

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н.БАХА

На правах рукописи

ЛЮБАРЕВ АРКАДИИ ЕФИМОВИЧ

УДК 577.121.4.012.5

НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
НА ПРИМЕРЕ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

03.00.04 - биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 1992

Работа выполнена в Научно-производственном объединении
"Витамины"

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
КУРГАНОВ Б.И.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
НАГРАДОВА Н.К.
доктор биологических наук, профессор
ЗВЯГИЛЬСКАЯ Р.А.

Ведущая организация - Институт теоретической и
экспериментальной биофизики РАН

Защита диссертации состоится "___" _____ 199_ года в ___.___
на заседании специализированного совета К 002.96.01
в Институте биохимии им. А.Н.Баха РАН по адресу:
117071, Москва, Ленинский просп., 33

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологической
литературы РАН по адресу: Москва, Ленинский просп., 33

Автореферат разослан "___" _____ 1992 года

Ученый секретарь
специализированного совета
доктор биологических наук



МОЛЧАНОВ М.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы одной из основных тенденций развития биохимии является переход от изучения отдельных метаболических реакций и изолированных биомолекул к исследованию сложных внутриклеточных систем. Становится очевидным, что ферменты в клетке находятся в условиях, сильно отличающихся от разбавленных растворов, в которых они обычно изучаются *in vitro* (Фридрих, 1986). В частности, многие экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ферменты, функционально объединенные в едином метаболическом пути, способны образовывать упорядоченные мультиферментные ансамбли, называемые метаболонами (Srere, 1985, 1987).

Характерными чертами метаболонов являются их тесная ассоциация с субклеточными структурами, а также высокая степень лабильности, что препятствует их обнаружению и выделению. Поэтому важную роль в изучении надмолекулярной организации метаболических систем может сыграть теоретический подход, заключающийся в создании пространственных моделей метаболонов (Курганов, Сугробова, Мильман, 1986). Такие теоретические построения нацеливают экспериментаторов на исследования в определенных направлениях, они позволяют лучше понять природу, механизмы сборки, функционирования и регуляции мультиферментных ансамблей.

Одним из метаболических путей, для которых получено множество данных, свидетельствующих в пользу существования метаболонов, является ЦТК¹. Этот путь занимает центральное место в

¹Принятые сокращения: ААТ – аспаратаминотрансфераза, Ак – аконитаза, ГАМК-Т – ГАМК-трансаминаза, ДЯПА – дегидрогеназа янтарного полуальдегида, ИЦДГ – изоцитратдегидрогеназа (NAD-зависимая), КГДГ – α -кетоглутаратдегидрогеназа, КГДГК – α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, ЛАДГ – липоамиддегидрогеназа, МДГ – малатдегидрогеназа, НДФК – нуклеозиддифосфаткиназа, ПДГК – пируватдегидрогеназный комплекс, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, СТК – сукцинаттиокиназа, ТС – транссукцинилаза, ФЕПМК – фосфоенолпируваткарбоксикиназа, Фум – фумараза, ЦС – цитратсинтаза, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

метаболизме большинства живых организмов, интегрируя пути биосинтеза и распада аминокислот, липидов, углеводов и других биомолекул и непосредственно связывая их с процессами преобразования энергии в митохондриях. Изучение регуляции ЦТК и энергетического метаболизма в целом является одной из важнейших задач биохимии, поскольку дает ключ к решению большого числа проблем медицины, сельского хозяйства и биотехнологии.

Целью работы явилось теоретическое исследование надмолекулярной организации ЦТК.

В задачи работы входило:

1. Дать общую характеристику понятия "метаболон" и определить общие принципы сборки метаболонов.
2. Построить пространственную модель комплекса ферментов ЦТК.
3. На основе анализа этой модели и литературных данных дать анализ принципов функционирования и регуляции метаболона.

Научная новизна. Впервые дана развернутая характеристика понятия метаболон как специфического уровня материальной организации биологических систем. Сформулированы общие принципы сборки метаболонов. Разработан метод компьютерного моделирования мультиферментных ансамблей.

Впервые построена пространственная модель комплекса ферментов ЦТК. Показана возможность вхождения в метаболон ЦТК ферментов, катализирующих сопряженные с ЦТК реакции: ААТ, НДФК, ФЕПКК, ГАМК-Т и ДЯПА.

Практическое значение работы. Настоящее исследование может служить теоретической базой для разработки новых подходов поиска лекарственных средств метаболической терапии. Предложенный в данной работе метод может быть использован при построении моделей метаболонов для различных метаболических систем.

Результаты предложенной работы используются при преподавании биохимии в Одесском государственном университете и Нижегородском медицинском институте, включены в учебник А.Я.Розанова "Механизмы регуляции биокатализа" для биологических специальностей вузов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на IV конференции молодых ученых и специалистов ВНИВИ (Москва, 1986), II рабочем совещании по биомолекулярной электронике

(Пушино, 1986), Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена" (Пушино, 1986), V Всесоюзном рабочем совещании "Жидкокристаллическое состояние в биологических системах и их моделях" (Пушино, 1986), V Всесоюзной научной конференции "Проблемы и перспективы ферментативного катализа" (Москва, 1987), Международном симпозиуме "Molecular organization of biological structures" (Москва, 1989).

Объем работы. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав (первая глава – литературный обзор), заключения, выводов и приложений. Список литературы содержит 250 источников (66 – отечественные и 184 – зарубежные). Работа иллюстрирована 2 таблицами и 13 рисунками.

МЕТАБОЛОН КАК УРОВЕНЬ МАТЕРИАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

В первой главе обсуждаются литературные данные о пространственно-временной организации клеточного метаболизма. Отмечается высокая степень внутриклеточной организации. Приводятся многочисленные данные об адсорбции ферментов клеточными структурами и о фермент-ферментных взаимодействиях. При обсуждении временной организации клеточного метаболизма особое внимание уделено регуляторному аспекту. Отмечено, что внутриклеточная регуляция организована в пространстве и времени.

Отдельный раздел посвящен анализу литературных данных о пространственно-временной организации ЦТК. Эти данные свидетельствуют о существовании в митохондриях сердца и других органов млекопитающих надмолекулярного комплекса, объединяющего ферменты цикла.

Обсуждаются теоретические представления о пространственно-временной организации клеточного метаболизма. Изложена развивающаяся с конца 70-х гг. концепция структурно организованных мультиферментных систем. В рамках этой концепции Srere в 1985 г. ввел термин "метаболон", которым он обозначил "надмолекулярный комплекс ферментов, катализирующих последовательные стадии метаболического пути, и структурных элементов клетки". Этот термин используется при дальнейшем изложении.

Во второй главе дается характеристика понятия "метаболон". Определено место метаболона в структурной и функциональной ие-

рархии биологических систем: метаболон относится к уровню над-молекулярных структур, который расположен между уровнями биомакромолекул и клеточных органоидов. Функция метаболона состоит в реализации определенного метаболического процесса, состоящего из совокупности метаболических реакций. Такие совокупности принято называть метаболическими системами. Таким образом, метаболон – это структура, объединяющая ферменты метаболической системы.

Важным свойством метаболона, отраженным и в его определении, является то, что метаболоны ассоциированы с клеточными структурами. Якорные белки, ответственные за ассоциацию метаболона со структурой, сами могут входить в состав метаболона, как например, СДГ в состав метаболона ЦТК.

ПРИНЦИПЫ СБОРКИ МЕТАБОЛОНОВ

Общие принципы. Метаболон формируется на биологических подложках, в роли которых могут выступать биологические мембраны, цитоскелет, структурные белки мышц и т.п. Подложка содержит белок, который выполняет якорные функции, при этом якорный белок и "заякоренный" комплекс образуют единую систему.

Одной из важнейших характеристик метаболона является его симметрия, которая должна соответствовать симметрии той структуры, на которой метаболон формируется. На основании анализа данных по структуре интегральных мембранных белков мы пришли к выводу, что преобладающими среди метаболонов должны быть структуры с осью симметрии третьего порядка.

Фермент, который связывается с якорным белком подложки, образует "ядро" метаболона и играет ключевую роль в формировании комплекса. Для этого фермента мы сформулировали следующие требования.

а) Молекула фермента должна иметь наибольшие размеры среди ферментов метаболической системы, то есть иметь наибольшую поверхность.

б) Фермент должен быть способен адсорбироваться на мембране, сохраняя при этом каталитическую активность.

в) Фермент должен иметь ось симметрии третьего порядка или собираться в тримеры в адсорбированном состоянии.

г) Фермент должен проявлять способность к самоассоциации. Эта способность означает наличие у фермента "липких концов", которые в условиях *in vivo* могут насыщаться путем взаимодействия с якорным белком подложки и с другими ферментами метаболической системы.

д) Фермент должен быть чувствителен к действию "вторых посредников", так как он образует вместе с якорным белком подложки центр управления метаболона.

Для определения взаимного расположения ферментов в метаболоне нами предложены следующие принципы, соблюдение которых обеспечивает конвейерную передачу метаболитов от одного фермента к другому.

1. Ферменты, которые катализируют реакции, следующие одна за другой в метаболическом пути, должны занимать соседние позиции в комплексе.

2. Ферменты, использующие и регенерирующие NAD, АТР, CoA и другие коферменты, должны находиться в контакте друг с другом. В ряде случаев целесообразно, чтобы все ферменты, использующие один кофермент, были расположены рядом.

3. Ферменты, активность которых регулируется интермедиатами данной метаболической системы, должны располагаться в метаболоне таким образом, чтобы обеспечить возможность реализации этого регуляторного механизма.

При построении модели должны учитываться также экспериментальные данные о взаимодействии ферментов, не связанных общими метаболитами. Не менее информативны, очевидно, и данные об отсутствии контактов между определенными ферментами.

Особенности сборки метаболона цикла трикарбоновых кислот. ЦТК связан со множеством метаболических процессов. Наиболее тесно с ЦТК ассоциированы реакции, катализируемые ААТ, НДФК, ФЕПКК и ферментами ГАМК-шунта. В отличие от ЦТК эти метаболические процессы характеризуются органной, тканевой и видовой специфичностью. Анализ литературных данных показывает, что для митохондрий сердца характерно сопряжение между гуанилат-зависимой СТК и НДФК. Для митохондрий печени целесообразно предполагать наличие сопряжения между СТК и GTP-зависимой ФЕПКК. В митохондриях мозга преобладает, по-видимому, аденилат-зависимая СТК, в то же время ферменты ЦТК сопряжены в них с ГАМК-Т и

ДЯПА.

Таким образом, метаболон ЦТК в разных органах должны иметь различия. В соответствии с этим мы предприняли попытку предложить три варианта гипотетической структуры метаболона ЦТК, которые отличаются друг от друга лишь включением различных дополнительных ферментов: во всех вариантах в состав комплекса входят все ферменты ЦТК и ААТ, в первом варианте комплекс включает дополнительно НДФК, во втором - ФЕПМК и в третьем - ГАМК-Т и ДЯПА.

Ядром метаболона ЦТК служит КГДГК, сердцевину которого составляют 24 субъединицы ТС, образующие структуру куба. Поскольку длина диагонали куба (20 нм, Tanaka et al., 1972) соответствует среднему расстоянию между внутренними поверхностями внутренней мембраны митохондрий сердца (15-30 нм по данным Srere, 1985), мы пришли к выводу, что ТС располагается так, что две противоположные вершины куба касаются противоположных поверхностей мембраны; при этом ось симметрии третьего порядка перпендикулярна этим поверхностям. Шесть молекул ЛАДГ расположены на гранях куба и также касаются одной из поверхностей мембраны, а шесть молекул КГДГ прикреплены к тем ребрам куба, которые не касаются мембраны. Таким образом, КГДГК имеет симметрию, относящуюся к точечной группе D_3 . Вокруг этой структуры и должны располагаться другие ферменты, входящие в метаболон ЦТК.

При построении структурной модели метаболона ЦТК мы приняли, что симметрия метаболона относится, как и симметрия адсорбированного КГДГК, к точечной группе D_3 . Следовательно, комплекс должен включать по шесть молекул каждого фермента. На основании экспериментальных данных о фермент-мембранных взаимодействиях мы постулировали, что большинство ферментов комплекса располагается в примембранном слое. Лишь для ААТ и ГАМК-Т не был предусмотрен контакт с мембраной.

Для обеспечения конвейерной передачи интермедиатов и коферментов были предусмотрены контакты между ферментами, занимающими соседние позиции в метаболических цепочках. Помимо этого, учитывались экспериментальные данные о взаимодействии ЦС с Фум (Veeskman & Kanarek, 1981) и об отсутствии взаимодействия между ААТ и Фум (Veeskman & Kanarek, 1981), а также между ЦС и КГДГК (Porraszy et al., 1983).

КОМПЬЮТЕРНАЯ ПРОГРАММА ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛИ МЕТАБОЛОНА ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Как отмечалось в предыдущей главе, мы сочли возможным предложить три варианта метаболона ЦТК. Поскольку эти варианты отличаются лишь одним-двумя ферментами, а расположение остальных не должно меняться, целесообразно было создать единую программу построения всех вариантов.

Для каждого варианта программа должна была решить следующие задачи:

1. Определить расположение всех ферментов в комплексе.
2. Определить все фермент-ферментные контакты в комплексе.
3. Иметь возможность вывода на экран дисплея и принтер различных проекций комплекса.

В качестве исходных данных взяты:

Состав комплекса:

- а) основная часть, общая для всех вариантов - 24 молекулы ТС и по 6 молекул ЦС, Ак, ИЦДГ, КГДГ, ЛАДГ, СТК, Фум, МДГ, ААТ;
- б) вариант 1 (сердце) - дополнительно 6 молекул НДФК;
- в) вариант 2 (печень) - дополнительно 6 молекул ФЕПКК;
- г) вариант 3 (мозг) - дополнительно по 6 молекул ГАМК-Т и ДЯПА.

Симметрия комплекса - точечная группа D_3 (одна ось симметрии третьего порядка z и три оси симметрии второго порядка).

Высота комплекса вдоль оси z ограничена двумя поверхностями мембраны, перпендикулярными этой оси.

Фермент-ферментные и фермент-мембранные контакты приняты на основании принципов сборки метаболона и литературных данных.

Поскольку геометрия большей части ферментов, входящих в комплекс, остается неизвестной, для удобства и простоты было принято, что большинство ферментов представляют сферические частицы. Радиус сфер был определен исходя из молекулярных масс ферментов на основании данных о корреляции между молекулярной массой и радиусом белковых глобул (Frigon et al., 1983). Пять ферментов (КГДГ, ААТ, НДФК, ГАМК-Т, а также димеры ТС) представлены в виде овалоидов вращения (ограниченных двумя полусферами и цилиндрической поверхностью), объем которых равен объему сферы, вычисленной исходя из молекулярной массы фермента.

Мы приняли следующую последовательность построения комплек-

са. Вначале строится кубическая сердцевина, образуемая 24 молекулами (12 димерами) ТС. Затем размещаются два других компонента КГДК - КГДГ и ЛАДГ. Далее присоединяются другие ферменты ЦТК в следующем порядке: ИЦДГ, СТК, Фум, МДГ, ЦС, Ак, после них присоединяется ААТ. Далее, в зависимости от варианта присоединяется либо НДФК, либо ФЕПКК, либо ДЯПА и ГАМК-Т.

Программа написана нами на языке Бейсик (расширенная версия) для компьютера Правец-16 (Болгария), совместимого с компьютерами IBM PC (использованный язык совместим с языком Basic фирмы Microsoft). Программа состоит из общей части и трех блоков: блока определения расположения молекул, блока определения контактов между ферментами и блока вывода проекций комплекса. Листинг программы приведен в Приложении 1.

Блок вывода проекций комплекса обеспечивает вывод на экран дисплея проекций сконструированной модели комплекса как на плоскость, перпендикулярную оси z (горизонтальная проекция), так и на любую плоскость, параллельную оси z (фронтальная или профильная проекции), а также вывод трех проекций одновременно в виде эпюра. При необходимости выведенное на экран изображение может быть скопировано на принтере с помощью клавиши PrtSc (пример такого изображения приведен в Приложении 2).

Вывод проекций может быть осуществлен в двух вариантах. В одном случае проекции молекул ферментов изображаются в виде окрашенных кругов или овалов. В другом варианте очерчиваются с помощью соответствующих линий лишь края кругов и овалов, которые должны быть видны на проекции.

Работа программы организована в форме диалога компьютера с пользователем. При ее запуске вначале работает головная программа блока определения расположения молекул, рассчитывая координаты молекул ферментов, общих для трех вариантов комплекса. Затем пользователю задается вопрос: какой из трех вариантов он бы хотел рассчитать? После ответа рассчитываются координаты молекул ферментов, специфичных для данного варианта.

После окончания расчета пользователю предлагается на выбор: определение контактов одного из ферментов, определение контактов всех ферментов, вывод изображения комплекса. Если пользователь выбирает вывод изображения, то далее предлагаются варианты: в окрашенном или неокрашенном виде, затем - три проекции

или одна, в последнем случае - горизонтальная или профильная проекции.

После выполнения каждой операции пользователь имеет возможность вернуться к одному из предыдущих меню и заказать другой вариант изображения или рассчитать другой вариант комплекса.

ГИПОТЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Анализ структуры. Предложенную нами структуру комплекса ферментов ЦТК можно представить в виде гексамера из шести идентичных асимметричных субъединиц. Каждая асимметричная субъединица содержит четыре мономера ТС, два мономера КРДГ, по одной молекуле всех остальных ферментов и якорный белок.

Три варианта асимметричной субъединицы метаболона изображены на рис. 1 - 3. Общий вид одного из вариантов комплекса показан

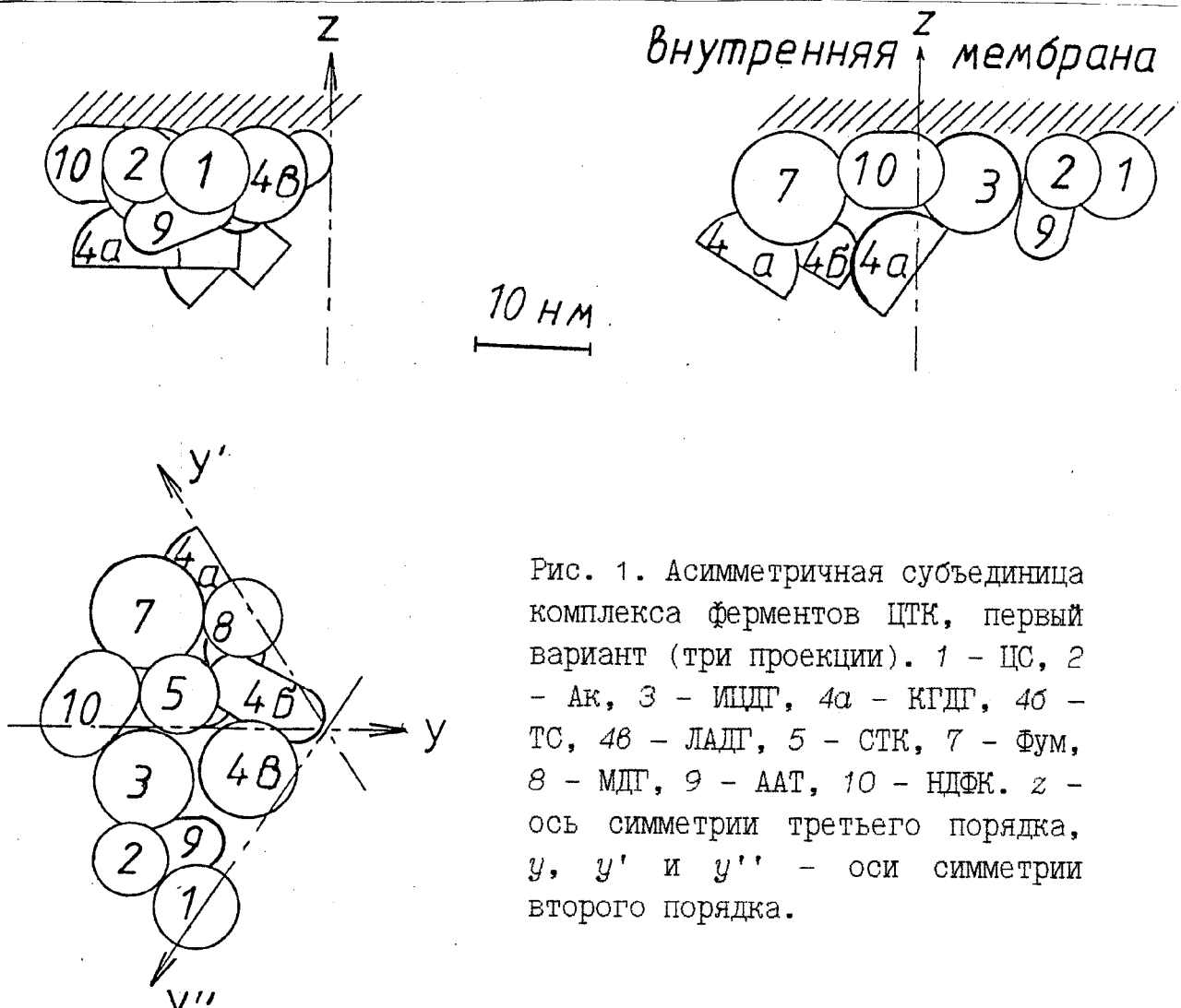


Рис. 1. Асимметричная субъединица комплекса ферментов ЦТК, первый вариант (три проекции). 1 - ЦС, 2 - Ак, 3 - ИЦДГ, 4а - КРДГ, 4б - ТС, 4в - ЛАДГ, 5 - СТК, 7 - Фум, 8 - МДГ, 9 - ААТ, 10 - НДФК. z - ось симметрии третьего порядка, y , y' и y'' - оси симметрии второго порядка.

на рис. 4. Комплекс "зажат" между противоположными поверхностями внутренней мембраны, при этом мембраны касаются все ферменты, за исключением КГДГ, ААТ и ГАМК-Т. В качестве якорных белков, ответственных за сборку комплекса ферментов ЦТК на мембране, выступают интегральные белки внутренней мембраны митохондрий, в том числе СДГ. Высота комплекса вдоль оси симметрии третьего порядка составляет 20 нм, диаметр комплекса 50 нм. Молекулярная масса (без учета СДГ) составляет $8 \cdot 10^6$ Да.

Расчет показывает, что концентрация белка в объеме, занимаемом комплексом, равна 45%. По данным Srere (1985) средняя концентрация белка в матриксе митохондрий составляет примерно 40%. Таким образом, метаболон должен иметь белковое окружение с такой же плотностью, как и внутри комплекса. И в этом, видимо, причина того, что комплекс не виден на электронно-микроскопических снимках.

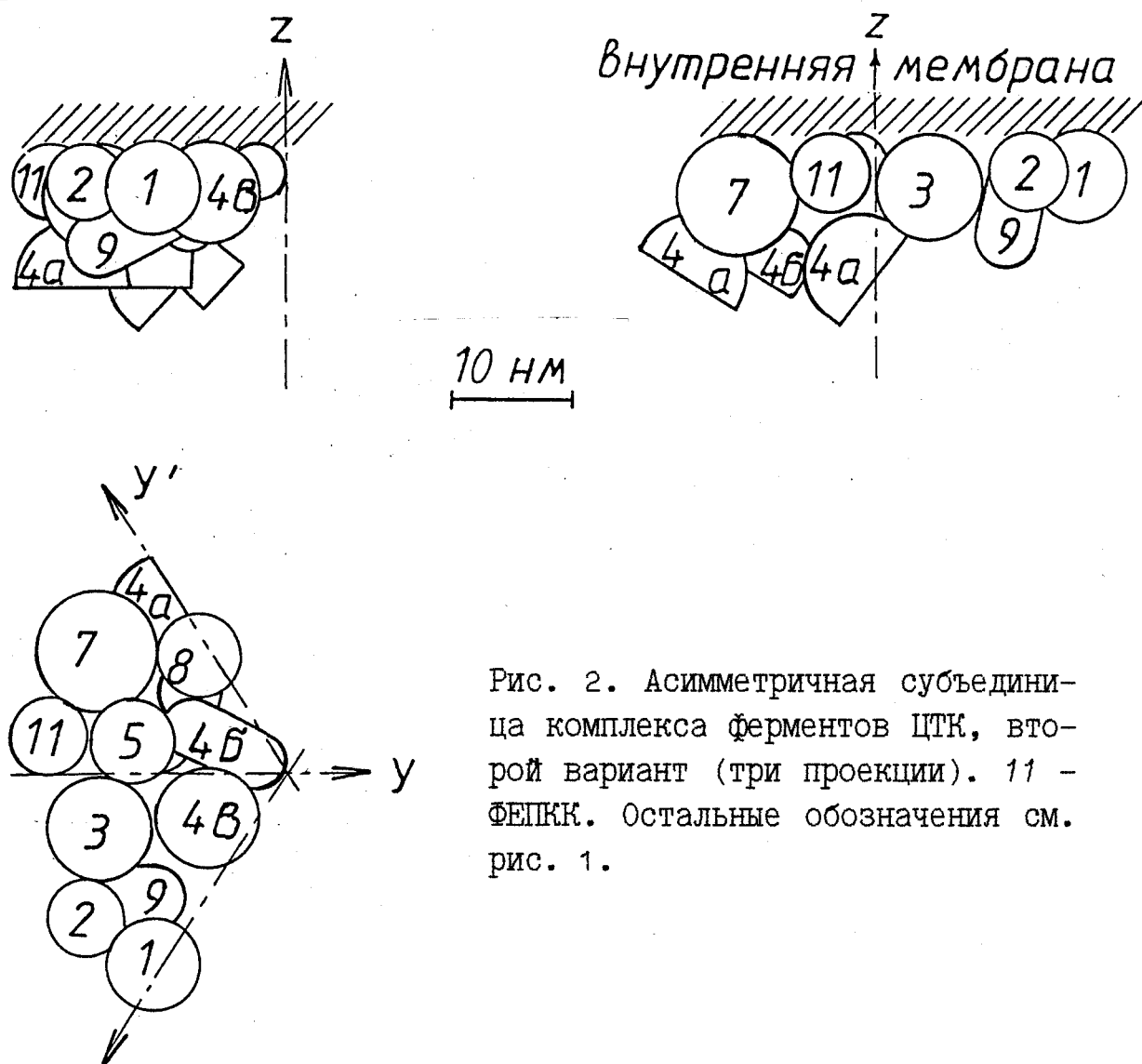


Рис. 2. Асимметричная субъединица комплекса ферментов ЦТК, второй вариант (три проекции). 11 - ФЕПМК. Остальные обозначения см. рис. 1.

Экспериментальные данные в пользу предложенной модели. Одним из главных свидетельств в пользу существования метаболонов являются экспериментальные данные о белок-белковых взаимодействиях между ферментами одной метаболической системы. Однако, такая информация получена преимущественно для пар ферментов, занимающих соседние позиции в метаболическом пути и связанных общими метаболитами. Возможности взаимодействия между ферментами, которые не связаны общими метаболитами, почти не изучались. Единственное исключение - работа Веекманс & Канарек (1981), в которой было показано взаимодействие ЦС с Фум и отсутствие такого взаимодействия между Фум и ААТ.

Упомянутые экспериментальные данные были использованы при построении модели метаболона ЦТК. С другой стороны, тот факт, что сконструированная модель согласуется с этими данными, говорит в пользу реальности модели. Следует также отметить, что не-

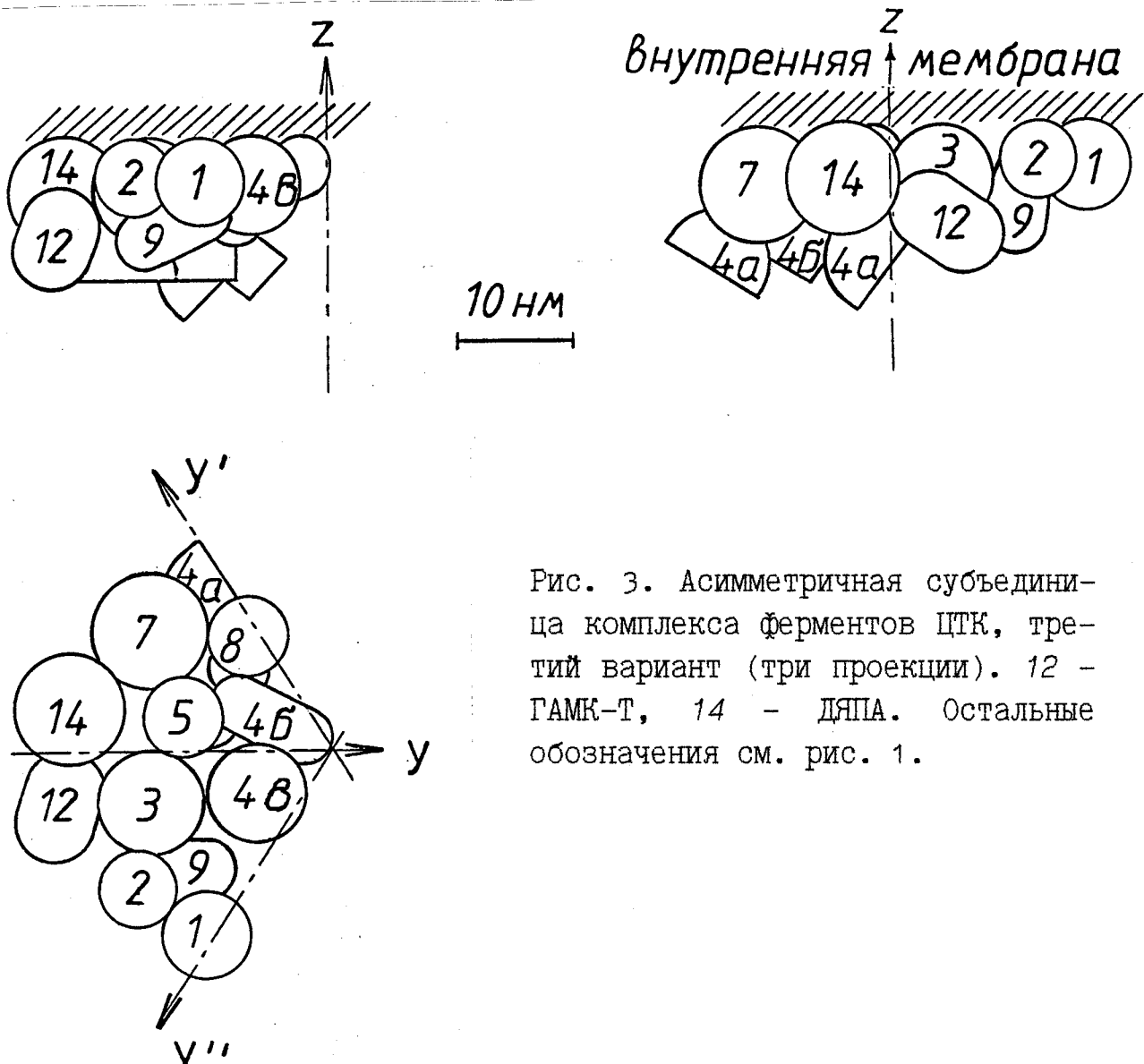


Рис. 3. Асимметричная субъединица комплекса ферментов ЦТК, третий вариант (три проекции). 12 - ГАМК-Т, 14 - ДЯПА. Остальные обозначения см. рис. 1.

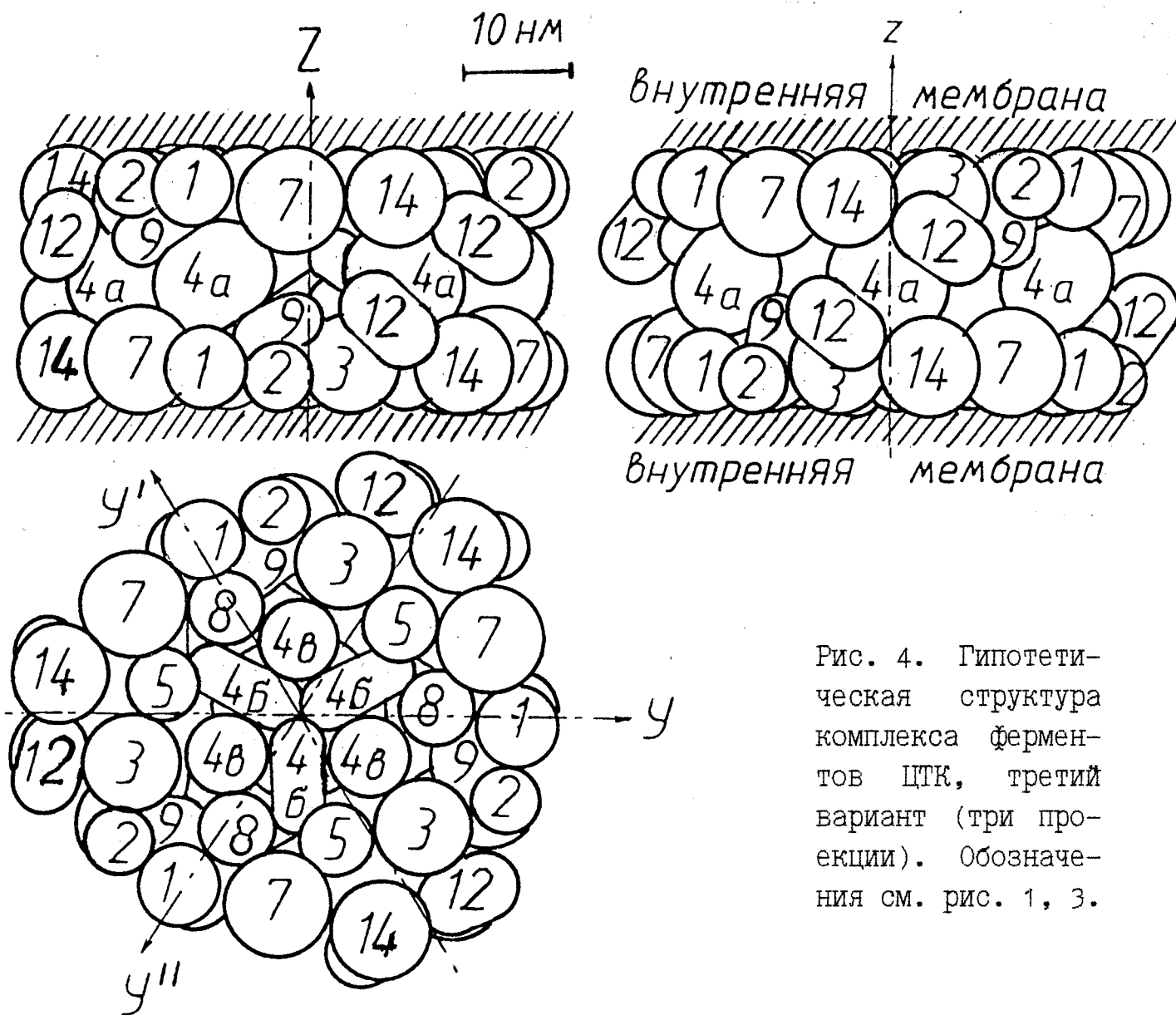


Рис. 4. Гипотетическая структура комплекса ферментов ЦТК, третий вариант (три проекции). Обозначения см. рис. 1, 3.

которые из упоминаемых сведений о фермент-ферментных взаимодействиях (Tyiska et al., 1986; Porpaczy et al., 1987; Kadrmaz et al., 1991) были опубликованы уже после того, как был создан первый вариант нашей модели. В то же время, возможность контактов для большинства пар ферментов рассматриваемой метаболической системы не проверялась. Такие исследования были бы весьма полезны для проверки предложенной модели.

В таблице 1 суммирована теоретическая и экспериментальная информация о парных контактах обсуждаемых ферментов. Знаком "+" помечены пары, для которых модель предусматривает контакт, знаком "-" - пары, для которых контакт не предусматривается. Пары со знаком "+" можно разделить на три категории. Первая - пары,

для которых наличие белок-белкового взаимодействия подтверждено экспериментально. Вторая - пары, для которых наличие контакта экспериментально не подтверждено, но такой контакт предсказывается на основании представлений о конвейерном (или "эстафетном") механизме передачи метаболитов. Третья категория - пары ферментов, контакт между которыми предсказывается на основании построенной модели метаболона ЦТК. В этом случае белок-белковое взаимодействие не обусловлено необходимостью прямой передачи метаболита от одного активного центра к другому, а выполняет структурную роль, стабилизируя комплекс. Проверка возможности таких контактов была бы наиболее интересна, и положительный результат мог бы быть наилучшим свидетельством в пользу верности предложенной модели.

Таблица 1

Белок-белковые контакты в метаболоне ЦТК

№		1	2	3	4а	4б	4в	5	7	8	9	10	11	12	14
1	ЦС	-	(+)	-	(-)	(-)	(-)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
2	Ак	(+)	-	{+}	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3	ИЦДГ	-	{+}	-	(+)	-	+	+	-	-	+	+	-	{+}	-
4а	КГДГ	(-)	-	(+)	-	(+)	(-)	-	+	-	{+}	-	-	-	+
4б	ТС	(-)	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-
4в	ЛАДГ	(-)	-	+	(-)	(+)	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	СТК	-	-	+	-	(+)	-	-	+	-	-	(+)	{+}	-	-
7	Фум	(+)	-	-	+	-	-	+	-	(+)	(-)	+	+	-	+
8	МДГ	(+)	-	-	-	-	+	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-
9	ААТ	(+)	+	+	{+}	-	-	-	(-)	(+)	-	-	-	-	-
10	НДФК	-	-	+	-	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-	-
11	ФЕПКК	-	-	-	-	-	-	{+}	+	-	-	-	-	-	-
12	ГАМК-Т	-	-	{+}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
14	ДЯПА	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	(+)	-

Знак "+" означает наличие контакта между ферментами; "(+)" - наличие контакта доказано экспериментально; "{+}" - контакт предсказывается на основании представлений о конвейерном механизме передачи метаболитов; "-" - отсутствие контакта; "(-)" - возможность контактирования ферментов изучалась, и получен отрицательный результат.

Другое перспективное направление исследований связано с изучением препаратов, полученных путем щадящей деструкции митохондрий ультразвуком. Впервые такие препараты получили Robinson & Srere (1985). Им удалось показать, что в результате воздействия митохондрии становятся проницаемы для крупных белков, но при этом в них сохраняется активность ферментов ЦТК. Это означает, что ферменты ЦТК в таких препаратах адсорбированы на поверхности мембраны, и можно предположить, что метаболон ЦТК в этом случае сохраняет свою нативную структуру.

Группой исследователей из Одесского государственного университета и Одесского медицинского института (В.А.Розанов, Фан Ван Тьи, Г.Р.Герасимьяк, А.Я.Розанов) совместно с нами была проверена возможность вхождения ААТ и ГАМК-Т в метаболон ЦТК. Эксперименты показали, что в митохондриях, обработанных ультразвуком, активность названных аминотрансфераз частично сохраняется, но в меньшей степени, чем активность дегидрогеназ (СДГ, КГДГК и ПДГК). Это означает, что ААТ и ГАМК-Т связаны с митохондриальной мембраной. То, что эта связь более слабая, чем у дегидрогеназ, может означать, что трансаминазы связаны с мембраной не непосредственно, а через другие ферменты, входящие в метаболон. В пользу того, что ГАМК-Т входит именно в метаболон ЦТК свидетельствуют данные о соосаждении ГАМК-Т и КГДГК при очистке не-синаптических митохондрий мозга крыс (Rozaov, 1989). Фан Ван Тьи (1990), выделяя из гомогената головного мозга крыс КГДГК и ПДГК, получил препарат, содержащий, помимо этих комплексов, также ААТ, ГАМК-Т и, по-видимому, другие ферменты. Полученные препараты эффективно катаболизировали меченую ГАМК до CO_2 , что свидетельствует о сопряжении ГАМК-Т и ДЯПА с ферментами ЦТК. Таким образом, полученные данные служат косвенным подтверждением предложенной модели.

Возможные механизмы функционирования метаболона. Построение гипотетической структуры метаболона позволяет сделать предположения относительно возможного механизма его функционирования. Сборка метаболона приводит к образованию микрокомпартамента, в котором метаболический процесс может протекать изолированно, без выхода интермедиатов в объем. Взаимодействия ферментов, входящих в состав метаболона, приводят к тому, что комплекс выступает как единая, кооперативно функционирующая система. Мы

предполагаем, что все реакции осуществляются синхронно на активных центрах соответствующих ферментов, а затем интермедиаты согласованно перемещаются в микрокомпарimente от одного активного центра к другому. При этом оказывается возможной "рекуперация энергии" на уровне целого метаболона, то есть использование энергии экзергонических стадий для осуществления эндергонических реакций и активного транспорта метаболитов в микрокомпарimente.

Важно отметить, что одновременное и согласованное функционирование компонентов метаболона необходимо для сохранения симметрии структуры метаболона в процессе работы. Согласно подходу, использованному в работе Гольдштейна и Корнилова (1988), "симметрия управляет динамикой комплекса". Используя этот принцип, обсудим режим работы метаболона ЦТК, обладающего осью симметрии третьего порядка.

Для того, чтобы цикл замкнулся, необходимо, чтобы оксалоацетат вернулся на первый фермент цикла - ЦС. Следовательно, структура метаболона должна быть замкнутой. Однако, из рисунков 1 - 3 видно, что асимметричная субъединица комплекса не замкнута, поскольку МДГ не контактирует с ЦС в этой субъединице. Это означает, что после однократного прохождения метаболического цикла оксалоацетат попадает на молекулу ЦС соседней субъединицы. Для того, чтобы субстрат вернулся на молекулу ЦС исходной субъединицы, он должен пройти полный круг по каналу одного "этажа" микрокомпаримента. Можно полагать, что перемещение субстратов происходит синхронно во всех трех субъединицах одного "этажа". Такой режим работы метаболона мы предложили назвать режимом работы по типу "карусели".

Одним из главных физиологических преимуществ образования метаболона является то, что клетка получает возможность управлять структурно организованным и кооперативно функционирующим комплексом как единым целым. Согласно представлениям, развиваемым Кургановым (1986), метаболон как управляемая система должен иметь пространственно разделенные рабочие центры и центры управления. В роли рабочего центра метаболона выступает, очевидно, микрокомпаримент, в котором происходит химическая трансформация поступающих в него субстратов. Роль центра управления отводится якорному белку подложки, участвующему в сборке комплек-

са. Контроль функционирования комплекса как целого осуществляется при помощи внешних факторов, по-видимому, вторых посредников, с помощью которых обеспечивается оптимальное функционирование метаболона в рамках системы более высокого уровня сложности, то есть в клетке.

Метаболон, очевидно, является мобильной структурой и находится в равновесии со свободными ферментами. Одним из наиболее важных факторов, определяющих формирование метаболона, являются уровни концентраций определенных метаболитов. В еще большей степени равновесие между метаболоном и свободными ферментами должно зависеть от функционального состояния митохондрий. Известно, что объем матрикса претерпевает значительные изменения при переходе митохондрий от конденсированной конформации к ортодоксальной (Srere, 1985). Этот процесс, контролируемый энергетическим состоянием митохондрий, должен оказывать влияние на равновесие между комплексом ферментов ЦТК и свободными ферментами. Высокая концентрация белка в матриксе в конденсированной конформации должна способствовать образованию метаболона. При набухании матрикса возможен частичный обратимый распад комплекса на свободные ферменты.

ВЫВОДЫ

1. Развито представление о метаболоне как о специфическом уровне материальной организации биологических систем, характеризующемся определенными размерами, структурными особенностями, функцией и законами регуляции. Сформулированы принципы сборки метаболонов, включающие ассоциацию с биологическими структурами, симметрию, обеспечение конвейерной передачи метаболитов.

2. Создана компьютерная программа построения модели метаболона цикла трикарбоновых кислот, позволяющая установить расположение ферментов в модели, определить фермент-ферментные контакты и вывести на экран различные изображения модели.

3. Впервые построена пространственная модель метаболона цикла трикарбоновых кислот. На основании предложенной модели сделано предсказание о существовании парных контактов между определенными ферментами цикла.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот // Тез. докл. Всес. симп. "Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена". Пущино, 1986. С. 13.
2. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот // Материалы Всес. симп. "Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена". Пущино, 1987. С. 55-66.
3. Курганов Б.И., Любарев А.Е. Сборка мультиферментных комплексов как путь создания управляемых систем // Биомолекулярная электроника и проблемы самосборки надмолекулярных структур. Пущино, 1987. С. 83-89.
4. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. № 5. С. 1286-1296.
5. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Моделирование надмолекулярных биоструктур с помощью компьютера // Тез. докл. Всес. научно-техн. совещ. "Автоматизация и компьютеризация научных исследований, технологических процессов и проектных работ". М., 1988. С. 29.
6. Kurganov B.I., Lyubarev A.E. Enzyme and multienzyme complexes as controllable systems // Soviet Scientific Reviews. Sec. D. Physicochemical Biology Reviews / Ed. Skulachev V.P. V. 8. Glasgow: Harwood Acad. Publ., 1988. P. 111-147.
7. Kurganov B.I., Lyubarev A.E. Multienzyme complexes (metabolons) as controllable systems // Abstr. 14th Intern. Congr. Biochemistry. Prague, 1988. V. 4. P. 34.
8. Kurganov B.I., Lyubarev A.E. Multienzyme complexes (metabolons) as controllable systems // Highlights of Modern Biochemistry / Ed. Kotyk A. V. 1. Utrecht: VSP, 1989. P. 183-191.
9. Lyubarev A.E., Kurganov B.I. Supramolecular organization of tricarboxylic acid cycle enzymes // BioSystems. 1989. V. 22. № 2. P. 91-102.
10. Kurganov B.I., Lyubarev A.E. Assembly and control of

functioning of metabolons // Abstr. Intern. Symp. "Molecular organization of biological structures". Moscow, 1989. V. 1. P. 137.

11. Курганов Б.И., Любарев А.Е. Принципы организации и функционирования микрокомпартамента метаболона // Биохимия. 1989. Т. 54. № 5. С. 716-718.
12. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Принципы пространственно-временной организации клеточного метаболизма // Усп. совр. биол. 1989. Т. 108. Вып. 1(4). С. 19-35.
13. Розанов В.А., Фан Ван Тъи, Герасимьяк Г.Р., Любарев А.Е., Курганов Б.И., Розанов А.Я. Надмолекулярная организация аминотрансфераз и дегидрогеназ α -кетокислот митохондрий головного мозга крыс // Укр. биохим. журн. 1991. Т. 63. № 2. С. 66-71.



Подписано к печати
Отпечатано на ротапринте в
Производственном комбинате
Литературного фонда

16 ноября 1992 г.

Формат бумаги 30x42/4
Объем 1,0 п.л.
Зак. 211 Тираж 100 экз.