

УДК 576.8.094.7

БИОФИЗИКА

А. Д. ИСМАИЛОВ, Л. И. БОГУСЛАВСКИЙ, Л. С. ЯГУЖИНСКИЙ,
В. П. СКУЛАЧЕВ

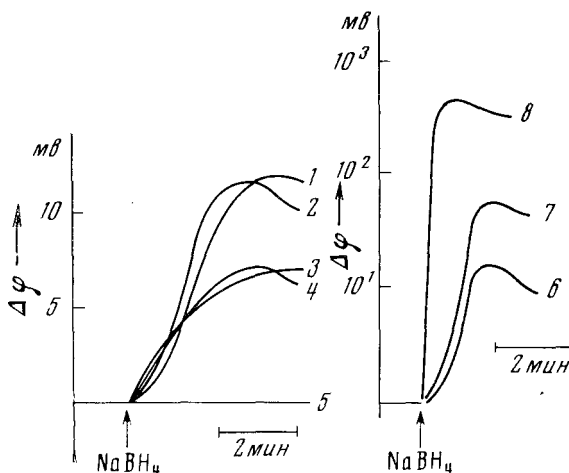
ГЕНЕРАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛА НА БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ В СИСТЕМЕ НАД-Н — ФЛАВИН- Q_6O_2

(Представлено академиком А. Н. Фрумкин 21 VIII 1972)

В митохондриях и микросомах протекание окислительно-восстановительных реакций может приводить к генерации трансмембранного потенциала. В модельных системах на бислойных липидных мембранах (б.л.м.) и на мицеллах этот процесс удавалось наблюдать лишь в простейших случаях для окислительно-восстановительных систем J^0 / J^- (¹); Fe^{2+} / Fe^{3+} (²); аскорбиновая кислота (феррицианид) — феррацен (³).

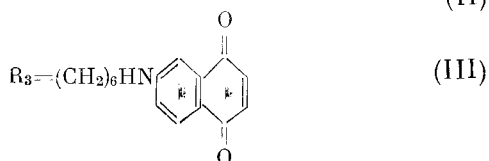
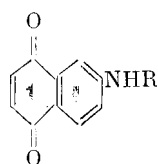
В настоящей работе изучались трансмембранные потенциалы и проводимость б.л.м., в которых генерация потенциала осуществлялась нафтохинонами I—III и коэнзимом Q_6 . В раствор с одной стороны мембраны добавлялись вещества, способные восстанавливать растворенные в липидах хиноны. В качестве восстановителя были использованы $NaBH_4$ и НАД-Н. Окислителем служил кислород, растворенный в воде. Б.л.м. готовились или из смеси лецитина с холестерином (⁴), или липидов, выделенных из бычьего мозга, и формировались на отверстии тефлонового стаканчика. Толщина мембраны контролировалась по изменению емкости на частоте

Рис. 1. Генерация потенциала на б.л.м. в системе $NaBH_4 / O_2$. Мембрана модифицирована коэнзимом Q_6 и нафтохинонами I—III. 1 — Q_6 , 2 — II, 3 — III, 4 — I, 5 — немодифицированная мембрана 6 — $NaBH_4$, 1 мг/мл, 7 — $NaBH_4$, 4 мг/мл, 8 — мембрана заменена платиной



0,2 гц и визуально под микроскопом. Растворы буферной смеси состава: 50 мМ трис, 50 мМ цитрат, 50 мМ NaCl (в отдельных случаях буферный состав был иным, см. подписи к рис. 1—4) — готовились на монодистиллированной воде. Перемешивание осуществлялось магнитной мешалкой. Для измерения потенциалов использовались хлоросеребряные электроды, соединенные с раствором через агар-агаровые мостики, наполненные 0,1 М KCl. Изменение потенциала во времени регистрировалось электрометром (входное сопротивление 10^{12} ом), соединенным с самописцем КСП-4.

На рис. 1 показано изменение во времени трансмембранного потенциала б.л.м. в буфере 0,1 М K_2HPO_4 + 0,05 М цитрат + 0,05 М KCl, pH 5,5.



и коэнзимом Q_6

Та сторона мембраны, на которой происходило восстановление хинона, имела плюс. Тот же знак потенциала наблюдается в том случае, когда мембрана заменялась платиной (рис. 1, 8).

Во всех случаях при добавлении NaBH_4 в один из отсеков ячейки на мембране в присутствии нафтохинонов и Q_6 возникал потенциал, который постепенно уменьшался со временем (рис. 1, 1, 2, 3, 4). Увеличение концентрации NaBH_4 приводит к возникновению более высокого потенциала (рис. 1, 7). В отсутствие хинонов трансмембранный потенциал не возникает (рис. 1, 5).

Коэнзим Q_6 является природным переносчиком электронов в дыхательной цепи митохондрий. Представляло интерес изучить свойства этого хи-

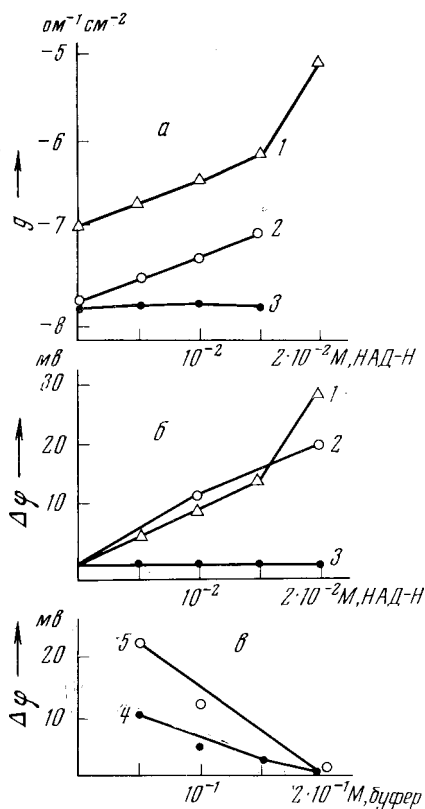


Рис. 2. Зависимость проводимости мембраны с Q_6 от концентрации НАД-Н (а) и зависимости трансмембранного потенциала от концентрации НАД-Н (б) и от буферной емкости раствора цитрат: трис: NaCl (1:1:1) (в). Б.л.м. из лецитина с холестерином (1), из мозговых липидов (2), немодифицированная (3), без разобидителя (4), с ТТФБ (5)

нона как переносчика электронов через искусственную фосфолипидную мембрану. В качестве восстановителя был выбран в этом случае НАД-Н. На рис. 2 показана зависимость проводимости и трансмембранного потенциала б.л.м. в присутствии Q_6 от концентрации добавленного НАД-Н. Добавление НАД-Н без Q_6 не приводит к возникновению потенциала на б.л.м. (рис. 2б, 3).

В присутствии Q_6 величина генерированного потенциала уменьшается с увеличением буферной емкости раствора (рис. 2в, 4). При добавлении к мембране, на которой генерируется потенциал, разобидителей окислительного фосфорилирования тетрахлортрифторметилбензимидазола или пентахлорфенола (ТТФБ или ПХФ) в буферной смеси 0,05 M цитрат + 0,05 M трис + 0,05 M NaCl , pH 5,8, величина регистрируемого потенциала возрастает (рис. 3а), однако этот эффект также уменьшается с ростом буферной емкости раствора (рис. 2в, 5).

Были также проведены опыты, в которых исследуемая система работала при градиенте протонов по обе стороны мембраны. Мембраны, сфор-

мированные из липидов, выделенных из бычьего мозга, в присутствии Q_6 и НАД-Н не обладают протонной проводимостью в растворах с низкой буферной емкостью. При высокой ($0,2\text{ M}$) буферной емкости создание градиента рН в $0,2$ ед. приводит к возникновению добавочного потенциала соответствующего знака величиной 5 мВ . Система, генерирующая потенциал, в присутствии одного из уже упомянутых разобщителей окислительного фосфорилирования становится чувствительной к градиенту рН. В частности, подщелачивание раствора со стороны, противоположной редокс-системе, может уменьшить трансмембранный потенциал или даже изменить его знак, в зависимости от количества добавленной щелочи (рис. 3б).

Известно, что в дыхательной цепи митохондрий между НАД-Н и коэнзимом Q_6 локализован флавопротеид, который принимает участие в переносе электронов от НАД-Н к Q_6 . Поэтому было логично построить модель-

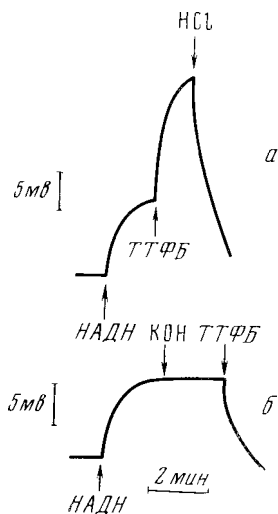


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика генерации трансмембранного потенциала на б.л.м., с Q_6 при добавлении НАД-Н ($0,5 \cdot 10^{-2}\text{ M}$). Разобщитель ТТФБ добавлялся к мембране в тот же отсек, где был НАД-Н (б) КОН — в противоположный отсек (б)

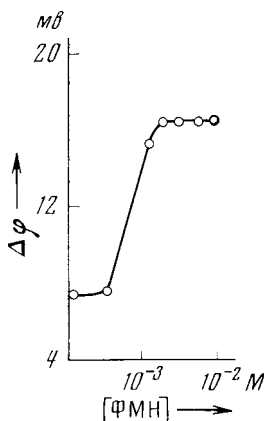


Рис. 4

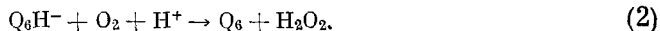
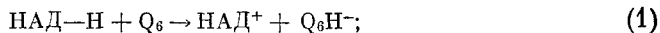
Рис. 4. Зависимость величины трансмембранного потенциала б.л.м., модифицированной Q_6 , от концентрации добавленного ФМН в присутствии НАД-Н ($0,5 \cdot 10^{-2}\text{ M}$) по одну сторону мембраны

ную систему, в которой генерация потенциала осуществляется системой НАД-Н — флавин — Q_6 — O_2 . Добавление НАД-Н и флавина к системе без Q_6 не приводит к возникновению э.д.с. на мембране. В присутствии Q_6 в буфере $0,1\text{ M}$ цитрат + $0,1\text{ M}$ трис + $0,1\text{ M}$ NaCl, рН 5,8, относительно низкие концентрации флавиномононуклеотида (ФМН) увеличивают трансмембранный потенциал, возникающий на б.л.м. при добавлении НАД-Н (рис. 4).

Обсуждение. Эксперименты, проведенные в настоящей работе, показали, что в присутствии хинона, растворенного в б.л.м., знак трансмембранного потенциала соответствует переходу отрицательно заряженной частицы со стороны, куда был добавлен восстановитель, на ту сторону, где происходит окисление хинона (рис. 1б, 7, 8). Эти данные свидетельствуют о том, что хиноны самой различной природы могут служить переносчиками электронов. В опытах с НАД-Н и Q_6 при условии невысокой буферной емкости раствора в мембране происходит генерация восстановленных форм хинонов, причем создание градиента рН не меняет потенциала на мембране (рис. 4). Это говорит о том, что ни одна из восстановленных форм хино-

нов в данных условиях не является эффективным переносчиком ионов H^+ через мембрану.

Окислительно-восстановительные реакции, протекающие на границах раздела фаз мембраны с водным раствором, могут быть записаны следующим образом:



Увеличение потенциала на б.л.м. при добавлении ТТБФ или ПХФ к мембране (рис. 3), после чего она становится селективно проницаемой к иону H^+ , свидетельствует в пользу образования градиента рН в примембранном слое в ходе окислительно-восстановительной реакции (2). Следует учесть, что хотя реакция (2) может протекать по обе стороны мембраны, наиболее интенсивно процесс протекает там, где частица Q_6H^- непосредственно возникает. Поэтому примембранное увеличение рН наиболее сильно на той стороне, где протекает окислительно-восстановительная реакция (1). Примембранное обеднение может быть снято в растворах крепкого буфера, что и видно на рис. 2в. В опытах без добавки к б.л.м. разобщителя окислительного фосфорилирования уменьшение потенциала, возникшего в результате электронообменных реакций (1) и (2), и одновременное появление протонной проводимости б.л.м. при увеличении буферной емкости раствора, возможно, указывает на накопление в мембране незаряженной формы коэнзима Q_6H_2 , которая должна обладать хорошо известным свойством фенолов, увеличивать протонную проводимость б.л.м. Накопление формы Q_6H_2 в б.л.м. объясняется тем, что в растворах с высокой буферной емкостью снимается примембранное обеднение протонами, в результате чего потребляющая ионы водорода реакция



сдвигается вправо.

Добавление ФМН к системе $НАД-Н - Q_6 - O_2$ увеличивает трансмембранный потенциал (рис. 4). В неравновесной системе это может быть объяснено тем, что флавин увеличивает скорость переноса электрона через мембрану, встраиваясь в электронотранспортную цепь. ФМН не растворим в липидах, это обстоятельство говорит о том, что флавин должен увеличивать скорость гетерогенной реакции восстановления Q_6 , протекающей на границе раздела фаз.

В настоящей работе обнаружено два эффекта. Первый эффект — это возникновение потенциала, который, по-видимому, обусловлен переносом заряда в ходе окислительно-восстановительных реакций по разные стороны мембраны. Второй эффект — это уменьшение концентрации протонов в примембранном слое в результате протекающего на одной стороне мощного процесса окисления $НАД-Н$ кислородом с участием коэнзима Q_6 .

Обнаруженное в присутствии переносчика протонов возникновение потенциала на б.л.м. в условиях, когда окислительно-восстановительная реакция протекает только с одной стороны мембраны указывает на то, что предложенная Митчелом схема генерации потенциала, в которой переносчики дыхательной цепи расположены поперек мембраны, не является единственно возможным вариантом механизма заряжения мембраны дыхательной цепью.

Институт электрохимии
Академии наук СССР
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 IX 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. I. Boguslavsky, F. I. Bogolepova, A. V. Lebedev, Chem. Phys. Lipids, 6, 296 (1971). ² И. Гюндель, Л. И. Богуславский, ДАН, 203, 951 (1972). ³ P. Hinkle, Biophys. Res. Commun. 41, 1375 (1970). ⁴ А. В. Лебедев, Л. И. Богуславский, Биофизика, 16, 221 (1971). ⁵ P. Mitchell, J. Moyle, Nature, 208, 1205 (1965).