

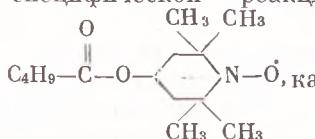
Р. М. ДАВЫДОВ, Н. М. КОЧЕРГИНСКИЙ, Р. Д. МАКОВСКИЙ,
Д. Н. ОСТРОВСКИЙ, Л. А. БЛЮМЕНФЕЛЬД

О ВЛИЯНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН НА КИНЕТИКУ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

(Представлено академиком А. И. Опарином 26 II 1974)

Рис. 1. Влияние мембран *M. lysodeikticus* на кинетику восстановления 2,2,6,6-тетраметил-1-оксисил-4-пиперидилового эфира валериановой кислоты *n*-фенилдиамином. Концентрация мембран 10 мг/мл по белку при pH 7,4 в 0,01 M фосфатном или трис-HCl-буфере, содержащем 0,001 M $MgCl_2$ при температуре 25°, концентрация *n*-фенилдиамина $2 \cdot 10^{-2}$ мол/л. 1 — без мембран, 2 — в присутствии мембран, 3 — восстановление радикала R^\bullet малатом Na в присутствии мембран, 4 — восстановление R^\bullet в присутствии малата Na и *n*-фенилдиамина, 5 — то же, что и 4, $+ 1 \cdot 10^{-5}$ M карбонилцианид-хлорфенилгидразон

или флюоресцентной метки). В работе ⁽¹⁾ было показано, что биомембранные могут оказывать существенное влияние на скорость ряда неферментативных реакций. На основании результатов, полученных в работе ⁽¹⁾, можно предположить, что величина эффекта (т. е. изменение кинетических параметров процесса) должна зависеть от структурного состояния мембранны. В настоящей работе мы проверили это предположение на примере неспецифической реакции между *n*-фенилендиамином и радикалом



$\text{C}_4\text{H}_9-\text{C}-\text{O}-$ N- $\overset{\text{+}}{\text{O}}$, катализируемой мембранами *M. lysodeikticus*. Изме-

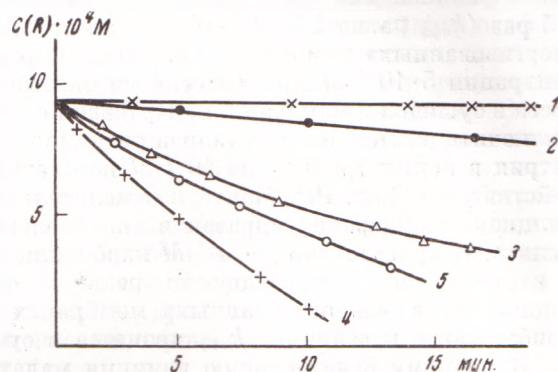


Рис. 1. Влияние мембран M. lysodeikticus на кинетику восстановления 2,2,6,6-тетраметил-1-оксил-4-пиперидилового эфира валериановой кислоты *n*-фенилендиамином. Концентрация мембран 10 мг/мл по белку при pH 7,4 в 0,01 M фосфатном или трис-HCl-буфере, содержащем 0,001 M MgCl₂ при температуре 25°. Концентрация *n*-фенилендиамина 2·10⁻² мол/л. 1 — без мембран, 2 — в присутствии мембран, 3 — восстановление радикала R[·] малатом Na в присутствии мембран, 4 — восстановление R[·] в присутствии малата Na и *n*-фенилендиамина, 5 — то же, что и 4, + 1·10⁻⁵ M карбоплицианид-хлорфенилгидразон

нение конформационного состояния нативных мембран, в которых дыхание сопряжено с фосфорилированием, осуществлялось добавками субстрата дыхания малата Na^+ .

Методика эксперимента изложена в работе (1). Экспериментальные данные по влиянию мембран в различных функциональных состояниях на кинетику окисления *n*-фенилендиамина радикалом приведены на рис. 1. Как следует из кинетической кривой 1, приведенной на этом рисунке, восстановление радикала *n*-фенилендиамина в водных растворах протекает с очень низкой эффективной константой скорости ($k_{\text{эфф}}$). Малат натрия не реагирует с радикалом и практически не влияет на скорость процесса. Суспензия мембран ускоряет окислительно-восстановительную реакцию почти в 30 раз ($k_{\text{эфф}} = 0,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) (рис. 1, 2). В присутствии малата натрия скорость восстановления радикала в водной суспензии мембран резко возрастает (рис. 1, 4).

Ранее нами было установлено, что радикал в суспензии мембран восстанавливается малатом Na^+ , причем восстановление радикала осуществляется на цитохром-с-цитохромоксидазном участке электронтранспортной цепи. С учетом поправки на гибель радикала за счет взаимодействия с малатом мы нашли, что в присутствии субстрата дыхания константа скорости реакции *n*-фенилендиамина с радикалом в суспензии мембран возрастает почти в 5 раз ($k_{\text{эфф}} \text{ равна } 2,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) по сравнению с величиной $k_{\text{эфф}}$ в «ненергизованных» мембранах. Окисленная форма *n*-фенилендиамина в концентрации $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ практически не оказывала влияния на скорость процесса в суспензии мембран в присутствии субстрата дыхания, что позволяет исключить возможность катализа реакции ее продуктами. АТФ и сукцинат натрия в концентрациях до 10^{-2} M не оказывали влияния на ускоряющее действие мембран. Разобщитель окислительного фосфорилирования карбонилцианид-хлорфенилгидразон в значительной степени снижает действие малата. В присутствии $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ карбонилцианид-хлорфенилгидразона эффективная константа скорости реакции окисления *n*-фенилендиамина радикалом в «нергизованных» мембранах снижается до $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, приближаясь к величине $k_{\text{эфф}}$ процесса в суспензии мембран без субстрата. К полному исчезновению влияния малата на ускоряющую эффективность мембран приводит предварительное медленное замораживание суспензии мембран при -2° . В последнем случае скорость гибели радикала в мембране в присутствии малата и *n*-фенилендиамина аддитивно складывается из скоростей восстановления радикала субстратом и *n*-фенилендиамином в отдельности.

Неаддитивное увеличение скорости реакции окисления *n*-фенилендиамина радикалом в суспензии мембран, обработанной субстратом, можно объяснить следующими причинами: 1) изменением структуры мембран в присутствии субстрата дыхания, 2) каталитическим влиянием *n*-фенилендиамина на восстановление радикала субстратом; 3) изменением pH в поверхностном слое мембран при добавлении малата натрия.

Для выяснения влияния *n*-фенилендиамина на скорость взаимодействия радикала с субстратом в мембранах была исследована кинетика восстановления изоиндолинового радикала (II) малатом натрия в суспензии мем-



бран в присутствии и без *n*-фенилендиамина. Было найдено, что в отсутствие субстрата этот радикал не восстанавливается *n*-фенилендиамином в суспензии мембран. Оказалось, что *n*-фенилендиамин в концентрации 10^{-2} M замедляет приблизительно на 10% скорость восстановления ради-

кала II субстратом. Таким образом, изменение ускоряющего влияния мембран на реакцию в присутствии субстрата нельзя объяснить катализитическим действием *n*-фенилендиамина на восстановление радикала малатом натрия. Трудно также объяснить наблюдаемый эффект лишь одним изменением pH в поверхностном слое мембран. Основываясь на результатах работы (1) по влиянию pH на скорость реакции в суспензии мембран, дополнительное 5-кратное ускорение процесса, вызванное субстратом, может быть объяснено лишь при условии, что локальное pH у поверхности мембран, находящихся в 0,01 M фосфатном буфере, уменьшится на 2,5—3 ед.

Можно также предположить, что влияние субстрата связано с изменением строения везикул мембран. Поскольку все опыты проводились в условиях низкого давления ($p=5 \cdot 10^{-3}$ мм рт. ст.), может создаться впечатление, что окисление субстрата, а следовательно, изменение структуры мембран и окислительное фосфорилирование отсутствуют. Было показано, что иминоксильные радикалы, в частности, могут принимать электроны от цитохромоксидазы, т. е. мембрана «дышит». Структурная перестройка мембран при окислении субстрата кислородом или другим акцептором (например, радикалом) должна сказаться на константе распределения реагентов между водной и мембранный фазами, что в конечном счете и приводит к изменению скорости реакции в суспензии мембран при добавлении субстрата. Необходимо отметить, что влияние субстрата на ускоряющую эффективность водной суспензии мембран практически полностью снимается карбонилцианид-хлорфенилгидразоном или медленным замораживанием мембран, которые разобщают окислительное фосфорилирование. Отсюда можно заключить, что по-видимому, структура и строение фосфорилирующих мембран отличаются от структуры мембран с разобщенным окислительным фосфорилированием или мембран, не обработанных субстратом. Поскольку структурная перестройка в мембранах, в частности, определяется конформационными изменениями белков дыхательной цепи и липопротеидных комплексов, и в связи с тем, что эффект наблюдается только в фосфорилирующих мембранах, можно предположить, что конформационные изменения в мембранах непосредственно принимают участие в трансформации энергии.

Отсутствие влияния сукцината обусловлено сильной инактивацией сукцинатдегидрогеназы в мембранах *M. lysodeikticus* (7). В отличие от митохондриальных мембран, на этих бактериальных мембранах не наблюдается дыхательного контроля (7). Этим, по-видимому, и можно объяснить отсутствие влияния АТФ на ускоряющую эффективность мембран.

В заключение отметим, что кинетика химической реакции оказалась чувствительным тестом на структурные перестройки и функциональное состояние мембранны. Кроме того, наблюдаемое действие мембран на протекание химических процессов может иметь регуляторное значение, оказывая влияние на скорости различных химических процессов ферментативного и неферментативного характера, протекающих в клетке.

Институт химической физики
Академии наук СССР

Поступило
23 II 1974

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. М. Давыдов, Н. М. Кочергинский и др., ДАН, т. 213, 466 (1973). ² C. R. Hackenbrock, J. Cell. Biol., v. 30, 269 (1966). ³ R. A. Harris, J. T. Penniston et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 59, 830 (1968). ⁴ B. Chance, C. P. Lee, FEBS Letters, v. 4, 181 (1969). ⁵ Б. Аннаев, В. К. Колтоговер, Л. М. Райхман, Биофизика, т. 17, 224 (1972). ⁶ A. Azzi, B. Chance et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 62, 612 (1969). ⁷ Н. С. Гельман, М. А. Лукоянова, Д. Н. Островский, Мембранные бактерий и дыхательная цепь, М., 1972. ⁸ E. Green, J. Ossai et al., Arch. Biochem. and Biophys., v. 125, 584 (1968). ⁹ Л. А. Блюменфельд, В. К. Колтоговер, Молекулярная биология, т. 6, 161 (1972).