

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ АЦЕТИЛИРОВАНИЕМ ХИМИЧЕСКИМИ И ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И МИКРОБНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ

© 2018 г. Н.И. Федотчева* **, М.Н. Кондрашова*, Е.Г. Литвинова*, М.В. Захарченко*, Н.В. Хундерякова*, Н.В. Белобородова**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

**Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии,
107031, Москва, ул. Петровка, 25/2
E-mail: nfedotcheva@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.18 г.

Исследовано влияние ацетилирующих и деацетилирующих соединений на активность сукцинатдегидрогеназы, а также на мембранный потенциал и кальциевую емкость в изолированных митохондриях печени, поддерживаемых окислением сукцината. В качестве ацетилирующих соединений применялись химический реагент *N*-ацетилимидазол, микробный метаболит фенилацетат, лекарственные соединения ацетилсалициловая кислота и *N*-ацетилцистеин. Эти соединения снижали активность сукцинатдегидрогеназы в разной степени в зависимости от концентрации и условий инкубации. Ингибиторный анализ с применением промежуточных переносчиков электронов показал, что ацетилированию подвергается убихинонсвязывающий сайт фермента. Ингибирование частично снималось или предотвращалось прединкубацией митохондрий с никотинамидадениндинуклеотидом, кофактором деацетилирования, и с полиамином спермидином, акцептором ацетильных групп.

Ключевые слова: ацетилирование, сукцинатдегидрогеназа, микробные метаболиты, *N*-ацетилимидазол, ацетилсалициловая кислота, фенилацетат.

DOI: 10.1134/S0006302918050125

Обратимое ацетилирование является одним из механизмов контроля активности метаболизма и функций белков и ферментов. К настоящему времени показано, что ацетилирование влияет на такие свойства ферментов, как активность, конформация, межбелковые взаимодействия, стабилизация и субклеточная локализация [1–4]. Связанные с ацетилированием изменения в функциях белков были обнаружены при ряде патологий [2,3]. Как правило, ацетилирование приводит к снижению активности ферментов, особенно в тех случаях, когда ацетильная группа связывается с аминокислотами активного центра фермента. Показано, что ацетилированию подвергаются преимущественно лизин, в меньшей степени треонин, тирозин и серин и, по некоторым данным, цистеин и метионин [5–7].

Наибольшее количество ацетилированных сайтов было обнаружено в митохондриях. С помощью протеомного анализа было показано, что 63% белков, локализованных в митохондриях, содержат ацетилированные аминокислотные остатки [8,9]. Среди митохондриальных ферментов, которые подвергаются ацетилированию, известны ферменты цикла трикарбоновых кислот, ферменты окисления жирных кислот, некоторые субъединицы комплексов дыхательной цепи и др. [5]. Большое количество ацетилированных сайтов в митохондриях по сравнению с другими компартментами объясняется тем, что митохондрии содержат высокую концентрацию ацетил-СоА, донора ацетильных групп. Его концентрация в матриксе может достигать 2 мМ [10]. Благодаря столь высоким концентрациям, кроме ферментативного ацетилирования, осуществляемого ацетилтрансферазами с участием ацетил-СоА, в митохондриях может происходить также неферментативное ацетилирование [10–12]. На изолированных митохондриях и гомогенатах показано влияние

Сокращения: СДГ – сукцинатдегидрогеназа, ТТФА – теноилтрифторацетат, ФМС – феназинметасульфат, NAD – никотинамидадениндинуклеотид, ДХФИФ – дихлофенол-индофенол, МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид.

избытка субстратов, окисление которых сопровождается накоплением ацетил-СоА, на дыхание митохондрий и индукцию митохондриальной поры в норме, при ожирении и диабете [13].

В большинстве исследований анализируются количественные показатели степени ацетилирования по количеству сайтов, содержащих ацетильную группу, в то время как влияние ацетилирования на активность ферментов исследовано в значительно меньшей степени. В отношении ферментов цикла трикарбоновых кислот методами протеомного анализа было обнаружено, что наибольшее количество ацетилированных сайтов содержат сукцинатдегидрогеназа (СДГ), малатдегидрогеназа и фумаратгидратаза [5]. Было показано, что деацетилирование активирует СДГ на 25–30% [14,15]. К настоящему времени известен только один фермент цикла трикарбоновых кислот – аконитаза, ацетилирование которого сопровождается увеличением ферментативной активности [16].

В регуляции процессов ацетилирования/деацетилирования участвует целый ряд метаболитов, включая никотинамидадениндинуклеотид, никотинамид, ацетил-СоА, коэнзим-А, ацетат, 2-гидроксибутират и др. [1,2,5]. Было обнаружено, что микробные метаболиты, в частности, бутират, пропионат, D-лактат и фенольные кислоты, участвуют в регуляции ацетилирования, так как являются ингибиторами реакций деацетилирования [17–20]. Ацетилирующими субстратами служат не только ацетил-СоА, но и другие соединения, содержащие ацетильную группу. У бактерий субстратом ацетилирования служит ацетилфосфат, концентрация которого у прокариотов близка к концентрации митохондриального ацетил-СоА [21,22]. В экспериментальных исследованиях для ацетилирования ферментов *in vitro* наиболее часто применяется синтетический реагент N-ацетилимидазол. Было показано, что N-ацетилимидазол ацетирует преимущественно тирозиновые и лизиновые аминокислотные остатки в соотношении 2 : 1 [23]. По разным данным N-ацетилимидазол снижал активность СДГ, влияя, предположительно, на связывание субстрата с каталитической субъединицей фермента [24], и ингибировал Na,K-АТФазу, снижая связывание АТФ [25]. В последнее время появились данные, что противовоспалительный препарат ацетилсалициловая кислота является донором ацетильной группы, ацетирует различные белки и, по некоторым данным, является даже более сильным ацетилирующим агентом, чем ацетил-СоА [26,27].

Таким образом, наряду с хорошо известными механизмами ингибирования щавелевоук-

сусной кислотой, окислительным стрессом или мутациями в субъединицах фермента, ацетилирование может участвовать в модуляции ферментативной активности СДГ, ключевого фермента цикла трикарбоновых кислот в поддержании энергообеспечения, мембранного потенциала и других функций митохондрий. В данной работе исследовано влияние ацетилирующих и деацетилирующих соединений на активность СДГ. В качестве соединений, влияющих на ацетилирование, применяли химический реагент N-ацетилимидазол, лекарственные соединения ацетилсалициловую кислоту и ацетилцистеин, микробный метаболит фенилацетат. Для идентификации возможных сайтов действия этих соединений применяли специфические ингибиторы СДГ малонат и теноилтрифторацетат (ТТФА), а также промежуточный переносчик электронов феназинметасульфат (ФМС). Исследовано влияние никотинамидадениндинуклеотида (NAD) как кофактора деацетилирования и полиамина спермидина, как возможного активатора деацетилирования на модуляцию активности СДГ ацетилирующими соединениями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий печени крыс. Эксперименты выполнены на самцах крыс линии Wistar. Митохондрии печени выделяли стандартным методом дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 300 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA, 10 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,4). Препарат митохондрий промывали средой выделения без EGTA, ресуспендировали в среде того же состава и хранили на льду.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы по восстановлению дихлофенолиндофенола. Активность сукцинатдегидрогеназы определяли по восстановлению акцептора электронов дихлофенолиндофенола (ДХФИФ) [19,20]. Митохондрии (0,5 мг белка/мл) инкубировали в 2 мл среды, содержащей 125 мМ КСI, 15 мМ HEPES, рН 7,4 в присутствии 1 мМ цианида, 20 мкл 10% тритона X-100, 100 мкМ ДХФИФ. Реакцию восстановления ДХФИФ индуцировали добавкой 5 мМ сукцината, активировали 250 мкМ ФМС и измеряли скорость восстановления акцептора при длине волны 600 нм на спектрофотометре Ocean Optics USB4000 (Ocean Optics, США).

Определение активности сукцинатдегидрогеназы по восстановлению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид. В 2 мл среды инкубации, содержащей 125 мМ КСI, 15 мМ HEPES, рН 7,4, 150 мкМ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бро-

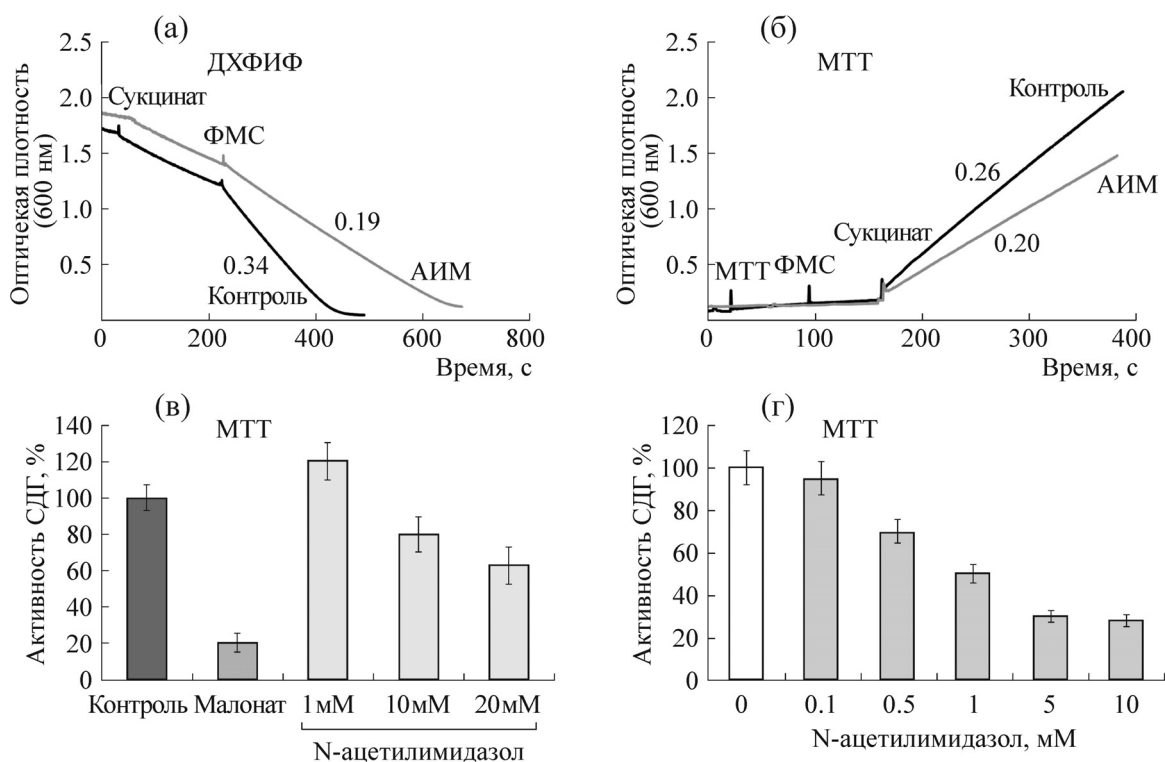


Рис. 1. Влияние N-ацетилимидазола на активность СДГ. Изменения оптической плотности ДХФИФ (а) и МТТ (б, в, г) при окислении сукцината в контроле и в присутствии N-ацетилимидазола (АИМ, 10 мМ). Концентрационная зависимость влияния N-ацетилимидазола на активность СДГ (в %), измеряемую по восстановлению МТТ при окислении сукцината без предварительной инкубации (в) и после 10-минутной прединкубации с N-ацетилимидазолом без субстрата (г).

мида (МТТ), 2 мкМ ротенона и 1 мМ сукцината, добавляли митохондрии (0,5 мг белка/мл) и инкубировали в течение 5 мин [28]. Прединкубацию митохондрий с тестируемыми соединениями проводили в отсутствие субстрата в течение 10 мин, затем добавляли сукцинат, МТТ и инкубировали дополнительно 5 мин. После инкубации в каждую пробу добавляли 20 мкл 10% тритона X-100 до полного лизиса митохондрий и измеряли оптическую плотность восстановленного акцептора при 580 нм на спектрофотометре Ocean Optics USB4000.

Измерение мембранного потенциала и кальциевой емкости митохондрий. Разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий определяли по распределению липофильного катиона тетрафенилфосфония, концентрацию которого во внешней среде регистрировали с помощью тетрафенилфосфоний-селективного электрода. Транспорт ионов Ca^{2+} в митохондрии регистрировали с помощью Ca^{2+} -селективного электрода по изменению концентрации кальция во внешней среде в ответ на последовательные добавки $CaCl_2$ в конечной концентрации 20 мкМ на установке «Record 4» (Россия) с компьютерной регистрацией. Каль-

циевую емкость митохондрий определяли по способности митохондрий аккумулировать и удерживать последовательные добавки ионов кальция до пороговой концентрации, необходимой для открытия неспецифической митохондриальной поры [29]. Среда инкубации содержала 125 мМ KCl, 1,5 мМ KH_2PO_4 и 15 мМ HEPES (pH 7,25).

Другие экспериментальные условия указаны в подписях под рисунками. На рисунках приведены данные типичных экспериментов, проведенных не менее чем в трех повторностях на разных препаратах митохондрий. Все используемые в работе реактивы были фирмы Sigma (США). Тестируемые соединения растворяли в воде и доводили pH до 7,25.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние N-ацетилимидазола на активность сукцинатдегидрогеназы. N-ацетилимидазол был использован в качестве контрольного препарата для оценки влияния ацетилирования на активность СДГ. Активность СДГ измерялась спектрофотометрически по восстановлению искусственных акцепторов ДХФИФ и МТТ. На рис. 1

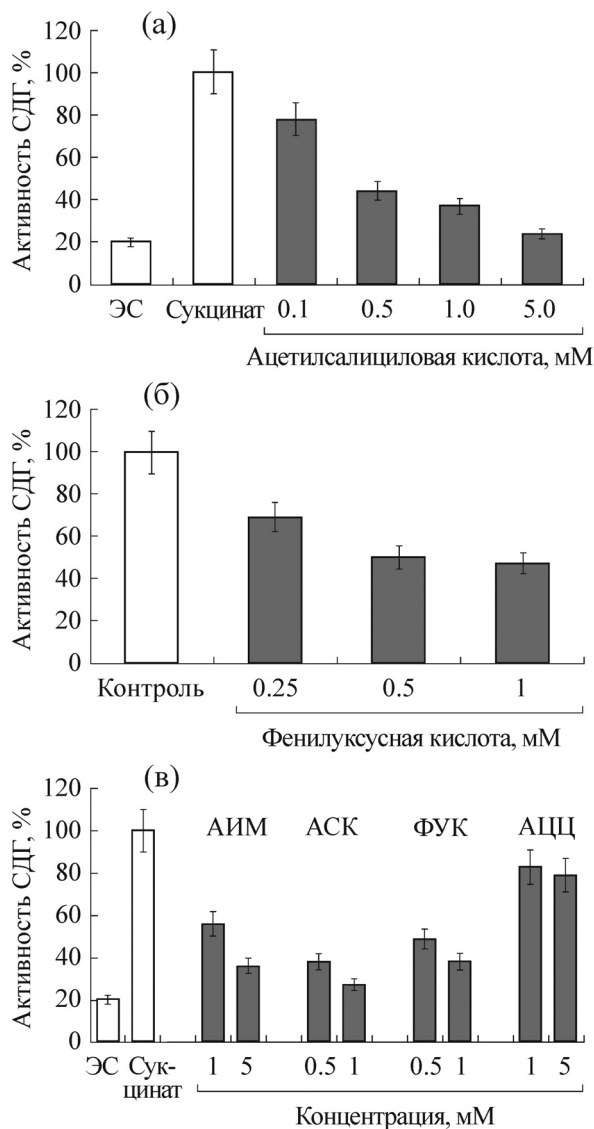


Рис. 2. Влияние ацетилсалициловой кислоты, N-ацетилцистеина и фенилуксусной кислоты на активность СДГ. Концентрационные зависимости действия ацетилсалициловой кислоты (а), фенилуксусной кислоты (б) и их сравнение с влиянием N-ацетилимидазола и N-ацетилцистеина (в) на активность СДГ (в %), измеряемую по восстановлению МТТ при окислении сукцината (1 мМ) после прединкубации этих соединений с митохондриями в отсутствие субстрата. За 100% принята оптическая плотность МТТ при окислении сукцината без других добавок, ЭС – оптическая плотность МТТ при окислении эндогенных субстратов.

показано влияние N-ацетилимидазола на активность СДГ при стандартном измерении восстановления ДХФИФ в присутствии тритона X-100 и промежуточного переносчика электронов ФМС (рис. 1а) и в таких же условиях при использовании в качестве акцептора МТТ (рис. 1б) при окислении сукцината изолированными митохондриями печени. В обоих случаях

N-ацетилимидазол вызывал ингибирование активности СДГ на 30–40%, действуя только при высоких концентрациях, в диапазоне 5–10 мМ, что соответствует литературным данным [23–25]. Как показано на рис. 1в, в такой же концентрации N-ацетилимидазол ингибировал восстановление МТТ при 10-минутной инкубации митохондрий с N-ацетилимидазолом и субстратом. Ингибирование восстановления МТТ малонатом, ингибитором СДГ, показывает специфичность измерения активности СДГ. Однако эффективность N-ацетилимидазола резко возрастала, если проводили его предварительную инкубацию с митохондриями в отсутствие субстрата окисления – сукцината (рис. 1г). В этом случае 30%-е ингибирование проявлялось уже при концентрации 0,5 мМ и возрастало до 70% при концентрации 5 мМ. Эти данные показывают, что, во-первых, субстрат защищает фермент от ингибирования N-ацетилимидазолом и, во-вторых, эти условия – прединкубация без субстрата – являются оптимальными для оценки действия ацетилирующих соединений на активность СДГ.

Влияние ацетилирующих лекарственных и микробных соединений на активность сукцинатдегидрогеназы. В этих экспериментах также проводили прединкубацию митохондрий с тестируемыми соединениями в отсутствие субстрата. Без прединкубации все соединения оказывали незначительный эффект только при высоких концентрациях, т.е. действовали подобно N-ацетилимидазолу. На рис. 2а показано изменение активности СДГ, определяемой по восстановлению акцептора МТТ, в ответ на добавление сукцината после прединкубации митохондрий с ацетилсалициловой кислотой в указанных концентрациях. Видно, что ацетилсалициловая кислота – более сильный ингибитор СДГ, чем N-ацетилимидазол, так как ингибирующий эффект проявляется уже при концентрации препарата 0,1 мМ и достигает 50% ингибирования при 0,5 мМ. Подобным образом действовала и фенилуксусная кислота (рис. 2б), вызывая 50%-е ингибирование при концентрации 0,5 мМ. В отличие от этих соединений, N-ацетилцистеин даже при высоких концентрациях оказывал на активность СДГ лишь незначительный эффект – 10%-е ингибирование при концентрации 5 мМ (рис. 2в). На рис. 2в приведены также сравнительные данные по действию тестируемых соединений на активность СДГ, из которых видно, что по ингибирующему эффекту они располагаются следующим образом: ацетилсалициловая кислота > фенилуксусная кислота > N-ацетилимидазол > N-ацетилцистеин.

Для определения возможных сайтов ингибирования фермента ацетилирующими соединениями в следующих экспериментах исследовали влияние ФМС на снятие индуцированного ингибирования. Из контрольных экспериментов с использованием ингибиторов СДГ малоната, ингибитора окисления сукцината, и ТТФА, ингибитора переноса электронов на убихинонсвязывающий сайт, следует, что ФМС снимает ингибирование СДГ, вызванное ТТФА, и не оказывает влияния на ингибирование, индуцированное малонатом. Этот эффект наблюдается как при использовании ДХФИФ (рис. 3а), так и МТТ (рис. 3б) в качестве акцепторов электронов. Подобная проба – МТТ плюс ФМС – была предложена ранее для оценки степени ингибирования малонат-чувствительной каталитической субъединицы СДГ [30]. На рис. 3в показано, что ФМС практически полностью снимал ингибирование, индуцированное тестируемыми соединениями. Эти данные показывают, что ингибирование восстановления акцепторов связано с действием этих соединений по типу ТТФА, т.е. с ингибированием убихинонсвязывающего сайта. В случае ацетилцистеина восстановление МТТ превышало контрольный уровень, что может объясняться участием тиоловых групп цистеина в восстановительных реакциях.

Влияние полиамина спермидина и кофактора NAD на снятие ингибирования сукцинатдегидрогеназы ацетилирующими соединениями. Ацетилирование полиаминов является ключевой реакцией их метаболизма. Спермидин содержит три аминогруппы в молекуле и, как недавно показано, стабилизирует митохондрии и поддерживает митохондриальные функции в норме, при старении, ишемии и других патологиях [31]. Оптимальная внутриклеточная концентрация спермидина, как и других полиаминов, контролируется спермидин-ацетилтрансферазой, образующей диацетилспермидин [32]. На основании этих данных можно предположить, что спермидин, связывая ацетильные группы, может снижать ацетилирование других субстратов, в частности СДГ. В следующих экспериментах исследовали возможное протекторное действие спермидина на ацетилирование СДГ. На рис. 4а показано влияние прединкубации митохондрий с ацетилирующими соединениями и спермидином на активность СДГ. В диапазоне концентраций от 1 до 5 мМ спермидин в контрольных пробах активировал СДГ на 10–20%. В присутствии ацетилирующих соединений спермидин частично снижал ингибирование, индуцированное N-ацетилимидазолом, ацетилсалициловой кислотой и фенилуксусной кислотой. Ак-

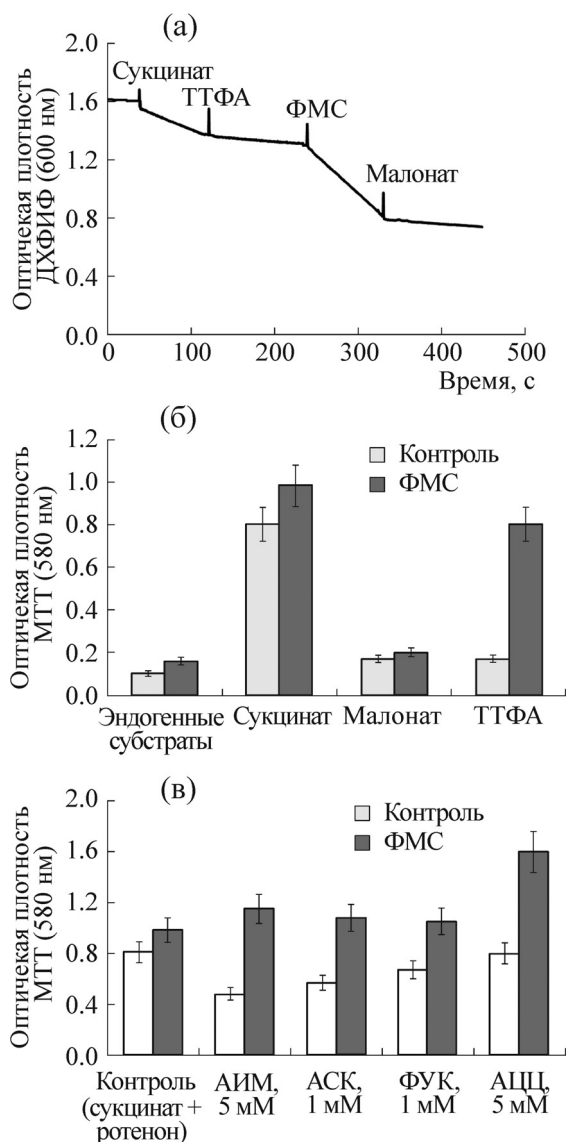


Рис. 3. Влияние ФМС на ингибирование СДГ малонатом, ТТФА и ацетилирующими соединениями. Оптическая плотность ДХФИФ (а) и МТТ (б) при окислении сукцината в присутствии ФМС (250 мкМ) и ингибиторов СДГ малоната (5 мМ) и ТТФА (50 мкМ); (в) – влияние ФМС на активность СДГ после прединкубации митохондрий с ацетилимидазолом (АИМ), ацетилсалициловой кислотой (АСК), фенилуксусной кислотой (ФУК) и ацетилцистеином (АЦЦ) в указанных концентрациях.

тивация СДГ спермидином в концентрации 2 мМ наблюдалась во всех случаях и варьировала от 18 до 25%.

Как показано на рис. 4б, ингибирование СДГ ацетилирующими соединениями не наблюдалось в присутствии NAD, который является кофактором в реакциях ферментативного деацетилирования с участием деацетилаз. NAD в присутствии ротенона, ингибитора NAD-зави-

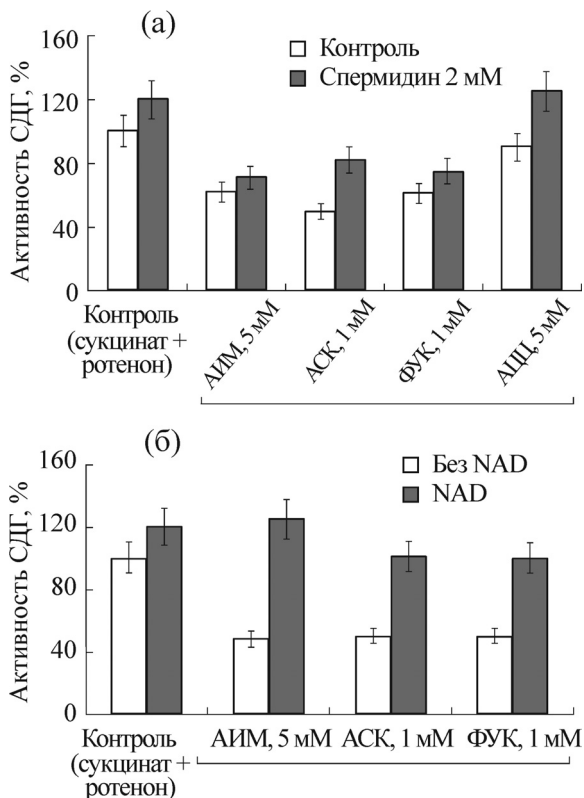


Рис. 4. Влияние спермидина и NAD на ингибирование СДГ ацетилирующими соединениями. Активность СДГ (в %), измеряемая по оптической плотности восстановленного МТТ при окислении сукцината после прединкубации митохондрий с ацетилимидазолом (АИМ), ацетилсалициловой кислотой (АСК), фенилуксусной кислотой (ФУК) и ацетилцистеином (АЦЦ) в указанных концентрациях в присутствии 2 мМ спермидина (а) и 0,5 мМ NAD (б).

симого окисления, активировал окисление сукцината в контроле и полностью снимал (или предотвращал) ингибирование СДГ N-ацетилимидазолом, ацетилсалициловой кислотой и фенилуксусной кислотой. Таким образом, NAD и аминсодержащие соединения, примером которых является спермидин, оказывают протекторное в отношении ингибирования СДГ ацетилирующими соединениями.

Влияние ацетилирующих соединений на мембранный потенциал и кальциевую емкость митохондрий при окислении сукцината. С целью сопоставления полученных данных о влиянии этих соединений на активность СДГ, определяемую с помощью искусственных акцепторов электронов ДХФИФ и МТТ, с их влиянием на функции митохондрий в следующих экспериментах мы провели исследование влияния ацетилимидазола, ацетилсалициловой кислоты и фенилуксусной кислоты на мембранный потенциал и кальциевую емкость митохондрий при

поддержке окислением сукцината. На рис. 5 показано их действие на мембранный потенциал в отсутствие сукцината, при последующем добавлении сукцината и при нагрузке ионами кальция. В отсутствие сукцината все соединения в разной степени снижали мембранный потенциал (рис. 5а,б). При добавлении субстрата наблюдалось восстановление мембранного потенциала, однако он был недостаточным для поддержания кальциевой емкости митохондрий, которая снижалась в два–три раза по сравнению с контролем (рис. 5в). Эти данные показывают, что снижение активности СДГ проявляется в снижении функций митохондрий. На рис. 5г показано (на примере ацетилсалициловой кислоты), что реагенты не влияют на мембранный потенциал, если они добавлены после сукцината, что полностью соответствует предыдущим данным о необходимости прединкубации с митохондриями в отсутствие субстрата для реализации ацетилирования и ингибирования СДГ.

Полученные данные показывают, что N-ацетилимидазол, ацетилсалициловая кислота и фенилуксусная кислота оказывают ингибирующее действие на активность СДГ. В меньшей степени влияет N-ацетилцистеин, что связано, вероятно, с участием тиоловых групп реагента в восстановительных реакциях. N-ацетилимидазол, ацетилсалициловая кислота и фенилуксусная кислота ингибируют убихинонсвязывающий сайт фермента, действуя по типу ТТФА, селективного ингибитора переноса электронов от каталитической субъединицы на убихинон. Влияние этих соединений резко возрастает в отсутствие субстрата СДГ, что хорошо согласуется с известными ранее данными о защитном действии субстратов на инактивацию некоторых ферментов N-ацетилимидазолом. В частности, АТФ защищал Na,K-АТФазу от ацетилирования и ингибирования N-ацетилимидазолом [25].

Наиболее эффективным ингибитором СДГ оказалась ацетилсалициловая кислота. Хотя в последнее время появляются многочисленные данные о влиянии этого соединения на ацетилирование различных белков, в том числе митохондриальных [27], его роль в модуляции активности СДГ ранее не исследовалась. Есть данные об ингибировании ацетилсалициловой кислотой другого фермента цикла трикарбоновых кислот – альфа-кетоглутаратдегидрогеназы [33]. Предполагается, что ингибирование фермента обусловлено ацетилированием сайта, связывающего альфа-кетоглутарат. Кроме того, было показано, что ацетилсалициловая кислота снижает активность комплекса I и комплекса IV дыхательной цепи митохондрий [34]. В отно-

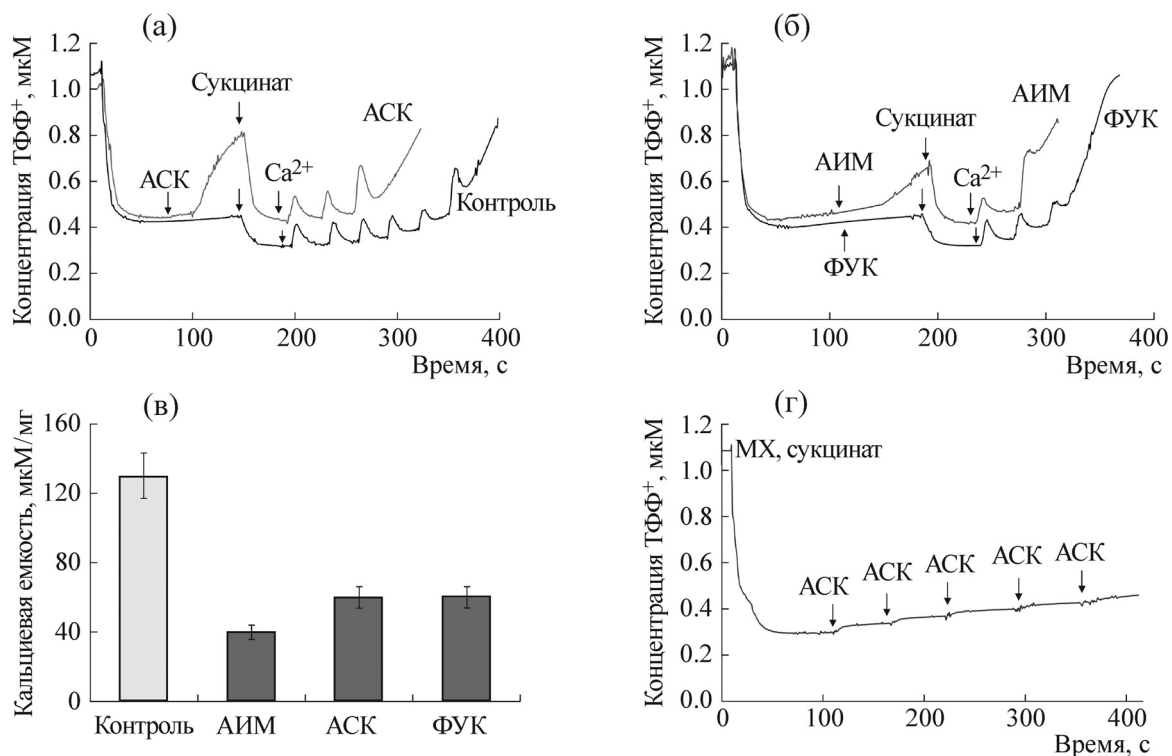


Рис. 5. Влияние ацетилирующих соединений на мембранный потенциал и кальциевую емкость митохондрий при окислении сукцината. Влияние ацетилсалициловой кислоты (АСК, 0,5 мМ) (а), фенилуксусной кислоты (ФУК, 0,2 мМ) и ацетилимидазола (АИМ, 5 мМ) (б) на мембранный потенциал и аккумуляцию ионов кальция; их влияние в этих же концентрациях на кальциевую емкость (в) и влияние ацетилсалициловой кислоты на мембранный потенциал при последовательных добавках по 0,2 мМ в присутствии сукцината (г).

шении СДГ как субстрата ацелирования косвенные данные показывают, что ацетилсалициловая кислота в высоких концентрациях снижает кальциевую емкость митохондрий, поддерживаемую окислением сукцината [35,36]. Эти данные хорошо согласуются с нашими результатами о влиянии ацетилсалициловой кислоты на мембранный потенциал и аккумуляцию ионов кальция при окислении сукцината, которые выявляют недостаточную активность СДГ для поддержания митохондриальных функций при дополнительных нагрузках. Представляют также интерес литературные данные о значительном снижении ацетилсалициловой кислотой экспрессии субъединицы С сукцинатдегидрогеназного комплекса [37]. Эта субъединица участвует в переносе электронов от каталитической субъединицы А на убихинон и, согласно нашим данным, является сайтом ингибирования фермента ацетилирующими реагентами.

В отличие от N-ацетилимидазола и ацетилсалициловой кислоты, фенилуксусная кислота не является донором ацетильных групп. Можно предполагать, что ее действие на СДГ может быть обусловлено как активацией ацелирования, так и прямым взаимодействием с фер-

ментом. В пользу участия фенилуксусной кислоты в ацелировании свидетельствуют данные о протекторном действии NAD, кофермента в реакциях деацелирования. На возможность взаимодействия фенилуксусной кислоты с ферментом указывают наши предыдущие данные, которые показывают, что фенольные кислоты (бензоат, циннамат, фенилпропионат и фенилацетат) ингибируют функции митохондрий, взаимодействуя с тиоловыми группами ферментов [38,39]. Оба механизма объединяет обнаруженное недавно участие тиоловых интермедиатов в регуляции реакций ацелирования [7].

На основании полученных нами данных можно предполагать, что одним из условий эффективного ацелирования СДГ является дефицит субстрата окисления. Как показано в ряде работ, гиперацилирование митохондриальных белков, в том числе неферментативное, наблюдается в условиях голодания и жировой диеты, которые увеличивают концентрацию ацетил-CoA [12]. С другой стороны, эти условия снижают концентрацию метаболитов цикла трикарбоновых кислот, что способствует, согласно нашим данным, ацелированию соот-

ветствующих ферментов. Как было недавно показано, переключение углеводного метаболизма на окисление жирных кислот является необходимой стадией перехода от провоспалительных иммунных реакций к противовоспалительным [40, 41]. Можно предполагать, что в регуляции этих переходов участвуют микробные метаболиты, влияющие на процессы ацетилирования/деацетилирования.

Актуальной проблемой является поиск метаболитов и факторов, способствующих деацетилированию и соответственно активации ферментов. В отличие от ацетилирования, которое может происходить как с участием ацетилтрансферазы, так и спонтанно при избытке доноров ацетильных групп, известно только ферментативное деацетилирование с участием NAD-зависимых деацетилаз (сиртуинов). Критическим фактором для активации деацетилаз является наличие высоких концентраций NAD, что нормально для физиологических условий и проблематично для патологических состояний, связанных с гипоксией и митохондриальной дисфункцией. В нашем исследовании впервые показано, что роль метаболитов, снижающих ацетилирование митохондриальных ферментов, могут выполнять полиамины. Полученные данные подтверждают предположение, что полиамины (спермин, спермидин, путресцин) могут влиять на уровень ацетилирования ферментов, снижая концентрацию ацетил-СоА за счет ацетилирования аминокгрупп полиаминов [42].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 16-04-00636, 16-04-00342) и Российского научного фонда (грант № 15-15-00110).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. J. Menzies, H. Zhang, E. Katsyuba, et al., *Nat. Rev. Endocrinol.* **12** (1), 43 (2016).
2. W. G. Kaelin, Jr. and S.L. McKnight, *Cell* **153** (1), 56 (2013).
3. C. Carrico, J. G. Meyer, W. He, et al., *Cell Metab.* **27** (3), 497 (2018).
4. G. R. Wagner and R. M. Payne, *J. Aging Res.* (2011). DOI: 10.4061/2011/234875.
5. S. C. Kim, R. Sprung, Y. Chen, et al., *Mol. Cell* **23** (18), 607 (2006).
6. L. M. Britton, A. Newhart, N. V. Bhanu, et al., *Epigenetics* **8** (10), 1101 (2013).
7. A. M. James, K. Hoogewijs, A. Logan, et al., *Cell Rep.* **18** (9), 2105 (2017).
8. J. Baeza, M. J. Smallegan, and J. M. Denu, *Trends Biochem. Sci.* **41** (3), 231 (2016).
9. E. Verdin, M. D. Hirschev, L. W. Finley, et al., *Trends Biochem. Sci.* **35** (12), 669 (2010).
10. A. S. Olia, K. Barker, C. E. McCullough, et al., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26083674> ACS Chem. Biol. **10** (9), 2034 (2015).
11. G. R. Wagner and M. D. Hirschev, *Mol. Cell.* **54** (1), 5 (2014).
12. G. R. Wagner and R. M. Payne, *J. Biol. Chem.* **288** (40), 29036 (2013).
13. Е. В. Гришина, М. Х. Галимова и др., *Биол. мембраны* **32** (5–6), 319 (2015).
14. L. W. Finley, W. Haas, V. Desquiret-Dumas, et al., *PLoS One* **6** (8), e23295 (2011)
15. H. Cimen, M. J. Han, Y. Yang, et al., *Biochemistry* **49**, 304 (2010).
16. J. Fernandes, A. Weddle, C. S. Kinter, et al., *Biochemistry* **54** (25), 4008 (2015).
17. M. Waldecker, T. Kautenburger, H. Daumann, et al., *J. Nutr. Biochem.* **19** (9), 587 (2008).
18. H. Zhang, M. Du, Q. Yang, et al., *J. Nutr. Biochem.* **27**, 299 (2016).
19. J. Sun, Q. Wu, H. Sun, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **15** (11), 21069 (2014).
20. M. L. Soliman, M. D. Smith, H. M. Houdek, et al., *J. Neuroinflammation* **9**, 51 (2012).
21. B. T. Weinert, V. Iesmantavicius, S.A. Wagner, et al., *Mol. Cell.* **51**, 265 (2013).
22. M. L. Kuhn, B. Zemaitaitis, L. I. Hu, et al., *PloS One* **9**, e94816 (2014).
23. G. D. Cymes, M. M. Iglesias, and C. Wolfenstein-Todel, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **42** (1), 33 (1993).
24. Y. Nakae and M. Shono, *Histochem. J.* **18** (4), 169 (1986).
25. J. M. Argъello and J. H. Kaplan, *Biochemistry* **29** (24), 5775 (1990).
26. M. H. Tatham, C. Cole, P. Scullion, et al., *Mol. Cell Proteomics* **16** (2), 310 (2017).
27. R. Uppala, B. Dudiak, M. E. Beck, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482** (2), 346 (2017).
28. Н. И. Федотчева, Е. Г. Литвинова, М. В. Захарченко и др., *Биохимия* **82** (2), 309 (2017).
29. Т. А. Федотчева, В. В. Теплова и Н. И. Федотчева, *Биол. мембраны* **35** (1), 79 (2018).
30. L. Guo, A.A. Shestov, A.J. Worth, et al., *J. Biol. Chem.* **291** (1), 42 (2016).
31. Y. Zhang, J. Yin, L. Zhang, et al., *Neurol. Res.* **39** (3), 248 (2017).
32. S. Mandal, A. Mandal, and M. H. Park, *Biochem. J.* **468** (3), 435 (2015).
33. A. C. Nulton-Persson, L. I. Szweda, and H. A. Sadek, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **44** (5), 591 (2004).
34. H. Raza, A. John, and S. Benedict, *Eur. J. Pharmacol.* **668** (1–2), 15 (2011).
35. T. Tomoda, K. Takeda, T. Kurashige, et al., *Liver.* **14** (2), 103 (1994).
36. K. W. Oh, T. Qian, D. A. Brenner, et al., *Toxicol. Sci.* **73** (1), 44 (2003).

37. X. Wang, A. Shojaie, Y. Zhang, et al., PLoS One **12** (5), e0178444 (2017).
38. Н. И. Федотчева, В. В. Теплова и Н. В. Белобородова, Биол. мембраны **27** (1), 60 (2010).
39. Н. И. Федотчева, В. В. Теплова и Н. В. Белобородова, Биофизика **57** (5), 820 (2012).
40. V. T. Vachharajani, T. Liu, X. Wang et al., J. Immunol. Res. **6**, 8167273 (2016).
41. T. F. Liu, V. T. Vachharajani, B. K. Yoza, et al., J. Biol. Chem. **287** (31), 25758 (2012).
42. A. E. Pegg, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. **294** (6), E995 (2008).

Modulation of the Activity of Succinate Dehydrogenase by Acetylation with Chemical and Drug Compounds and Microbial Metabolites

N.I. Fedotcheva* **, M.N. Kondrashova*, E.G. Litvinova*, M.V. Zakharchenko*, N.V. Khunderyakova*, and N.V. Beloborodova**

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Federal Research Clinical Center for Reanimatology and Rehabilitation, Petrovka 25/2, Moscow, 107031 Russia*

The effect of acetylating and deacetylating compounds on the activity of succinate dehydrogenase, as well as on the membrane potential and calcium retention capacity in the isolated liver mitochondria, supported by the oxidation of succinate, was investigated. The chemical reagent *N*-acetylimidazole, the microbial metabolite phenylacetate, drug compounds acetylsalicylic acid and *N*-acetylcysteine were used as acetylating compounds. These compounds reduced succinate dehydrogenase activity to different extents depending on the concentration and incubation conditions. An inhibitory analysis using intermediate electron carriers showed that the ubiquinone-binding site of the enzyme undergoes acetylation. Inhibition was partially eliminated or prevented by pre-incubation of mitochondria with NAD as a co-factor for deacetylation, and with polyamine spermidine, an acceptor of acetyl groups.

Keywords: acetylation, succinate dehydrogenase, microbial metabolites, N-acetylimidazole, acetylsalicylic acid, phenylacetate