

МЕХАНИЗМЫ БЫСТРОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Веснік ГрДу. Сер.2 // 2010.- № 2.- С.146-152.

В обзоре представлены основные механизмы быстрой регуляции пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ-комплекс) млекопитающих. Он включает некоторые новые данные о роли фосфорилирования-дефосфорилирования, об изоформах ПДГ-превращающих ферментов (киназа и фосфатаза), о влиянии экзогенного тиаминдифосфата и некоторых дивалентных ионов на кинетические параметры ПДГ-комплекса, насыщенного ТДФ. Это влияние может иметь аллостерическую природу. Предполагается, что важными факторами регуляции активности ПДГ-комплекса являются обратимое фосфорилирование и прямое влияние кофакторов на сродство ПДГ-комплекса млекопитающих.

Последовательный процесс окислительного декарбосилирования пирувата осуществляется с помощью мультиферментного пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ-комплекс), который катализирует превращение пирувата, КоА и NAD^+ в ацетил-КоА, NADH и CO_2 [33, 34, 47]. Основной продукт, КоА-активированный двухуглеродный компонент, может конденсироваться с оксалоацетатом в первой реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) или использоваться для синтеза жирных кислот и холестерина. Так как этот процесс связывает гликолиз с ЦТК и биосинтезом липидов, он занимает центральное место в клеточном метаболизме. В эукариотических клетках ПДГ-комплекс локализуется в матриксе митохондрий и как путем экспрессии генов, контролирующей синтез отдельных компонентов этого комплекса *de novo*, так и с помощью некоторых других механизмов, осуществляющих быструю регуляцию его активности [33, 34, 47, 53, 54].

Структура ПДГ-комплекса

ПДГ-комплекс в клетках тканей млекопитающих представляет собой достаточно сложное образование [39, 47]. Его структурное ядро состоит из 60 липоат-содержащих субъединиц дигидролипоацетилтрансферазы (НФ 2.3.2.12, E2) [38, 57]. Каждая субъединица содержит внутренний домен (ВД), связывающий домен (СД) и два липоильных домена (ЛД1 и ЛД2), объединенные гибкими связями. Внутренние домены образуют пентагональный додекаэдрон, а другие образуют выступающую «качающуюся ручку», включающую липоатный остаток [35]. 30 гетеротетрамерных ($\alpha_2\beta_2$) молекул ТДФ-содержащей ПДГ (НФ 1.2.4.1, E1) объединены в связанные домены E2 [16, 39]. 12 гомодимерных молекул FAD-содержащей дигидролипоамиддегидрогеназы (НФ 1.8.1.4, E3) связаны со связывающими доменами так называемого «E3-связывающего белка», который отличается от типичной субъединицы E2, так как он содержит только один липоильный домен (ЛД3) и не обладает каталитической активностью [40].

Изучение структурной организации E1 может быть особо полезно для понимания его каталитических и регуляторных механизмов. Например, кристаллическая структура голофермента ПДГ человека при разрешении 1,95 Å [43] дает доказательства возможности челночного движения E1 гетеродимеров ($\alpha\beta$). Это согласуется с механизмом флип-флоп каталитического действия E1 человека [20]. Исследования с применением точечного мутагенеза, кинетического анализа и рентгеноструктурной кристаллографии E1 человека показали, что Про-188, Мет-181 и Арг-349 в α -субъединице, а также Трп-135 в β -субъединице играют важную роль в определении структуры белка. α Про-188 и α Мет-181 остатки имеют большое значение для связывания ТДФ [26, 38].

Регуляция обратимого фосфорилирования

В настоящее время не подлежит сомнению, что фосфорилирование-дефосфорилирование является основным механизмом, контролирующим активность ПДГ-комплекса у млекопитающих [3, 13, 18, 27, 29, 37, 41]. Для реализации этого механизма ПДГ-комплекс использует два специфических фермента: киназу пируватдегидрогеназы (НФ 2.7.1.99, ПДГК) и фосфатазу ПДГ (нет НФ номера, ПДГФ). Фосфорилирование и соответствующая инактивация E1 катализируется под действием ПДГК, в то время как дефосфорилирование и реактивация E1 осуществляется под действием ПДГФ [27, 54]. Регуляторные ферменты интегрированы с ПДГ-комплексом в основном через E2-липоильные домены [40].

Характеристика ПДГ киназ

ПДГК – это специфическая киназа, которая фосфорилирует три сериновых остатка в трех отдельных местах E1-компонента ПДГ-комплекса, используя АТФ в качестве донора фосфатных групп [55, 39, 41, 37]. ПДГК млекопитающих представлена четырьмя изоформами [14, 15, 40]. Гены, которые кодируют ПДГК₁, ПДГК₂ и ПДГК₄, наиболее сильно экспрессируются в мышечной ткани скелетных мышц и сердца, а также в ткани печени [14, 15, 40, 50]. С другой стороны, гены, кодирующие ПДГК₃ и ПДГК₂, экспрессируются в почках, мозге и яичках [17, 32]. Это свидетельствует о существовании существенных различий изоформ ПДГК и их мРНК в разных тканях млекопитающих. Установлена трехмерная структура ПДГК (изоформа 2) у крыс [45]. Интересно, что ПДГК млекопитающих обладают низкой гомологичностью по сравнению с другими эукариотическими сериновыми протеинкиназами, но сходны с бактериальными гистидиновыми протеинкиназами [40]. Однако их каталитические механизмы различаются, поскольку ПДГК фосфорилируют сериновый остаток непосредственно, без фосфорилирования гистидинового

интермедиата [45]. Каждая изоформа ПДГК представляет собой гомодимер, состоящий из субъединиц с молекулярной массой от 39 до 48 кДа [32, 34].

Регуляторные свойства ПДГ киназ

ПДГ-комплекс млекопитающих содержит только 1-3 молекулы ПДГК [57], которые связаны в основном с мобильными липоильными доменами E2-субъединиц [28]. Только изоформа ПДГК₄ связывается в основном с липоильным доменом «E3-связывающего белка» [13]. Такая локализация ПДГК-аз на «качающихся ручках» и их перенос с одного липоильного домена на другой обеспечивает возможность достижения почти всех мест фосфорилирования в 30 молекулах комплекса E1 [25]. ПДГК-азы активируются посредством конформационных изменений, связанных с липоильными доменами [13, 23, 36]. Более того, активность ПДГК стимулируется при восстановлении и и ацетилировании липоильных остатков, происходящих при действии ПДГ-комплекса [40]. Многочисленные исследования ПДГ-комплекса, изолированного из разных тканей млекопитающих, показывают, что ПДГК стимулируется под влиянием NADH, пирувата, КоА и ацетил-КоА [23, 24, 39, 56, 57]. Высокое соотношение NADH/NAD⁺ вызывает восстановление липоильных групп через обратимую реакцию, катализируемую дигидролипоамиддегидрогеназой (E3), а высокое соотношение ацетил-КоА/КоА способствует ацетилированию восстановленных липоильных групп под влиянием E2 [32, 34]. Высокие концентрации NADH и ацетил-КоА обнаружены в митохондриях при интенсивном окислении жирных кислот, например, во время голодания, при высоком содержании жиров в пище и при диабете [40, 42]. Для этих метаболических состояний характерны фосфорилирование и сопутствующая инактивация ПДГ-комплекса посредством стимулирования ПДГК. С другой стороны, высокие концентрации NAD⁺ и КоА ведут к угнетению ПДГК, и ПДГ-комплекс остается активным [18, 56]. Пируват также оказывает угнетающее влияние на ПДГК [36]. Изоформа ПДГК₂ более чувствительна к угнетению пируватом и стимуляции NADH и ацетил-КоА, чем другие изоформы ПДГК [37, 40]. Конкурентное ингибирование ПДГК в присутствии АДФ, но не АТФ также вносит существенный вклад в регуляцию активности ПДГ-комплекса [3, 55]. Изучение ПДГК₂ показало, что диссоциация АДФ из активного центра является лимитирующим этапом в E2-активируемом катализе при действии изоформы 2 [31, 36]. Превращение всех липоильных групп в E2-олигомере в окисленную форму значительно уменьшает K_{cat} и K_m ПДГК₂ для АТФ. С другой стороны, восстановление и еще в большей степени восстановительное ацетилирование увеличивает связывание ПДГК₂ с E2 и стимулирует его [37]. Таким образом, изменения концентрации пирувата и соотношений NADH/NAD⁺, ацетил-КоА/КоА и АТФ/АДФ при гормональной регуляции и различных функциональных состояниях существенно меняют активность ПДГК и – противоположным образом – активность ПДГ-комплекса [23, 24]. Можно также добавить, что липопротеин, сильно угнетающий ПДГ-комплекс, был выделен из митохондрий надпочечников быка [4]. Степень угнетения увеличивалась при снижении концентрации АТФ. Предполагается, что митохондриальный липопротеин может специфически защищать активный центр ПДГК или места фосфорилирования E1 во время каталитического акта.

E1-компонент ПДГ-комплекса млекопитающих имеет три места фосфорилирования. Изоформы ПДГК проявляют разную активность в отношении этих трех мест. Их относительная активность по отношению к месту 1 составляет следующее соотношение: ПДГК₂ > ПДГК₄ > ПДГК₁ > ПДГК₃; по отношению к месту 2: ПДГК₃ > ПДГК₄ > ПДГК₂ > ПДГК₁ [32]. Что касается места 3, то различия в активности ПДГК изоформ не совсем ясны. Согласно Колобовой и др. [41], ПДГК₁ может фосфорилировать все три места, тогда как ПДГК₂, ПДГК₃ и ПДГК₄ каждая фосфорилирует только места 1 и 3. Ранее было показано, что только фосфорилирование мест 1 и 2 приводит к инактивации ПДГ-комплекса, тогда как дополнительное фосфорилирование места 3 угнетает реактивацию E1 под действием ПДГ-фосфатазы [55]. Однако позднее было установлено, что фосфорилирование каждого места ведет к инактивации ПДГ-комплекса, но разными путями [25, 41]. Например, фосфорилирование места 1 ПДГ человека предупреждает ее взаимодействие с субстратом пируватом и с липоильным доменом, тогда как модификация места 3 препятствует взаимодействию E1 с ТДФ [32]. Добавление экзогенного ТДФ в среду инкубации приводит к угнетению активности ПДГК [1, 12, 49]. Особенно сильно ТДФ уменьшает количество фосфата, который включается при действии ПДГК₁ в местах 2 и 3, а ПДГК₂ – в месте 2 [41]. Интересные данные были получены в кинетических исследованиях ПДГ-комплекса из сердца зубра: полностью дефосфорилированный ПДГ-комплекс проявляет положительную кооперативность к местам связывания пирувата при низких концентрациях субстрата, тогда как частичное фосфорилирование этого комплекса (35% снижения активности) снимает кооперативность [5].

Что касается быстрой регуляции метаболизмом, то в этом процессе очень важен долговременный контроль количества ПДГК на уровне транскрипции [32, 40]. Например, из 4 изоформ наибольшие изменения количества ферментативного белка были обнаружены для изоформ ПДГК₄ и ПДГК₂. Голодание и диабет увеличивают уровень экспрессии ПДГК₄ в большинстве тканей [17]. Лечение инсулином крыс-диабетиков изменяет эти сдвиги в противоположную сторону [40]. Голодание также увеличивает экспрессию ПДГК₂ в печени и почках [42].

Характеристика ПДГ фосфатаз

ПДГФ является специфической фосфатазой, которая удаляет Pi из мест фосфорилирования E1 и реактивирует E1 компонент и весь ПДГ-комплекс. ПДГ-комплекс млекопитающих содержит две неидентичные субъединицы массой 52 и 96 кДа [6]. Меньшая субъединица проявляет каталитическую

активность, тогда как большая представляет собой флавопротеин, участвующий в регуляции активности комплекса [9]. Есть две изоформы ПДГФ, кодируемые двумя разными генами для каталитических субъединиц [19]. Изоформы ПДГФ₁ и ПДГФ₂ обладают разной активностью, способностью к регуляции и распределением в тканях [8]. Известно, что связывание ПДГФ₁ с ПДГ-комплексом млекопитающих происходит через липоильный домен ЛД₂ и требует наличия Ca²⁺, который играет роль мостика [13]. Что касается связывания ПДГФ₂, то данные о ее свойствах пока недостаточны.

Регуляторные свойства ПДГФ

Для реакции, катализируемой обеими изоформами ПДГФ, требуется Mg²⁺ в миллимолярных концентрациях [27]. Ионы магния могут быть заменены на Mn²⁺. Значение Km для ПДГФ из сердца свиньи для MgCl₂ (2,5 mM) и MnCl₂ (1,8 mM) сходны [55], но в случае ПДГФ из надпочечников быка эти константы различаются в три раза (1,20 и 0,35 mM), и более высокая активность наблюдается в присутствии Mn⁺, а не Mg⁺ [2]. Кроме Mg⁺, для изоформы ПДГФ₁ требуется также Ca²⁺ в микромолярных концентрациях. Ca²⁺, кроме того, что он участвует во взаимодействии ПДГФ₁ с ЛД₂ доменом, выраженно стимулирует активность ПДГФ₁ [13, 19]. Более того, был выделен и частично охарактеризован специфический регуляторный белок для ПДГФ₁ [40]. ПДГФ₁ более чувствительна к Mg²⁺, чем ПДГФ₂ [40]. Полиамины, особенно спермин, заметно снижают значение Km для Mg²⁺ у обеих изоформ ПДГФ [13]. В общем, быстрая регуляция активности ПДГФ играет менее значимую роль, чем регуляция ПДГК. Активность ПДГФ в основном зависит от двухвалентных катионов. Например, мышечное сокращение вызывает увеличение митохондриального Ca²⁺, который может затем стимулировать активность ПДГФ₁ и в целом ПДГ-комплекс [32, 40]. Инсулин может стимулировать ПДГФ-азы через их фосфорилирование протеинкиназой Сδ, которая активируется и переносится в митохондрии клеток мышцы и печени при действии инсулина [7]. Кроме быстрой регуляции дивалентными ионами, полиаминами и, возможно, инсулином, происходит также долговременная регуляция ПДГФ посредством изменений ее экспрессии на генетическом уровне. Голодание и диабет снижают экспрессию ПДГФ₁, особенно в сердце и почках крыс [19], тогда как инсулин увеличивает ее [18, 40].

Изостерическое торможение конечными продуктами

В многочисленных кинетических исследованиях ПДГ-комплекса, выделенного из разных тканей млекопитающих, было показано его конкурентное торможение в присутствии избытка ацетил-КоА и NADH против CoA и NAD⁺ [11, 55, 56]. Значения Ki для NADH были такого же порядка, как и значения Km для NADH. Было высказано предположение, что угнетение активности ПДГ-комплекса избытком NADH на изостерическом уровне (на активных местах E3 компонента) важно для контролирования активности ПДГ-комплекса в тканях млекопитающих [55]. Угнетение E2, вызываемое ацетил-КоА, может быть немного менее значимо для регуляции ПДГ-комплекса, так как значения Ki для ацетил-КоА обычно выше, чем значения Km для CoA [55]. Например, в случае ПДГ-комплекса из сердца человека это различие достигает трехкратных значений [22]. Даже в таких состояниях, как голодание или диабет, когда соотношение ацетил-КоА/CoA и NADH/NAD⁺ очень высоко в некоторых тканях, ацелирование и восстановление липоильных групп в обратных реакциях, катализируемых E2 и E3, может вести к угнетению декарбоксилирования пирувата, катализируемого E1 [32, 55]. Торможение продуктом реакции в активных центрах E2 и E3 компонентах, по-видимому, является необходимым компонентом в аллостерической регуляции ПДГ-киназы избытком ацетил-КоА и NADH. Оба механизма соответствуют одному общему принципу регуляции: “negative feedback inhibition” – торможение продуктами реакции.

Аллостерическая регуляция некоторыми кофакторами

Согласно многим исследованиям, ТДФ играет только каталитическую роль в активных местах E1 [38, 44, 47]. В течение долгого времени предполагалось, что ПДГ-комплекс из тканей млекопитающих теряет ТДФ практически полностью во время выделения этого комплекса, так как измеряемая активность ПДГ-комплекса оказывалась значительно ниже в отсутствие добавленного ТДФ [1, 51, 52]. Эти измерения базировались на измерении начальной скорости реакции, катализируемой этим комплексом. Однако значительно более высокая его активность обнаруживалась в том случае, когда скорость реакции измерялась в течение более долгого времени, потому что в отсутствие добавления ТДФ максимальная скорость достигалась только после лаг-периода длительностью в несколько минут [46]. Было установлено, что длительность лаг-периода и соответствующая скорость реакции сильно зависят от концентрации и типа присутствующих дивалентных ионов (Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺). Более короткий лаг-период и более высокая активность ПДГ-комплекса с эндогенным ТДФ наблюдались в присутствии Mn²⁺ [10]. Кинетические исследования ПДГ-комплекса, насыщенного эндогенным ТДФ в активных местах E1, из сердца быка, зубра и свиньи показали, что добавление экзогенного ТДФ ведет к исчезновению лаг-периода и различным снижениям значений Km для пирувата, но более умеренному снижению Km для CoA и NAD⁺ на фоне отсутствия значимых изменений максимальной скорости реакции [47, 48]. Значение кажущейся Km для ТДФ составляет около 0,2 мкМ, что свидетельствует о высокой эффективности кофактора. В общем, увеличение сродства фермента к субстрату без изменения Vmax является типичным проявлением наличия положительных аллостерических модуляторов в рамках модели Monod и др. [30]. ТДФ действует именно таким образом. Например, значения Km ПДГ-комплекса из сердца свиньи для пирувата в отсутствие и в присутствии добавленного ТДФ составили 76,7 ± 6,6 и 19,0 ± 2,7 мкМ соответственно [49]. Увеличение сродства ПДГ-комплекса для субстрата было в 4 раза больше. Было показано, что ТДФ, добавленный к

ПДГ-комплексу, приводит к изменению УФ-спектра и спектра циркулярного дихроизма, а также снижает эмиссию флуоресценции комплекса, содержащего связанные молекулы эндогенного ТДФ в активных центрах [21]. Спектральные данные свидетельствуют о наличии конформационных изменений в ПДГ-комплексе. Следовательно, ТДФ как аллостерический модулятор может быстро вызвать конформационные и функциональные изменения мультиферментного комплекса. Дивалентные ионы Mg^{2+} , Ca^{2+} и особенно Mn^{2+} усиливают эффект ТДФ [10]. Полученные результаты позволяют предположить, что ТДФ, кроме его участия в каталитической функции, играет важную роль как положительный регуляторный эффектор в отношении ПДГ-комплекса. До настоящего времени структурные исследования ПДГ были ограничены процессами в активных центрах фермента и взаимодействием между его субъединицами [26, 43].

Литература

1. Влияние тиаминфосфатов на активность регуляторных ферментов пируватдегидрогеназного комплекса / Ю.М.Пархоменко [и др.] // Укр.биохим.ж. - 1987.- Т.52.- С.49-54.
2. Струмило, С.А. Изучение реактивации частично фосфорилированного пируватдегидрогеназного комплекса из надпочечников быка / С.А.Струмило // Биохимия.- 1983.- Т.48.- С.1879-1883.
3. Струмило, С.А. Характеристика киназной активности пируватдегидрогеназного комплекса из надпочечников быка / С.А.Струмило, С.В.Сенкевич, В.В.Виноградов // Биохимия.- 1981.- Т.46.- 974-978.
4. Угнетение киназной активности пируватдегидрогеназного комплекса надпочечников быка митохондриальной фракцией / С.А.Струмило [и др.] // Биохимия.- 1984.- Т.49.- С.155-159.
5. Чигер, М.Б. Изменения свойств пируватдегидрогеназного комплекса из сердца зубра после его частичного фосфорилирования // М.Б.Чигер, С.А.Струмило // Укр.биохим.ж. - 1995.- Т.67.- С.С.25-28.
6. Activated function of the pyruvate dehydrogenase phosphatase through Ca^{+} -facilitated binding to the inner lipoyl domain of the dihydrolipoyl acetyltransferase / Chen [et al.] // J.Biol.Chem.- 1996.- Vol.271.- P.28064-28070.
7. Activation and mitochondrial translocation of protein kinase C δ are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells / Caruso M. // J.Biol.Chem.- 2001.- Vol.276.- P.45088-45097.
8. Characterization of the isozymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: implications for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity / Т.Кarpova [et al.] Biochim.Biophys.Acta.-2003.-Vol.1652.-P.125-135.
9. Cloning, expression, and properties of the regulatory subunit of bovine pyruvate dehydrogenase phosphatase / J.E.Lawson [et al.] // J.Biol.Chem.- 1997.- Vol.272.- P.31625-31629.
10. Czerniecki, J. Cooperation of divalent ions and thiamine diphosphate in regulation of the function of pig heart pyruvate dehydrogenase complex / J. Czerniecki, M.Czygier // J.Nutr.Sci.Vitaminol. (Tokio).- 2001.- Vol.47.- P.385-386.
11. Czygier, M. Basic properties of the pyruvate dehydrogenase complex isolated from aurochs heart / M. Czygier, S.Strumilo // Acta Biochim.Polon. - 1994.- Vol.41.- P.453-457.
12. Czygier, M. An investigation of the kinase activity of aurochs heart pyruvate dehydrogenase complex / M. Czygier, S.Strumilo // Biochem.Mol.Biol.Int. - 1995.- Vol.37.- P.313-317.
13. Essential roles of lipoyl domains in the activated function and control of pyruvate dehydrogenase kinases and phosphatase isoform 1 / T.E.Roche [et al.] // Eur.J.Biochem.- 2003.- Vol.270.- P.1050-1056.
14. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex / M.M.Bowker-Kinley [et al.] // Biochem.J.- 1998.- Vol.329.- P.191-196.
15. Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans // R.Gudi [et al.] // J.Biol.Chem.- 1995.- Vol.270.- P.28989-28994.
16. Fries, M. Reaction mechanism of the heterotetrameric ($\alpha 2\beta 2$) E1 component of 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes / M.Fries, H.I.Jung, R.N.Perham // Biochemistry.- 2003.- Vol.42.- P.6996-7002.
17. Harris, R.A. Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression / R.A.Harris, B.Huang, P.Wu // Adv.Enzyme Regul.- 2001.- Vol.41.- P.269-288.
18. Holness, M.J. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex by reversible phosphorylation / M.J.Holness, M.C.Sugden // Biochem.Soc.Trans.- 2003.- Vol.31.- P.1143-1151.
19. Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation / B.Huang [et al.] // J.Biol.Chem.- 1998.- Vol.273.- P.17680-17688.
20. Khailova, L.S. Intense cooperativity in enzyme action of pyruvate dehydrogenase / L.S.Khailova, L.G.Korotchkina, S.E.Severin // In: Biochemistry and Physiology of TDP Enzymes. Eds H.Bisswanger, J.Ulrich/- VCH Weinheim.- Blauberer, Germany.- 1990.- P.251-261.
21. Kinetic and spectral investigation of allosteric interaction of coenzymes with 2-oxo acid dehydrogenase complexes / S.Strumilo [et al.] // J.Mol.Struct.- 2002.- Vol.614.- P.221-226.
22. Kiselevsky, Y.V. Kinetic characterization of the pyruvate and oxoglutarate dehydrogenase complexes from human heart / Y.V.Kiselevsky, S.A.Ostrovtsova, S.A.Strumilo // Acta Biochim.Polon.- 1990.- Vol.37.-P.135-139.
23. Klyuyeva, A. Allosteric coupling in pyruvate dehydrogenase kinase 2 / A.Klyuyeva, A.Tuganova, K.M.Popov // Biochemistry.- 2008.- Vol.32.- P.8358-8366.
24. Klyuyeva, A. The carboxy-terminal tail of pyruvate dehydrogenase kinase 2 is required for the kinase activity / A.Klyuyeva, A.Tuganova, K.M.Popov // Biochemistry.- 2005.- Vol.44.- P.13573-13582.
25. Korotchkina L.G. Probing the mechanism of inactivation of human pyruvate dehydrogenase by phosphorylation of three sites / L.G.Korotchkina, M.S.Patel // J.Biol.Chem.- 2001.- Vol.276.- P.5731-5738.
26. Korotchkina L.G. Function of several critical amino acids in human pyruvate dehydrogenase revealed by its structure / L.G.Korotchkina, E.M.Ciszak, M.S.Patel // Arch.Biochem.Biophys.- 2004.- Vol.429.- P.171-179.
27. Linn, T.C. α -keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation / T.C.Linn, F.H.Pettit, L.J.Reed // Proc.Natl Acad.Sci.- 1969.- Vol.62.- P.234-241.
28. Liu, S. Dinding of the pyruvate dehydrogenase kinase to recombinant constructs containing the inner lipoyl domain of the dihydrolipoyl acetyltransferase component / S.Liu, J.C.Baker, T.E.Roche // J.Biol.Chem.- 1995.- Vol.270.- P.793-800.

29. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex / M.J.Rardin [et al.] // *Anal.Biochem.*- 2009.- Vol.389.-P.157-164.
30. Monod, J. On the nature of allosteric transitions: a plausible model / J.Monod, J.Wyman, J.-P.Changeux // *J.Vo.Biol.*- 1965.- Vol.12.- P.88-117.
31. Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by E2 and E2 plus E3-binding protein and their capacities to bind the E2 and E3 components / Y. Hiromasa [et al.] // *J.Biol.Chem.*- 2004.- Vol.279.- P.6921-6933.
32. Patel, M.S. The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex / M.S.Patel, L.G.Korotchkina // *Biochem.Mol.Biol.Education.*- 2003.- Vol.31.- P.5-15.
33. Patel, M.S. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex / M.S.Patel, L.G.Korotchkina // *Biochem.Soc.Trans.*- 2006.- Vol.34.- P.217-222.
34. Patel, M.S. Pyruvate dehydrogenase complex as a marker of mitochondria metabolism/ M.S.Patel, L.G.Korotchkina // *Oxidative Stress Biomarkers and antioxidant protocols.Part II. In: Methods in Mol.Biol.*- Ed. D.Armstrong.- Humana Press Inc., Totowa.- 2008.- Vol.186.- P.255-264.
35. Perham, R.N. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions / R.N.Perham // *Annu.Rev.Biochem.*- 2000.- Vol.69.- P.961-1004.
36. Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 limited and further inhibited by slowing down the rate of dissociation of ADP / H.Bao [et al.] // *Biochemistry.*- 2004.- Vol.43.- P.13432-13441.
37. Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 activity stimulated by speeding up the rate of dissociation of ADP // H.Bao [et al.] // *Biochemistry.*- 2004.- Vol.43.- P.13442-13451.
38. Reaction mechanisms of thiamine diphosphate enzymes: defining states of ionization and tautomerization / N.S.Nemeria [et al.] // *FEBS Lett.*- 2009.- Vol.276(9).- P.2432-2446.
39. Reed, L.J. A trail of research from lipoic acid to α -keto acid dehydrogenase complexes / L.J.Reed // *J.Biol.Chem.*- 2001.- Vol.276.- P.38329-38336.
40. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex / Harris R.A. [et al.] // *Adv.Enzyme Regul.*- 2002.- Vol.42.- P.249-259.
41. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites / E.Kolobova [et al.] // *Biochem.J.*- 2001.- Vol.358.- P.69-77.
42. Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues / P.Wu [et al.] // *Arch.Biochem.Biophys.*- 2000.- Vol.381.- P.1-7.
43. Structural and functional insights into the molecular mechanisms responsible of pyruvate dehydrogenase kinase 2 / T.Green [et al.] // *J.Biol.Chem.*- 2008.- Vol.283.- P.15789-15798.
44. Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase / Ciszak E.M. [et al.] // *J.Biol.Chem.*- 2003.- Vol.278.- P.21240-21246.
45. Structure of pyruvate dehydrogenase kinase. Novel Folding pattern for a serine protein kinase / C.N.Steussy [et al.] // *J.Biol.Chem.*- 2001.- Vol.276.- P.37443-37450.
46. Strumilo, S. Hysteresis behaviour of the pyruvate dehydrogenase complex containing endogenous thiamine pyrophosphate / S.Strumilo // In: *Thiamine Pyrophosphate Biochemistry.* Eds. Schellenberger A., Schowen R.L., CRC Press.Boca Raton, Florida.- 1988.- P.83-91.
47. Strumilo, S. Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex / S.Strumilo // *Acta Biochim.Polonica.*- 2005.- Vol.52.- P.759-764.
48. Strumilo, S. Regulation of bovine pyruvate dehydrogenase complex by thiamine pyrophosphate / S.Strumilo, M.Czygier // *Biochem.Arch.*- 1998.- Col.14.- P.27-32.
49. Strumilo, S. Regulatory effect of thiamine pyrophosphate on pig heart pyruvate dehydrogenase complex / S.Strumilo, J.Czerniecki, P.Dobrzyn // *Biochem. Biophys.Res.Commun.*- 1999.- Vol.26.- P.341-345.
50. Sugden, M. PDC deletion: the way to the man's heart disease / M.Sugden // *Am.J.Physiol.Heart Circle Physiol.*- 2008.- Vol.295.- P.H917-H919.
51. Sumegi, B. Elementary steps in the reaction of the pyruvate dehydrogenase complex from pig heart. Kinetic of thiamine diphosphate binding to the complex / D.Sumegi, I.Alkonyi // *Eur.J.Biochem.*- 1983.- Vol.136.- P.347-352.
52. The elementary reactions of the pig heart pyruvate dehydrogenase complex. A study of the inhibition by phosphorylation / D.A.Walsh [et al.] // *Biochem.J.*- 1976.- Vol.157.- P.41-67.
53. The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex / R.M.Denton [et al.] // *Adv.Enzyme Regul.*- 1996.- Vol.36.- P.183-198.
54. Tissue-specific pyruvate dehydrogenase complex deficiency causes cardiac hypertrophy and sudden death of weaned male mice / S.Sidhu [et al.] // *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*- 2008.- Vol.295.- P.H946-H952.
55. Walajtys, E.I. Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat liver mitochondria by phosphorylation-dephosphorylation / E.I.Walajtys, D.P.Gottesman, J.R.Williamson // *J.Biol.Chem.*- 1974.- Vol.249.- P.1857-1865.
56. Wieland, O.H. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation / O.H.Wieland // *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.*- 1983.- Vol.96.- P.123-170.
57. Yeaman, S.J. The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances / S.J.Yeaman // *Biochem.J.*- 1989.- Vol.257.- P.625-632.

S.A.Strumilo, N.P.Kanunnikova

MECHANISMS OF SHORT-TERM REGULATION OF THE MAMMALIAN PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX

The main mechanisms of regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) is presented in the review. It includes some new data about the role phosphorylation-dephosphorylation, about isoforms of the

PDH converting enzymes (kinase and phosphatase), about influence of exogenous thiamine diphosphate and some divalent ions on the kinetic parameters of PDHC saturated with endogenous tightly bound TDP. This influences may have an allosteric nature. It is suggested that important factors for the regulation of the PDHC are reversible phosphorylation, and direct increase of mammalian PDHC affinity for the substrate by cofactors.

Струмило Славомир Александрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии животных Белостокского университета.
E-mail: sstrum@uwb.edu.pl

Канунникова Нина Павловна, доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой зоологии и физиологии человека и животных ГрГУ им. Я.Купалы.
Гродно, ул. Поповича, 30, кв.10.
Тел. дом. 50-19-97, тел каф. 48-50-02, тел. моб. 762-36-30.
E-mail: n.kanunnikova@grsu.by