

УДК 577.15.02

РОЛЬ Mn^{2+} У РІВНОВАЗІ НАДФ-ЗАЛЕЖНИХ ІЗОЦИТРАТДЕГІДРОГЕНАЗ

М. І. Шевченко, М. Ф. Гулий

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Академії наук Української РСР, Київ

(Надійшла до редакції 28.VI 1973 р.)

Вивчали вплив Mn^{2+} на ізоцитратдегідрогеназну реакцію в цитоплазмі та мітохондріях печінки кролів. Виявлено, що на відміну від цитоплазми пряма й зворотна ізоцитратдегідрогеназні реакції, які каталізує фермент мітохондрій, активуються в 10 разів меншими концентраціями йонів Mn^{2+} . На підставі експериментально визначеної й математично обчисленої константи рівноваги ($K_{\text{рівн}}$) зроблено висновок, що рівновага ізоцитратдегідрогеназної реакції в мітохондріях може бути зміщена в бік утворення ізоцитрату при невеликих концентраціях Mn^{2+} і в бік утворення α -кетоглутарату при збільшенні концентрації Mn^{2+} . Рівновага реакції в цитоплазмі меншою мірою, ніж у мітохондріях, зміщена в бік утворення α -кетоглутарату. Встановлено, що ізоцитратдегідрогеназна реакція не підпорядковується механізму Теорела — Чанса.

НАДФ-залежна ізоцитратдегідрогеназа (ІДГ) (КФ 1.1.1.42, треодс-ізоцитрат : НАДФ-оксидоредуктаза — декарбоксилююча) каталізує одночасно оборотні процеси окиснення ізолимонної кислоти у щавлевоянтарну і декарбоксилювання останньої в α -кетоглутарову, а також карбоксилювання α -кетоглутарової в ізолимонну через утворення щавлевоянтарної кислоти. ІДГ із мітохондрій і цитоплазми печінки кроля мають істотні кінетичні відмінності [1]. Фермент мітохондрій більшою мірою здатний каталізувати відновне карбоксилювання α -кетоглутарату, ніж фермент цитоплазми, оскільки має менші значення констант Міхаеліса (K_m) для субстратів і кофакторів цієї реакції. В зв'язку з цим можна чекати, що положення рівноваги ізоцитратдегідрогеназної реакції буде відрізнятися для обох ферментів, а визначення величини $K_{\text{рівн}}$ допоможе з'ясувати фізіологічну роль цих ферментів у клітині.

В нашому дослідженні було визначено $K_{\text{рівн}}$ для ІДГ з мітохондрій і цитоплазми, а також вивчено вплив Mn^{2+} на пряму і зворотну реакції для обох ферментів.

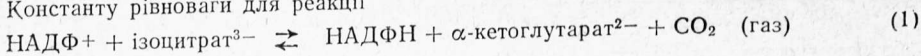
Матеріали й методи

Клітинні фракції з гомогенату печінки кролів виділяли методом де Дюва й співробітників [2], дещо видозміненим [3]. Вивчаючи НАДФ-залежну ІДГ мітохондрій, використовували розчинний мітохондріальний білок, одержаний, як описано раніше [1]. Активність НАДФ-залежних ІДГ визначали за Очоа [4]. Швидкість реакції виражали в одиницях екстинкції (ΔE_{340}) за 1 хв на 1 мг білка. $K_{\text{рівн}}$ визначали описаним раніше методом [5] при температурі 20°C у розчинах з постійною йонною силою 0,404. Для кожного ферменту рН реакційних сумішей доводили до 7,4, додаючи HSO_3^- у певних концентраціях, розрахованих для розчинного CO_2 і pK' 6,4 для H_2CO_3 . Підтримували постійну концентрацію $MnCl_2$ для мітохондріальної ІДГ — $20,0 \cdot 10^{-5}$ М, для цитоплазматичної — $3,3 \cdot 10^{-3}$ М.

$K_{\text{рівн}}$ визначали при наблизненні рівноваги з боку як d-ізоцитрату, так і α -кетоглутарату, і концентрацію НАДФН при рівновазі обчислювали за зміною екстинкції при 340 нм. Для обчислень було застосовано коефіцієнт молярної екстинкції для НАДФН $6,24 \cdot 10^6$ см²/моль [5], щоб врахувати поглинання α -кетоглутарату. Значення

парціального тиску CO_2 одержували, враховуючи барометричний тиск і тиск насичених водяних парів при температурі досліду.

Константу рівноваги для реакції

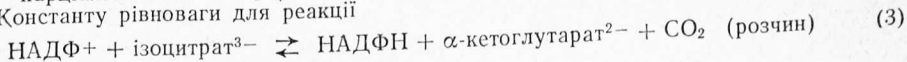


було обчислено за рівнянням:

$$K_p = \frac{[\text{НАДФН}] \cdot [\alpha\text{-кетоглутарат}^{2-}]}{[\text{НАДФ}^+] \cdot [\text{ізоцитрат}^{3-}]} \times \frac{p}{760}, \quad (2)$$

де p — парціальний тиск CO_2 (в мм Hg).

Константу рівноваги для реакції



обчислювали за рівнянням:

$$K_c = \frac{[\text{НАДФН}] \cdot [\alpha\text{-кетоглутарат}^{2-}] \cdot [\text{CO}_2]}{[\text{НАДФ}^+] \cdot [\text{ізоцитрат}^{3-}]} \quad (4)$$

Концентрацію розчиненого CO_2 обчислювали за парціальним тиском і даними [6] для розчинності CO_2 у воді і NaCl у широкому температурному інтервалі.

Результати і обговорення

Показано [4, 7—13], що для прямої й зворотної ізоцитратдегідрогеназних реакцій необхідні йони двовалентних металів; найбільший активуючий вплив щодо цього властивий Mn^{2+} . Ми вивчали дію Mn^{2+} на швидкість прямої й зворотної реакцій, які каталізуються цитоплазм-

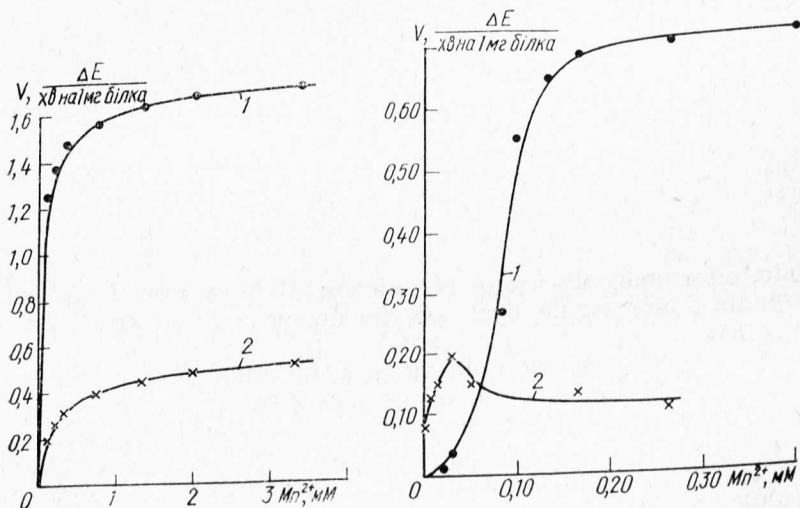


Рис. 1. Вплив Mn^{2+} на швидкість реакції ізоцитратдегідрогенази цитоплазми: 1 — декарбоксилювання d -ізоцитрату, 2 — карбоксилювання α -кетоглутарату.

Рис. 2. Вплив Mn^{2+} на швидкість реакції ізоцитратдегідрогенази мітохондрій: 1 — декарбоксилювання d -ізоцитрату, 2 — карбоксилювання α -кетоглутарату.

матичною (рис. 1) і мітохондріальною (рис. 2) ІДГ. Оптимальна концентрація Mn^{2+} (рис. 1) для реакцій декарбоксилювання d -ізоцитрату та карбоксилювання α -кетоглутарату однакова, і він має схожий вплив на швидкість обох реакцій. Без йонів Mn^{2+} реакція, яку каталізує ІДГ цитоплазми, зовсім не відбувається.

Оптимальна концентрація Mn^{2+} для реакції декарбоксилювання ферментом із мітохондрій (рис. 2) становить $20,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, а реакція карбоксилювання α -кетоглутарату перебігає з максимальною швидкістю за наявності $1,67 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ Mn^{2+} , тобто при концентрації, у 10 разів меншій. Крім того, якщо пряма реакція без йонів Mn^{2+} не відбувається, то зворотна в цьому випадку перебігає з невеликою швид-

Таблиця 1

Константи рівноваги цитоплазматичної ізоцитратдегідрогеназної реакції

[НАДФ]	[Ізоцитрат]	[α -Кетоглутарат]	[НАДФН]	P, мм Hg	[CO ₂], ммолі	K _p , атм	K _c , молі
ммолі							
A. 39,0	27,4	338,9	5,9	739	36,2	1,82	0,068
20,5	26,9	173,4	6,4	739	36,2	1,94	0,072
30,1	27,5	338,8	5,8	745	35,6	2,28	0,085
22,4	28,8	337,5	4,5	745	35,6	2,28	0,085
20,0	26,4	173,9	6,9	745	35,6	2,17	0,081
29,8	27,2	326,9	6,1	745	35,6	2,30	0,085
38,6	27,0	326,7	6,3	745	35,6	1,89	0,070
Середнє						2,07	0,077
B. 7,4	7,4	9,2	10,5	742	36,4	1,72	0,064
7,1	7,1	9,6	10,8	742	36,4	2,05	0,076
8,7	8,7	8,0	18,1	742	36,4	1,85	0,069
8,5	8,5	8,2	18,3	742	36,4	2,05	0,076
11,1	11,1	22,2	11,3	742	36,4	1,95	0,073
9,8	9,8	23,5	8,1	742	36,4	1,95	0,073
7,9	7,9	8,8	14,5	742	36,4	1,85	0,069
7,2	7,2	9,5	10,7	742	36,4	1,85	0,069
11,2	11,2	22,1	11,2	742	36,4	1,95	0,073
Середнє						1,92	0,072
Середнє з А і Б						2,00	0,075

Примітка до табл. 1 та 2. Рівновага встановлювалася з боку обох реакцій; в інкубаційну суміш додавали ізоцитрат, α -кетоглутарат та НАДФ (А) і α -кетоглутарат та НАДФН (Б).

кістю, що, можливо, пов'язано із вмістом Mn^{2+} в мітохондріях. Отже, концентрація Mn^{2+} може бути регуляторною щодо активності ІДГ в мітохондріях.

У табл. 1 представлено дані щодо визначення $K_{рівн}$ для ферменту з цитоплазми, які свідчать, що різниця між середніми значеннями, одержаними шляхом наближення рівноваги з боку обох реакцій, становить 7%. Для ІДГ із мітохондрій серця бика [5] було одержано значення $K_{рівн}$, що різняться на 10%. Такі відмінності, на думку вказаних авторів, пов'язані з невеликими втратами коензимів з наближенням до рівноваги. Для ІДГ цитоплазми середнє значення K_p становить 2,0 атм, K_c — 0,075 М (табл. 1). Значення $K_{рівн}$ для ІДГ мітохондрій (табл. 2), одержані так само, як і для ферменту з цитоплазми, також мають різницю. Можливо, це пов'язане з втратами коензимів при досягненні рівноваги. Середнє значення K_p для ІДГ з мітохондрій становить 21,3 атм, K_c — 0,80 М (табл. 2).

Для бісубстратної системи значення $K_{рівн}$ може бути обчислено математично, якщо відомі дійсні значення K_m для субстратів реакції [14]. Для ферментативної реакції, яка відбувається за типом послідовного механізму [15, 16], закономірне співвідношення Холдена:

$$K_{рівн} = V_f \cdot K_{CD} / V_r \cdot K_{AB}, \quad (5)$$

де А і В — субстрати реакції, С і Д — її продукти, V_r та V_f — максимальна швидкість прямої та зворотної реакцій відповідно. Якщо наявність одного субстрату в активному центрі ферменту не впливає на

Константи рівноваги мітохондріальної ізоцитратдегідрогеназної реакції

[НАДФ]	[Ізоцитрат]	[НАДФН]	[α -Кетоглутарат]	$p, \text{ мм Hg}$	$[\text{CO}_2], \text{ ммолі}$	$K_p, \text{ атм}$	$K_c, \text{ молі}$
<i>ммолі</i>							
А. 20,3	26,7	6,6	2006,6	755	36,1	23,7	0,88
20,8	18,9	6,1	1333,9	755	36,1	20,2	0,75
20,3	18,4	6,6	1339,6	755	36,1	23,0	0,85
13,2	36,9	4,8	2337,8	755	36,1	22,3	0,83
13,5	37,2	4,5	2337,5	755	36,1	20,3	0,76
20,8	27,2	6,1	2006,1	755	36,1	21,0	0,78
20,6	27,0	6,3	2006,3	755	36,1	22,0	0,82
11,1	18,1	6,9	673,9	755	36,1	22,4	0,84
39,8	11,6	5,1	2005,1	755	36,1	20,9	0,78
39,5	11,3	5,4	2005,4	755	36,1	23,5	0,88
Середнє						21,9	0,82
Б. 4,3	4,3	13,7	28,6	750	35,9	20,4	0,76
4,5	4,5	13,5	28,8	750	35,9	18,5	0,69
10,6	10,6	7,4	322,4	750	35,9	20,4	0,76
6,4	6,4	2,6	326,6	750	35,9	20,0	0,74
8,0	8,0	2,0	659,0	750	35,9	19,8	0,74
7,9	7,9	2,1	659,1	750	35,9	21,4	0,80
6,9	6,9	38,0	26,4	750	35,9	20,3	0,76
7,1	7,1	19,8	59,6	750	35,9	22,5	0,84
7,2	7,2	19,7	59,5	750	35,9	21,8	0,81
Середнє						20,6	0,77
Середнє з А і Б						21,3	0,80

зв'язування іншого субстрату, то $K_{AB} = K_A \cdot K_B$, $K_{CD} = K_C \cdot K_D$ і рівняння (5) набуває вигляду [14]:

$$K_{\text{рівн}} = V_f \cdot K_C \cdot K_D / V_r \cdot K_A \cdot K_B. \quad (6)$$

Якщо константи швидкості перетворення потрійного комплексу ЕАВ набагато перевищують константи швидкостей розпаду бінарних комплексів ферменту з одним субстратом, а потрійні комплекси менш стійкі, ніж бінарні, значить, діє механізм Теорела — Чанса, для якого утворення потрійного комплексу не вважається кінетично істотною умовою [17]. В цьому випадку поряд із співвідношенням Холдена виконують таке:

$$K_{\text{рівн}} = V_f^3 \cdot K_C \cdot K_D / V_r^3 \cdot K_A \cdot K_B \quad (7)$$

і, використовуючи рівняння (6) та (7), перевіряють, чи здійснюється механізм Теорела — Чанса.

Для ізоцитратдегідрогеназної реакції $K_{\text{рівн}}$ було обчислено за рівняннями:

$$K_{\text{рівн}} = V_f \cdot K_{\alpha\text{-кетоглут., HCO}_3^-} \cdot K_{\text{НАДФН}} / V_r \cdot K_{\text{Ізоцитрат}} \cdot K_{\text{НАДФ}}; \quad (8)$$

$$K_{\text{рівн}} = V_f^3 \cdot K_{\alpha\text{-кетоглут., HCO}_3^-} \cdot K_{\text{НАДФН}} / V_r^3 \cdot K_{\text{Ізоцитрат}} \cdot K_{\text{НАДФ}} \quad (9)$$

з урахуванням того, що для ферменту цитоплазми $K_{\alpha\text{-кетоглут., HCO}_3^-} = K_{\alpha\text{-кетоглут.}} \cdot K_{\text{HCO}_3^-}$ [1].

Математичне обчислення для ІДГ цитоплазми дає значення $6,0 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ за рівнянням (8) і $0,14 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ за рівнянням (9). Як свідчать ці дані, значення $K_{\text{рівн}}$ $6,0 \cdot 10^{-2} \text{ М}$, обчислене за рівнянням (8), задовільно узгоджується з визначеною експериментально величиною $7,5 \cdot 10^{-2} \text{ М}$. Отже, для ізоцитратдегідрогеназної реакції утворення потрійного комплексу типу ЕАВ є істотною кінетичною умовою.

Для ІДГ мітохондрій також було обчислено $K_{\text{рівн}}$ за рівнянням (8), що було пов'язане з деякими обмеженнями. Дійсні $K_{\text{м}}$ для ІДГ мітохондрій визначали за наявності $26,7 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ Mn^{2+} для прямої реакції та $1,67 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ — для зворотної, оскільки в кожному випадку необхідно було брати оптимальну концентрацію. Обчислення $K_{\text{рівн}}$ із застосуванням дійсних $K_{\text{м}}$ дає нам значення $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ для субстратів зворотної реакції та значення швидкості прямої реакції $V_r = 0,040$ (рис. 2) при концентрації йонів Mn^{2+} $1,67 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ і дійсних $K_{\text{м}}$ для субстратів прямої реакції, визначених при вищій концентрації Mn^{2+} .

Одержане значення $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ свідчить, що рівновага зміщена в бік утворення ізоцитрату. Із зменшенням концентрації Mn^{2+} до $1,67 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ швидкість реакції декарбоксилювання ізоцитрату значно зменшується, і цілком імовірно, що спорідненість ферменту до субстрату теж зменшується або залишається такою самою. Але збільшення величини $K_{\text{м}}$ для *d*-ізоцитрату і НАДФ певним чином позначиться на обчисленому значенні $K_{\text{рівн}}$, а саме — викличе його зменшення, тобто рівновага буде ще більше зміщена в бік утворення ізоцитрату.

Отже, за наявності $1,67 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ Mn^{2+} рівновага ізоцитратдегідрогеназної реакції більшою чи меншою мірою зміщується в бік синтезу ізоцитрату. Експериментальне визначення в присутності $20,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ Mn^{2+} дає нам значення $K_{\text{рівн}}$, яке відрізняється від обчисленого принаймні в 45 разів.

Все це свідчить про те, що Mn^{2+} дійсно може відігравати регуляторну роль в ізоцитратдегідрогеназній реакції. За наявності Mn^{2+} в невеликих концентраціях відбувається переважно реакція карбоксилювання α -кетоглутарату і утворення ізоцитрату, із збільшенням концентрації Mn^{2+} карбоксилювання пригнічується і рівновага зміщується в бік утворення α -кетоглутарату.

Одержані результати дають нам змогу деякою мірою наблизитись до вирішення питання про фізіологічну роль НАДФ-залежних ІДГ в клітинах печінки. Оскільки встановлено, що здатність клітин печінки до окиснення ізоцитрату визначається переважно цитоплазматичною фракцією [18, 19], було запропоновано особливий шлях окиснення ізоцитрату в печінці і зроблено висновок, що позамітохондріальна частина циклу трикарбонових кислот є основним джерелом цитоплазматичного НАДФН [20, 21]. У мітохондріях, на думку багатьох дослідників [22—26], НАДФ-залежна ІДГ поряд із НАД-залежною ІДГ бере також участь в окисненні ізоцитрату разом із піридиннуклеотидтрансгідрогеназою.

Як виявилось у наших дослідках, рівновага ізоцитратдегідрогеназної реакції в цитоплазмі не дуже зміщена в бік утворення α -кетоглутарату порівняно з мітохондріями і легко може бути зворотною за наявності певних умов, тобто цей процес має значення не лише для утворення НАДФН, а й для синтезу ізоцитрату — важливого метаболіту в клітині. Дехто вважає [21], що ІДГ цитоплазми відіграє важливу роль у регуляції гліколізу й глікогенолізу в разі зміни позамітохондріального рівня ізоцитрату.

В мітохондріях НАДФ-залежна ІДГ здатна каталізувати не лише окиснювальне декарбоксилювання ізоцитрату, а й брати участь в утворенні ізоцитрату при зменшенні концентрації Mn^{2+} , тобто фіксація CO_2 НАДФ-залежною ІДГ може бути важливим метаболічним етапом у синтезі проміжних сполук циклу трикарбонових кислот [27].

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. М. Ф. Гулий, М. И. Шевченко, Укр. біохім. журн., 45, 515, 1973.
2. C. de Duve et al., Biochem. J., 60, 604, 1955.
3. B. Sedwick, G. Hübscher, Biochim. Biophys. Acta, 106, 63, 1965.
4. S. Ochoa, J. Biol. Chem., 174, 133, 1948.
5. J. C. Londesborough, K. Dalziel, Biochem. J., 110, 217, 1968.
6. H. S. Harhed, R. Davis, J. Amer. Chem. Soc., 65, 2030, 1943.
7. E. Alder et al., Biochem. J., 33, 1028, 1939.
8. S. Ochoa, E. Weiz-Tabori, J. Biol. Chem., 174, 123, 1948.
9. J. Moyle, Biochem. J., 63, 548, 1956.
10. W. D. Lotspeich, R. A. Peters, Biochem. J., 49, 704, 1951.
11. T. Higashi et al., J. Biochem., 57, 793, 1965.
12. B. Nortrop, W. W. Cleland, Fed. Proc., 29, 408, 1970.
13. S. K. Wolfson, H. G. Williams-Ashman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96, 231, 1957.
14. R. A. Alberty, J. Amer. Chem. Soc., 75, 1928, 1953.
15. W. W. Cleland, Biochim. Biophys. Acta, 67, 104, 1963.
16. W. W. Cleland, Biochim. Biophys. Acta, 67, 188, 1963.
17. H. Theorell, B. Chance, Acta Chem. Scand., 5, 1127, 1951.
18. J. M. Lowenstein, J. Biol. Chem., 236, 1217, 1961.
19. L. Ernster, F. Navazio, Biochim. Biophys. Acta, 26, 408, 1957.
20. D. Pette, "Regulation of metabolic processes in mitochondria" (ed. by J. M. Ta-ger et al.), 1966, 28.
21. H. Goebell, D. Pette, Enzymol. Biol. et Clin., 8, 161, 1967.
22. J. L. Purvis, Biochim. Biophys. Acta, 30, 440, 1958.
23. A. O. Hawtrey, Biochem. J., 85, 293, 1962.
24. A. M. Stein, N. O. Kaplan, M. M. Ciotti, J. Biol. Chem., 234, 979, 1960.
25. A. M. Stein, G. H. Stein, S. K. Kirkman, Biochem., 6, 1370, 1967.
26. P. V. Vignais, P. M. Vignais, Biochim. Biophys. Acta, 47, 515, 1961.
27. C. R. Makerer, M. A. Mehlman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 140, 1127, 1972.

РОЛЬ Mn^{2+} В РАВНОВЕСИИ НАДФ-ЗАВИСИМЫХ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗ

М. И. Шевченко, М. Ф. Гулий

Институт биохимии им. А. В. Палладина Академии наук Украинской ССР, Киев

Резюме

Изучали влияние Mn^{2+} на реакцию, катализируемую изоцитратдегидрогеназой из цитоплазмы и митохондрий печени кролика. Показано, что, в отличие от цитоплазмы, прямая и обратная реакции, катализируемые ферментом митохондрий, активируются в 10 раз меньшими концентрациями ионов Mn^{2+} . На основании экспериментально определенной и математически рассчитанной константы равновесия делается вывод, что равновесие реакции, катализируемой изоцитратдегидрогеназой митохондрий, сдвинуто в сторону образования α -кетоглутарата при увеличении ее. Равновесие цитоплазматической реакции сдвинуто в сторону синтеза α -кетоглутарата, но в меньшей степени, чем для изоцитратдегидрогеназы митохондрий. Показано, что изоцитратдегидрогеназная реакция не подчиняется механизму Теорелла—Чанса.

ROLE OF Mn^{2+} IN EQUILIBRIUM OF NADP-DEPENDENT ISOCYTRATE DEHYDROGENASES

M. I. Shevchenko, M. F. Guly

The A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The reaction catalyzed by isocitrate dehydrogenase from cytoplasm and mitochondria of the rabbit liver was studied as affected by Mn^{2+} . It is shown that in contrast to cytoplasm, the direct and reverse reactions catalyzed by the mitochondrion enzyme are activated by 10-fold less concentrations of ions Mn^{2+} . On the basis of the experimentally determined and mathematically calculated equilibrium constant, a conclusion is made that equilibrium of the reaction catalyzed by mitochondrion isocitrate dehydrogenase is shifted towards formation of isocitrate with a small concentration of Mn^{2+} and towards α -ketoglutarate formation with the concentration increase. Equilibrium of the cytoplasmic reaction is displaced towards synthesis of α -ketoglutarate but to a less degree than for mitochondrion isocitrate dehydrogenase. The isocitrate dehydrogenase reaction is shown to be not subjected to the mechanism of Theorell-Chance.