

ENZIMOLOGIJA

ANALIZINIS IR SISTEMINIS FERMENTINIŲ SISTEMŲ REGULIACIJOS TYRIMAS. METABOLINIO VALDYMO TEORIJA

Analiziniai tyrimai. Klasikinė enzimologija detalai aprašo individualių izoliuotų (ir išvalytų) fermentų kinetinius parametrus, kurie nustatomi tam tikrose, dažniausiai optimaliose sąlygose. Tokie duomenis gali būti panaudojami, bandant rekonstruoti fermentų veikimą sudėtingose polifermentinėse sistemose. Tačiau duomenų *in vitro* projektavimas procesams *in vivo* susiduria su nemažais sunkumais, kadangi būtina įvertinti sudėtingą ir nuolat besikeičiančią ląstelės aplinką, jos struktūros heterogeniškumą, fermentų tarpusavio sąveiką, didelio skaičiaus moduliatorių poveikį, metabolitų surišimo ar tiesioginio pernešimo galimybę ir pan. Metabolitų ir kitų medžiagų, susijusių su tiriamu procesu, koncentracija ir kitos sąlygos gali neatitikti ribų, kuriuose nustatytos kinetinės fermentų charakteristikos. Be to daugeliu atveju metabolitų ir efektorių tikrųjų koncentracijų neįmanoma įvertinti. Michaelis-Menten modelio kinetika atitinka nedaugelis fermentinių procesų, žymiai didesniai jų daliai būdingi nukrypimai nuo tiesinės $1/v_0$ versus $1/S$ priklausomybės ir ją aprašančių lygčių. Didelio skaičiaus biologinių reakcijų mechanizmai ir juos atitinkančios kinetinės lygtys yra daug sudėtingesni (dalyvauja 2 ir daugiau substratų). Vis dėlto galima tam tikroje substrato koncentracijų srityje taikyti Michaelis-Menten kinetines lygtis. Galimybes tokiu būdu analizuoti fermentines reakcijas suteikia matematinis modeliavimas (MM). MM panaudoja individualių fermentų kinetikos duomenis ir greičio lygtis ir gali būti naudojamas ir izoliuotų fermentų veikimo mechanizmui nustatyti, ir fermentinių sistemų veikimo ir reguliacijos analizei. Yra sukurtos specialios programos, pvz., PENNZYME programa, leidžiančios lyginti stacionarinės kinetikos duomenis su greičio lygtimis. MM panaudojimo reakcijų mechanizmams tirti pavyzdys aprašytas Biochem. Journal 1980 m. - buvo pasiūlyti du hipotetiniai modeliai piruvato kinazės reguliacijos koordinuotos alosterinės sąveikos būdu. MM pagalba buvo parinktos sąlygos, kuriose fermento elgesys labiausiai skiriasi priklausomai nuo to, kuris iš modelių realiai veikia. Atliktas tose sąlygose eksperimentas patvirtino vieno iš modelių teisingumą.

Veikiantis MModeliai sukurti tokioms sudėtingoms fermentinėms sistemoms kaip Krebso ciklas, glikolizė, oksidacinis fosforilinimas, fotosintezės/Kalvino ciklas (17 reakcijų), širdies energetinio metabolizmo modelis (iki 80 reakcijų). Kadangi modeliavimui naudojami santykinu tikslumu nustatyti kinetiniai parametrai ir konstantos, modelio rezultatai gali gerokai nutolti nuo realybės, ypač sudėtingesnių sistemų atveju. Būtina rasti būdus matematinių hipotezių tikrinimui eksperimento sąlygomis, nes matematiniai sprendimai gali būti absurdiški fizinės chemijos požiūriu. Prieš kuriant sudėtingus MModelius, būtina turėti paprastesnius ir tikrinti tarpinio sudėtingumo modelius. Praktiniu požiūriu labai svarbūs yra dviejų fermentų sąveikos modeliai, kurie leidžia prognozuoti ir sudėtingų sistemų elgesį, o taip pat patikrinti hipotezes eksperimentiškai, sumaišant mėgintuvėlyje atskirus sistemos komponentus.

Tarpinis tyrimo būdas (tarp analitinio ir sisteminio) - fermentų tyrimas *in situ* intaktinėse ar kvaziintaktinėse ląstelėse, audiniuose ar organuose. Be molekulinio sąveikų lygio, tokiose sistemose veikia viršmolekulinės organizacijos faktoriai. Ląstelės enzimologija

turi savo metodologiją ir interpretacijos problemas. Metodai skirstomi į invazyvius (dalinai suardoma pradinė ląstelės struktūra) ir neinvazyvius (be struktūros suardymo).

1. Invazyvūs metodai. Organinių tirpiklių (pvz. toluolo) ar detergentų (saponino) pagalba pašalinami membranos plazminės membranos sąlygojami barjerai, taip kad fermentai ir kitos makromolekulės liktų savo vietose, o metabolitai galėtų laisvai judėti. Todėl tyrimai atliekami su skinuotom raumenų skaidulom arba saponinu apdorotais miocitais santykinai atitinka sąlygas *in vivo*. Tokiu būdu buvo nustatyta, kad kai kurių fermentų atveju kinetiniai parametrai nustatyti *in vitro* (izoliuotiems fermentams) atitinka kinetinems fermentų savybes *in vivo*. Tai būdinga bakterijų fermentams. Tačiau eukariotų fermentai daug jautresni ląstelės aplinkai - pvz., žiurkės kepenų citrato sintazės K_m oksaloacetatui ir V_{max} *in vivo* lieka toks pats kaip nustatytas *in vitro*, tačiau K_m acetylCoA *in vivo* padidėja 10 kartų, o inhibuojantis ATP ir NADH poveikis sumažėja. Eritrocitų gliceraldehyd-3-fosfato dehidrogenazės K_m GA-3-P₁ ir P₁ toks pats, o K_m NAD⁺ *in vivo* didesnis 4 kartus nei *in vitro*. Šie pavyzdžiai rodo, kad būtina eukariotų ląstelių kinetinius parametrus nustatyti sąlygose *in vivo*.

Tam tikrą informaciją apie metabolitų pasiskirstymą tarp citozolio ir mitochondrijų galima gauti subfrakcionavimo būdu po apdorojimo organiniais tirpikliais ir detergentais.

2. Neinvazyvūs metodai. - Organų spektrofotometrijos ar fluorimetrijos būdu nustatomi piridininių nukleotidų, flavininių nukleotidų ir citochromų kiekiai ląstelėje. Sudėtingiausias iš neinvazyvių metodų yra branduolinio magnetinio rezonanso (BMR) metodas, kuriuo galima nustatyti adenilatų, kreatinfosfato kiekius audiniuose ir gyvuose organizmuose. tačiau šis metodas turi nemažai jautrumo ir interpretacijos problemų.

Sisteminis tyrimo būdas metodologiškai skiriasi nuo analizinio, kurio esmė yra bandymas rekonstruoti sistemos elgesį remiantis jos individualių narių savybėmis. Sisteminis mąstymo būdas atskirus fermentus vertina kaip sudedamąsias sistemos dalis. Nors yra atsižvelgiama į atskirų jos narių savybes, kartu postuluoja kad sistema yra daugiau nei paprasta sudedamųjų dalių suma. Aiškiausiai sisteminis mąstymo būdas suformuluotas 1973 m. Kacser ir Burns, 1974 m. Heinrich ir Rapoport, 1978 m. Newsholme ir Crabtree darbuose. Pradiniu atskaitos tašku tokiuose tyrimuose laikomas bendras sudėtingos polifermentinės sistemos veikimo greitis (vadinamas **srautu**), o pagal jo pokyčius įvairiomis aplinkybėmis sprendžiama apie atskirų fermentų vaidmenį toje sistemoje ir jų savybes. Taigi, dėmesis koncentruojamas metabolitų srauto sistemoje kontrolės struktūros nustatymui, t.y., įvertinama, kuri(os) sistemos grandi(y)s lemia srauto ir metabolitų koncentracijų sistemoje pokyčius. Ankstesniame polifermentinių sistemų reguliacijos tyrimo etape buvo manoma, kad labai paprasta nustatyti pagrindines metabolinių srautų kontrolės vietas - tokiomis vietomis buvo įprasta laikyti pirmąsias ir negrįžtamas arba nepusiausvyrines metabolinių sekų reakcijas, be to, vyravo nuomonė, jog sekoje yra tik vienas kontroliuojantis fermentas (*pace-maker, bottle-neck, rate-limiting step*). Populiari buvo argumentas, kad tam tikro fermento jautrumas efektoriams yra savaiminis jo reguliacinio vaidmens įrodymas. Vėliau tapo aišku, kad toks supaprastinimas nepagrįstas, kad polifermentinės sistemos greitį kontroliuojančių grandžių gali būti keletas, ir kad tai nebūtinai pirmoji, ar nepusiausvyrinė reakcija. Be to, metabolinės sistemos valdymas nėra fiksuotas – tam tikrų fermentų įnašas į srauto valdymą priklauso nuo sistemos darbo režimo (apkrovimo). Pasikeitus veikimo sąlygoms, valdymas gali pereiti kitiems fermentams. Tai reiškia, kad įvairiose ląstelės būsenose metabolinių procesų reguliacija greičiausiai

nevyksta pagal vienodą scenarijų, ji yra kintama, lanksti. Tai nereiškia, kad MCA siūlomi kiekybiniai kontrolės parametrai yra beveik, nes galioja tik konkrečiomis aplinkybėmis. Svarbiausia yra tai, kad MCA siūlo ne paruoštas kontrolės schemas, bet aiškina, kad valdymas yra kintamas, ir paaiškina, koks yra valdymo persiskirstymo mechanizmas (tai vyksta per kinetinių rodyklių pokyčius).

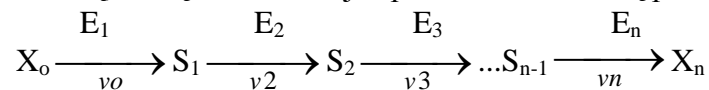
METABOLINIO VALDYMO TEORIJA (METABOLIC CONTROL THEORY)

(Kacser ir Burns, 1973; Heinrich ir Rapoport, 1974; Newsholm ir Crabtree, 1978.)

Metabolinių procesų **valdymo/kontrolės** sąvoka apibrėžia poveikius, kurie keičia metabolinės sistemos veikimo greitį. Kontroliuojanti sistemos grandis yra ta, kurią veikiant, kinta bendras sistemos srauto greitis ir metabolitų lygis sistemoje.

Reguliacijos sąvoka apibrėžia fiziologinius būdus (kurie naudojami ląstelėje) keisti sistemos greitį ir metabolitų koncentracijas.

Metabolinė sistema - fermentinių reakcijų (įskaitant ir pernašos procesus), chemiškai apjungtų tarpinių metabolitų, sistema. Sistema atvira, ji sąveikauja su aplinka per pradinį substratą ir galutinį produktą, kurių koncentracijos palaikomos išorinių procesų.



Sistemai būdingi nekintantys (išorinės aplinkos poveikyje) vidiniai parametrai - K_m , K_i , K_{cat} , K_p ; ir išoriniai parametrai, kurių pagalba aplinka gali keisti sistemą - metabolitų ir efektorių koncentracijos. Stacionarioje būsenoje srautas J pastovus:

$$J = dx_n / dt = v_1 = v_2 = v_3 = \dots = v_n$$

Srauto kontrolės koeficientas:

$$C_i^J = \frac{\delta J}{J} / \frac{\delta E_i}{E_i}, \text{ kai } \delta E_i \rightarrow 0.$$

E_i - i-tojo fermento koncentracija (aktyvumas), J - stacionarios būsenos greitis sistemoje.

Srautas yra visų jį sudarančių fermentų veikimo funkcija, nes bet kurio iš jų aktyvumo sumažinimas iki nulio sukeltų srauto greičio sumažėjimą iki nulio. Tačiau fermentai nėra lygūs pagal jų aktyvumo pokyčių įtaką srautui. C_i yra procentinis srauto pokytis sukeltas 1% pokyčio i-tojo fermento aktyvume. Jis parodo, kokia duoto fermento įtaka srautui per sistemą.

Sumavimo teorema (summation theorem):

$$\sum_{i=1}^n C_i^J = 1.$$

\Rightarrow fermento C_i priklauso ne tik nuo jo paties savybių, bet ir nuo visų kitų sistemos narių C_i reikšmių. C_i - **sisteminė fermento savybė**. Jos negalima nustatyti, vertinant izoliuoto fermento kinetines savybes. Fermento C_i gali keistis dėl kitų sistemos narių C_i pokyčių.

Elastingumo koeficientas

nusako atskiro fermento aktyvumo priklausomybę nuo metabolitų (ar efektorių) koncentracijos pokyčių:

$$\varepsilon_k^J = \frac{\delta v_i}{v_i} / \frac{\delta M_k}{M_k}$$

M_k - efektoriaus (metabolito) k koncentracija, v_i - izoliuoto i -tojo fermento veikimo stacionarus greitis tomis pačiomis sąlygomis (substratų, produktų, efektorių koncentracijoms, temperatūrai, pH ir t.t) kurios yra nagrinėjamoje sistemoje. **Elastingumas** rodo fermentinės reakcijos greičio "jautrumą" metabolitams ir nusako atskiro fermento savybės - tai yra **individuali** (ne sisteminė) **fermento savybė**.

Sąryšio teorema (connectivity theorem):

Nusako, kaip sisteminiai ir individualūs kontrolės parametrai priklauso vieni nuo kitų:

$$\sum_{i=1}^n C_i^J \cdot \varepsilon_x^i = 0,$$

Modelinėje sistemoje iš dviejų narių:

$$C_1 \cdot \varepsilon_1 + C_2 \cdot \varepsilon_2 = 0, \text{ kitaip: } \frac{C_1}{C_2} = -\frac{\varepsilon_2}{\varepsilon_1}.$$

\Rightarrow dviejų nuosekloje sekoje esančių fermentų kontrolės koeficientų santykis atvirkščiai proporcingas jų elastingumams. Tai reiškia, kad dideliu elastingumu pasižymintis fermentas neturi didelės įtakos srautui.

Koncentracijos kontrolės koeficientas

nusako fermento įtaką metabolitų koncentracijoms sistemoje:

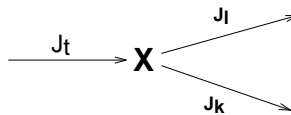
$$C_{E_i}^S = \frac{\delta S}{S} / \frac{\delta E_i}{E_i}$$

i -tojo fermento aktyvumo pokyčio sukeltas metabolito S koncentracijos pokytis.

Koncentracijos kontrolės koeficientų sumavimo teorema:

$$\sum_{i=1}^n C_i^S = 0$$

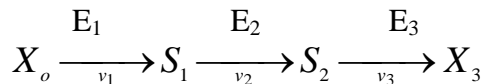
Kuomet metabolinis srautas išsišakoja į kelis srautus, pradinis srautas lygus srautų per atskiras šakas sumai - $J_t = J_1 + J_k$:



Išsišakojimo teorema: išsišakojusios sekos šakų kontrolės koeficientai proporcingi srautų dydžiams per atitinkamas šakas:

$$C_k^J / C_l^J = J_k / J_l$$

Sistemoje



Sąryšis tarp bet kurio sistemos nario C_E^J ir visų sistemos narių elastingumų $\varepsilon_{S_i}^{v_i}$

(X_0 ir X_n yra pakankamai didelės, kad būtų laikomos nekintančiomis, todėl neatsižvelgiama į fermentų elastingumus šiems metabolitams).

$$C_{E_1}^J = \frac{|\varepsilon_1^2 \cdot \varepsilon_2^3|}{|\varepsilon_1^2 \cdot \varepsilon_2^3| + |\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^3| + |\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^2|},$$

$$C_{E_2}^J = \frac{|\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^3|}{|\varepsilon_1^2 \cdot \varepsilon_2^3| + |\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^3| + |\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^2|},$$

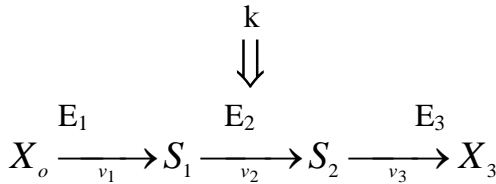
$$C_{E_3}^J = \frac{|\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^2|}{|\varepsilon_1^2 \cdot \varepsilon_2^3| + |\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^3| + |\varepsilon_1^1 \cdot \varepsilon_2^2|}.$$

Tokios lygtys reiškia, kad sistemos narių C_i lemia individualūs visų sistemos narių atsakai į visų metabolitų koncentracijos pokyčius ($\varepsilon_{S_i}^{v_i}$).

Labai svarbus parametras, nusakantis išorinio efektoriaus poveikį sistemai, yra atsako koeficientas. **Atsako koeficientas** rodo, kaip kinta sistemos greitis, keičiantis metabolito ar efektoriaus k koncentracijai M_k :

$$R_k^J = \frac{\delta J}{J} / \frac{\delta M_k}{M_k},$$

Sistemoje, kur efektorius k yra išorinis ir veikia tik fermento E_2 aktyvumą:



Kombinuotas atsako koeficientas:

$$R_k^J = \frac{\delta J}{J} / \frac{\delta k}{k}$$

Sistemos bendras atsakas į efektoriaus poveikį proporcingas veikiamo fermento C_i ir to fermento elastingumo efektoriui sandaugai:

$$R_k^J = C_{E_i}^J \cdot \varepsilon_k^{E_i}$$

⇒ faktas, kad fermentą veikia tam tikras efektorius dar neįrodo, kad tas fermentas gali reguliuoti srautą sistemoje. Net jeigu fermento “jautrumas” (elastingumas) efektoriui didelis, efektoriaus neveiks bendro sistemos greičio, kai fermento kontrolės koeficiento reikšmė lygi arba artima 0.

Kai tas pats efektorius veikia daugiau nei 1 sistemos fermentą, bendras sistemos atsakas:

$$R_k^J = \sum_{i=1}^n C_{E_i}^J \cdot \varepsilon_k^{E_i}.$$

IŠVADOS

1. Molekulių demokratija - polifermentinėse sistemose nėra vienos srautą limituojančios grandies. Srauto kontrolė pasiskirsčiusi tarp sistemos grandžių
2. Pasiskirstymas priklauso nuo sistemos būsenos, (apkrovimo).

3. Srauto kontrolė nėra fiksuota - ji gali persiskirstyti tarp sistemos grandžių net nežymiai pakeitus jos veikimo sąlygas.

EKSPERIMENTINIS METABOLINĖS KONTROLĖS TEORIJOS TAIKYMAS

Tiriama sistema turi būti stacionarioje būsenoje, t.y., metabolitų koncentracijos turi būti pastovios laiko bėgyje. Tai gali būti pasiekama: a) perfuzijos būdu, b) naudojant dideles substrato ir produkto koncentracijas, (kad galima būtų neatsižvelgti į jų pokyčius), c) naudojamos regeneracinės sistemos, kurių pagalba iš susidarantys reakcijos produktai verčiami substratais. Be to, kitos sąlygos (temperatūra, pH, metabolitų, efektorių koncentracijos ir t.t.) turi kuo labiau atitikti sąlygoms *in vivo*.

Kontrolės koeficientai matuojami 2 pagrindiniais būdais:

I. Bottom-up:

? Kiek fermentas Y svarbus srauto kontrolėje?

Tiesiogiai manipuluojant konkrečių fermentų aktyvumu, matuojami atskirų fermentų C_i ir, įvertinus visų atskirų srauto grandžių C_i , sprendžiama apie kontrolės pasiskirstymą polifermentinėje sekoje.

II. Top-down (modulių kinetinė analizė):

? Kur yra pagrindinė srauto kontrolės dalis metabolito X atžvilgiu $\xrightarrow{?} X \xrightarrow{?}$

Sistema dalinama į 2 ar 3 paprastesnes dalis (reakcijų blokus) ir, nustačius atskirų blokų elastingumą juos rišančiam tarpiniam metabolitui X, apskaičiuojami fermentinių blokų C_i . Skaičiavimui naudojamos sumavimo, sąryšio ir išsišakojimo teoremos.

Konkrečiu atveju metodo pasirinkimą lemia eksperimentinės galimybės ir tyrimo tikslai.

Bottom-up:

įvairiais metodais keičiamas atskirų sekos fermentų aktyvumas (ar kiekis).

A. Genetiniais metodais;

B. Titruojant fermentu;

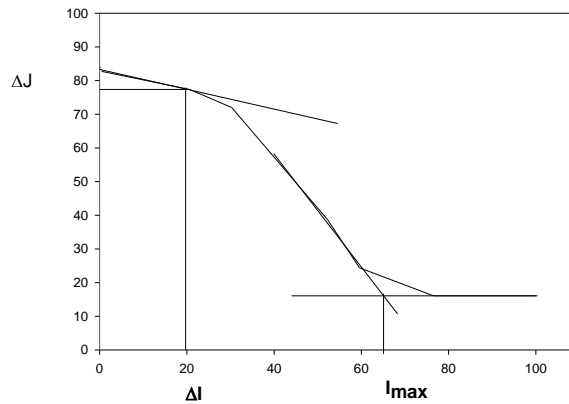
B. Titruojant specifiniais slopikliais:

Jeigu žinomas 1) slopiklio tipas,

2) slopinimo konstantos,

3) slopiklio koncentracija sistemoje.

Pagal srauto priklausomybės nuo specifinio slopiklio koncentracijos kreivę (titravimo kreivę, Pav. 11.1) apskaičiuojamas C_i :



Pav. 11. 1. Fermento kontrolės koeficiento srauto atžvilgiu nustatymas, titruojant savitais slopikliais. J_o - pradinis srauto dydis, ΔJ_o - srauto pokytis sukeltas slopiklio koncentracijos ΔI . I_{max} - I koncentracija, pakankama pilnam slopinimui. Naudojamos formulės:

negrįžtamam slopikliui: $C_i = -\frac{dJ}{J_o} \frac{dI}{I_{max}}$, nekonkurentiniam slopikliui:

$C_i = -\frac{dJ}{J_o} \frac{dI}{K_i}$, konkurentiniam slopikliui: $C_i = -\frac{dJ}{J_o} \frac{dI}{K_i(1 + S / K_m)}$, kur K_i - slopinimo

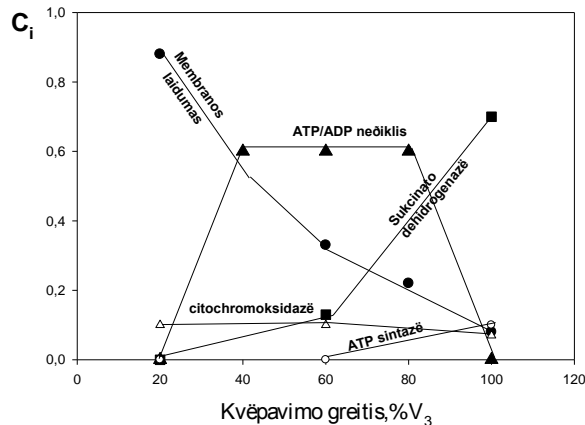
konstanta, nustatyta tomis sąlygomis, S - substrato, su kuriuo konkuruoja slopiklis, koncentracija, ir K_m tam substratui.

Tokiu būdu 1982 Groen ir bendraautoriai (Olandija) nustatė kontrolės pasiskirstymą tarp kepenų mitochondrijų oksidacinio fosforilavimo grandžių, vėliau panaši priklausomybė nustatyta triušio širdies mitochondrijose mūsų laboratorijoje (Pav. 11.2):

Oksidacinio fosforilavimo fermento kontrolės koeficiento (C_i)

priklausomybė nuo santykinio mitochondrijų kvėpavimo

greičio (arba metabolinės būsenos)



Izoliuotos triušio širdies mitochondrijos, substratas - sukcinatas (+rotenonas)

Pav. 11.2. Oksidacinio fosforilavimo fermentų kontrolės koeficientai kvėpavimo srauto atžvilgiu.

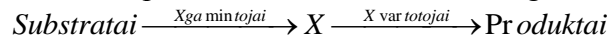
Loginės išvados:

1. Srauto kontrolė pasiskirsčiusi tarp sistemos grandžių;
2. Pasiskirstymas priklauso nuo sistemos būsenos (apkrovimo) - kinta priklausomai nuo mitochondrijų metabolinės būsenos.

Mūsų laboratorijoje nustatyta kontrolės koeficientų reikšmės įvairių triušio širdies oksidacinio fosforilavimo grandžių. Bottom-up naudojamas gana plačiai, nes gaunama tiesioginė informacija apie konkrečių fermentų dalyvavimą srauto kontrolėje.

Top-down

Sistema suskirstoma į blokus pasirinkto metabolito X atžvilgiu:



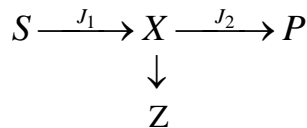
Sistemoje neturi būti grįžtamų ryšių. Metodo privalumas tame, kad galima nieko nežinoti apie sekos struktūrą, kadangi daugelis reakcijų apjungiamos į blokus.

Reikalavimai X:

1. X turi būti sistemos tarpinis metabolitas,
2. X koncentracija turi būti lengvai išmatuojama - jis neturi būti kompartmentuojamas, ribotai difunduojantis ar perduodamas tarpfermentiniais kanalais,
3. X turi būti vienintelis tarpinis metabolitas tarp X gamintojų ir X vartotojų, kad pokyčiai X gamintojų aktyvume keistų X vartotojų aktyvumą (ir atvirkščiai) tik per X, o ne dar kitais būdais.

Pvz.:

Metabolito X koncentracija gali būti keičiama, įvedant papildomą seką Z:



Tuomet nustatoma:

$$\varepsilon_x^{J_1} = \frac{dJ_1}{J_1} \bigg/ \frac{dx}{x},$$

$$\varepsilon_x^{J_2} = \frac{dJ_2}{J_2} \bigg/ \frac{dx}{x}.$$

Pagal sumavimo ir sąryšio teoremas

$$\frac{C_1}{C_2} = - \frac{\varepsilon_x^{J_2}}{\varepsilon_x^{J_1}},$$

ir $C_1 + C_2 = 1$;

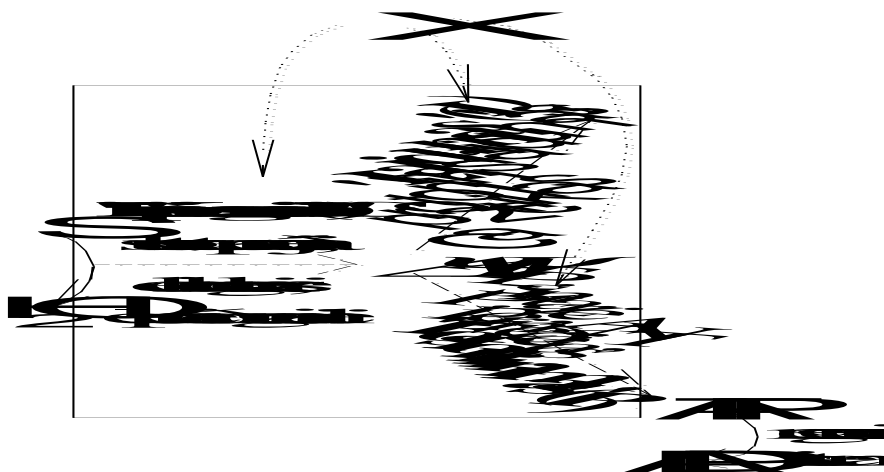
Išskaičiuojama:

$$C_2 = 1 - C_1$$

$$C_2 = \frac{\varepsilon_x^{J_1}}{\varepsilon_x^{J_1} - \varepsilon_x^{J_2}}.$$

Kitas būdas keisti X koncentraciją yra poveikis X gamintojų kinetikai. Taip nustatomas X vartotojų elastingumas X , matuojant dx ir J_2 . Savo ruožtu, keičiant X vartotojų kinetiką, nustatomas $\varepsilon_x^{J_1}$.

Tam gali būti naudojami bet kurie J_1 ar J_2 slopikiai ar aktyviekiai. Toks metodas pritaikytas oksidaciniam fosforilinimui tirti 1990 m. Hafner, Brown, Brand. Oksidacinio fosforilinimo sistemoje vienas iš svarbių tarpinių metabolitų yra membraninis potencialas $\Delta\Psi$. $\Delta\Psi$ gamina oksidacinė posistemė (vadinama "kvėpavimo grandine") iš tiesų susideda iš substratų nešiklių, dehidrogenazių, kvėpavimo grandinės kompleksų; $\Delta\Psi$ panaudoja dvi posistemės - protonų laidumo (prie kurių prisideda bet kurių katijonų ciklinės pernašos), ir fosforilinimo posistemė, kuria sudaro adenilatų bei fosfato nešikliai, bei ATP sintazė (Pav. 11.3):



Pav. 11.3. Oksidacinio fosforilinimo suskirstymas į modulius (posistemės), jungiamus $\Delta\Psi$.

Sistemą sudaro izoliuotos mitochondrijos, kvėpuojančios stacionariu greičiu. Kvėpavimo grandinė elektronų pernešimo metu pumpuoja protonus iš mitochondrijų užpildo į išorę, taip susidaro $\Delta\Psi$, kuri panaudoja fosforilinimo sistema ir vidinės membranos pralaidumą jonams sąlygojantys procesai. Priklausomai nuo ADP-regeneracinės sistemos aktyvumo, mitochondrijos gali kvėpuoti įvairiu greičiu tarp v_3 ir v_4 . Kadangi kelias išsišakojęs, be sumavimo ir sąryšio teoremų dar taikysime išsišakojimo teoremą, pagal kurią išsišakojusios sekos atskirų šakų kontrolės koeficientai proporcingi srautų dydžiams per atitinkamas šakas:

$$C_k^J / C_l^J = J_k / J_l$$

Kad pilnai išnagrinėti kontrolę tokioje sistemoje, pakanka žinoti srautą per kiekvieną sistemos bloką (šaką) ir kiekvieno bloko elastingumą $\Delta\Psi$. Jis nustatomas, keičiant $\Delta\Psi$ kito bloko pagalba (moduliuojant kito bloko aktyvumą savitais efektoriais). Nustatomos sekančios priklausomybės nuo $\Delta\Psi$ (Pav. 11.4):

- J_C (matuojama kaip J_O) titruojant J_P slopikliu arba keičiant J_P aktyvumą regeneracinės sistemos pagalba,
- J_L (matuojama kaip J_O , esant oligomicino pertekliui), titruojant J_C slopikliu.

c) J_P - priklausomybe nustatoma, titruojant J_C slopikliu ir apskaičiuojant pagal $J_C - J_L = J_P$. Šiuo atveju kiekviename titravimo kreivės taške iš J_C reikšmės atimama tą patį $\Delta\Psi$ dydį atitinkanti J_L reikšmė nustatyta (b) būdu. Taip apskaičiuotas J_P srautas išreiškiamas J_C (ngatO/min mg) vienetais.

Tuomet pagal šių trijų srautų priklausomybės nuo $\Delta\Psi$ kreivių skaičiuojami elastingumai:

$$a) \rightarrow d) \quad \varepsilon_{\Delta P}^C = \frac{dJ_C}{J_C} \bigg/ \frac{d\Delta P}{\Delta P},$$

$$b) \rightarrow e) \quad \varepsilon_{\Delta P}^L = \frac{dJ_L}{J_L} \bigg/ \frac{d\Delta P}{\Delta P},$$

$$c) \rightarrow f) \quad \varepsilon_{\Delta P}^P = \frac{d(J_C - J_L)}{J_C - J_L} \bigg/ \frac{d\Delta P}{\Delta P}.$$

Toliau taikomos sumavimo, sąryšio ir išsišakojimo teoremos, pagal jas sudarytos trijų lygčių sistemos sprendiniai:

A. Trijų blokų (C,P,L) kontrolės koeficientai kvėpavimo greičio J_C atžvilgiu:

$$C_C^{J_C} = \frac{J_P \cdot \varepsilon_{\Delta P}^P + J_L \cdot \varepsilon_{\Delta P}^L}{J_P \cdot \varepsilon_{\Delta P}^P + J_L \cdot \varepsilon_{\Delta P}^L - J_C \cdot \varepsilon_{\Delta P}^C},$$

$$C_P^{J_C} = J_P \cdot (1 - C_C^{J_C}) / J_C,$$

$$C_L^{J_C} = J_L \cdot (1 - C_C^{J_C}) / J_C;$$

B. Trijų blokų kontrolės koeficientai fosforilinio greičio J_P atžvilgiu:

$$C_C^{J_P} = \frac{J_C \cdot \varepsilon_{\Delta P}^P}{J_P \cdot \varepsilon_{\Delta P}^P + J_L \cdot \varepsilon_{\Delta P}^L - J_C \cdot \varepsilon_{\Delta P}^C},$$

$$C_P^{J_P} = 1 - J_P \cdot C_C^{J_P} / J_C,$$

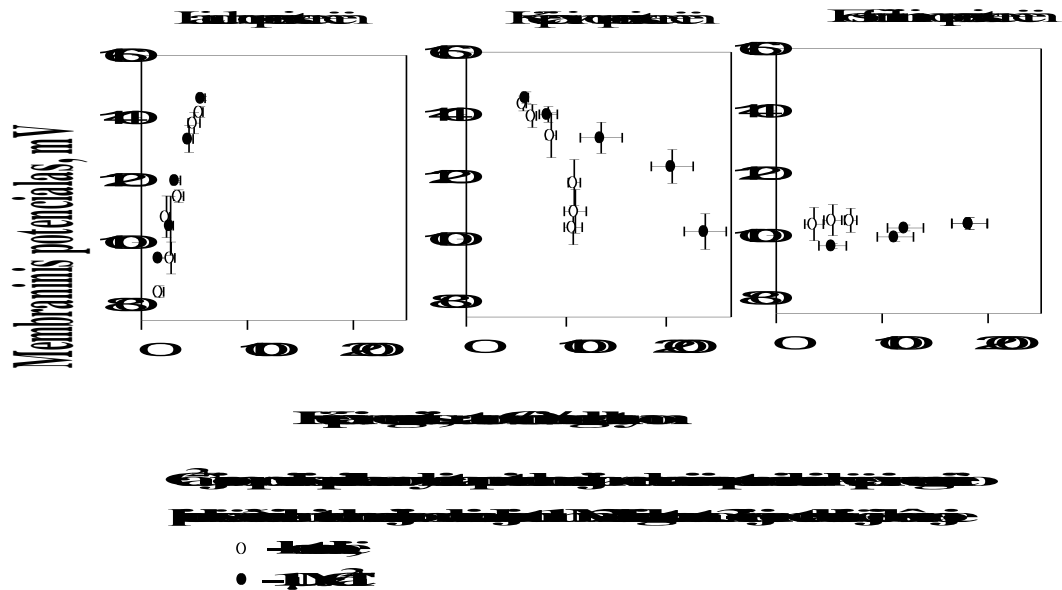
$$C_L^{J_P} = -J_L \cdot C_C^{J_P} / J_C;$$

C. Trijų blokų kontrolės koeficientai membranos laidumo J_L atžvilgiu:

$$C_C^{J_L} = \frac{J_C \cdot \varepsilon_{\Delta P}^L}{J_P \cdot \varepsilon_{\Delta P}^P + J_L \cdot \varepsilon_{\Delta P}^L - J_C \cdot \varepsilon_{\Delta P}^C},$$

$$C_P^{J_L} = -J_P \cdot C_C^{J_L} / J_C,$$

$$C_L^{J_L} = 1 - J_L \cdot C_C^{J_L} / J_C.$$



Pav. 11. 4. Kinetinės laidumo, kvėpavimo ir fosforilinimo posistemių priklausomybės nuo $\Delta\Psi$, esant įvairiai Ca^{2+} jonų koncentracijai.

Srauto kontrolės koeficientų, nustatytų a) titruojant specifiniais inhibitoriais ir b) elastingumą analizės metodu, palyginimas. Sukcinato oksidacijos greičio trečioje metabolinėje širdies mitochondrijų būsenoje kontrolės pasiskirstymas tarp oksidacinio fosforilinimo grandžių:

	Bottom-up	Top-down
C_L	0.08	C_L 0.01
C_{SDH}	0.7	C_R 0.88
C_{cytox}	0.07	
C_{ATPase}	0.1	C_P 0.11
C_{ANT}	0	