

УДК 577.151

ЦИНК КАК ПЕРЕКЛЮЧАТЕЛЬ ЛИПОАМИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ СЕРДЦА СВИНЬИ – ПРЕДСТАЦИОНАРНАЯ И СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА ДИАФОРАЗНОЙ РЕАКЦИИ*

© 2020 И.Г. Газарян^{1,2,3,4}, В.А. Щедрина^{3,5}, Н.Л. Клячко^{3,5},
А.А. Захарянц^{4,6}, С.В. Казаков², А.М. Браун^{1**}

¹ Кафедра клеточной биологии и анатомии, Нью-Йоркский медицинский колледж,
10605 Нью-Йорк, США; электронная почта: abraham_brown@nymc.edu

² Кафедра химии и физических наук, Дайсон колледж искусств и наук,
Пейс университет, 10570 Нью-Йорк, США

³ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
кафедра химической энзимологии, 119899 Москва, Россия

⁴ Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФНИЦ «Основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия

⁵ Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, 392000 Тамбов, Россия

⁶ Институт биоорганической химии имени академиком М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.05.2020

После доработки 11.06.2020

Принята к публикации 14.06.2020

Повышение внутриклеточного уровня Zn^{2+} вследствие ишемии способствует смерти клетки, компрометируя функцию митохондрий. Zn^{2+} является дифференциальным регулятором митохондриальной липоамиддегидрогеназы (LADH) в области физиологических концентраций ($K_d = 0,1$ мкМ свободного цинка), ингибируя липоамид-дегидрогеназную и активируя NADH-дегидрогеназную активности. Данный эффект вызван координацией Zn^{2+} цистеинами активного центра LADH. Описан детальный кинетический механизм диафоразной (NADH-дегидрогеназной) реакции, катализируемой LADH из сердца свиньи, с использованием 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCPIP) в качестве модельного акцептора электронов. Анаэробные эксперименты методом остановленной струи продемонстрировали, что двухэлектронно-восстановленная форма LADH в 15–25 раз менее активна по отношению к DCPIP, чем четырехэлектронная или Zn^{2+} -связанная восстановленные формы LADH (константы скорости равны $(6,5 \pm 1,5) \times 10^3$ М⁻¹с⁻¹, $(9 \pm 2) \times 10^4$ М⁻¹с⁻¹ и $(1,6 \pm 0,5) \times 10^5$ М⁻¹с⁻¹ соответственно). Стационарная кинетика для различных субстратов диафоразы показала, что Zn^{2+} ускоряет реакцию исключительно для двухэлектронных (дурохинон, DCPIP), но не одноэлектронных акцепторов (бензохинон, убихинон, феррицианид), что косвенно указывает на низкую электрон-донорную способность двухэлектронно-восстановленной формы LADH, доминирующей при низких уровнях NADH, по сравнению с четырехэлектронной или Zn^{2+} -связанной формами восстановленного фермента. Полученные данные позволяют предположить, что связывание цинка тиолами активного центра превращает фермент из одноэлектронного в двухэлектронный донор. Такой переключатель, активируемый цинком, потенциально может изменить соотношение продуктов оксидазной активности LADH – супероксида и H₂O₂.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убихинон, 2,6-дихлорфенолиндофенол, дурохинон, феррицианид, ферментативная кинетика, дигидролипоил-дегидрогеназа.

DOI: 10.31857/S0320972520080060

ВВЕДЕНИЕ

Большой объем накопленной информации указывает на токсическую роль внутриклеточ-

ного цинка, высвобождаемого в результате ишемии-реперфузии, в последующей судьбе клетки [1–4]. Повышение внутриклеточного уровня Zn^{2+} связывают с потерей мембранного потен-

Принятые сокращения: BQ – 1,4-бензохинон; DCPIP – 2,6-дихлорфенолиндофенол; DQ – дурохинон (2,3,5,6-тетраметил-1,4-бензохинон); ДТТ – дитиотрейтол; FC – феррицианид калия; LADH – дигидролипоил-дегидрогеназа (= липоамиддегидрогеназа); KGDHC – α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс; Q_o – 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон; S – субстрат-акцептор; UQ_o – убихинон.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-134, 20.07.2020.

** Адресат для корреспонденции.

циала, продукцией активных форм кислорода и смертью клетки [5,6]. Снижение накопления цинка в митохондриях путем его хелатирования приводит к уменьшению ишемических повреждений мозга в модели инсульта [7]. Нами было ранее показано, что цинк конкурирует с кальцием за вход в митохондрии, по-видимому, через митохондриальный кальциевый унипортер [8], что недавно было подтверждено другой группой исследователей [9].

Zn^{2+} является мощным ингибитором митохондриального дыхания и вызывает открытие митохондриальной поры [5,6]. Предполагается, что Zn^{2+} может регулировать митохондриальное дыхание обратимо, ингибируя α -кетоглутарат-дегидрогеназный комплекс (KGDHC) [10]. Липоамид-дегидрогеназа (LADH) – ключевой компонент митохондриальных дегидрогеназных комплексов, включая KGDHC, катализирует перенос восстановленных эквивалентов с дигидролипоата, связанного на соседней дигидролипоил-ацилтрансферазной субъединице комплекса, на NAD^+ . Эта обратимая реакция осуществляется двумя реакционными центрами – тиоловой парой, которая принимает электроны от дигидролипоата, и нековалентно-связанным FAD/FADH₂, который переносит электроны на NAD^+ . Фермент также катализирует «диафоразную» реакцию восстановления хинонов (или других акцепторов электрона) под действием NADH. Эта вторичная активность требует участия только одного каталитического центра – FAD – и значительно ускоряется под действием ионов металлов или других реагентов, которые связывают [11] или модифицируют [12–17] каталитические тиолы, необходимые для липоамид-дегидрогеназной активности. Zn^{2+} увеличивает диафоразную активность LADH по отношению к убихинону [18,19]. Усиление диафоразной активности также наблюдалось для генно-инженерных мутантов с отсутствием одного из каталитических тиолов [20]. Хотя стимулирование диафоразной активности было показано неоднократно [12–17, 20], ее кинетическая модель с точными кинетическими параметрами никогда не являлась предметом исследования.

Мы ранее показали, что Zn^{2+} ингибирует обратимую липоамид-дегидрогеназную реакцию, катализируемую очищенной LADH из сердца свиньи (K_i 0,15 мкМ) в обоих направлениях, блокируя каталитические тиолы [21]. Взаимодействие с цинком приводило к 3–4 кратному усилению оксидазной активности LADH [21], для которой нужен только каталитический центр FAD. Целью настоящей работы явилось детальное кинетическое описание диафоразной реакции, катализируемой LADH, в отсутствие и

в присутствии цинка с DCPIP в качестве модельного субстрата. Результаты стационарной и предстационарной кинетики предполагают, что кроме переключения LADH из тиол-редуктазы в хинон-редуктазу, связывание цинка может изменять предпочтение фермента – от одноэлектронных акцепторов в сторону двухэлектронных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты/ферменты. NADH, NADPH, Tris, $ZnCl_2$, 2,6-дихлорфенолиндофенол (DCPIP), 1,4-бензохинон (BQ), феррицианид калия (FC), дурухинон – DQ (2,3,5,6-тетраметил-1,4-бензохинон), убихинон Q₀, приобретены у «Sigma-Aldrich» (США), HCl – у J.T.Baker, Inc. (NJ, США). Все растворы приготовлены на дистиллированной деионизованной воде с сопротивлением >15 МΩ/см. Все реактивы были из «Sigma Ultra grade», если такой уровень очистки был коммерчески доступен (для уменьшения возможного присутствия двухвалентных катионов). Запасные водные растворы 10 мМ NADH и 10 мМ $ZnCl_2$ готовили непосредственно перед экспериментом.

Липоамид-дегидрогеназа из сердца свиньи (LADH) от «Sigma-Aldrich», по данным SDS-PAGE, не содержала белковых примесей (< 2%). Фермент очищали FPLC гелевой фильтрацией для удаления сульфата аммония и FAD, порциями по 0,5 мл (1 : 3 суспензии фермента к воде), на колонке с Superdex 200 («Pharmacia Biotech»), уравновешенной 0,2 М Tris-HCl буфером, pH 7,5. Концентрацию LADH определяли по поглощению на 455 нм ($\epsilon_{455} = 11\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [1]). Тиоредоксин-редуктаза из *Escherichia coli* была приобретена у «Sigma-Aldrich» и использована после обессоливания через Sephadex G-25.

Стационарная кинетика. Все измерения проводили на 96-луночном планшетном спектрофотометре (SpectraMax Plus, США) в 200 мкл объеме реакционной смеси на лунку в двухволновом режиме по поглощению NADH ($\epsilon_{340} = 6,22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [22]) и DCPIP ($\epsilon_{600} = 20,6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [22]) при 20 °С. Длина светового пути составляла 0,43 см. Реакции проводили в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5. Для коррекции на неферментативное восстановление DCPIP контроли (при отсутствии фермента) ставили одновременно на одном и том же микропланшете, для последующего вычитания значения скорости неферментативного восстановления из скорости ферментативного восстановления.

Изучение восстановления DCPIP под действием NADH в отсутствие добавленного

цинка проводили, варьируя NADH в диапазоне 10–500 мкМ и DCPiP 2–50 мкМ. Реакцию инициировали добавлением 400 нМ раствора фермента. Зависимость скорости реакции от концентрации DCPiP при фиксированных различных концентрациях NADH описывали линейной регрессией, из параметров которой рассчитывали константы скорости. Значения констант скорости были определены как среднее из трех независимых экспериментов.

Для исследования эффектов цинка был использован аналогичный подход: аликвоты NADH и ZnCl₂ помещали в лунки, а затем инициировали реакцию добавлением 160 мкл буферной смеси фермента и варьируемых концентраций DCPiP с помощью многоканальной пипетки. Для измерения скорости восстановления DCPiP под действием NADH, концентрации реагентов варьировали в диапазоне 30–400 нМ LADH, 0,002–0,1 мМ DCPiP, 0,01–0,5 мМ NADH, 0,1–20 мкМ ZnCl₂. Восстановление дурохина, убихина, бензохина и феррицианида, катализируемое, соответственно, 160, 200, 50 и 150 нМ LADH, изучали по поглощению NADH на 340 нМ при его фиксированной концентрации, равной 0,02 мМ, и различных варьируемых концентрациях акцептора электрона и Zn²⁺. В случае тиоредоксинредуктазы из *E. coli* варьировали концентрации DCPiP при фиксированной концентрации NADPH (0,02 мМ) в отсутствие и в присутствии 5 мкМ Zn²⁺. Восстановление бензохина под действием LADH и DCPiP под действием *E. coli* TRR проводили в двойном и тройном повторе соответственно.

Данные по активации в присутствии Zn²⁺ анализировали в координатах Лайнуивера–Берка, используя метод наименьших квадратов в программе Sigma Plot 12.5 (SPSS, США). Каждый эксперимент проводили в тройном повторе. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка из трех независимых экспериментов. Статистическую значимость изменений в углах наклона в двойных обратных координатах проверяли, проводя парный *t*-тест («Sigmastat software», США), используя оценки наклона и стандартные ошибки измерения регрессий для высокой дозы Zn²⁺ и контрольной серии для каждой панели.

Предстаационарная кинетика. Анаэробные измерения методом остановленной струи проводили в четверном повторе на High-Tech SF-61 спектрофотометре («High-Tech Scientific», Великобритания), установленном в анаэробном боксе под N₂ с содержанием O₂ менее 1 ppm. Мертвое время прибора составляло 0,8 мс. Температуру (22 °С) контролировали с помощью термостата Techne-400 circulator («Techne Ltd.», Ве-

ликобритания) с наружной системой охлаждения. Раствор фермента и порошок субстрата помещали в закрытые сосуды и подвергали деоксигенации перед помещением в анаэробный бокс. Деоксигенацию буфера (0,05 М Tris-HCl, pH 7,5), используемого в экспериментах, проводили в течение ночи в анаэробном боксе. Запасные растворы NADH (0,75 мМ) и ZnCl₂ (1,875 мМ) готовили анаэробно под N₂ в боксе в данном буфере непосредственно перед экспериментом.

Изменения в поглощении связанного с белком флавина определяли в режиме быстрого сканирования с использованием ксеноновой лампы. Запасный раствор фермента (15 мкМ) выстреливали против возрастающих концентраций NADH (7,5–60 мкМ) для определения концентрации NADH, обеспечивающей максимальное поглощение на 530 нм, являющееся индикатором образования двухэлектронно-восстановленной формы LADH (LADH-2e) — комплекса с переносом заряда, имеющего один свободный восстановленный тиол и тиол, связанный через «общий электрон» с FAD [10]. Навысшая концентрация комплекса с переносом заряда наблюдалась при использовании полуторакратного избытка NADH к ферменту.

Изменения в поглощении DCPiP регистрировали в режиме фиксированной длины волны на 600 нм. Для определения константы скорости окисления двухэлектронно-восстановленной формы фермента под действием DCPiP, фермент (2 мкМ) предварительно восстанавливали 1,5-кратным избытком NADH и затем выстреливали против возрастающих концентраций DCPiP в диапазоне 2–60 мкМ. Для определения константы скорости Zn²⁺-связанного фермента, 2 мкМ LADH предварительно восстанавливали 1,5 эквивалентами NADH в присутствии 100 мкМ Zn²⁺. Комплекс LADH-Zn затем восстанавливали добавлением еще 1,5 эквивалентов NADH для получения полностью восстановленного FAD (Zn-LADH-2e) и уже затем выстреливали против растущих концентраций DCPiP (2–60 мкМ).

Взаимодействие двухэлектронно-восстановленного фермента (LADH-2e) с DCPiP удовлетворяло условию одного оборота фермента в реакции псевдо-первого порядка, когда $[S]_0 \gg [E]_0$. Кинетические кривые аппроксимировали экспоненциальной функцией $A = A_0 \exp(-k[S]_0 t)$, используя метод наименьших квадратов в программе минимизации, предоставленной также фирмой «High-Tech Scientific». Константы скорости второго порядка определяли из наклона зависимости кажущейся константы скорости первого порядка от концентрации DCPiP.

Для определения константы скорости окисления четырехэлектронно-восстановленного фермента (LADH-4e) под действием DCPiP, фермент был предварительно восстановлен 50 эквивалентами NADH для обеспечения полного восстановления FAD и затем «выстреливался» против возрастающих концентраций DCPiP. Поскольку восстановление фермента NADH протекает исключительно быстро в данных условиях [23], то весь фермент можно считать находящимся в четырехэлектронной восстановленной форме (LADH-4e) в течение всей реакции восстановления DCPiP, т.е. эксперимент можно считать стационарным с детекцией уменьшения поглощения DCPiP в миллисекундном диапазоне. В этих условиях уравнение $[S] = [S]_0 \exp(-k[E]_0 t)$, при $t \rightarrow 0$, превращается в ли-

нейную функцию $[S] = [S]_0 (1 - k[E]_0 t)$, которая позволяет рассчитывать константу скорости из начального угла наклона кинетической кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Стационарная кинетика диафоразной реакции. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации NADH в двойных обратных координатах проявляет гиперболический характер вплоть до 0,2 мМ NADH, выше которой наблюдается субстратное ингибирование (рис. 1, а). Последнее является следствием диссоциативной инактивации фермента под действием избытка NADH, которая характерна для четырёхэлектронно-восстановленной формы LADH

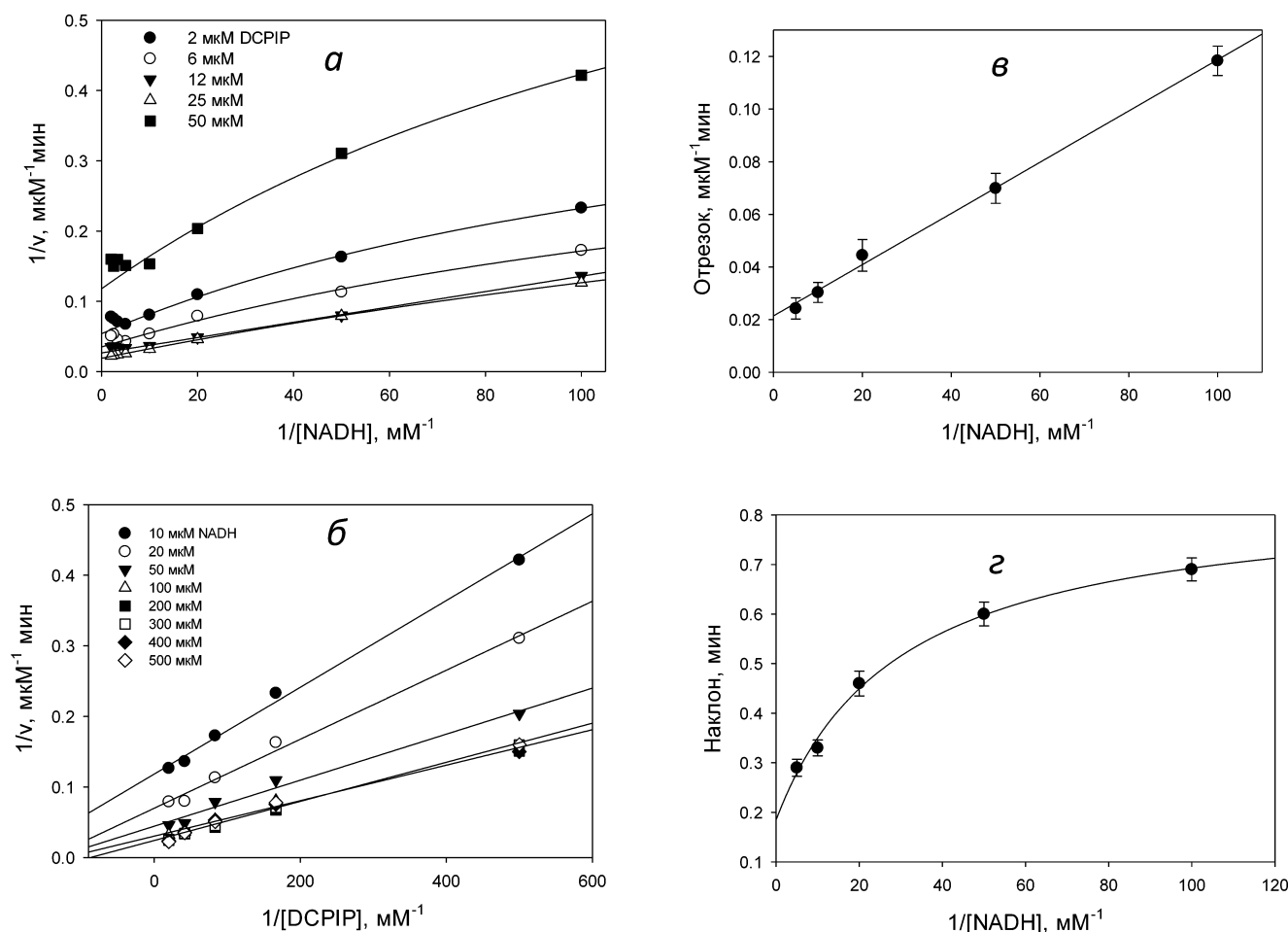


Рис. 1. Зависимость скорости восстановления DCPiP под действием NADH, катализируемым 400 нМ LADH, от концентрации одного из субстратов при варьируемой концентрации второго субстрата. а – Зависимость от $[\text{NADH}]$; б – зависимость от $[\text{DCPiP}]$; в–z – вторичные графики зависимости отрезка и угла наклона из рис. б соответственно, от концентрации NADH (концентрации NADH, вызывающие инактивацию фермента, опущены). 50 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7,5, 22 °С. Кривые на панелях а и z описаны гиперболической зависимостью с помощью метода наименьших квадратов. Кривые на панелях б и в – линейные регрессии. Данные представляют один репрезентативный эксперимент, проведенный в режиме параллельного измерения скоростей (см. детали в разделе «Материалы и методы»)

(LADH-4e) из различных источников [24]. Предыдущие работы, по-видимому, не учитывали сложный характер реакции восстановления DCPiP под действием LADH и считали, что она протекает с образованием тройного комплекса [25, 26]. Зависимость скорости реакции в двойных обратных координатах при ненасыщающих концентрациях DCPiP (рис. 1, а) лишь с большой натяжкой можно описать линейной зависимостью, при этом прямые линии не будут пересекаться в одной точке, что явилось бы доказательством механизма с образованием тройного комплекса.

Представление экспериментальных данных в двойных обратных координатах зависимости скорости реакции от концентрации DCPiP хорошо описывается линейной зависимостью для неинактивирующих концентраций NADH, т.е. ниже 0,2 мМ (рис. 1, б), что позволяет легко провести дальнейший анализ (рис. 1, в, г). Аналогичный вид имеют зависимости скорости реакции под действием цинка: линейная зависимость от концентрации DCPiP наблюдается как при низких (рис. 2, а), так и высоких (рис. 2, б) концентрациях NADH, в то время как зависимость скорости реакции от концентрации NADH имеет гиперболический характер при низких концентрациях цинка, но превращается в линейную зависимость при высоких (рис. 2, в).

По аналогии с нашей работой по изучению влияния ионов цинка на оксидазную активность LADH [21], для объяснения гиперболической зависимости, наблюдаемой при восстановлении DCPiP под действием NADH, катализируемом LADH, предложена схема реакции, включающая два цикла. Поскольку DCPiP известен исключительно как двухэлектронный акцептор [26], мы предполагаем, что только те формы фермента, в которых FAD восстановлен полностью, способны восстановить данный субстрат. Таким образом, комплекс с переносом заряда будет очень плохим катализатором восстановления DCPiP, и мы должны предположить, что изомеризация фермента в форму с полностью восстановленным FAD происходит либо перед связыванием с DCPiP, либо после — внутри фермент-субстратного комплекса. Второй вариант механизма наиболее вероятен, поскольку в наших предыдущих работах по стационарной кинетике наблюдалось прямое образование комплекса с переносом заряда при восстановлении LADH под действием NADH [21]. При этом восстановление фермента эквимольным количеством NADH в анаэробных условиях приводило к распределению 1 : 1 между комплексом с переносом заряда и формой с полностью восстановленными тиолами [21].

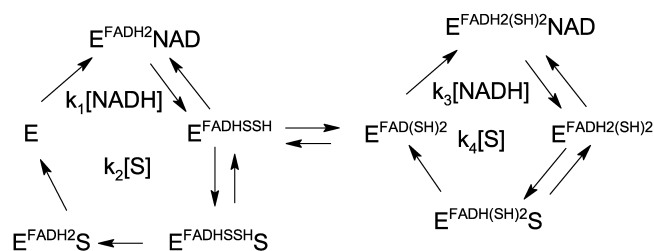


Схема 1

Для упрощения уравнения скорости смешанные кажущиеся константы скорости k_1 и k_3 приписаны стадиям связывания NADH и восстановления фермента, и смешанные кажущиеся константы скорости k_2 и k_4 для связывания и отщепления DCPiP в правом и левом циклах соответственно, как показано на схеме 1. Константа равновесия между комплексом с переносом заряда и формой с двумя восстановленными тиолами принята равной 1 [21]. Основное различие между двумя циклами состоит в относительной скорости восстановления фермента под действием NADH, с $k_1 \gg k_3$, и восстановления DCPiP с $k_4 \gg k_2$. Уравнение скорости в этом случае выглядит как сумма двух гиперболических функций:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} \times \frac{k_2[S] + k_1[NADH]}{k_2[S] + k_3[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} \times \frac{k_4[S] + k_3[NADH]}{k_2[S] + k_3[NADH]} \quad (1)$$

Вышеприведенное уравнение может быть реорганизовано (уравнение 2), чтобы показать вклад отношения констант скорости в результирующую зависимость:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{(1 - k_3/k_1) + (1 - k_2/k_4)}{k_2[S] + k_3[NADH]} \quad (2)$$

Таким образом, график в двойных обратных координатах должен иметь гиперболический характер зависимости по обоим субстратам, что и наблюдается в эксперименте. То, что гиперболический характер зависимости очень плохо виден для DCPiP, особенно при высоких концентрациях NADH (см. рис. 1, б и рис. 2, б) вполне ожидаемо, поскольку k_1 , в меньшей мере, в 5 раз выше, чем k_2 и k_3 [21]. С увеличением концентрации NADH и предполагая $k_3 \approx k_4 \gg k_2$, уравнение 2 упрощается до уравнения 3, которое предполагает линейную зависимость от DCPiP при высоких концентрациях NADH:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{2}{k_3[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} \quad (3)$$

Поэтому значение кажущейся константы скорости восстановления DCPiP, рассчитанное из наклона графика зависимости $1/v$ от $1/[DCPiP]$ при высоких концентрациях NADH, будет близко к значению константы скорости

восстановления четырехэлектронно-восстановленной формой фермента – k_4 . Кажущаяся константа скорости окисления NADH, рассчитанная из отрезка на оси ординат, будет равна $k_3/2$.

Кажущаяся линейность зависимости, показанной на рис. 2, б ($r^2 = 0,991 \pm 0,005$), позволяет проанализировать зависимость отрезка и наклона от концентрации NADH (рис. 1, в и г), как обсуждено выше. Величина отрезка зависит линейно от $1/[NADH]$, в то время как наклон зависит гиперболически от $1/[NADH]$. При очень высоких концентрациях NADH наклон становится равным кажущейся константе скорости реакции фермента с DCPIP ($k_4 = (2,1 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, см. рис. 1, б и г). Кажущаяся константа скорости для NADH ($k_3/2$) может быть рассчитана из наклона вторичного графика (рис. 1, в, $k_{NADH} = (4,6 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Стационарные данные по восстановлению DCPIP были получены при относительно низких концентрациях DCPIP для уменьшения вклада неферментативного восстановления, и поэтому, точное определение k_1 и k_2 было затруднено. Однако значение k_1 известно для реакции восстановления бензохинона, которая протекает как один каталитический цикл с участием двухэлектронно-восстановленного фермента (табл. 1) [26].

В присутствии Zn^{2+} сильная активация наблюдается как для восстановления DCPIP (рис. 2, а, б), так и для окисления NADH (рис. 2, в). Как видно из рис. 2, в, при низких ненасыщающих концентрациях DCPIP Zn^{2+} ускоряет реакцию, увеличивая кажущуюся константу скорости для окисления NADH до $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Концентрация полуактивации по Zn^{2+} составляет

$\sim 1,8 \text{ мкМ}$ (см. вставки в рис. 2, а и в) в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,5. При коррекции на хелатирование цинка в трисовом буфере данная концентрация соответствует $\sim 0,1 \text{ мкМ}$ свободного Zn^{2+} [21, приложение]. Это значение близко к значению константы ингибирования цинком активности липоамид-дегидрогеназы и активации NADH-оксидазы, определенной нами ранее [21], и подтверждает гипотезу об одинаковом молекулярном механизме наблюдаемых эффектов – связывании Zn^{2+} каталитическими тиолами (схема 2).

Ион Zn^{2+} также ускоряет стадию восстановления DCPIP. Это действие лучше всего видно при низких концентрациях NADH (рис. 2, а), когда фермент функционирует преимущественно в рамках левого цикла на схеме 1. Однако и при высоких концентрациях NADH, ускорение в присутствии Zn^{2+} все еще заметно (рис. 2, б). Оценка кажущейся константы скорости восстановления DCPIP в присутствии насыщающих концентраций Zn^{2+} составляет $1,85 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (рис. 2, а).

График в двойных обратных координатах при насыщающей концентрации Zn^{2+} представляет собой параллельные прямые линии (рис. 2, г), характерные для механизма типа пинг-понг для реакции восстановления DCPIP в присутствии цинка, и позволяет определить значения констант скорости для NADH как $(8,9 \pm 2,0) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и для DCPIP как $(2,2 \pm 0,4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Значение константы скорости по DCPIP равно таковому при экстраполяции значения k_4 в отсутствие цинка из рис. 1, г, а значение константы скорости по NADH близко к таковому для восстановления бензохинона [26].

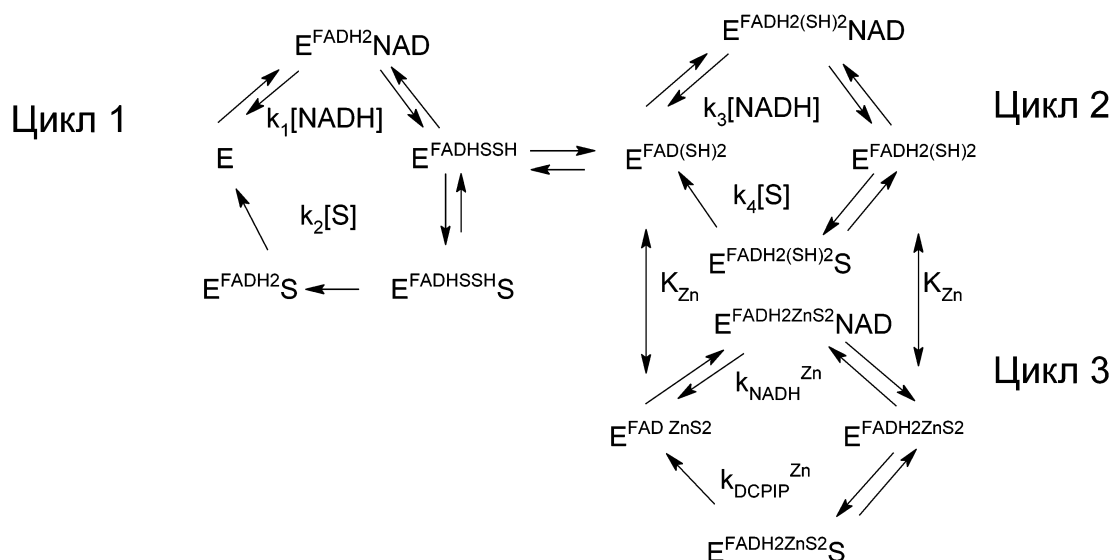


Схема 2

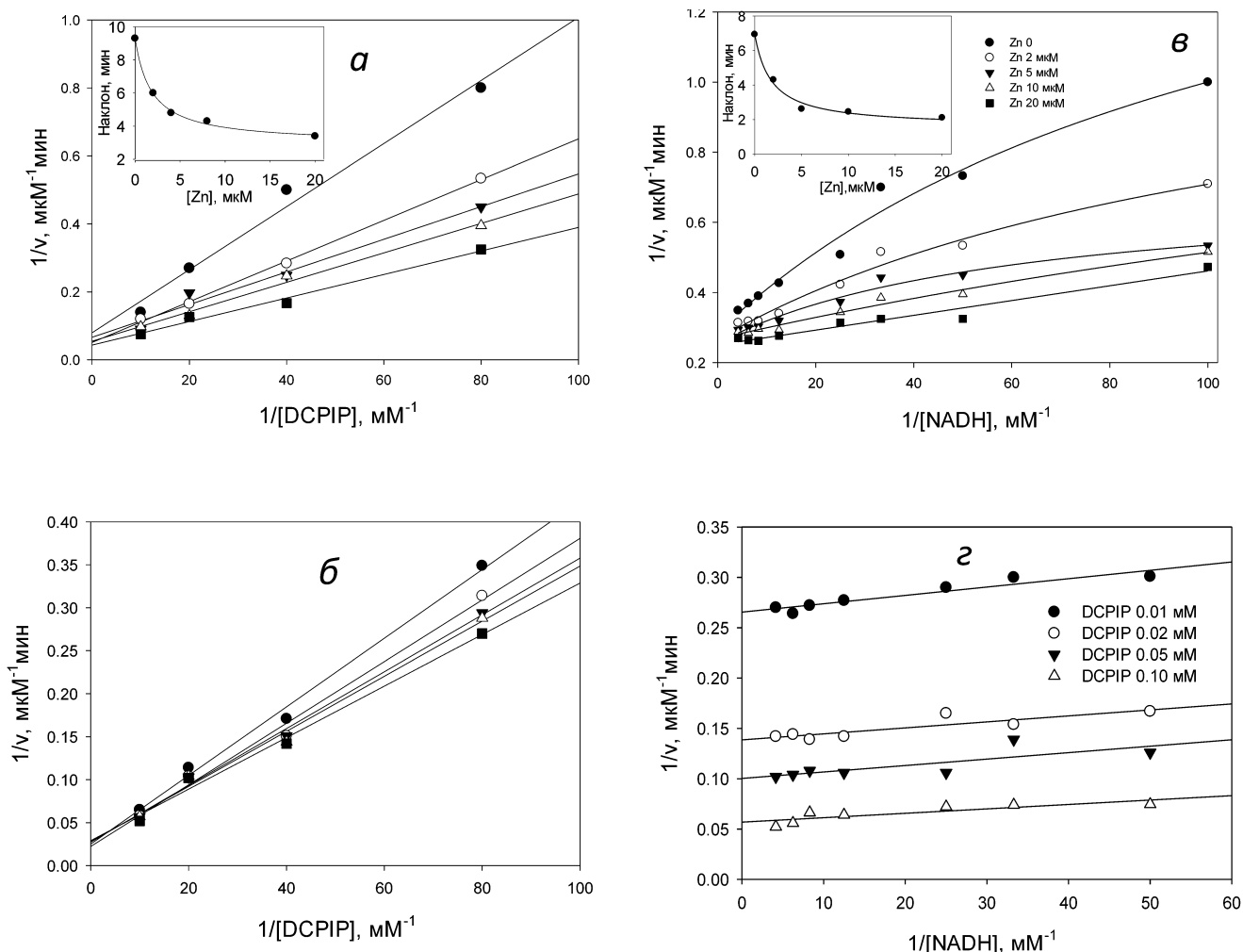


Рис. 2. Влияние цинка на стационарную кинетику восстановления DCPiP под действием NADH. Влияние 0–20 μM Zn^{2+} на скорость окисления NADH при варьируемых $[DCPiP]$ и фиксированной $[NADH]$, равной а – 240 μM и б – 240 μM . Вставка в рис. 2, а показывает зависимость кажущейся константы восстановления DCPiP от Zn^{2+} ; в – влияние Zn^{2+} на скорость восстановления 12,5 μM DCPiP при различных концентрациях NADH. Вставка показывает зависимость кажущейся константы окисления NADH от Zn^{2+} ; г – зависимость скорости восстановления DCPiP от NADH при варьировании концентрации обоих субстратов в присутствии 20 μM Zn^{2+} . Каждая панель соответствует независимому репрезентативному эксперименту. Условия реакций аналогичны представленным на рис. 1, за исключением концентрации LADH, равной 30 nM

Предстаационарная кинетика восстановления DCPiP в отсутствие и в присутствии Zn^{2+} . Ускорение под действием ионов цинка хорошо видно при сравнении кинетических кривых взаимодействия различных восстановленных форм LADH с DCPiP (рис. 3, а). В случае восстановления DCPiP, Zn-связанный фермент ведет себя идентично четырехэлектронно-восстановленной LADH (LADH-4e), в то время как двухэлектронно-восстановленная LADH (LADH-2e) приблизительно в 20 раз менее активна по отношению к DCPiP (рис. 3, б, табл. 1). Намного меньшая активность двухэлектронно-восстановленного фермента по отношению к DCPiP (т.е. $k_2 \ll k_4, k_{DCPiP}^{Zn}$) может проистекать из допол-

нительной стадии внутримолекулярного переноса электрона в цикле 1, которая отсутствует в циклах 2 и 3 на схеме 2.

Отрезок на оси ординат зависимости кажущейся константы скорости от концентрации субстрата соответствует константе скорости диссоциации DCPiP из комплекса с ферментом (рис. 3, б), что позволяет рассчитать константу связывания DCPiP с ферментом, принимая во внимание величину константы скорости ассоциации, определенную из наклона зависимости. Константы связывания субстрата для Zn^{2+} -связанной и несвязанной двухэлектронно-восстановленной формы фермента равны в пределах ошибки измерения ($3,5 \pm 0,6 \mu M$). Это значе-

Таблица 1. Константы скорости диафоразной реакции, представленной на схеме 2

Обозначения констант скорости	Значения констант скорости, М ⁻¹ ·с ⁻¹	
	предстационар	стационарная кинетика
NADH и окисленная LADH, k_1	н.о.	$(0,92 \pm 0,10) \times 10^{6*}$
NADH и 2e-восстановленная LADH, k_3	н.о.	$(0,92 \pm 0,10) \times 10^5$
NADH и Zn-LADH, k_{NADH}^{Zn}	н.о.	$(0,9 \pm 0,2) \times 10^6$
DCPIP и 2e-восстановленная LADH, k_2	$(6,5 \pm 1,5) \times 10^3$	н.о.
DCPIP и 4e-восстановленная LADH, k_4	$(9 \pm 2) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^5$
DCPIP и восстановленная Zn-LADH, k_{DCPIP}^{Zn}	$(1,6 \pm 0,5) \times 10^5$	$(2,2 \pm 0,4) \times 10^5$

Примечание. * k_1 определена в реакции восстановления бензохинона [26].

ние соответствует ранее определенной константе связывания [25], хотя авторы и постулировали образование тройного комплекса для восстановления DCPIP. Значение константы скорости, определенное методом остановленной струи, для стадии восстановления DCPIP Zn-связанным ферментом (табл. 1) соответствует таковому, определенному из стационарной кинетики реакции, и подтверждает предложенный механизм на схемах 1 и 2.

Степень экспериментально наблюдаемой стимуляции в стационарной реакции в присутствии насыщающих концентраций Zn²⁺ варьирует от 2–2,5 раз при низких концентрациях DCPIP (потому что скорость-лимитирующая стадия изменяется с k_3 на $k_{DCPIP}^{Zn} \approx k_4$) до 4–5 раз при низких концентрациях NADH (поскольку

скорость-лимитирующая стадия меняется с k_2 на $k_{DCPIP}^{Zn} \approx k_4$). Принимая равными значения констант скорости восстановления DCPIP четырехэлектронно-восстановленной и восстановленной Zn-связанной формой – $k_4 \approx k_{DCPIP}^{Zn}$, и констант скорости окисления NADH окисленным нативным ферментом и Zn-связанным ферментом – $k_1 \approx k_{NADH}^{Zn}$, уравнения для стационарной скорости реакции в присутствии Zn²⁺ может быть записано как:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{(1-k_3/k_1)+(1-k_2/k_4)}{k_2[S]+k_3[NADH]+k_1[NADH][Zn]/K_{Zn}} \quad (4)$$

Таким образом, степень ускорения реакции в стационарных условиях под действием Zn²⁺ определяется соотношением смешанных констант скорости k_1, k_2, k_3, k_4 и диапазоном концентра-

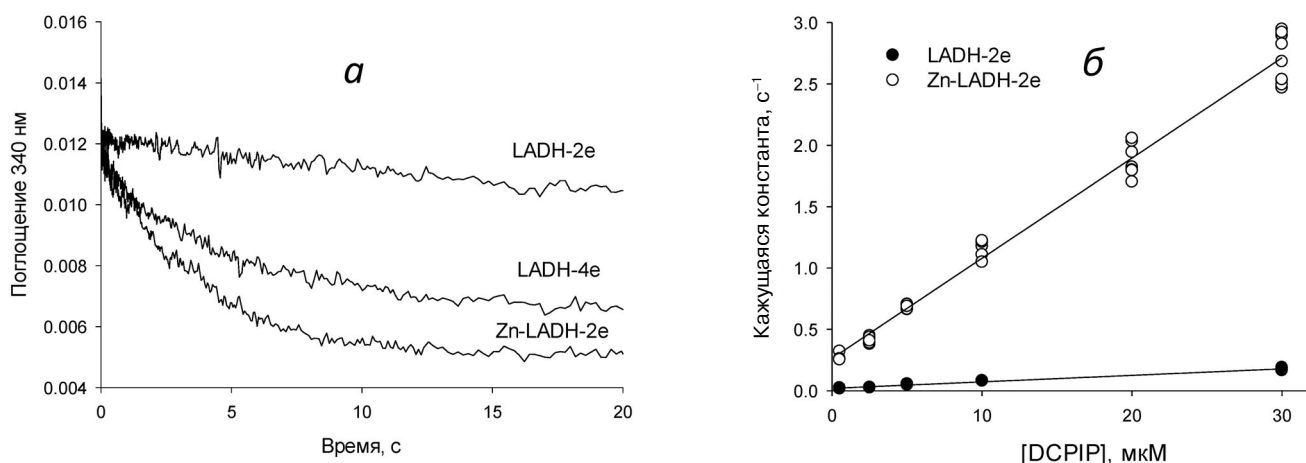


Рис. 3. Кинетика восстановления 5 мкМ DCPIP тремя формами LADH. Приготовление соответствующих форм восстановленной LADH описано в разделе «Материалы и методы». а – Оригинальные кривые; б – определение констант скорости восстановления DCPIP двухэлектронно-восстановленной формой (LADH-2e) (черный кружок) и Zn-связанной формой (Zn-LADH-2e) (светлый кружок). Каждая точка соответствует индивидуальному «выстрелу». Константы скорости определены из наклонов. Условия реакции: 1 мкМ LADH и 1,5 мкМ NADH в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5, 22 °С

ций субстратов в отдельном эксперименте (уравнение 4). Последствия этого для каталитического поведения LADH и близких к ней ферментов обсуждаются далее.

Отсутствие стимулирования Zn^{2+} в реакции восстановления бензохинона LADH и в реакциях, катализируемых тиоредоксин-редуктазой *E. coli*. Каталитический дисульфид, присутствующий во всех FAD-тиол оксидоредуктазах, включающих LADH, глутатион-редуктазу и тиоредоксин-редуктазу, усложняет механизм диафоразной реакции вследствие существования двух- и четырехэлектронно-восстановленных форм ферментов. Как показано выше, Zn^{2+} переключает механизм фермента с двух циклов на один-единственный каталитический цикл, предотвращая перенос электронов между двумя реакционными центрами. Стимулирование в присутствии Zn^{2+} не будет наблюдаться, если фермент в отсутствие Zn^{2+} функционирует лишь в рамках одного из циклов, т.е. либо в правом, либо в левом цикле на схеме 1. Если $k_2 \geq k_1 > k_3$ (т.е. скорость-лимитирующая стадия представляет собой двухэлектронное восстановление фермента NADH), тогда фермент осциллирует между окисленной и двухэлектронно-восстановленной формами. Это условие выполняется для восстановления бензохинона, где $k_{NADH} = 9,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1} < k_{BQ} = 1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [26]. В этом случае связывание Zn^{2+} каталитическими тиолами не должно оказывать влияния на измеряемую скорость реакции. Экспериментальные данные, показанные на рис. 4, а, подтверждают этот вывод – добавление Zn^{2+} не влияет на скорость восстановления бензохинона ($k_{BQ} \approx k_{BQ}^{Zn} \approx 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$).

Если $k_3 \geq k_1 > k_2$, то фермент осциллирует между двух- и четырехэлектронно-восстановленной формой, т.е. с полностью восстановленным FAD. Такой сценарий никогда не реализуется для LADH, глутатион и тиоредоксин редуктаз млекопитающих, которые образуют стабильные комплексы с переносом заряда, где один из электронов находится в совместном владении FAD и каталитического тиола [21, 27]. А вот тиоредоксин редуктаза *E. coli*, напротив, не образует комплекса с переносом заряда и поэтому работает в каталитическом цикле с полностью восстановленным FAD [28–30]. Как и ожидалось, в таком случае добавление Zn^{2+} не влияет на активность тиоредоксин редуктазы *E. coli* (рис. 4, б).

Различие эффектов Zn^{2+} при восстановлении одно- и двухэлектронных субстратов. Как предполагалось выше, более низкая активность двухэлектронно-восстановленного фермента по отношению к DCPIP ($k_2 \ll k_4, k_{DCPIP}^{Zn}$) может являться следствием скорости-лимитирующего внутримолекулярного переноса электронов (см. цикл 1 схемы 2), который предоставляет второй электрон для обязательного двухэлектронного восстановления DCPIP [31]. Если такое предположение верно, то замена DCPIP на одноэлектронный акцептор уберет различия между k_2 и k_{DCPIP}^{Zn} .

Это именно тот случай, когда восстанавливается одноэлектронный акцептор – феррицианид – под действием NADH: Zn^{2+} явно влияет на стадию окисления NADH, как видно из уменьшения отрезка с увеличением концентрации Zn^{2+} на рис. 5, а, но практически не влияет

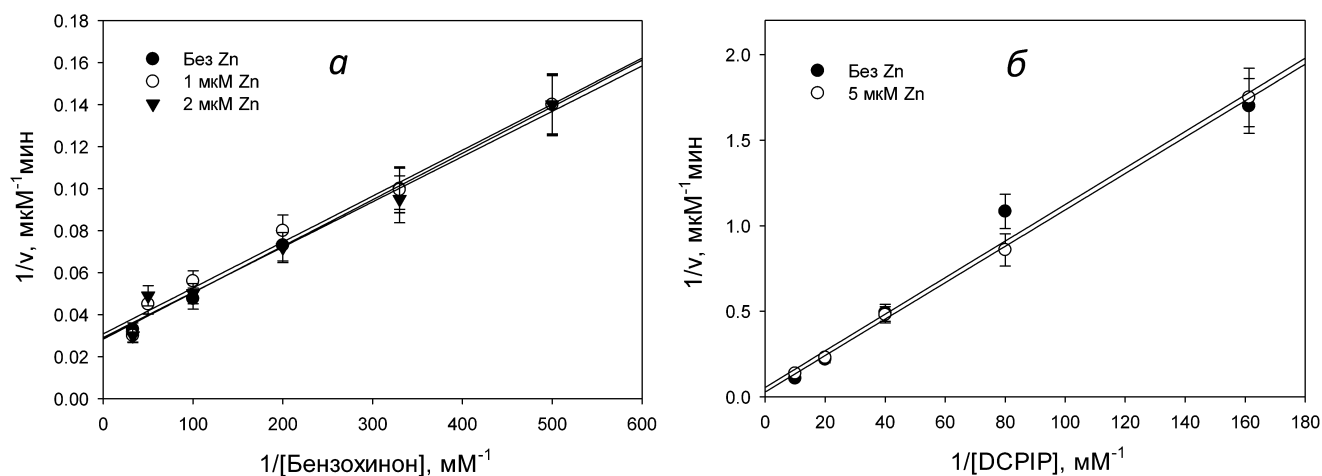


Рис. 4. Отсутствие ускорения реакции под действием Zn^{2+} в реакции восстановления (а) бензохинона 20 мкМ NADH, катализируемой 50 нМ LADH; (б) DCPIP 20 мкМ NADPH, катализируемой 0,2 мкМ тиоредоксин редуктазой *E. coli*. а – Черный кружок – без Zn^{2+} , светлый кружок – в присутствии 1 мкМ Zn^{2+} , черный треугольник – 2 мкМ Zn^{2+} ; б – черный кружок – без Zn^{2+} , светлый кружок – 5 мкМ Zn^{2+} . Кажущиеся константы скорости, определенные из наклонов: (а) $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ и (б) $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$

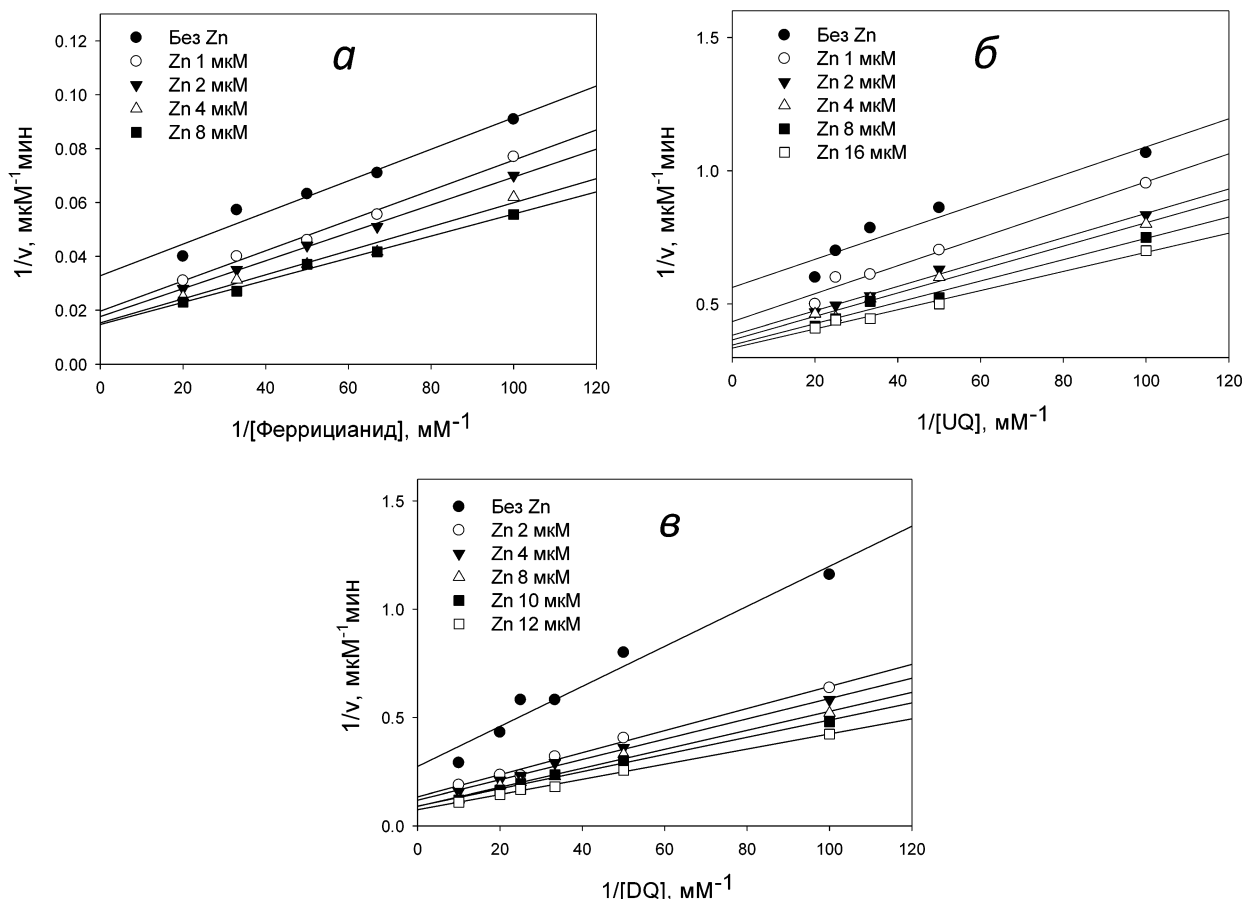


Рис. 5. Влияние Zn^{2+} на восстановление различных электрон-акцепторных субстратов $20 \mu M$ NADH при катализе LADH. а – Феррицианид, $0,15 \mu M$ LADH; б – убихинон, $0,20 \mu M$ LADH; в – дурухинон, $0,18 \mu M$ LADH

на стадию восстановления феррицианида, поскольку наклон не изменяется ($p = 0,063$). Кажущаяся константа скорости для восстановления феррицианида – $(2,5 \pm 0,2) \times 10^5 M^{-1}c^{-1}$ – такая же, как и ранее определенная Vienozinskis et al. [26].

Поскольку $k_1 \gg k_3$ в случае LADH из сердца свиньи, Ур.4 может быть упрощено до:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{2-k_2/k_4}{k_2[S]+k_3[NADH]+k_1[NADH]/K_{Zn}}. \quad (5)$$

При равных константах восстановления акцептора электронов двух- и четырехэлектронно-восстановленными формами LADH ($k_2 \approx k_4 \ll \ll k_1$) и сопоставимых концентрациях NADH и субстрата, ускорение под действием Zn^{2+} будет наблюдаться только при варьировании концентрации NADH:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{1}{k_1[NADH]} \times \frac{1}{\frac{k_4[S]}{k_1[NADH]} + \frac{[Zn]}{K_{Zn}}} \approx \frac{1+K_{Zn}}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} \quad (6)$$

Данная модель предсказывает увеличение кажущейся константы скорости стадии восста-

новления субстрата под действием Zn^{2+} только если имеется значительное различие в константах скорости восстановления субстрата двух- и четырехэлектронно-восстановленными формами LADH ($k_2 \ll k_4$ в схеме 1). Максимальный эффект на стадию восстановления субстрата при добавлении Zn^{2+} будет наблюдаться при низких концентрациях NADH, удовлетворяющих условию $k_3[NADH] \leq k_2[S]$, где в отсутствие цинка стационарной формой фермента является его двухэлектронно-восстановленная форма:

$$\frac{E_0}{v} = \frac{1}{k_1[NADH]} + \frac{1}{k_4[S]} + \frac{2}{k_2[S] \left(1 + \frac{k_3[NADH]}{k_2[S]} + \frac{k_1[NADH]}{k_2[S]} \times \frac{[Zn]}{K_{Zn}} \right)}. \quad (7)$$

В этом случае добавление цинка в концентрации, равной K_{Zn} , увеличит кажущуюся константу скорости для акцептора электронов с $(1/k_4 + 1/k_2)$ до $1/k_4$. Для наглядности влияния Zn^{2+} на стадии восстановления субстрата, наклоны на рис. 5 рассматриваются только для невысоких концентраций NADH.

Еще два субстрата были исследованы на предмет проверки предположения, что Zn^{2+} ус-

коряет восстановления только двухэлектронных акцепторов. Влияние Zn^{2+} на скорость стадии восстановления убихинона (рис. 5, б) такое же, как и на восстановление феррицианида (рис. 5, а), в то время как влияние цинка на восстановление duroхинона (рис. 5, в) такое же, как и для DСPIР (рис. 2, а). Константы скорости стадии восстановления duroхинона и убихинона Zn^{2+} -связанным двухэлектронно-восстановленным ферментом одинаковы в пределах ошибки измерения и равны $(2,4 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Однако ускорение в стационарных условиях для убихинона несильное и различие в наклонах не достигает статистической значимости ($p = 0,065$), в отличие от индуцированного Zn^{2+} ускорения для duroхинона, которое статистически значимо ($p = 0,0003$) и составляет 2–3 раза, как наблюдалось ранее и для DСPIР. Такое различие между субстратами соответствует предложенной модели, а именно – убихинон может выступать как одно-, так и двухэлектронный акцептор, в то время как duroхинон является исключительно двухэлектронным акцептором (стандартный потенциал восстановления duroхинона в семихинон составляет -240 мВ , а для семихинона в duroгидрохинон – $+350 \text{ мВ}$, что делает двухэлектронное восстановление предпочтительным). Таким образом, цинк увеличивает константу скорости восстановления двухэлектронных акцепторов, поскольку двухэлектронно-восстановленный Zn^{2+} -связанный фермент содержит $FADH_2$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа в совокупности с предыдущей публикацией [21] ясно указывает на действие Zn^{2+} как дифференциального регулятора дегидрогеназной и диафоразной активностей LADH. За счет координации восстановлен-

ных цистеинов активного центра Zn^{2+} переключает фермент из режима дегидрогеназы в диафоруазу и избирательно активирует восстановление исключительно двухэлектронных субстратов-акцепторов. Это переключение происходит в интервале физиологических концентраций Zn^{2+} .

Величина эффекта Zn^{2+} на стадию восстановления субстрата определяется отношением k_2/k_4 , которое оказывается зависящим от того, является ли субстрат одно- или двухэлектронным акцептором (см. табл. 2). Феррицианид известен исключительно как одноэлектронный акцептор, в то время как большинство хинонов может выступать в обоих качествах [26]. Данные, представленные здесь, согласуются с рассмотрением DСPIР и duroхинона как двухэлектронных акцепторов, в отличие от одноэлектронных феррицианида и убихинона. Бензохинон также может выступать как одноэлектронный акцептор, что объясняет отсутствие ускорения вод воздействием Zn^{2+} . Однако отсутствие ускорения стадии окисления NADH заставляет предполагать, что основным фактором при восстановлении бензохинона является соотношение констант скорости $k_2 \geq k_1 > k_3$ (т.е. лимитирующей скоростью является двухэлектронное восстановление фермента под действием NADH).

Вывод о том, что двухэлектронно-восстановленный фермент в отсутствие Zn^{2+} является плохим двухэлектронным донором в сравнении с четырехэлектронно-восстановленным ферментом (LADH-4e) или восстановленным Zn-связанным ферментом (Zn-LADH-2e), напрямую подтверждается значениями констант скорости, определенными методом остановленной струи (рис. 3 и табл. 1). Таким образом, можно спекулировать на тему переключения фермента под действием Zn^{2+} из одноэлектронной в двухэлектронную редуктазу. Среди семейства

Таблица 2. Влияние цинка на элементарные стадии диафоразной реакции для различных акцепторных субстратов

Субстрат-акцептор	Фермент	Соотношение констант скорости	Число принимаемых электронов	Ускорение цинком стадии	
				окисления NADH	восстановления субстрата
Бензохинон	LADH	$k_2 \geq k_1$	1	нет	нет
Феррицианид	LADH	$k_2 \cong k_4 < k_1$	1	да	нет
Убихинон	LADH	$k_2 \cong k_4 < k_1$	1 или 2	да	нет
Дурохинон	LADH	$k_2 < k_4 < k_1$	2	да	да
DСPIР	LADH	$k_2 < k_4 < k_1$	2	да	да
DСPIР	<i>E. coli</i> TRR	$k_3 \geq k_1$	2	нет	нет

FAD-дителил оксидоредуктаз эффект переключения будет наиболее сильным для ферментов, у которых разница редокс-потенциалов двух- и четырехэлектронно-восстановленных форм фермента наиболее велика.

Характер влияния Zn^{2+} на кинетику восстановления феррицианида и убихинона, катализируемого LADH, напоминает его влияние на катализируемую LADH реакцию восстановления кислорода [21]. В частности, отсутствие изменений в наклоне прямых в двойных обратных координатах $1/v - 1/[O_2]$ в присутствии насыщающей концентрации цинка привело к заключению о равных константах скорости взаимодействия двух- и четырехэлектронно-восстановленного фермента с кислородом (k_2 и k_4) [21]. Однако такое заключение не означает, что продукты этих реакций одинаковы. Кислород может выступать и как одно-, и как двухэлектронный акцептор, образуя соответственно супероксид-радикал и пероксид водорода. Можно предположить, что восстановление кислорода комплексом с переносом заряда приведет к образованию значительно больших количеств супероксида, чем сообщалось ранее [21, 32]. В этой связи необходимо проведение дополнительных исследований по влиянию цинка на соотношение продуктов восстановления кислорода. Связывание цинка LADH может иметь физиологически значимый эффект, переключая с производства супероксида на пероксид водорода.

Предполагается, что внутриклеточная концентрация Zn^{2+} важна для поддержания митохондриального обмена между восстановленными нуклеотидов (NAD(P)H) и тиолов (LADH, тиоредоксин и глутатион редуктазные активности) [21,33]. По-видимому, изменяя внутриклеточную концентрацию Zn^{2+} можно изменить соотношение одно- и двухэлектронных продуктов восстановления. Цинк сильно активирует восстановление убихинона до убихинола, катализируемое липоамид-дегидрогеназой и глутатион-редуктазой, но ингибирует селено-содержащую тиоредоксин-редуктазу [34]. Продукты одноэлектронного восстановления под действием LADH – такие как семихиноны и супероксид-радикал – высокореактивные и потенциально опасные соединения, поэтому цинк может играть защитную роль, способствуя образованию двухэлектронных продуктов восстановления, таких как гидрохиноны или H_2O_2 , которые в гораздо меньшей степени повреждают клеточные структуры.

Двойственная роль цинка в повреждении тканей при ишемии-реперфузии широко об-

суждается [35–37], поскольку недавно сообщалось о его нейропротекторной роли как медикамента [38, 39]. Очевидно, что превентивное действие цинка может быть связано с активацией антиоксидантной (запускаемой Nrf2) и ангиогенной генетическими программами (стабилизация HIF за счет ингибирования цинком негативного регулятора стабильности HIF – HIF пролилгидроксилазы [40]), однако эти механизмы не могут объяснить положительные эффекты администрации высоких доз цинка после инсульта. Количество связанного цинка в клетках млекопитающих составляет порядка 200–300 мкМ [41], тогда как свободного цинка в матриксе митохондрий клеточной линии PC12 определяется всего 0,2 нМ с помощью радиометрической флуоресцентной пробы [42]. Переключение активностей, описанное в данной работе, происходит с кажущейся константой ингибирования цинком, равной 2 мкМ в присутствии Tris-буфера, что с поправкой на хелатирование составляет порядка 100 нМ свободного цинка (в соответствии с расчетами, приведенными в [21]). Выход свободного цинка при окислительном стрессе, приводящем к окислению тиолов белков, включая «хранилища» цинка – металлотионеины, может легко достичь субмикромольного уровня, достаточного для превращения LADH в диафоруазу. LADH является модельным ферментом для семейства флавин-дителил- NAD(P)H-зависимых оксидоредуктаз, таких как глутатион- и тиоредоксин-редуктазы. Наблюдения, приведенные в данной статье, указывают на возможную роль цинка в механизме выживания клетки за счет его координации тиолами активного центра данных ферментов, переключая диафоразную активность этих ферментов из одноэлектронного в двухэлектронный режим восстановления.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 20-04-00921, 17-54-33027 и 18-29-09154).

Благодарности. Авторы глубоко признательны миссис Джилл Эшби и проф. Роджеру Н. Ф. Торнли (Великобритания) за неоценимую помощь в проведении анаэробных экспериментов методом остановленной струи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koh, J.-Y., Suh, S. W., Gwag, B. J., He, Y. Y., Hsu, C. Y., and Choi, D. W. (1996) The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia, *Science*, **272**, 1013-1016, doi: 10.1126/science.272.5264.1013.
2. Choi, D. W., and Koh, J. Y. (1998) Zinc and brain injury, *Ann. Rev. Neurosci.*, **21**, 347-375, doi: 10.1146/annurev.neuro.21.1.347.
3. Sensi, S. L., Paoletti, P., Bush, A. I., and Sekler, I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 780-791, doi: 10.1038/nrn2734.
4. Shuttleworth, C. W., and Weiss, J. H. (2011) Zinc: new clues to diverse roles in brain ischemia, *Trends Pharmacol. Sci.*, **32**, 480-486, doi: 10.1016/j.tips.2011.04.001.
5. Skulachev, V. P., Christyakov, V. V., Jasaitis, A. A., and Smirnova, E. G. (1967) Inhibition of the respiratory chain by zinc ions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 1-6, doi: 10.1016/0006-291x(67)90242-2.
6. Sensi, S. L., Yin, H. Z., Carriedo, S. G., Rao, S. S., and Weiss, J. H. (1999) Preferential Zn²⁺ influx through Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 2414-2419, doi: 10.1073/pnas.96.5.2414.
7. Dong, W., Qi, Z., Liang, J., Shi, W., Zhao, Y., Luo, Y., Ji, X., and Liu, K. J. (2015) Reduction of zinc accumulation in mitochondria contributes to decreased cerebral ischemic injury by normobaric hyperoxia treatment in an experimental stroke model, *Exp. Neurol.*, **272**, 181-189, doi: 10.1016/j.expneurol.2015.04.005.
8. Gazaryan, I. G., Krasinskaya, I. P., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2007) Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition, *J Biol. Chem.*, **282**, 24373-24380, doi: 10.1074/jbc.M611376200.
9. Ji, S. G., Medvedeva, Yu. V., and Weiss, J. H. (2020) Zn²⁺ entry through the mitochondrial calcium uniporter is a critical contributor to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration, *Exp. Neurol.*, **325**, 113161, doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113161.
10. Brown, A. M., Kristal, B. S., Effron, M. S., Shestopalov, A. I., Ullucci, P. A., Sheu, K.-F. R., Blass, J. P., and Cooper, A. J. L. (2000) Zn²⁺ inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, **275**, 13441-13447, doi: 10.1074/jbc.275.18.13441.
11. Casola, L., Brumby, P. E., and Massey, V. (1966) The reversible conversion of lipoyl dehydrogenase to an artificial enzyme by oxidation of sulfhydryl groups, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4977-4984.
12. Veeger, C., and Massey, V. (1962) Inhibition of lipoyl dehydrogenase by trace metals, *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 83-100, doi: 10.1016/0006-3002(60)90108-6.
13. Casola, L., and Massey, V. (1966) Differential effects of mercurial on the lipoyl reductase and diaphorase activities of lipoyl dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4985-4993.
14. Nakamura, M., and Yamazaki, I. (1972) One-electron transfer reactions in biochemical systems. VI. Changes in electron transfer mechanism of lipoamide dehydrogenase by modification of sulfhydryl groups, *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 249-257, doi: 10.1016/0005-2728(72)90113-2.
15. Thorpe, C., and Williams, C. H., Jr. (1975) Modification of pig heart lipoamide dehydrogenase by cupric ions, *Biochemistry*, **14**, 2419-2424, doi: 10.1021/bi00682a023.
16. Lowe, C. R. (1977) Immobilised lipoamide dehydrogenase. 2. Properties of the enzyme immobilised to agarose through spacer molecules of various lengths, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 401-409, doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11608.x.
17. Gutierrez Correa, J., and Stoppani, A. O. M. (1993) Inactivation of lipoamide dehydrogenase by cobalt(II) and iron(II) Fenton systems: effect of metal chelators, thiol compounds and adenine nucleotides, *Free Radic. Res. Commun.*, **19**, 303-314, doi: 10.3109/10715769309056519.
18. Olsson, J. M., Xia, L., Eriksson, L. C., and Bjornstedt, M. (1999) Ubiquinone is reduced by lipoamide dehydrogenase and this reaction is potently stimulated by zinc, *FEBS Lett.*, **448**, 190-192, doi: 10.1016/s0014-5793(99)00363-4.
19. Xia, L., Bjornstedt, M., Nordman, T., Eriksson, L. C., and Olsson, J. M. (2001) Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1486-1490, doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02013.x.
20. Hopkins, N., and Williams, C. H., Jr. (1995) Characterization of lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli* lacking the redox active disulfide: C44S and C49S, *Biochemistry*, **34**, 11757-11765, doi: 10.1021/bi00037a013.
21. Gazaryan, I. G., Krasnikov, B. F., Ashby, G. A., Thorneley, R. N., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 10064-10072, doi: 10.1074/jbc.M108264200.
22. Popov, V. O., Gazarian, I. G., Egorov, A. M., and Berezin, I. V. (1985) NAD-dependent hydrogenase from the hydrogen-oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* Z-1. Kinetic studies of the NADH-dehydrogenase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **827**, 466-471.
23. Maeda-Yorita, K., Russell, G. C., Guest, J. R., Massey, V., and Williams, C. H., Jr. (1991) Properties of lipoamide dehydrogenase altered by site-directed mutagenesis at a key residue (I184Y) in the pyridine nucleotide binding domain, *Biochemistry*, **30**, 11788-11795, doi: 10.1021/bi00115a008.
24. Van Berkel, W. J. H., Regelink, A. G., Beintema, J. J., and de Kok, A. (1991) The conformational stability of the redox states of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*, *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1049-1055, doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16469.x.
25. Tsai, C. S. (1980) Kinetic studies of multifunctional reactions catalysed by lipoamide dehydrogenase, *Int. J. Biochem.*, **11**, 407-413, doi: 10.1016/0020-711x(80)90311-0.
26. Vienozinskis, J., Butkus, A., Cenas, N., and Kulys, J. (1990) The mechanism of the quinone reductase reaction of pig heart lipoamide dehydrogenase, *Biochem. J.*, **269**, 101-105, doi: 10.1042/bj2690101.
27. Williams, C. H., Arcsott, L. D., Muller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K., and Schirmer, R. H. (2000) Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6110-6117, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01702.x.
28. Lennon, B. W., and Williams, C. H., Jr. (1996) Enzyme-monitored turnover of *Escherichia coli* thioredoxin reductase: insights for catalysis, *Biochemistry*, **35**, 4704-4712, doi: 10.1021/bi952521i.
29. Lennon, B. W., Williams, C. H., Jr., and Ludwig, M. L. (2000) Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase, *Science*, **289**, 1190-1194, doi: 10.1126/science.289.5482.1190.
30. Williams, C. H., Jr. (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*, *FASEB J.*, **9**, 1267-1276, doi: 10.1096/fasebj.9.13.7557016.
31. Dooijewaard, G., and Slater, E. C. (1976) Steady-state kinetics of high molecular weight (type-I) NADH dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 1-15, doi: 10.1016/0005-2728(76)90109-2.

32. Bando, Y., and Aki, K. (1991). Mechanisms of generation of oxygen radicals and reductive mobilization of ferritin iron by lipoamide dehydrogenase, *J. Biochem.*, **109**, 450-454, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123402.
33. Gaballa, A., and Helmann, J. D. (2002) A Peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, **45**, 997-1005, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03068.x.
34. Nordman, T., Xia, L., Björkhem-Bergman, L., Damdimopoulos, A., Nalvarte, I., Arnér, E. S., Spyrou, G., Eriksson, L. C., Björnstedt, M., and Olsson, J. M. (2003) Regeneration of the antioxidant ubiquinol by lipoamide dehydrogenase, thioredoxin reductase and glutathione reductase, *Biofactors*, **18**, 45-50, doi: 10.1002/biof.5520180206.
35. Galasso, S. L., and Dyck, R. H. (2007) The role of zinc in cerebral ischemia, *Mol. Med.*, **13**, 380-387, doi: 10.2119/2007-00044.Galasso.
36. Levenson, C. W. (2005) Zinc supplementation: neuroprotective or neurotoxic? *Nutr. Rev.*, **63**, 122-125, doi: 10.1111/j.1753-4887.2005.tb00130.x.
37. Ischia, J., Bolton, D. M., and Patel, O. (2019) Why is it worth testing the ability of zinc to protect against ischaemia reperfusion injury for human application, *Metallomics*, **11**, 1330-1343, doi: 10.1039/c9mt00079h.
38. Aquilani, R., Baiardi, P., Scocchi, M., Iadarola, P., Verri, M., Sessarego, P., Boschi, F., Pasini, E., Pastoris, O., and Viglio, S. (2009) Normalization of zinc intake enhances neurological retrieval of patients suffering from ischemic strokes, *Nutr. Neurosci.*, **12**, 219-225, doi: 10.1179/147683009X423445.
39. Kitamura, Y., Iida, Y., Abe, J., Ueda, M., Mifune, M., Kasuya, F., Ohta, M., Igarashi, K., Saito, Y., and Saji, H. (2006) Protective effect of zinc against ischemic neuronal injury in a middle cerebral artery occlusion model, *J. Pharmacol. Sci.*, **100**, 142-148, doi: 10.1254/jphs.fp0050805.
40. Osipyants, A. I., Smirnova, N. A., Khristichenko, A. Yu., Nikulin, S. V., Zakhariants, A. A., Tishkov, V. I., Gazaryan, I. G., and Poloznikov, A. A. (2018) Metal ions as activators of hypoxia inducible factor, *Moscow University Chem. Bull.*, **73**, 13-18.
41. Maret, W. (2015) Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules, *Metallomics*, **7**, 202-211, doi: 10.1039/c4mt00230j.
42. McCranor, B. J., Bozym, R. A., Vitolo, M. I., Fierke, C. A., Bambrick, L., Polster, B. M., Fiskum, G., and Thompson, R. B. (2012) Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an *in vitro* model of ischemia/reperfusion, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **44**, 253-263, doi: 10.1007/s10863-012-9427-2.

ZINC SWITCH IN PIG HEART LIPOAMIDE DEHYDROGENASE: STEADY-STATE AND TRANSIENT KINETIC STUDIES OF THE DIAPHORASE REACTION*

**I. G. Gazaryan^{1,2,3,4}, V. A. Shchedrina^{3,5}, N. L. Klyachko^{3,5},
A. A. Zakhariants^{4,6}, S. V. Kazakov², and A. M. Brown^{1**}**

¹ Department of Cell Biology and Anatomy, New York Medical College, 10605 NY, USA; E-mail: abraham_brown@nymc.edu

² Department of Chemistry and Physical Sciences, Dyson College of Arts and Sciences, Pace University, 861 Bedford Road, Pleasantville, 10570 NY, USA

³ Department of Chemical Enzymology, Lomonosov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁵ Derzhavin Tambov State University, 392000 Tambov, Russia

⁶ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

Submitted May 27, 2020

Revised June 11, 2020

Accepted June 14, 2020

Elevation of intracellular Zn²⁺ following ischemia contributes to cell death by affecting mitochondrial function. Zn²⁺ is a differential regulator of the mitochondrial enzyme lipoamide dehydrogenase (LADH) at physiological concentrations ($K_a = 0.1 \mu\text{M}$ free zinc), inhibiting lipoamide and accelerating NADH dehydrogenase activities. These differential effects have been attributed to coordination of Zn²⁺ by LADH active-site cysteines. A detailed kinetic mechanism has now been developed for the diaphorase (NADH-dehydrogenase) reaction catalyzed by pig heart LADH using 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP) as a model quinone electron acceptor. Anaerobic stopped-flow experiments show that two-electron reduced LADH is 15-25-fold less active towards DCPIP reduction than four-electron reduced enzyme, or Zn²⁺-modified reduced LADH (the corresponding values of the rate constants are $(6.5 \pm 1.5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(9 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, and $(1.6 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively). Steady-state kinetic studies with different diaphorase substrates show that Zn²⁺ accelerates reaction rates exclusively for two-electron acceptors (duroquinone, DCPIP), but not for one-electron acceptors (benzoquinone, ubiquinone, ferricyanide). This implies that the two-electron reduced form of LADH, prevalent at low NADH levels, is a poor two-electron donor compared to the four-electron reduced or Zn²⁺-modified reduced LADH forms. These data suggest that zinc binding to the active-site thiols switches the enzyme from one- to two-electron donor mode. This zinc-activated switch has the potential to alter the ratio of superoxide and H₂O₂ generated by the LADH oxidase activity.

Keywords: ubiquinone, 2,6-dichlorophenol indophenol, duroquinone, ferricyanide, enzyme kinetics, dehydrolipoyl dehydrogenase