания колонки с сефадексом G-25. Для очистки НАДФ-ИДГ использовали ступенчатый градиент концентраций KCl в элюирующем буфере. Десорбцию НАДФ-ИДГ из печени крыс осуществляли в градиенте: 20-40 мМ. Элюирующая среда содержала вышеназванные ингредиенты. Скорость элюции – 30-40 мл/ч. Фракции, обладающие максимальной НАДФ-ИДГ- активностью, использовали для дальнейшей очистки.

4. *Гель-фильтрация на сефадексе G-150.* Ферментный препарат наносили на колонку (2 × 60 см) и элюировали тем же буфером, что и при обессоливании на сефадексе G-25 со скоростью 30 мл/ч.

Все этапы выделения и очистки фермента осуществляли при температуре 0-4°C. Опыты проводили в 3-4 кратной биологической повторности, аналитические определения в каждой пробе – в 2-х повторностях. Для определения достоверности результатов применяли метод вариационной статистики [11].

В работе использовались следующие реактивы и материалы: Tris (“Serva” Германия), изоцитрат натрия, глюкоза, глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, фосфоенолпируват, 3-фосфоглицериновая кислота (“Sigma”, США), NADP, глутамин, глутамат, глицин, аргинин, валин, ДЭАЭ-целлюлоза (“Reanal”, Венгрия), сефадекс G-25, G-150 (“Pharmacia”, Швеция). Остальные реактивы отечественного производства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью 93,7-кратной очистки был получен ферментный препарат митохондриальной НАДФ-ИДГ с удельной активностью 16,5 ед. на мг белка (табл. 1). Очищенный ферментный препарат был использован для исследования кинетических параметров каталитического действия и ряда регуляторных свойств фермента.

Изучение влияния изоцитрата и НАДФ на активность митохондриальной формы НАДФ-ИДГ показало, что зависимость скорости реакции от концентраций изоцитрата и НАДФ подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен (рис. 1). Константа Михаэлиса (K_m) для изоцитрата, определенная методом двойных обратных координат, составила 0,07 ммоль/л, K_m для НАДФ в тех же координатах составила 0,06 ммоль/л (рис. 1). Для проявления активности НАДФ-ИДГ необходимо присутствие ионов Mn²⁺ в реакционной среде. Считают, что истинным субстратом НАДФ-ИДГ является комплекс [Mn²⁺ – изоцитрат] [3]. При высоких концентрациях ионов Mn²⁺ имеет место падение ферментативной активности. По-видимому, это происходит в результате вытеснения истинного субстрата вследствие конкуренции изоцитрата и кофактора (ионов Mn²⁺) за субстратсвязывающие центры в молекуле фермента, что свидетельствует о взаимодействии НАДФ-ИДГ и со свободными ионами Mn²⁺. В качестве кофактора для фермента также могут выступать и ионы Mg²⁺. Исследования показали, что ионы Mn²⁺ оказывают более значительный активирующий эффект по сравнению с ионами Mg²⁺. K_m для ионов Mn²⁺ составляет 0,27 ммоль/л, K_m для ионов Mg²⁺ – 0,33 ммоль/л (рис. 1).

Исследования влияния некоторых интермедиатов цикла Кребса показало, что 2-оксоглутарат является конкурентным ингибитором митохондриальной НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крысы по отношению к изоцитрату. Константа ингибирования (K_i), определенная графически методом Диксона [12], составила 0,38 ммоль/л (рис.2а). Конкурентный характер ингибирования показан также для фермента из куколки тутового шелкопряда *Bombyx mori*, моллюска *Mytilus edulis* [13,

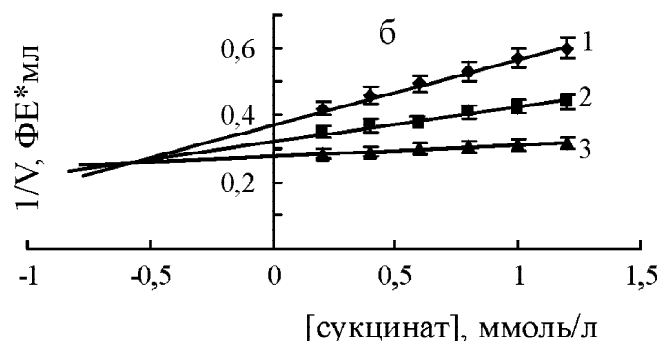
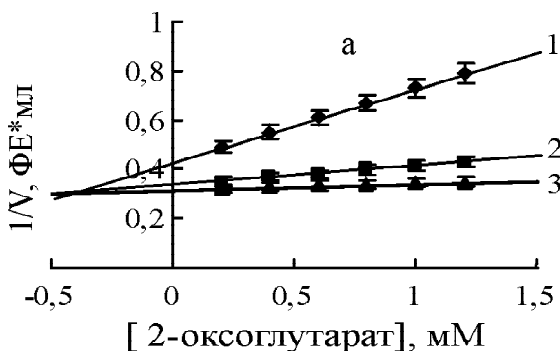


Рис. 2. Определение типа и константы ингибирования митохондриальной НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крыс 2-оксоглутаратом (а) и сукцинатом (б) при фиксированных концентрации изоцитрата: 1 – 0,5 ммоль/л; 2 – 1 ммоль/л; 3 – 1,5 ммоль/л

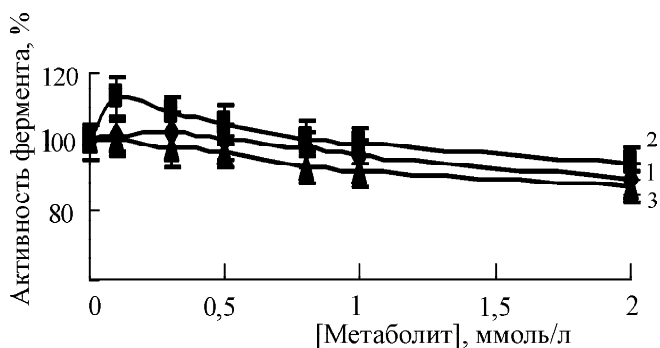


Рис. 3. Влияние цитрата (1), цис-аконитата (2) и транс-аконитата (3) на активность митохондриальной НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крысы

14]. Очевидно, ингибирование 2-оксоглутаратом НАДФ-ИДГ осуществляется по принципу обратной связи и является, универсальным механизмом регуляции активности фермента у различных организмов. Это может иметь важное значение с точки зрения регуляции азотного обмена, так как 2-оксоглутарат выполняет функции предшественника глутаминовой кислоты и основного акцептора азота в реакциях переаминирования. Таким образом, увеличение концентрации 2-оксоглутарата не только подавляет активность НАДФ-ИДГ, но также и оказывает влияние скорость реакций переаминирования. Анализ влияния другой дикарбоновой кислоты – сукцината – на активность НАДФ-ИДГ показал, что данный интермедиат ЦТК также является конкурентным ингибитором фермента по отношению к изоцитрату (рис.2б). Значение K_i , определенное методом Диксона составило 0,56 ммоль/л.

Исследование влияния ряда трикарбоновых кислот цикла Кребса показало, что в регуляции активности митохондриальной формы НАДФ-ИДГ из печени крысы принимают участие цитрат, цис- и транс-аконитат (рис. 3). Цитрат до 0,3 ммоль/л практически не

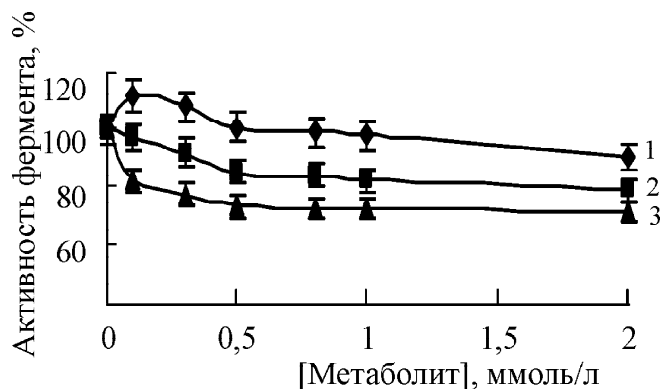


Рис. 4. Влияние глутамин (1), аргинина (2) и глицина (3) на активность митохондриальной НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крысы

оказывает влияния на функционирование фермента, при более высоких концентрациях наблюдается незначительное ингибирование НАДФ-ИДГ. Результаты исследования влияния цис- и транс-аконитата на НАДФ-ИДГ из печени крысы показали, что цис-форма аконитата может слабо активировать фермент при концентрациях до 0,1 ммоль/л. При более высоких концентрациях метаболита имеет место снижение активирующего эффекта. Транс-аконитат оказывает ингибирующее воздействие на фермент при концентрациях более 0,1 ммоль/л.

Изучение влияния некоторых аминокислот на активность НАДФ-ИДГ из печени крысы показало, что глутамин при низких концентрациях до 0,1 ммоль/л оказывает незначительный активирующий эффект, а при более высоких концентрациях имеет место снижение активирующего действия. При концентрациях выше 1 ммоль/л наблюдается слабое ингибирование активности фермента. Исследование действия глутамата на функционирование митохондриальной НАДФ-зависимой ИДГ выявило, что данный метаболит не влияет на активность фермента. Аргинин и

Таблица 2

Влияние некоторых интермедиатов углеводного метаболизма на активность митохондриальной НАДФ-ИДГ

| Концентрация, ммоль/л | Влияние метаболита, % от контроля | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------------------|
| | глюкоза | глюкозо-1-фосфат | глюкозо-6-фосфат | фосфоенол-пируват | 3-фосфо-глицериновая кислота |
| 0.002 | 100±0.0 | 95±3.2 | 100±0.0 | 90±2.7 | 76±3.2 |
| 0.005 | 83±1.3 | 80±3.1 | 87±2.7 | 76±3.3 | 68±2.6 |
| 0.01 | 76±2.0 | 73±3.2 | 70±3.4 | 65±2.6 | 59±2.3 |
| 0.02 | 73±2.9 | 71±3.0 | 69±3.3 | 75±2.5 | 48±2.4 |
| 0.05 | 71±2.3 | 65±2.4 | 68±2.4 | 69±3.0 | 44±2.2 |
| 0.1 | 70±2.4 | 59±2.5 | 55±1.6 | 56±2.7 | 39±1.8 |
| 0.4 | 64±2.5 | 53±2.3 | 53±2.0 | 53±1.8 | 35±1.7 |
| 0.6 | 52±2.4 | 52±2.1 | 39±1.7 | 48±1.7 | 33±1.1 |
| 1 | 50±2.1 | 51±2.0 | 30±1.3 | 37±1.2 | 30±1.2 |

глицин оказывают сходное ингибирующее воздействие на активность митохондриальной изоформы фермента. Валин не влияет на НАДФ-ИДГ (рис. 4).

Результаты исследования влияния интермедиатов углеводного метаболизма на активность митохондриальной НАДФ-ИДГ из гепатоцитов крысы представлены в табл. 2. Установлено, что глюкоза в меньшей степени подавляет активность фермента, чем углеводы, имеющие в своей структуре фосфатную группировку. Можно предположить, что сахарофосфаты оказывают значительный ингибирующий эффект на НАДФ-ИДГ в результате взаимодействия отрицательно заряженной фосфатной группы, содержащейся в их структуре с положительно заряженными ионами Mn^{2+} , которые являются кофакторами фермента и необходимы для протекания реакции.

Таким образом, полученные кинетические параметры каталитического действия митохондриальной НАДФ-ИДГ говорят о высокой чувствительности данного фермента к концентрациям субстрата и кофакторов, что может также иметь существенное значение с точки зрения обеспечения возможности регуляции путей центрального метаболизма с помощью данного фермента. Полученные данные свидетельствуют, что в регуляцию активности фермента могут быть вовлечены интермедиаты как азотного, так и углеродного метаболизма, что может способствовать координации и интеграции процессов, сопряженных с важнейшими метаболическими блоками клеточного обмена веществ на уровне ИДГ-реакции.

Работа поддержана грантом Минобразования РФ Е 00-6.0-23, 2001 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Illigworth I.A., Tipton K.F.* // *Biochem.J.* 1968. V.118. №2. P.253-258.
2. *Higashi I., Maruyama E., Otani I. et al.* // *Biochem. J.* 1965. V.57. №6. P.793-798.
3. *Попова Т.Н.* Исследование NADP-специфичной изоцитратдегидрогеназы в высших растениях: Дис. докт. биол. наук.-М., 1994.
4. *Chen R.D., Bismuth E., Champigny M.L.* // *Planta.* 1989. V.17. № 8. P.157-163.
5. *Friga G.M., Farkas G.L.* // *Arch. Microbiol.* 1981. V.129, N5. P.331-334.
6. *Ingebretsen O.S.* // *J. Bacterial.* 1975. V.124 № 1. P.65-72.
7. *Попова Т.Н.* // *Биохимия.* 1993. Т.58. № 126. С.1861-1879.
8. *Землянухин А.А., Попова Т.Н.* // *Физиология растений.* 1989. Т.36. № 4. С.753-761.
9. *Popova T., Pinheiro de Carvalho M.A.A.* // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1998. 459. P.1-18.
10. *Прохорова М.И.* Методы биохимических исследований. – Л.: Изд-во ЛГУ. 1982. 272с.
11. *Ллойд Э., Ледерман У.* Справочник по прикладной статистике.-М.: Финансы и статистика, 1990.- С.493-513.
12. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты.-3-е изд.-М.: Мир, 1982.-Т.1-3.
13. *Miake F., Torikata T., Koga K, Hayashi K.* // *J. Biochem.* 1977. V.82, N2. P.449-454.
14. *Head E.J.H.* // *Eur. J. Biochem.* 1980. V.111, N2. P.581-586.