

УДК 577.15:616.36-002-099.3:616-003.96

АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА. МОЛЕКУЛЯРНАЯ И НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

Зимин Ю.В., Уланова А.А., Соловьева А.Г.

*ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии»,
Нижегород, e-mail: sannag5@mail.ru*

В обзоре проведен анализ литературы, касающийся особенностей молекулярной и надмолекулярной регуляции одного из ферментов класса оксидоредуктаз, алкогольдегидрогеназы (АДГ). Фермент широко распространен в природе и выделен из различных источников у человека и животных. Установлено, что у животных АДГ преимущественно находится в форме димера. В настоящее время различают три класса алкогольдегидрогеназы, полипептидные цепи которых являются продуктами экспрессии 5 генетических локусов. У человека АДГ локализуется в желудочно-кишечном тракте, почках, эндокринных железах, мозге. Фермент сосредоточен преимущественно в цитозольной фракции. АДГ митохондрий находится, предположительно, в межмембранном пространстве. При этом одна из форм фермента, с высоким сродством к ацетальдегиду, связана с внешней стороной внутренней мембраны митохондрий. Другая форма алкогольдегидрогеназы, с низким сродством к ацетальдегиду, взаимодействует с внутренней стороной внешней мембраны.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, свойства, регуляция

ALCOHOLE DEHYDROGENASE. MOLECULAR AND SUPRAMOLECULAR REGULATOIN

Zimin Y.V., Ulanova A.A., Soloveva A.G.

Research Institute of Traumatology and Orthopedic, Nizhny Novgorod, e-mail: sannag5@mail.ru

The analysis of literature, touching the features of the molecular and supramolecular adjusting of one of enzymes of class of oxidoreductases,alcohole dehydrogenase (ADG), has been conducted in a review. The enzyme widespread in the nature also is allocated from various sources at the person and animals. It is established, that at animals ADG mainly is in the dimer form. Now distinguish three classes of alcohole dehydrogenase, polypeptide chains of which are products of an expression of 5 genetic locuses. At person ADG it is localised in a gastroenteric path, kidneys, endocrine glands, brain. The enzyme is concentrated mainly in cytosolic fraction. ADG of mitochondries is, presumably, between membranes. Thus one of forms of enzyme, with high affinity to acetaldehyde, relates to exteriority of internal membrane of mitochondria. Other form of alcohole dehydrogenase, with low affinity to acetaldehyde, interacts with the internal side of external membrane.

Keywords: alcohole dehydrogenase, properties, regulation

Современная энзимология в классическом понимании живет сегодня в новом биоинформационном измерении, когда ферменты рассматриваются не только как отдельные представители макромолекул, но и изучается роль каждого из них в метаболизме клеток в целом. Большинство энзимологов прекрасно понимают, что наиболее значимые эксперименты, направленные на выяснение физико-химических механизмов биокатализа, можно получить на очищенных ферментах. Однако такого рода «чистые» эксперименты порождают закономерный вопрос: можно ли свойства ферментов, наблюдаемые *in vitro*, корректно отнести к условиям их функционирования в живой клетке. Это можно сделать только гипотетически. Поэтому многие исследователи склонны считать, что традиционная энзимология, исследующая поведение очищенных ферментов в водных растворах – наука во многом «искусственная». Реальный выход из создавшегося положения – это разработка и изучение надмолекулярных модельных систем, отражающих в различной мере условия микроокружения ферментов в условиях *in vivo*.

На примере одного из ферментов класса оксидоредуктаз, алкогольдегидрогеназы (АДГ) мы попытались провести анализ особенностей молекулярной и надмолекулярной регуляции данного фермента по данным литературы.

Известно, что алкогольдегидрогеназа катализирует окисление спиртов и восстановление альдегидов в присутствии кофакторов НАД и НАДН. В физиологических условиях ферментативная реакция сдвинута в сторону образования эндогенного этанола, а не ацетальдегида [1].

Фермент широко распространен в природе и выделен из различных источников у человека и животных [11, 12, 14, 6, 18]. Установлено, что у животных АДГ преимущественно находится в форме димера. Для некоторых ферментов из бактерий, дрожжей характерны тетрамерные формы АДГ.

В настоящее время различают три класса АДГ (I–III), полипептидные цепи которых (α ; β 1–3; j 1–2; p ; x) являются продуктами экспрессии 5 генетических локусов (АДГ 1-5).

АДГ-I – является основным ферментом печени, обуславливающим при алкогольной

интоксикации окисление большей части поступившего в организм этанола. Он построен из субъединиц первых трёх типов (α ; β ; γ), комбинирующихся в различные гомо- и гетеродимеры. Полиморфизм АДГ печени человека в значительной мере обусловлен этим классом изоферментов. Данная форма фермента имеет низкие значения K_m для этанола, высокую чувствительность при ингибировании пиразолом и его производным, а также наиболее широкую субстратную специфичность среди всех классов ферментов. Комбинация субъединиц приводит к образованию трёх основных изоферментов АДГ-I: EE, ES и SS. Специфичность изоферментов не абсолютна. SS – фермент, который проявляет активность по отношению к спиртам, а EE – изофермент, активный в реакциях окисления гидроксильных групп боковых цепей ряда стероидов [7].

АДГ-II – гомодимер, состоящий из полипептидных цепей «р». Он характеризуется низким сродством к этанолу, незначительно ингибируется пиразолом, не окисляет метанол, этиленгликоль, циклогексанол. Считается, что он обеспечивает окисление этанола до 40% при его концентрации в крови порядка 100 мМ. Наиболее вероятным физиологическим субстратом АДГ-II являются альдегиды, продукты обмена норадrenalина, для которых значение K_{cat}/K_m на два порядка выше, чем других субстратов [9].

АДГ-III состоит из двух одинаковых субъединиц типа «х». Данный фермент не чувствителен к пиразолу. Имеет низкое сродство к короткоцепочечным спиртам. Метанол не является субстратом для АДГ-III. Скорость окисления этанола возрастает линейно до 2,5 М концентрации без признаков насыщения. Роль этого фермента в окислении этанола незначительна, физиологические функции пока не известны [13].

Практически все препараты АДГ при электрофорезе дают множественные полосы (коммерческие препараты АДГ печени лошади – 6; грубые экстракты тканей – до 9–12 полос), что указывает на наличие у фермента множественных молекулярных форм и выраженный полиморфизм [10].

НАД-зависимая АДГ-I окисляет первичные, вторичные и циклические спирты. Первичные спирты окисляются до альдегидов, вторичные – до кетонов. Ингибиторами фермента являются вещества, связывающие цинк или взаимодействующие с SH-группами: 8-оксихинолин, фенантролин, этилендиаминтетрауксусная кислота, бипиридин, 4-метилпиразол, меркаптоэтанол [8]. Конкурентными ингибиторами АДГ являются галогенсодержащие субстра-

ты: трихлорэтанол, хлоралгидрат, а также фенилгидразин. Для ряда соединений: адреноблокаторы, амфетамин, тиреоидные гормоны, диметилформамид, дисульфидрам, амантадин – механизм ингибирования окончательно не выяснен [17]. Значительно меньше известно об активаторах АДГ. Так, очищенный фермент из печени крыс активируется дезоксихолом натрия (1 мМ) и другими желчными кислотами. Показана активация алкогольдегидрогеназы путём гликозилирования [19].

Показано, что увеличение количества АДГ, связанной на единицу массы носителя, сопровождается снижением её активности. Причиной снижения активности дегидрогеназы при её иммобилизации являются диффузионные затруднения, препятствующие доступу субстратов к активным центрам фермента.

Установлено, что при повышении ионной силы раствора (0,1 М NaCl) наблюдается полная диссоциация комплексов формилдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы с поликатионами, что свидетельствует об электростатическом характере сил, обуславливающих образование данных комплексов. Имеются сведения, указывающие на связь алкогольдегидрогеназы с сорбитдегидрогеназой, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой в цитоплазме печени крыс [5]. Показана возможность образования комплекса между глицеральдегидфосфатдегидрогеназой и алкогольдегидрогеназой дрожжей, который характеризуется медленной ассоциацией и еще более медленной диссоциацией.

Изменение специфичности фермента в результате его солубилизации может быть как истинным, связанным с изменением каталитических свойств самого фермента, так и кажущимся, т.е. обусловленным изменением величины константы Михаэлиса, которая зависит от локальной концентрации субстрата вокруг фермента. Ярким примером изменения субстратной специфичности алкогольдегидрогеназы, обусловленного эффектами распределения субстрата, является реакция окисления алифатических спиртов, катализируемая АДГ из печени лошади в системе обращённых мицелл АОТ (аэрозоль диизооктилсульфосукцинат натрия – один из наиболее широко применяемых поверхностно активных веществ) в октане. Переход от водного раствора к системе обращённых мицелл сопровождается сдвигом максимума на кривой зависимости константы скорости второго порядка этой реакции K_{cat}/K_m от длины углеводородной цепи в молекуле спиртового субстрата. А, именно, в воде оптимальный субстрат – октанол, в коллоидном растворе воды в ок-

тане – бутанол. Таким образом, субстратная специфичность АДГ, мерой которой является величина K_{cat}/K_m , резко изменяется при переходе от водного раствора к мицеллярному. В то же время конформация активного центра АДГ при таком переходе не меняется. Кроме того, изучение закономерностей равновесия ферментативной реакции в мицеллярной системе позволило предположить механизм регуляции метаболитов в клетке путём небольшого изменения степени гидратации биомембран [15].

Вполне естественным является объяснение функции АДГ, присутствующей в большом количестве в печени животных и человека, в том, что фермент образует, а не потребляет эндогенный этанол и таким образом активно регулирует уровень эндогенного ацетальдегида.

Иммуногистохимическим методом показано, что АДГ локализуется у человека в желудочно-кишечном тракте, почках, эндокринных железах, мозге [16]. Фермент сосредоточен преимущественно в цитозольной фракции, хотя не исключается возможность его взаимодействия с мембранами субклеточных органелл, в частности, митохондрий.

Практически мало, что известно о топографии фермента в клетке. Имеется ряд работ, указывающих на то, что алкогольдегидрогеназа присутствует в митохондриальной фракции печени [3, 4, 2].

Предполагается, что АДГ митохондрий находится, преимущественно, в межмембранном пространстве. При этом одна из форм АДГ, с высоким сродством к ацетальдегиду, связана с внешней стороной внутренней мембраны митохондрий, а другая форма АДГ, с низким сродством к ацетальдегиду, взаимодействует с внутренней стороной внешней мембраны.

В целом, в митохондриях видимо существует надмолекулярный пул (метаболический или энзиматический компартмент) алкогольдегидрогеназы, который регулирует содержание эндогенного этанола и ацетальдегида в клетке.

Выяснение особенностей регуляции митохондриальных форм фермента требует проведения дальнейших исследований.

Список литературы

1. Ашмарин И.П. Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины // Успехи биологической химии – 2003. – Т. 43. – С. 3–18.
2. Зимин Ю.В., Соловьева А.Г. Регуляторная роль надмолекулярного комплекса алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы митохондрий клетки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – № 12. – С. 644–645.

3. Зимин Ю.В., Сяткин С.П., Березов Т.Т. Надмолекулярная регуляция активности некоторых оксидоредуктаз клетки в норме и патологии // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т.47, № 3. – С. 247–287.

4. Зимин Ю.В., Сяткин С.П., Березов Т.Т. Молекулярные механизмы метаболической адаптации патологически измененной печени при токсическом гепатите // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т.47, № 3. – С. 346–352.

5. Судовцев В.Е. К вопросу об электрофоретической оценке множественных молекулярных форм ферментов и их соотношениях на примере алкогольдегидрогеназы из цитозоля печени млекопитающих // Вопр. мед. химии. – 1985. – Т. 31, № 3. – С. 71–77.

6. Brown S.D. et al. Mutant alcohol dehydrogenase leads to improved ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum* // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – Vol. 108, № 33. – P. 13752–13757.

7. Casini A. Human hepatic stellate cells express class I alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase but not cytochrome P450 2E1 // J Hepatol. – 1998. – Vol. 28, № 1. – P. 40–45.

8. Cheng Li-Yao, Lek Lee-Hua. Inhibition of alcohol dehydrogenase by thiol compounds // FEBS Lett. – 1992. – Vol. 300, № 3. – P. 251–253.

9. Chrostek L., Szmitekowski M. Serum activities of classes I and II alcohol dehydrogenase in toxic liver damage // Clin. Chem. Acta. – 1998. – Vol. 271, № 2. – P. 163–169.

10. Goedde H.W., Agarwal D.P. Polymorphism of aldehyde dehydrogenase and alcohol sensitivity // Enzyme. – 1987. – Vol. 37, № 1–2. – P. 29–44.

11. The protective effects of osmolytes on yeast alcohol dehydrogenase conformational stability and aggregation / H.Y. Han, Z.G. Yao, C.L. Gong, W.A. Xu // Protein Pept Lett. – 2010. – № 8. – P. 1058–1066.

12. Herdendorf T.J., Plapp B.V. Origins of the high catalytic activity of human alcohol dehydrogenase 4 studied with horse liver A317C alcohol dehydrogenase // Chem Biol Interact. – 2011. – Vol. 191, № 1–3. – P. 42–47.

13. Jensen D.E., Belka G.K., Bois G.C. S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzymes // Biochem. J. – 1998. – Vol. 331, № 2. – P. 659–668.

14. Matsumoto M. et al. Ethanol metabolism by HeLa cells transduced with human alcohol dehydrogenase isoenzymes: control of the pathway by acetaldehyde concentration // Alcohol Clin Exp Res. – 2011. – Vol. 35, № 1. – P. 28–38.

15. Minter S.D. Micellar enzymology for thermal, pH, and solvent stability // Methods Mol Biol. – 2011. – № 679. – P. 19–24.

16. Montavon P., Felber J. P., Holmquist B. A human liver alcohol dehydrogenase enzyme – linked immunosorbent assay method specific for class I, II and III isozymes // Anal. Biochem. – 1989. – Vol. 176, № 1. – P. 48–56.

17. Schindler J.F., Berst K.B., Plapp B.V. Inhibition of human alcohol dehydrogenase by formamides // J.Med. Chem. – 1998. – Vol. 41, № 10. – P. 1696–1701.

18. Strommer J. The plant ADH gene family // Plant J. – 2011. – Vol. 66, № 1. – P. 128–142.

19. Walton D.J., Shilton B.H. Effect of glycation upon activity of liver alcohol dehydrogenase // Adv Exp Med Biol. – 1993. – № 328. – P. 493–500.

References

1. Ashmarin I.P. *Uspekhi Biologicheskoy Khimii*, 2003, T. 43, pp. 3–18.
2. Zimin Yu.V., Soloveva A.G. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, no. 12, pp. 644–645.
3. Zimin Yu.V., Syatkin S.P., Berezov T.T. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 2001, T.47, no. 3, pp. 247–287.

4. Zimin Yu.V., Syatkin S.P., Berezov T.T. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 2001, T.47, no. 3, pp. 346–352.
5. Sudovtsev V.E. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 1985, T. 31, no. 3, pp. 71–77.
6. Brown S.D. et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, Vol. 108, no. 33, pp.13752–13757.
7. Casini A. J. *Hepatology*. 1998, Vol. 28, no. 1, pp. 40–45.
8. Cheng Li-Yao, Lek Lee-Hua. *FEBS Lett.* 1992, Vol. 300, no. 3, pp. 251–253.
9. Chrostek L., Szmitkowski M. *Clin. Chem. Acta*, 1998, Vol. 271, no. 2, pp. 163–169.
10. Goedde H.W., Agarwal D.P. *Enzyme*. 1987, Vol. 37, no. 1 – 2, pp. 29–44.
11. Han H.Y., Yao Z.G., Gong C.L., Xu W.A. *Protein Pept Lett.* 2010, no. 8, pp. 1058–1066.
12. Herdendorf T.J., Plapp B.V. *Chem. Biol. Interact.* 2011, Vol. 191, no. 1–3, pp. 42–47.
13. Jensen D.E., Belka G.K., Bois G.C. *Biochem. J.*, 1998, Vol. 331, no. 2, pp. 659–668.
14. Matsumoto M. et al. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2011, Vol. 35, no. 1, pp. 28–38.
15. Minteer S.D. *Methods Mol. Biol.* 2011, no. 679, pp. 19–24.
16. Montavon P., Felber J.P., Holmquist B. *Anal. Biochem.* 1989, Vol. 176, no. 1, pp. 48–56.
17. Schindler J.F., Berst K.B., Plapp B.V. *J. Med. Chem.* 1998, Vol. 41, no. 10, pp. 1696–1701.
18. Strommer J. *Plant J.*, 2011, Vol. 66, no. 1, pp.128–142.
19. Walton D.J., Shilton B.H. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993, no. 328, pp. 493–500.

Рецензенты:

Веселов А.П., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и физиологии растений, декан биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород.

Корягин А.С., д.б.н., профессор кафедры физиологии и биохимии человека и животных ННГУ им. Н.И. Лобачевского, зам. декана по научной работе биологического факультета, г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 20.02.2012.