

А. В. ПАНОВ, Ю. М. КОНСТАНТИНОВ, В. В. ЛЯХОВИЧ,
действительный член АМН СССР В. П. КАЗНАЧЕЕВ

ИНГИБИРОВАНИЕ АДЕНИННУКЛЕОТИДТРАНСЛОКАЗЫ ПАЛЬМИТОИЛ-КоА

Адениннуклеотидтранслоказа играет важную роль в общем механизме сопряженного с дыханием синтеза АТФ в митохондриях (¹, ²). Показано, что пальмитоил-КоА является конкурентным ингибитором переноса АДФ и АТФ через внутреннюю мембрану митохондрий (³). У высоко сопряженных митохондрий адениннуклеотидтранслоказа проявляет более высокое сродство к АДФ, чем к АТФ, которое устраняется разобщением окислительного фосфорилирования (⁴). В связи с этим представляет интерес выяснить вопрос о том, зависит ли ингибирующее действие пальмитоил-КоА на адениннуклеотидтранслоказу от энергетического состояния митохондрий.

Митохондрии печени крыс выделялись по методу Вайнбах (⁴). Дыхание митохондрий определялось полярографически по стационарным платиновым электродам полузакрытого типа. АТФазная активность определялась потенциометрически, как описано Митчелл (⁵).

На рис. 1 показано изменение величины K_M для АДФ, при изучении АДФ-стимулированного дыхания, в зависимости от величины дыхательного контроля. Величина K_M рассчитывалась с учетом только олигомицин-чувствительного дыхания. Скорость нефосфорилирующего дыхания митохондрий определялась в параллельных опытах для каждой концентрации АДФ в присутствии олигомицина. Можно видеть, что снижение величины дыхательного контроля с 4,5 до 1,6, вызванное старением митохондрий при 0°, сопровождается увеличением K_M для АДФ с 13,5 мкМ до 80 мкМ. Принято считать, что величина дыхательного контроля отражает степень сопряжения дыхания и фосфорилирования и, согласно хемосмотической гипотезе сопряжения, определяется состоянием внутренней мембраны митохондрий, исходно непроницаемой для ионов H^+ и OH^- . Снижение дыхательного контроля сопровождается увеличением протонной проводимости и изменением $t_{1/2}$ со 100 сек. до 50 сек. (⁶). Из этих данных следует, что величина мембранного потенциала контролирует эффективность работы адениннуклеотидтранслоказы в отношении переноса АДФ.

Сравнение величин K_M для АДФ, найденных для митохондрий с различными величинами дыхательного контроля, с величиной K_M для АТФ, определяемой по скорости гидролиза АТФ в присутствии хлоркарбонилцианид-фенилгидраза (ХКФ), показывает, что по мере старения митохондрий

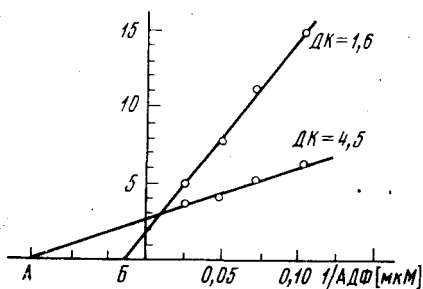


Рис. 1. Зависимость K_M для АДФ от величины дыхательного контроля. Среда: KCl 100 мМ, трис-НСl 20 мМ, рН 7,4, KH_2PO_4 5 мМ, $MgCl_2$ 0,5 мМ, сукцинат 5 мМ, глюкоза 50 мМ, гексокиназа 0,4 мг, ротенон 3 мкМ, митохондрии 1 мг, объем 1 мл. Здесь и на рис. 2 ДК — дыхательный контроль. По оси ординат:

10^{-9} г-ат. О/мин. на 1 мг белка

А — $K_M=13,5$ мкМ, Б — $K_M=80$ мкМ

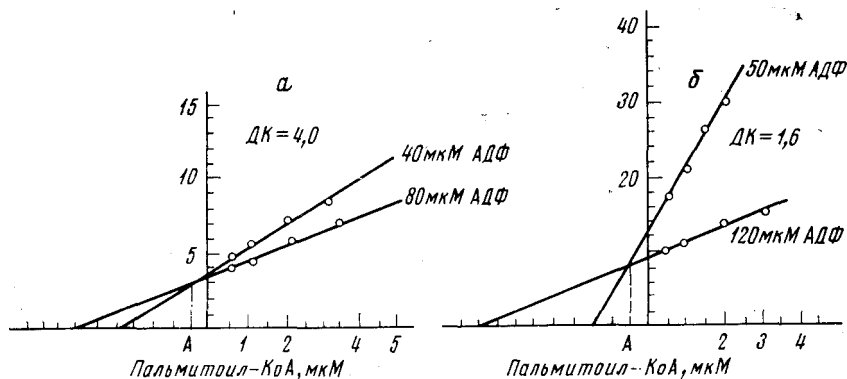


Рис. 2. Определение K_i для ингибирования пальмитоил-КоА АДФ-стимулированного дыхания в зависимости от величины дыхательного контроля. Условия инкубации, как на рис. 1. а — дыхательный контроль=4,5, б — ды-

хательный контроль=1,6. По оси ординат: 10^{-9} г-ат. О/мин. на 1 мг белка

$$A - K_i = 0,5 \text{ мкМ}$$

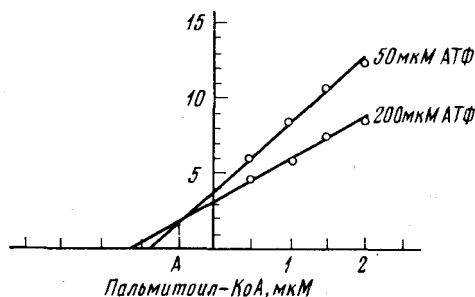
величина K_m для АДФ приближается к величине K_m для АТФ, равной 100 мкМ. Тем не менее, во всех случаях нами было найдено, что сохраняются конкурентные взаимоотношения между пальмитоил-КоА и аденин-нуклеотидами. Конкурентное ингибирование АТФазной активности пальмитоил-КоА связано с торможением переноса АТФ через внутреннюю мембрану митохондрий, а не с ингибированием собственно АТФазы, поскольку пальмитоил-КоА не ингибировал АТФазную активность субмитохондриальных частиц, которая выше, чем АТФазная активность митохондрий в присутствии разобщителя.

На рис. 2 и 3 представлены величины K_i для ингибирования пальмитоил-КоА дыхания, стимулированного АДФ, свежесыведенных митохондрий (K_m для АДФ=13,5 мкМ; рис. 2а), старевших митохондрий (K_m для АДФ=80 мкМ; рис. 2б) и стимулированной разобщителем АТФазной активности митохондрий (K_m для АТФ=100 мкМ, рис. 3). Можно видеть, что во всех случаях величины K_i для ингибирования пальмитоил-КоА соответствующих реакций имеют величины одного порядка. Исходя из данных о том, что в сопряженных митохондриях обмен АДФ намного активнее, чем обмен АТФ (¹, ²), а при разобщении специфичности обмена АДФ и АТФ становятся равными (²), Клингенберг с соавторами делает вывод о том, что обмен АТФ, в сравнении с обменом АДФ, в нормальных сопряженных митохондриях ингибируется энерготрансформирующей системой окислительного фосфорилирования (⁷). Такого рода контролирующим механизмом в энергизованных митохондриях может быть торможение электрическим потенциалом движения АТФ⁴⁻ против АДФ³⁻ через внутреннюю мембрану

Рис. 3. Определение K_i для ингибирования пальмитоил-КоА АТФазы митохондрий. Среда: КСI 125 мМ, глицил — глицин 3,3 мМ, рН 7,1, антимицин 1 мг на 1 мг белка, ротенон 4 мкМ, ХКФ $1 \cdot 10^{-6}$ М, митохондрии 5 мг, объем 6 мл. По оси ординат: 10^2

10^{-9} г-ат. О/мин. на 1 мг белка

$$A - K_i = 0,5 \text{ мкМ}$$



митохондрий. Термодинамические и кинетические особенности электрогенного транспорта адениннуклеотидов рассматриваются в работе (7).

Поскольку представленные в настоящей работе данные показывают, что величины K_i для ингибирования пальмитоил-КоА реакцией синтеза, или гидролиза АТФ не зависят от степени энергизации митохондрий, то можно предположить, что ингибирующее влияние пальмитоил-КоА на транспорт адениннуклеотидов обусловлено его влиянием только (или главным образом) на процесс связывания АТФ и АДФ с переносчиком. В этом случае взаимоотношения между экзогенными адениннуклеотидами, пальмитоил-КоА и точкой связывания переносчика будут, вероятно, определяться только их концентрациями в свободном состоянии.

Низкие величины K_i для ингибирования пальмитоил-КоА АДФ-стимулированного дыхания и АТФазной активности митохондрий, и независимость величины K_i от энергизации митохондрий позволяют предполагать, что пальмитоил-КоА и, возможно, другие ацилпроизводные КоА могут играть важную роль в регуляции обмена клеточных адениннуклеотидов при различных метаболических состояниях.

Институт клинической и экспериментальной медицины
Сибирского отделения Академии медицинских наук СССР
Новосибирск

Поступило
12 VII 1974

Новосибирский государственный медицинский институт

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Klingenberg, E. Pfaff, In: T. W. Goodwin, The Metabolic Roles of Citrate, N. Y.—London, 1968, p. 105. ² M. Klingenberg, E. Pfaff, In: J. M. Tager et al., Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, v. 7, Elsevier, Amsterdam, 1966, p. 180. ³ S. V. Pande, M. C. Blanchaer, J. Biol. Chem., v. 246, 402 (1971). ⁴ E. C. Weinbach, Anal. Biochem., v. 2, 335 (1964). ⁵ P. Mitchell, J. Moyle, Biochem. J., v. 104, 588 (1967). ⁶ А. В. Долгов, В. В. Ляхович, А. В. Панов, Сб.: Биофизика мембран, Каунас, 1973, стр. 234. ⁷ M. Klingenberg, H. W. Heldt, E. Pfaff, In: The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, Bari, 1969, p. 237.