

Ю. А. ШАХОВ, С. Э. МАНСУРОВА, И. С. КУЛАЕВ

ОБНАРУЖЕНИЕ СИНТЕЗА НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПИРОФОСФАТА НА УРОВНЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦАХ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА БЫКА

(Представлено академиком А. И. Опариным 23 VIII 1974)

Сопряженный с дыханием синтез неорганического пирофосфата (PP_n) был недавно нами обнаружен в митохондриях печени крысы и сердца быка (¹⁻³). Настоящая работа является продолжением исследований в этом направлении.

Поскольку в митохондриях, кроме процесса окислительного фосфорилирования, протекает множество других биохимических реакций (синтез белка, нуклеиновых кислот, коферментов, биосинтез липидов и т. д.), где PP_n образуется как побочный продукт, в данной работе был изучен синтез этого соединения во фрагментах внутренней мембраны. Эта субмитохондриальная структура осуществляет только процессы, связанные с окислительным фосфорилированием, и лишена ферментативных систем внешней мембраны и митохондриального матрикса.

Митохондрии из сердца быка выделяли по методу Крейна (⁴). Фосфорилирующие (АТФ-синтезирующие) субмитохондриальные частицы (с.м.ч.— Mg^{2+}), получаемые из фракции «тяжелых» митохондрий по методу Хансена и Смита (⁵), как правило, не были способны синтезировать PP_n . Для получения PP_n -синтезирующих частиц необходимо было сократить время и мощность озвучивания. Поэтому в дальнейшем митохондрии разрушали на транзисторном децинтеграторе MST-150 2 раза по 30 сек. с перерывом в 1 мин. при амплитуде колебания стержня 5–6 мкм в максимальном резонансе. 40 мл суспензии митохондрий (белок 40–50 мг/мл) озвучивали в стеклянном стакане при температуре охлаждающей рубашки — 5° в среде следующего состава: 0,25 М сахараза; 0,01 М трис-НСI-буфер (рН 7,5); 0,001 М сукцинат; 0,01 М $MgCl_2$. Активность обратного переноса электронов, получаемых с.м.ч., составляла 40–60 нмол. НАД-Н в 1 мин. на 1 мг белка. Синтез АТФ и PP_n изучали при инкубации частиц в среде: 0,25 М сахараза, 0,005 М трис-НСI-буфер (рН 7,5); 0,037 М сукцинат; 0,0008 М ЭДТА, 0,0025 М KH_2PO_4 ; 0,03 М $MgCl_2$. В некоторых экспериментах добавляли 0,003 М АМФ или АДФ, 0,002 М НАД-Н. Объем среды инкубации 2 мл, белок 5–10 мг/мл. Реакцию останавливали хлорной кислотой. АТФ определяли с геоксипиназой (0,1 мг на 1 мл среды) и глюкозой (0,04 М) (⁶), PP_n — по методу Гринди и Николая (⁷) в кислотном экстракте.

Активности АТФазы и РРазы определяли по освобождению ортофосфата при инкубации частиц в среде следующего состава: 0,25 М сахараза; 0,01 М трис-НСI-буфер (рН 7,5); 0,001 М АТФ или $Na_2P_2O_7$; 0,004 М $MgCl_2$; белок 2–5 мг/мл, при 30°. Реакцию останавливали хлорной кислотой. Фосфор определяли по методу Беренблума и Чейна (⁸).

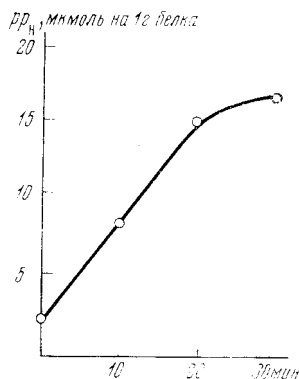


Рис. 1. Синтез неорганического пирофосфата субмитохондриальными частицами

Отмывание РРазы из с.м.ч. проводили на холоду (+3°) при интенсивном перемешивании в среде: 0,25 *M* сахара; 0,01 *M* трис-НСI-буфер (рН 7,5) и иногда 0,03 *M* MgCl₂ с последующим переосаждением.

Как видно из рис. 1, субмитохондриальные частицы способны синтезировать РР_n. Для того чтобы показать зависимость синтеза РР_n от функционирования электронтранспортной цепи, мы изучали влияние ингибиторов электронного транспорта и разобщителя на биосинтез РР_n. В наших экспериментах ротенон в концентрации 2 мкг на 1 мг белка (субстрат 0,002 *M* НАД-Н), 1·10⁻³ *M* цианид и 4·10⁻⁴ *M* 2,4-динитрофенол полностью ингибировали исследуемый процесс. Таким образом, как в митохондриях (1-3), так и в с.м.ч. полученных из них, РР_n может образовываться

Т а б л и ц а 1

Влияние озвучивания на активность РРазы
в субмитохондриальных частицах и их способность
синтезировать РР_n

Время озвучивания, мин.	Активность АТФазы, м.е.	Активность РРазы, м.е.	Скорость синтеза РР _n , мкмол. на 1 г белка в 1 мин.
1	98	4,25	0,53
1,5	95	1,16	0,43
2	92	0,56	0,0

Т а б л и ц а 2

Зависимость синтеза РР_n субмитохондриальными частицами
от присутствия в них РРазы

	Контроль	Сахароза+ +MgCl ₂	Сахароза
Активность АТФазы, м.е.	92	98	116
Синтез АТФ, мкмол. на 1 мг белка за 10 мин.	45	36	42
Активность РРазы, м.е.	10	2,8	3,5
Синтез РР _n , мкмол. на 1 г белка за 10 мин.	8,0	0,0	0,0

Пр и м е ч а н и е. Отмывание проводили в 0,25*M* сахарозе в присутствии и в отсутствие магния.

как продукт фосфорилирования на уровне дыхательной цепи. Однако, если в митохондриях синтез РР_n идет параллельно образованию АТФ и возрастает при ингибировании последнего, то в частицах на фоне синтеза АТФ накопления РР_n не наблюдается. Только при полном отсутствии фосфорилирования на основе адепиловой системы (добавление олигомицина 2 мкг/мг или инкубация частиц в среде без АМФ или АДФ) наблюдается синтез РР_n. По-видимому, это объясняется более сильным нарушением системы синтеза РР_n в процессе озвучивания митохондрий, по сравнению с АТФ.

Было замечено, что РРазы связана с мембраной значительно слабее, чем АТФаза. При разрушении митохондрий ультразвуком примерно 5-7% от общей активности РРазы остается связанной с частицами, а остальная переходит в надосадочную жидкость. Величина удельной активности РРазы в с.м.ч. сильно зависит от времени озвучивания. Так, при удлинении времени обработки митохондрий ультразвуком с 1 до 2 мин. РРазная активность с.м.ч. уменьшалась в 5-7 раз, а активность АТФазы

практически не менялась (табл. 1). При этом паблюдалась корреляция между способностью с.м.ч. к синтезу РР_n и содержанием в них РРазы. Как видно из табл. 1, максимальная скорость синтеза РР_n обнаруживалась в частицах с максимальной РРазной активностью. Ингибирование этого фермента $1 \cdot 10^{-2}$ М фторидом также приводило к полному исчезновению биосинтеза РР_n в с.м.ч. Эти данные говорят о возможном участии РРазы митохондрий в сопряженном с дыханием синтезе РР_n.

Далее мы попытались отмыть частицы от РРазы и проследить при этом за интенсивностью образования РР_n. Активное перемешивание частиц в растворе 0,25 М сахарозы в течение 10–15 мин. приводило к резкому снижению в них активности РРазы и незначительному изменению активности АТФазы. При этом способность с.м.ч. к синтезу АТФ практически не менялась, а биосинтез РР_n прекращался полностью (табл. 2).

На основании всех полученных данных можно заключить, что синтез РР_n в с.м.ч. зависит от функционирования электронтранспортной цепи, а фактором сопряжения дыхания и синтеза РР_n, по-видимому, является неорганическая РРазы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
12 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Э. Мансурова, Ю. А. Шахов, И. С. Кулаев, ДАН, т. 213, № 5, 1207 (1973).
² S. E. Mansurova, Yu. A. Shakhov et al., FEBS Letters, in press. ³ С. Э. Мансурова, Сб.: Проблемы регуляции обмена веществ у микроорганизмов, Пущино-на-Оке, 1973, стр. 231. ⁴ F. L. Crane, C. L. Clenn, D. E. Green, Biochem. and biophys. acta, v. 22, 214 (1964). ⁵ M. Hansen, A. Smith, Biochem. and biophys. acta, v. 81, 214 (1964). ⁶ Methods in Enzymology, Ed. by S. P. Colowick and Kaplan, v. 2, London, 1955, p. 541. ⁷ G. B. Grindley, C. A. Nichol, Anal. Biochem., v. 33, 114 (1970). ⁸ J. Berenbleem, E. Chain, Biochem. J., v. 32, 295 (1938).