

УДК 577.158.1

БИОХИМИЯ

А. П. АРЧАКОВ, А. В. КАРЯКИН, В. П. СКУЛАЧЕВ

**МЕЖМЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ
В ОТСУТСТВИЕ РАСТВОРИМЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 12 V 1974)

Ранее нами было показано, что НАД-Н-цитохром- b_5 -редуктазная система микросом при наличии растворенного окислительно-восстановительного переносчика — цитохрома с, может передавать электроны на внутреннюю мембрану митохондрий, т. е. служить шунтирующим механизмом, снабжающим электронами цитохромоксидазный комплекс (^{1, 2}).

В настоящей работе изучалась возможность межмембранного транспорта электронов в отсутствие добавленного переносчика.

Микросомную и митохондриальную фракции получали, как описано ранее (³). Кривые восстановления цитохрома b_5 и цитохрома $a+a_3$ регистрировали на спектрофотометре «Хитачи» 356 по $\Delta A_{408-424}$ и $\Delta A_{603-630}$ соответственно. Поглощение кислорода измеряли на полярографе LP-7 со стационарным платиновым электродом, закрытым тефлоновой пленкой.

Перенос электронов между мембранами эндоплазматического ретикулума удалось обнаружить в системе, состоящей из интактных микросомных

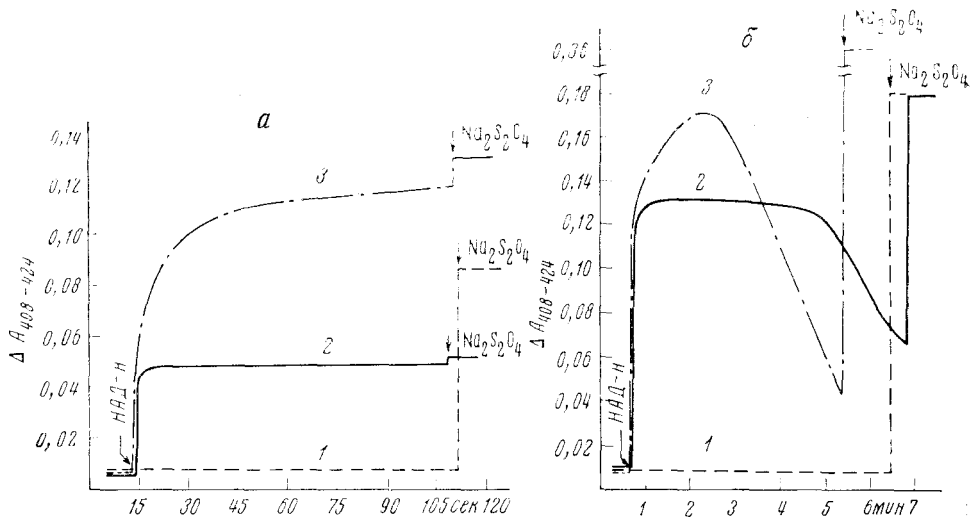


Рис. 1. Анаэробное (а) и аэробное (б) восстановление цитохрома b_5 в системе, содержащей интактные микросомы и микросомы, обработанные мерсалилом. а — инкубационная смесь объемом 3 мл содержала: 50 мМ трис-НСI-буфер, рН 7,4, 100 мкмол. глюкозы, 50 единиц активности глюкозооксидазы, 500 единиц активности каталазы, 3 мг белка микросом, обработанных мерсалилом из расчета 0,2 мкмоль на 1 мг микросомного белка при температуре 4° в течение 20 мин. (1); 1,5 мг белка интактных микросом (2); 1,5 мг белка интактных микросом и 3,0 мг белка микросом, обработанных мерсалилом (3). б — тот же объем инкубационной смеси с тем же буфером + 6 мг белка обработанных мерсалилом микросом (1), 6 мг белка интактных микросом и 6 мг белка микросом, обработанных мерсалилом (3). Реакцию начинали добавлением в инкубационную среду 30 мкМ НАД-Н

пузырьков и пузырьков, в которых НАД-Н-специфичные флавопротенды, восстанавливаемые цитохромом b_5 , были инактивированы предварительной обработкой сульфгидрильным ядом — мерсалилом. Как видно из рис. 1а (кривая 1), в анаэробных условиях добавление НАД-Н к обработанным мерсалилом микросомам не приводит к восстановлению цитохрома b_5 , ко-

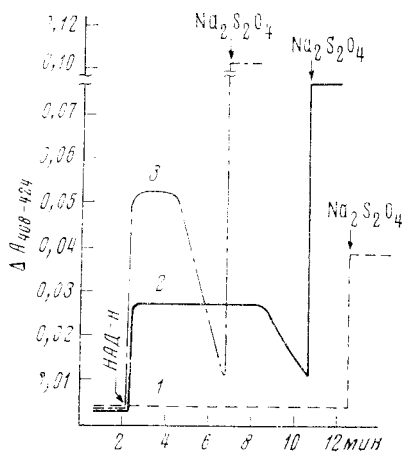


Рис. 2. Аэробное восстановление-окисление цитохрома b_5 в системе, содержащей митохондрии и микросомы, обработанные мерсалилом. Инкубационная смесь того же объема и с тем же буфером, что и на рис. 1, + ротенон $5 \cdot 10^{-6}$ M, 3 мг белка микросом, обработанных мерсалилом и 4 мг белка митохондрий (2), 3 мг белка микросом, обработанных мерсалилом и 4 мг белка митохондрий (3). Реакцию начали добавлением в инкубационную среду 30 мкM НАД-Н

торый в данном случае можно восстановить лишь с помощью дитионита. Цитохром b_5 intactных пузырьков этим же количеством НАД-Н восстанавливается полностью (кривая 2). Если инкубационная среда содержала смесь intactных и обработанных мерсалилом микросом, НАД-Н восстанавливает цитохром b_5 , принадлежащий как мерсализированным, так и немер-

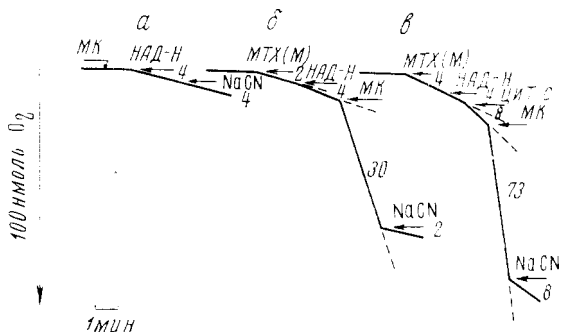


Рис. 3. Скорость потребления кислорода в системе, содержащей микросомы и обработанные мерсалилом митохондрии. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала: 50 mM трис-HCl-буфер, pH 7,4, 1 мг микросомного (МК) белка (а); 8 мг белка обработанных мерсалилом митохондрий (МТХ(М)) и 1 мг микросомного белка (б); 1 мг митохондриального белка, обработанного мерсалилом и 0,05 мг микросомного белка (в). Добавки: 1 mM НАД-Н, 1 mM NaCN, 10 мкM цитохром с (Цит с). Цифры над кривыми обозначают скорость поглощения кислорода (нмол·мг⁻¹·мин⁻¹)

сализированным пузырькам (кривая 3). Различаются лишь скорости восстановления этих двух подфракций цитохрома b_5 . Гемопротенд intactных пузырьков восстанавливается гораздо быстрее, чем мерсализированных. Подобную картину можно наблюдать и в аэробных условиях (рис. 1б). Восстановление смеси мерсализированных и intactных микросом приводит к увеличению уровня восстановленности и сокращению времени полуокисления цитохрома b_5 (рис. 1б, 3) по сравнению с контролем (кривая 2), содержащим intactные микросомы.

Объяснить полученные результаты можно следующим образом. Находящийся на поверхности микросомного пузырька цитохром b_5 (⁴, ⁵) в интактных микросомах восстанавливается флавопротеидом. При соударении такого пузырька с другим, обработанным мерсалилом и потому несущим окисленный цитохром b_5 , происходит межмембранная передача электрона путем цитохром b_5 — цитохром b_5 взаимодействия. Локализация НАД-Н-зависимого флавопротеида на внутренней стороне микросомного пузырька (⁴) делает маловероятной возможность его участия в данном процессе.

Использование подобной модельной системы позволяет наблюдать межмембранный транспорт электронов из внешней мембраны митохондрий на цитохром b_5 микросом (рис. 2). Если инкубационная среда содержит митохондрии и обработанные мерсалилом микросомы, то в присутствии ротеона, ингибитора внутренней дыхательной цепи митохондрий, добавление НАД-Н приводит к восстановлению цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий и микросом (рис. 2, 3). Транспорт электронов из НАД-Н-зависимой дыхательной цепи эндоплазматического ретикулула в мембранную систему митохондрий иллюстрирует рис. 3. Добавление микросом к митохондриям, обработанным мерсалилом, приводит к появлению заметной скорости поглощения кислорода при использовании в качестве субстрата НАД-Н (кривая 2) по пути, чувствительному к цианиду. Транспорт электронов в этом случае, по-видимому, идет путем межмембранного переноса восстанавливающих эквивалентов из НАД-Н-зависимой дыхательной цепи микросом на цитохром b_5 внешней мембраны митохондрий, а затем на цитохром c и цитохромоксидазу внутренней митохондриальной мембраны. Следует, однако, отметить, что скорость поглощения кислорода в этом слу-

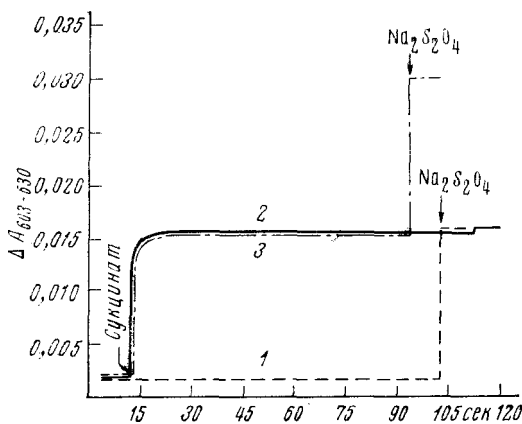


Рис. 4. Восстановление цитохромоксидазы в системе, содержащей интактные и обработанные мерсалилом субмитохондриальные частицы. Инкубационная смесь того же объема и с тем же буфером, что и на рис. 1, +NaCN 2 мМ, 6 мг белка субмитохондриальных частиц сердца быка, обработанных мерсалилом (1), 6 мг белка интактных частиц (2), 6 мг белка интактных частиц, обработанных мерсалилом, и 6 мг белка интактных частиц (3). Реакцию начинали добавлением 10 мМ сукцината

чае значительно ниже, чем в инкубационной смеси, дополненной цитохромом c (кривая 3).

Таким образом, взаимодействие субклеточных структур, содержащих на своей поверхности цитохром b_5 , может привести к межмембранной передаче электрона.

С целью выяснения вопроса, специфична ли эта реакция для цитохрома b_5 или она может иметь место и в случае других компонентов редокс-цепей, изучалась возможность переноса восстанавливающих эквивалентов

при взаимодействии субмитохондриальных частиц между собой. Обработанные мерсалилом субмитохондриальные частицы теряют способность восстанавливать цитохромоксидазу сукцинатом (ср. кривые 1 и 2 рис. 4). Добавление интактных субмитохондриальных частиц к частицам, отравленным мерсалилом, оказывается неэффективным; цитохромоксидаза последних по-прежнему остается окисленной. Следовательно, восстанавливающие эквиваленты не могут быть переданы от одних субмитохондриальных частиц к другим.

Полученные данные указывают на то, что функция межмембранного переноса электронов специфична для цитохрома b_5 .

Второй Московский государственный
медицинский институт
им. Н. И. Пирогова

Поступило
29 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. И. Арчаков, А. В. Карякин, В. П. Скулачев, ДАН, т. 209, 221 (1973). ² А. I. Archakov, A. V. Karjakin, V. P. Skulachev, FEBS Letters, v. 39, 239 (1974). ³ А. I. Archakov, L. P. Panchenko et al., Anal. Biochem., v. 54, 223 (1973). ⁴ А. И. Арчаков, Л. Ф. Панченко и др., ДАН, т. 196, 223 (1971). ⁵ Ph. Strittmatter, M. I. Pogers, L. Spatz, J. Biol. Chem., v. 247, 7188 (1972).