

УДК 612.015.1:543.42

В. К. КОЛЬТОВЕР, Л. М. РАЙХМАН, А. А. ЯСАЙТИС, Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПИНОВОГО ЗОНДА ЗАВИСИМЫХ ОТ АТФ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ В МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ

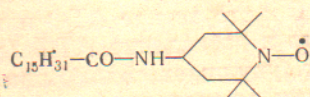
(Представлено академиком А. Н. Белозерским 5 VI 1970)

Уже давно высказано предположение, что осуществление окислительного фосфорилирования в митохондриях сопровождается конформационными изменениями соответствующих ферментных систем (^{1, 2}). При помощи измерения светорассеяния и электронной микроскопии удается наблюдать изменение формы и объема митохондрий и субмитохондриальных частиц (с.м.ч.) в зависимости от их функционального состояния (окисление или восстановление, энергизация или дезэнергизация) (³⁻⁶). Однако это еще не является доказательством наличия конформационных переходов митохондриальных липопротеидных структур, поскольку изменение размеров митохондрий или с.м.ч. могут быть обусловлены процессами поглощения и выделения воды этими частицами, сопровождающими активный транспорт ионов (^{7, 8}). Аналогичные соображения не позволяют однозначно трактовать результаты опытов с флуоресцирующими красителями типа анилинафталинсульфоновой кислоты, поскольку они несут электрический заряд и изменение их флуоресценции при энергизации митохондрий может быть обусловлено не изменением конформации митохондриальных структур, а перераспределением красителя между внутренним объемом митохондрий и внешней средой (⁹).

Весьма перспективным методом для исследования конформационных переходов мембранных структур митохондрий является применение неполярных спиновых зондов, представляющих собой нейтральные молекулы, способные гидрофобно связываться с мембранными образованиями (¹⁰). Спектры э.п.р. зонда зависят от характера его молекулярного окружения, что позволяет обнаруживать структурные изменения матрицы, с которой связан зонд. Ранее было показано изменение анизотропии спектров э.п.р. зонда, связанного с митохондриальными мембранами, при восстановлении дыхательной цепи (¹¹). Однако в этих условиях имело место также частичное восстановление молекул самого зонда, что затрудняло интерпретацию полученных результатов. В настоящей работе мы попытались обнаружить при помощи спинового зонда конформационные переходы в мембранах митохондрий и с.м.ч. при их энергизации АТФ.

Опыты проводили на митохондриях и с.м.ч. из сердца крупного рогатого скота. Митохондрии выделяли, как описано ранее (¹²). С.м.ч. получали путем разрушения легкой фракции митохондрий ультразвуком в среде следующего состава: сахароза 0,25 М, трис-буфер (рН 7,5) 10 мМ, версен 1 мМ. После озвучивания фракцию с.м.ч. собирали ультрацентрифугированием при 105 000 g в течение часа.

В качестве спинового зонда использовали синтезированный по методу Розанцева (¹³) радикал.



Митохондриальные препараты суспендировали в среде, содержащей трис-буфер (рН 7,5) 100 мМ, КСl 100 мМ, MgCl₂ 10 мМ, сахарозу 0,25 М при концентрации белка 20 мг/мл. Перед началом опыта в суспензию вво-

дили феррицианид (20 мМ) для полного окисления дыхательной цепи во избежание восстановления радикала, после чего добавляли радикал в виде 0,01 мл спиртового раствора на 1 мл инкубационной среды с таким расчетом, чтобы концентрация его в среде составляла 10^{-4} М. Отдельные порции приготовленных таким образом препаратов смешивали с равным объемом раствора АТФ определенной концентрации в инкубационной среде такого же состава и рН, доведенным до 7,5 (в контрольных опытах добавляли инкубационную среду без АТФ) и снимали спектры э.п.р. через

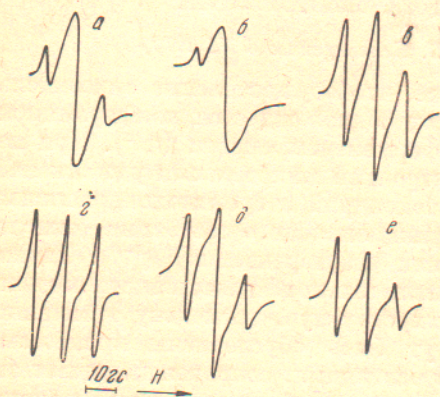


Рис. 1. Спектры э.п.р. радикала в разных средах. а — радикал в суспензии с.м.ч. (рН 7,5) без АТФ, б — эмульсия радикала в воде, в — радикал в с.м.ч. после добавления АТФ (10 мМ), г — раствор радикала в спирте, д — радикал в с.м.ч. без АТФ при снижении рН до 4,4, е — радикал в целых митохондриях после прибавления АТФ (10 мМ)

различные сроки после смешивания. Инкубацию проводили при температуре 25°. В экспериментах с применением разобщителей последние обычно преинкубировали с митохондриальными препаратами в течение 3—5 мин. до прибавления АТФ.

Как видно из рис. 1а, спектр э.п.р. радикала в окисленных с.м.ч. без АТФ представляет плохо разрешенный триплет с уширенной центральной компонентой. Спектр является наложением двух сигналов: слабого триплета, обусловленного молекулами радикала, «соллюбилизованного» мембранными структурами, и широкого синглета, который характерен для гидрофобного радикала в водной фазе (рис. 1б), что обусловлено образованием молекулами радикала мицелл типа эмульсии «масло в воде», где анизотропное сверхтонкое взаимодействие приводит к уширению резонансных линий.

Добавление к суспензии с.м.ч. АТФ вызывает значительные изменения спектров э.п.р. (сужение центральной линии и увеличение интенсивности крайних компонент), указывающие на улучшение соллюбилизации радикала (рис. 1в). Для количественной оценки степени соллюбилизации гидрофобного радикала в различных состояниях митохондрий или с.м.ч. удобно ввести «параметр соллюбилизации (п.с.), равный отношению интегральной интенсивности одной из крайних компонент к интенсивности центральной линии. П.с. изменяется от $\sim 0,1$ в водной фазе (рис. 1б) до 1 в менее полярной среде, способной растворять радикал (рис. 1г).

Поскольку молекулы радикала нейтральны, подобные изменения спектров э.п.р. под влиянием АТФ едва могут быть связаны с перераспределением радикала между внутренним пространством митохондрий и внешней средой вследствие изменения транспорта ионов через митохондриальные мембраны при энергизации. С гораздо большей вероятностью можно утверждать, что улучшение «соллюбилизации» радикала в мембранах при добавлении АТФ свидетельствует об изменении конформации мембранных липопротеидов, в результате чего гидрофобные области становятся более доступными для зонда.

В дальнейшем было обнаружено, что снижение рН суспензии спинеченных частиц до 4—4,5 в отсутствие АТФ приводит к таким же изменениям спектров э.п.р., что и добавление АТФ (рис. 1д). Сдвиг рН в щелочную сторону, наоборот, ухудшает соллюбилизацию радикала частицами (рис. 2). Таким образом, увеличение концентрации протонов само по себе, без энергизации, способно вызвать такие конформационные изменения, при которых возрастает число неполярных групп на «открытых» участках митохондриальных липопротеинов.

Поскольку с.м.ч. обладают способностью накапливать протоны при энергизации, возникает вопрос о том, действует ли АТФ непосредственно на конформацию липопротеидных структур или же влияет косвенным образом, через закисление внутреннего объема частиц. В связи с этим важно было сопоставить влияние АТФ на с.м.ч. и целые митохондрии, которые характеризуются противоположной по сравнению с с.м.ч. ориентаци-

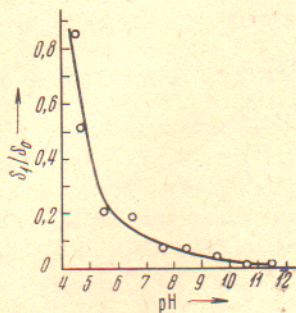


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость степени соллюбилизации радикала в с.м.ч. от pH среды (S_1/S_0 — параметр соллюбилизации)

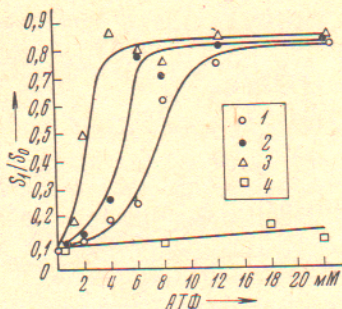


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость степени соллюбилизации радикала от концентрации АТФ в с.м.ч. — интактных (1) и обработанных разными дозами олигомицина (2 — 0,1 $\mu\text{г}/\text{мг}$, 3 — 0,2 $\mu\text{г}/\text{мг}$, 4 — 1,5 $\mu\text{г}/\text{мг}$)

ей внутренней мембраны и выбрасывают протоны во внешнюю среду. Как видно из рис. 1e, АТФ вызывает такие же изменения в случае целых митохондрий, как и с с.м.ч. Эффект не может быть связан с накоплением протонов во внешней среде, так как за время инкубации митохондрий с АТФ pH внешней среды снижалось не более чем до 6,8. Это дает основание думать, что наблюдаемые при помощи спинового зонда конформационные переходы в мембранных липопротеидах под влиянием АТФ являются, скорее, прямым следствием энергизации, а не каким-либо косвенным эффектом. Сюда надо добавить также, что АДФ, в отличие от АТФ, не вызывает заметных конформационных переходов, а преинкубация митохондриальных препаратов с динитрофенолом (10^{-4} M) и олигомицином (1 $\mu\text{г}/\text{мг}$) предотвращает появление изменений спектров э.п.р. спинового зонда при последующем добавлении АТФ.

Однако обработка динитрофенолом и олигомицином митохондриальных препаратов после добавления АТФ не приводила к полному обращению индуцированных АТФ изменений спектров э.п.р. Такая кажущаяся необратимость конформационных переходов, регистрируемых по спектрам э.п.р., объясняется, по всей вероятности, тем, что молекулы зонда, связанные в результате энергизации с неполярными группами, в силу своей высокой гидрофобности не диффундируют назад в водную фазу при последующей дезэнергизации.

Количественное изучение интенсивности конформационных переходов при различных концентрациях АТФ показывает, что эта зависимость носит явно выраженный S-образный характер (рис. 3). Кооперативный характер переходов митохондриальных мембран проявляется также и на кривых зависимости ингибирования конформационных переходов, индуцируемых АТФ, от концентрации динитрофенола и олигомицина (рис. 4a).

Интересное явление имеет место в случае олигомицина. В то время как в концентрации около 1 $\mu\text{г}$ на 1 мг белка и выше этот антибиотик предотвращает появление конформационных изменений при добавлении АТФ, в меньших концентрациях (0,1—0,2 $\mu\text{г}/\text{мг}$) он оказывает противоположный эффект, усиливая влияние АТФ. У митохондрий, обработанных малыми количествами олигомицина, данные значения п.с. достигаются при

добавлении меньших концентраций АТФ, так что кривая зависимости п.с. от концентрации АТФ оказывается сдвинутой влево (рис. 3).

Высокую чувствительность п.с. к АТФ можно наблюдать без олигомицина на хорошо сопряженных частицах (полученных разрушением митохондрий ультразвуком в присутствии АТФ, сукцината и ионов Mg^{2+} и Mn^{2+}), причем на таких частицах олигомицин не оказывает активирующую

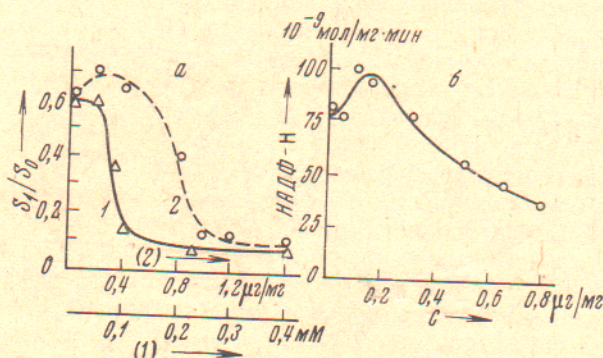


Рис. 4. Анализ конформационных переходов. *a* — влияние разных концентраций динитрофенола (1) и олигомицина (2) на соллюбилизацию радикала в с.м.ч. в присутствии 10 мМ АТФ; *б* — влияние разных концентраций олигомицина на зависимую от АТФ трансгидрогеназную реакцию пиридиннуклеотидов. Состав инкубационной среды: сахараза 0,25 М трис-буфер (рН 7,5) 50 мМ, $MgSO_4$ 10 мМ, этанол 0,6%, алкогольдегидрогеназа 0,1 мг/мл, NaCN 5 мМ, НАДФ $1,7 \cdot 10^{-2}$ М, НАД $8 \cdot 10^{-5}$ М, АТФ 2 мМ, белок с.м.ч. 1 мг/мл. Восстановление НАДФ регистрировалось флуорометрически

щего действия. В этой связи важно отметить и тот факт, что в случае с.м.ч., у которых проявляется стимулирующее влияние олигомицина на увеличение п.с. в присутствии АТФ, удается обнаружить также активирование малыми концентрациями олигомицина зависимой от АТФ трансгидрогеназной реакции пиридиннуклеотидов (рис. 4б). Отсюда можно сделать заключение, что эффект малых доз олигомицина на зависимые от АТФ конформационные переходы мембранных структур с.м.ч. (проявляющиеся в изменении п.с. радикала) имеют ту же природу, что и при активации олигомицином зависимых от АТФ эндергонических реакций.

Авторы выражают благодарность В. П. Скулачеву за полезное обсуждение полученных результатов и В. В. Кулене за проведение опытов по определению трансгидрогеназной активности с.м.ч.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
1 IV 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. Д. Бойер, В сборн. Молекулярная биология (проблемы и перспективы), «Наука», 1964, стр. 227. ² Д. Грин, Р. Гольдбергер, Молекулярные аспекты жизни, М., 1968. ³ L. Packer, A. L. Tarpey, J. Biol. Chem., 235, 2, 525 (1960). ⁴ L. Packer, J. Biol. Chem., 235, 1, 242 (1960). ⁵ D. Green, VII Intern. Congress of Biochem. Abstracts, Tokyo, 2, 1967, p. 193. ⁶ D. Green, R. Harris, Federation European Biochem. Soc. letters, 5, 4, 241 (1969). ⁷ L. Packer, J. Cell Biol., 39, 2, 382 (1968). ⁸ G. F. Azzone, E. Rossi, A. Scarpa, In: Regulation Function of Biological Membranes, Amsterdam, 1968, p. 236. ⁹ A. Azzi, B. Chance, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 62, 2, 612 (1969). ¹⁰ A. D. Keith, A. S. Waggoner, O. H. Griffith, ibid., 61, 3, 819 (1968). ¹¹ V. K. Koltover, M. G. Goldfield et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 421 (1968). ¹² А. А. Ясайтис, В. В. Чистяков, В. П. Скулачев, В сборн. Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, М., 1967, «Наука», стр. 55. ¹³ E. G. Rozantsev, L. A. Krinitzkaia, Tetrahedron, 21, 497 (1965).