



УДК 577.150.7—158.4:611.81

РЕГУЛЯЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ МОЗГА
ПРИ НАРУШЕНИИ СВЯЗИ С МЕМБРАНАМИ

ХВАТОВА Е. М., ГАРСИЯ А., ЗИМИН Ю. В., СЕМЕНОВА Т. С.

Горьковский медицинский институт им. С. М. Кирова

Изучены каталитические свойства гексокиназы (ГК), креатинкиназы (КК) и малатдегидрогеназы (мМДГ) в митохондриях и субмитохондриальных фракциях мозга крыс. Для изученных ферментов показаны различия в каталитических свойствах растворимых и мембраносвязанных форм. Солюбилизация ГК и КК существенно меняет величину V при сохранении типа кинетики реакции. мМДГ митохондрий и интактных мембран характеризуется S-образной кинетикой реакции окисления NADH. Обработка мембран фосфатным буфером ведет к солюбилизации части фермента. При этом фермент, оставшийся на мембране, как и солюбилизованный буфером, проявляет классическую кинетику реакции. При изменении свойств липидов мембраны, развивающихся при гипоксии, нарушаются связи ассоциированных с мембранами ферментов. Снижается доля митохондриальной ГК, одновременно отмечено изменение кинетических характеристик солюбилизованной фосфатным буфером мМДГ. Стабилизация митохондриальных мембран, возникающая при адаптации к гипоксии, ведет к усилению связи КК и ГК с мембранами. Снижается доля солюбилизуемых ферментов, изменяются кинетические характеристики мМДГ, остающейся на мембране после обработки фосфатным буфером. Результаты, полученные на субмитохондриальных фракциях мозга при различном состоянии липидов мембран, позволяли предположить наличие в митохондриях по меньшей мере трех форм мМДГ. К ним мы относим матричную форму фермента, а также связанную с мембраной за счет белок-белковых взаимодействий и ассоциированную на мембране за счет белок-липидных связей.

В общей проблеме регуляции каталитических свойств ферментов особое место занимает вопрос о влиянии структурных компонентов клетки на этот процесс. Митохондрии содержат несколько сот различных ферментов и являются примером внутриклеточных структурных образований, у которых обе мембраны содержат все категории мембранных белков-ферментов, а в матриксе и межмембранном пространстве присутствуют растворенные ферменты. Известно, что ряд солюбилизованных ферментов обладает свойством обратимой ассоциации с митохондриальными мембранами. Примерами таких энзимов могут служить ГК—поверхностный фермент наружной мембраны; КК—фермент межмембранного пространства, способный к ассоциации с наружной стороной внутренней мембраны, и NAD-зависимая мМДГ—фермент матрикса и внутренней мемб-

раны. Для этих ферментов показаны различия в каталитических и регуляторных свойствах в зависимости от их связи с мембраной или переходе в растворимое состояние [1—3].

В предыдущих исследованиях показана зависимость каталитических и регуляторных свойств КК, ГК и мМДГ мозга от их взаимодействия с мембранами митохондрий [4, 5]. Значение этого пути регуляции активности ферментов еще более возрастает при изменении физиологического состояния органа. Так, кислородное голодание мозга опасно нарушениями в митохондриях энергетических процессов, для которых очень высока степень риска незавершенности. Вместе с тем, механизм этого типа регуляции активности ферментов остается до конца не изученным.

Целью настоящего исследования явилось изучение мембранной регуляции каталитических свойств ферментов мозга, способных к ассоциации с митохондриальными мембранами. Для этого изучали каталитические характеристики ГК, КК и мМДГ в субмитохондриальных фракциях ткани мозга и их изменение при гипоксии и адаптации к кислородному голоданию.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на крысах-самцах массой 120—180 г.

Фракцию митохондрий клеток мозга получали дифференциальным центрифугированием [6].

Способность ГК к солюбилизации с митохондриальными мембран определяли при ступенчатой обработке митохондрий 0,1 М KCl. Активность ГК определяли спектрофотометрически, как описано ранее [7].

Экстракцию КК из разрушенных гипотоническим шоком митохондрий проводили 0,2 М фосфатным буфером, pH 7,5, с последующим отделением мембран центрифугированием при 100000 g в течение 15 мин. Активность фермента определяли в митохондриях, митохондриальных мембранах после их обработки фосфатным буфером и фосфатном солюбилизате по методу Лызловой и соавт. [8].

Препараты субмитохондриальных фракций для изучения свойств мМДГ получали по следующей схеме. Митохондрии мозга разрушали гипотонической обработкой и мембраны отделяли от содержимого межмембранного пространства и матрикса центрифугированием при 150000 g в течение 1 ч. Полученные мембраны (в дальнейшем первая мембранная фракция) суспендировали в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4. Последующим центрифугированием при 50000 g в течение 2-х ч разделяли супернатант (фосфатный солюбилизат) и осадок (вторая мембранная фракция).

Кинетические характеристики мМДГ (реакция окисления NADH) изучали в митохондриях, первой и второй мембранных фракциях и фосфатном солюбилизате при постоянной концентрации оксалоацетата и переменной концентрации NADH [9]. Белок определяли по Лоури.

Острое кислородное голодание мозга вызывали помещением животных в барокамеру проточного типа при атмосферном давлении 143 мм рт. ст. на 30 мин. Для развития адаптации к гипоксии животных еже-

дневно в течение 4 дней помещали в барокамеру при разрежении атмосферы 310 мм рт. ст. на 1 ч.

Результаты и обсуждение

Изучены каталитические свойства ГК, КК и мМДГ в растворимой форме и при их ассоциации с мембранами митохондрий. Во всех случаях взаимодействие с мембранами изменяло свойства ферментов.

Так, адсорбция ГК на внешней мембране митохондрий увеличивает величину V более чем в 2 раза (с 40 до 8 нмоль $\text{NADPH}/\text{мг}$ белка $\cdot$ мин). При этом гиперболическая зависимость скорости реакции от концентрации Mg^{2+} -АТФ не меняется. По данным Wilson [10, 11], увеличение скорости реакции может возрасти на порядок, что связано с увеличением K_1 по глюкозо-6-фосфату в 10 раз [11, 12].

Для креатинкиназы показано, что после гипотонической обработки митохондрий активность фермента распределена поровну между ассоциированной с мембранами и свободной формами. Обработка 0,2 М фосфатным буфером позволила установить, что мембраносвязанная форма КК составляет 24%, а способная к солюбилизации КК достигает 76% общей митохондриальной активности фермента. Потеря связи с мембраной увеличивает величину V с 0,4 до 2,5 нмоль креатина/мг белка за минуту.

Для мМДГ установлено, что в митохондриальной фракции кинетика реакции характеризуется S-образной кривой насыщения фермента NADH (рис. 1). мМДГ в первой мембранной фракции сохраняла неклассическую форму кривой насыщения, а в растворимой части митохондрий приобрела гиперболическую зависимость. Эти результаты предполагают наличие, по крайней мере, двух форм фермента с разной кинетикой реакции. Ранее сообщалось, что очищенный фермент из митохондрий мозга обладал классической кинетикой [9]. Изменение формы кривой насыщения в первой мембранной фракции указывает на приобретение нового свойства ферментов в результате взаимодействия с мембраной.

Изучение кинетических характеристик мМДГ второй мембранной фракции и фосфатного солюбилизата показало, что в обоих случаях фермент проявляет классическую кинетику по NADH (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что с мембраной связаны, по меньшей мере, две формы фермента. Одна форма снимается фосфатным буфером и с ней легко связать проявление S-образной кинетики реакции, вторая буфером не снимается и, также как фермент матрикса, характеризуется классической кинетикой.

По современным представлениям, характер связей мМДГ с митохондриальной мембраной имеет двойную природу. На митохондриях сердца установлена возможность значительного (до 80%) освобождения мембран от мМДГ при обработке фосфолипазой A_2 [13]. Таким же эффектом обладают растворы с высокой ионной силой [13, 14]. Вместе с тем, приводятся данные, полученные также на митохондриях сердца, которые указывают на возможность белок-белковых взаимодействий мМДГ с мембраной [15—18]. Можно полагать, что 20% фермента, которые не

чувствительны к действию фосфолипазы A_2 , ассоциируются с мембраной за счет белок-белковых связей.

В состоянии острого кислородного голодания установлено общее снижение начальных скоростей малатдегидрогеназной реакции практически для всех субмитохондриальных фракций. Кинетика реакции не изменяется в митохондриальной фракции, а также в первой и второй фракциях мембран, хотя K_m и V претерпевают некоторые изменения в сторону снижения. Существенно изменяется в этом состоянии кинетика мМДГ во фракции фосфатного солюбилизата. У солюбилизованного фермента отчетливо проявляется отклонение от классической кинетики реакции, хорошо выполнимой в норме (рис. 2). Эти изменения можно связать с модификацией липидов и увеличением их лабильности в мембране за счет активации ПОЛ—типичной мембранной реакции на гипоксию [19]. Об этом свидетельствуют данные об изменении физико-химических и каталитических свойств мМДГ после обработки фермента фосфолипазой D [20], что связывают с модификацией найденного у мМДГ фосфолипидного компонента (около 2 мкг/мг белка фосфатидилохолина, фосфатидилэтаноламина и кардиолипина). Кроме того, показана модификация свойств фермента при взаимодействии с фосфолипидами [21] и фосфолипидными пузырьками [22]. Изменение свойств фермента фосфатного солюбилизата в представленных данных можно связать с возможным обогащением фермента мембранными липидами и их модификацией.

В пользу изменения процесса ассоциации ферментов с мембранами митохондрий в условиях острого кислородного голодания можно привести также результаты исследований ГК. Установлено, что при снижении суммарной тканевой активности ГК с 12,4 до 2,3 мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин имеет место перераспределение активности фермента между мембранной и солюбилизированной формами. Активность солюбилизованного фермента увеличивается с 0,58 до 1,32, в то время как активность ассоциированного с мембраной фермента снижается с 11,2 до 0,84 мкмоль NADPH/мг белка за 1 мин.

Кинетика малатдегидрогеназной реакции приобретает новые характеристики в ходе адаптивной перестройки метаболизма к гипоксии (рис. 3). Кинетика реакции для митохондриальной фракции и фосфатного солюбилизата у подопытных и контрольных животных существенно не отличается. Вместе с тем, мМДГ второй фракции мембран приобретает отчетливую неклассическую зависимость скорости реакции от концентрации NADH. Это новое качество фермента, ранее не проявлявшееся у мМДГ второй фракции мембран интактных животных. Возникновение нового типа кинетики, свойственного первой мембранной фракции и митохондриям в целом, можно отнести к вероятному усилению белок-липидных взаимодействий в ходе адаптивной перестройки мембранных систем клетки. Известно, что адаптация животных к гипоксии вызывает достоверное повышение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы), а также снижает перекисное окисление фосфолипидов мембран [23].

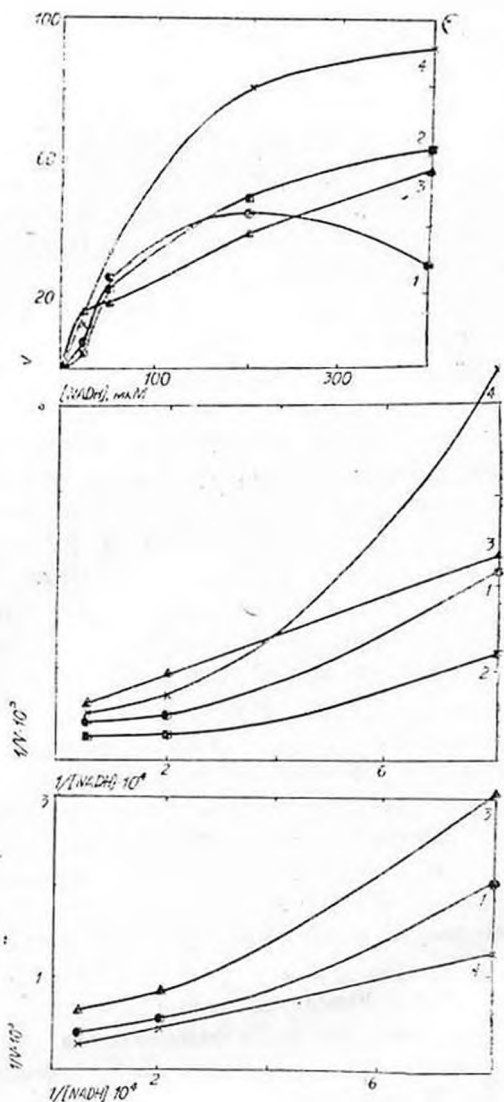


Рис. 1. Зависимость скорости реакции (нмоль NADH/с) от концентрации NADH для мМДГ субклеточных фракций мозга интактных животных. Здесь и на рис. 2, 3: 1—митохондриальная фракция, 2—первая фракция мембран, 3—вторая фракция мембран, 4—фосфатный солюбилизат). Количество белка в пробе—0,01 мг для фосфатного солюбилизата и 0,1 мг для остальных фракций

Рис. 2. Графики зависимости скорости реакции от концентрации NADH в координатах Лайнуивера-Берка для мМДГ субмитохондриальных фракций мозга крыс при гипоксии

Рис. 3. Графики в координатах Лайнуивера-Берка для мМДГ мозга животных, адаптированных к гипоксии

О стабилизации митохондриальных мембран в ходе гипоксической адаптации можно судить также по способности к солюбилизации КК и ГК. Так, для ГК солюбилизация с наружной мембраны митохондрий под действием 0,1 М KCl уменьшается в 4 раза (с 49 до 13% от общей активности митохондриального фермента). Одновременно отмечено увеличение начальных скоростей реакции на малых концентрациях Mg^{2+} -АТР, от сутствие эффекта насыщения фермента субстратом для изученных концентраций. Для КК также показано, что доля фермента, сохраняющего связь с мембраной после обработки 0,2 М фосфатным буфером, увеличивается (с 24 до 69%). Суммарная активность фермента снижена с 0,85 до 0,66 мкмоль креатина/мг белка 1 мин.

Полученные экспериментальные данные, а также результаты, опубликованные другими исследователями, позволяют высказать предположение о том, что митохондрии мозга содержат не менее трех форм мМДГ. Первая матричная форма, мМДГ, локализована в матриксе, где она может быть в виде индивидуального белка и в комплексе с другими ферментами матрикса. Эта форма обладает классической кинетикой реакции окисления NADH, как и очищенный фермент. Вторая форма—фермент, ассоциированный с мембраной за счет белок-белковых взаимодействий, реализация которых, по-видимому, не меняет конформационного состояния мМДГ—она обладает классической кинетикой. Третья форма—фермент, ассоциированный с мембраной за счет белок-липидных взаимодействий. Каталитические свойства мМДГ модифицированы, фермент характеризуется выраженными отклонениями от классической кинетики.

Ассоциация фермента с фосфолипидами мембраны изменяет, по-видимому, конформацию субъединиц димера, что придает мМДГ аллостерические свойства. Эти качества могут трансформироваться в зависимости от состояния фосфолипидов мембраны, что наглядно показано на свойствах малатдегидрогеназы фосфатного солюбилизата в экстремальных условиях гипоксии, а также во второй фракции мембран при адаптивной перестройке метаболизма.

На примере изученных ферментов можно проследить за универсальным механизмом регуляции активности ферментов за счет их взаимодействия с мембранами митохондрий. Изменение свойств фосфолипидов мембран митохондрий при гипоксии ведет к нарушению взаимодействий между ферментами и мембранами. При этом происходит не только перераспределение ассоциированных с мембранами ферментов в пользу увеличения доли свободных форм, но и изменение свойств оставшихся на мембране энзимов. Стабилизация мембран при адаптации к гипоксии, напротив, усиливает взаимодействия ферментов с мембранами, что ведет не только к восстановлению исходных свойств ферментов, но и к возникновению у них новых качеств.

CONTROL OF BRAIN MITOCHONDRIAL ENZYMES BY ALTERED ASSOCIATION WITH MEMBRANES

KHVATOVA E. M., GARCIA A., ZIMIN Yu. V., SEMENOVA T. S.

Kirov Medical School, Gor'ky

The catalytic properties of hexokinase (HK), creatine kinase (CK) and malate dehydrogenase (mMDH) in rat brain mitochondrial and sub-mitochondrial fractions have been investigated. The difference in catalytic properties of soluble and membrane-associated forms has been shown. The solubilization of HK and CK leads to a significant V change but the type of reaction kinetic remains unchanged. mMDH of mitochondria and intact membranes has a characteristically S-shaped kinetics. Treatment of membranes by the phosphate buffer leads to solubilization of a part of mMDH. The enzyme remaining on the membrane, as well as the solubilized mMDH, possess a classical reaction kinetic. Changes in properties of membrane lipids induced by hypoxia disturb the enzyme-membrane interactions. The mitochondrial fraction of HK decreases, and kinetic characteristics of mMDH solubilized by the phosphate buffer are modified. Stabilization of the mitochondrial membrane resulting from adaptation to hypoxia, leads to an increased interaction of CK and HK with the membrane. The amount of the solubilized enzymes decreases, and kinetic characteristics of mMDH remaining on the membrane after phosphate treatment changed. These results lead to a view, that mMDH is present in mitochondrial in three forms: (1) the matrix-associated enzyme; (2) the enzyme associated with the membrane by protein-protein interactions; and (3) the enzyme associated with the membrane by protein-lipid interactions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kircova M., Russanov E. *Acta physiol et pharmacol. Bulg.*, v. 5, № 4, p. 57—62, 1979.
2. Липская Т. Ю., Молокова Е. В.—В кн.: Биохимия и биофизика мышц, с. 118—129, М., Наука, 1983.
3. Курганов Б. И.—В кн.: Физико-химические проблемы ферментативного катализа (под ред. Ю. М. Торчинского), с. 97—103, М., Наука, 1984.
4. Khvatova E. M., Garcia A., Zimin Y. V.—In: Abstracts of the Sixth ESN General Meeting in Prague, p. 431, 1986.
5. Хватова Е. М.—В кн.: Всесоюзный симпозиум по медицинской энзимологии, тезисы докладов (под ред. С. С. Дубова), с. 34—35, М., 1986.
6. Fonyo A., Somogyi J. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, v. 18, № 3, p. 191—198, 1960.
7. Хватова Е. М., Доведова Е. Л., Михалева И. И. *Нейрохимия*, т. 6, № 1, с. 57—63, 1987.
8. Аызлова С. Н., Тааме Н., Стефанов В. Е., Южнива Т. А.—В кн.: Структурные основы и регуляция биологической подвижности, с. 108—111, М., Медицина, 1980.

9. Хвостова Е. М., Гарсия А. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 270—277, 1986.
10. Wilson I. E. Curr. Top. Cell. Regul., v. 16, № 4, p. 2—54, 1980.
11. Wilson I. E. Handbook of Neurochemistry, v. 4, p. 151—172, 1983.
12. Sprengers E. D., Koenderman A. H. L., Staal G. E. I. Biochim et biophys. acta, v. 755, № 1, p. 112—118, 1983.
13. Comte J., Gautheron D. Biochemie, v. 60, p. 1299—1305, 1973.
14. Elduque A., Casado F., Cortes A., Bozal J. Int. J. Biochem., v. 14, № 3, p. 221—229, 1982.
15. Consiglio E., Varrone S., Covelli I. Eur. J. Biochem., v. 17, p. 403—414, 1970.
16. Passarella S., Marra E., Doonan S., Quagliariello E. Biochem. J., v. 210, № 1, p. 207—214, 1983.
17. Passarella S., Marra E., Atlante A., Quagliariello E.—In: Achiev. Perspect. Mitoch. Res. Proc. Int. Symp. (ed. by E. Quagliariello), v. 1, p. 357—364, Elsevier, Amsterdam, 1985.
18. Moore G. E., Gadol S. M., Robinson J. B. Jr., Srere P. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 121, p. 612—618, 1984.
19. Джафаров А. И., Магомедов Н. М., Кулиева Э. М., Нейман-заде Н. К., Керимов Р. Ф., Мамедханлы Т. А., Хасасва Э. Г., Чогошвили А. Г. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 433—435, 1985.
20. Suleiman S. A. Indian J. Biochem. Biophys., v. 20, № 5, p. 276—279, 1983.
21. Dodd G. H. Eur. J. Biochem., v. 33, № 3, p. 418—427, 1973.
22. Webster K. A., Freeman K. B., Ohki S. Biochem. J., v. 186, № 1, p. 227—233, 1980.
23. Меерсон Ф. З. Адаптация, стресс и профилактика, 274 с., М., Наука, 1981.

Поступила 13. IV 1986