

2010



*New Information Technologies in Medicine,  
Biology, Pharmacology and Ecology*

**Труды международной  
конференции “Новые  
информационные  
технологии в медицине,  
биологии, фармакологии и экологии”**



## **ТРУДЫ**

**XVIII МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
И ДИСКУССИОННОГО НАУЧНОГО КЛУБА**

**Новые информационные технологии в медицине,  
биологии, фармакологии и экологии**

**ТОМ 2**

**IT + M&Ec`2010**

**Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2010 года**

**New Information Technology in Medicine,  
Pharmacology, Biology and Ecology**

УДК: 577.152.1

## Н.5. ВЛИЯНИЕ pH НА КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРО-ГЕНАЗЫ

Островцова С.А.<sup>1</sup>, Письменецкая И.Ю.<sup>2</sup>, Мери А.Н.<sup>3</sup>

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»<sup>1</sup>  
Днепропетровская государственная медицинская академия, ул. Дзержинского<sup>2</sup>  
Manchester University, UK*

## H.5. THE EFFECT OF PH ON KINETIC PROPERTIES OF BOVINE HEART 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE

Astrautsova S.A.<sup>1</sup>, Pismenetskaya I.U.<sup>2</sup>, Merry A.H.<sup>3</sup>

*Grodno Medical State University<sup>1</sup>  
Dnipropetrovsk State Medical Academy<sup>2</sup>  
University of Manchester, UK<sup>3</sup>*

2-oxoglutarate dehydrogenase (OGD) was obtained by dissociation of 2-oxoglytarate dehydrogenase complex purified from bovine heart into separate enzyme components. Studies on the kinetic properties of OGD at pH range from 6 to 10 have shown the appearance of allosteric behaviour in catalysis by two types of active sites of the enzyme. The appearance of positive cooperativity in the active sites interactions has been shown at pH range from 4 to 5. Negative cooperativity has been found at pH values higher then 8.

2-оксоглутаратдегидрогеназа (ЕС 1.2.4.2) – первый компонент мультиферментного оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДК) катализирует окислительное декарбоксилирование 2-оксоглутарата (2-ОГ), реакцию, лимитирующую протекание каскада реакций цикла трикарбоновых кислот (1). Изучение кинетики оксоглутаратдегидрогеназной реакции показало, что фермент подвержен целому ряду регуляторных воздействий со стороны продуктов и субстратов реакции, адениновых нуклеотидов, ионов фосфора и др. (4, 5). Кроме того, анализ кинетического поведения оксоглутаратдегидрогеназы, выделенной из различных источников, выявил проявления аллостерического поведения фермента. Ранее нами было показано наличие в составе димерной оксоглутаратдегидрогеназы двух типов активных центров, отличающихся сродством к субстрату. Активные центры первого типа быстро взаимодействовали с субстратом, а центры второго типа – связывали субстрат значительно медленнее [3]. При этом выявлено регуляторное воздействие субстрата на оксоглутаратдегидрогеназу: 2-оксоглутарат в случае преинкубации его с ферментом значительно снижает скорость ферментативной реакции, катализируемой ее быстро реагирующими активными центрами, вызывая отрицательные кооперативные взаимодействия между ними [3].

Целью данного исследования было изучение влияния pH на кинетику ферментативной реакции, катализируемой оксоглутаратдегидрогеназой, выделенной из сердца быка по методу, описанному ранее [2]. Ферментативную активность измеряли спектрофотометрически, регистрируя скорость восстановления искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) при 600 нм.

Влияние pH на активность ОГД выявляли при варьировании концентраций субстрата (от 10 до 50  $\mu\text{M}$ ) и оптимальных для ферментативной реакции условиях. Диапазон использованных значений pH был выбран с учетом возможности регистрации достоверных данных по выявлению активности фермента. В ходе анализа зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации 2-оксоглутарата с использованием двойных обратных координат были получены величины полунасыщения субстратом ( $[S]_{0.5}$ ) при различных значениях pH (рис. 1).

На рисунке видно, что в области низких значений pH, от 4 до 5, сродство обоих типов активных центров ОГД к субстрату практически не отличается. Однако по мере роста pH начинает увеличиваться сродство к субстрату быстро реагирующих центров (рис. 1-1), в то время как эффективность связывания субстрата медленно реагирующими центрами снижается (рис. 1-2).

При pH равно 7 величины  $[S]_{0.5}$ , вычисленные для двух типов активных центров, отличаются более чем в 10 раз. С дальнейшим ростом pH эффективность взаимодействия первого типа активных центров практически не меняется, оставаясь высокой вплоть до pH 9, при этом второй тип активных центров начинает связывать субстрат более активно, о чем свидетельствуют более низкие значения величин полунасыщения субстратом при pH 7.6 – 9.0.

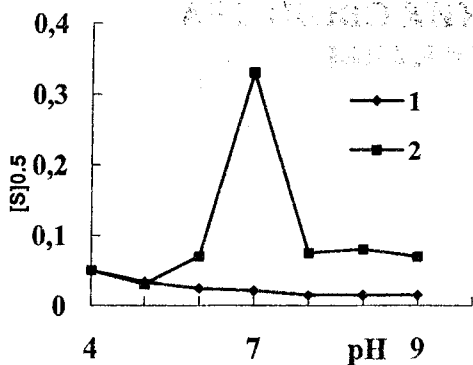


Рис.1 Величины  $[S]_{0.5}$  при различных значениях pH: 1 – центры с высоким сродством к субстрату, 2 – центры с низким сродством к субстрату.

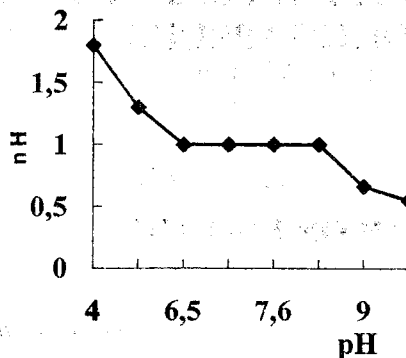


Рис.2. Значения величины коэффициента Хилла ( $n_H$ ) при различных pH.

Изучение полученных данных в координатах Хилла выявило проявления признаков кооперативности 2-оксоглутарат - связывающих центров. В случае протекания реакции при pH среды 4.0 – 6.0 отмечены положительные кооперативные взаимодействия между активными центрами фермента. Коэффициент Хилла был равен 1.8 при pH 5 (рис.2).

В диапазоне значений pH 6.5 – 8 фермент не проявлял отклонений от гиперболической кинетики, а при pH выше 8.0 зарегистрировано появление отрицательной кооперативности (коэффициент Хилла был равен 0.66 при pH 9.0). Изменения кинетического поведения оксоглутаратдегидрогеназы при варьировании pH среды, в которой происходит ферментативная реакция, указывает на то, что фермент реагирует на изменение степени протонирования функционально важных групп, расположенных в его активных центрах, предполагая наличие медленных конформационных переходов в молекулах ОГД во время каталитического акта. Не исключено также влияние pH на взаимодействия между двумя субъединицами ОГД, что может отражаться на связывании субстрата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Cooney, G.J., Taegtmeier, H & Newsholme, E.A. Tricarboxylic acid cycle flux and enzyme activities in the isolated rat heart//*Biochem.J.*- 1981.-V.200. - P.701-703.
2. Ostrovtsova S.A. Inhibition of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by free fatty acids//*Medical Sci. Res.* 1996.-V.24.-N9. - P.625-627.
3. Ostrovtsova S.A. Chemical modification of lysine and arginine residues of bovine heart 2-oxoglutarate dehydrogenase: effect on the enzyme activity and regulation//*Acta Biochimica Polonica.*- 1998.- V. 45.- N4.- P.1031-1036.
4. Salud Rodríguez-Zavala J., J P. Pardo, R.Moreno-Sánchez. Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex by inorganic phosphate,  $Mg^{2+}$ , and other effectors. // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* - 2003. - V.379.- N1.-P.78-84.
5. Strumilo S. A. Often ignored facts about the control of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex// *Biochemistry and Molecular Biology Education.* - 2005. - V.33.- N4.- P284-287.