



УДК 577.23

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ РЕДОКС-ЭКВИВАЛЕНТОВ,
ПЕРЕНОСИМЫХ ЦИТОХРОМОМ c_1 , И ЛОКАЛИЗАЦИЯ
ЭТОГО КОМПОНЕНТА ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ
НА ВНЕШНЕЙ СТОРОНЕ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ

Киселев А. В., Константинов А. А.

*Отдел биоэнергетики Межфакультетской лаборатории биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Подвергнуто экспериментальной проверке предположение об участии цитохрома c_1 в генерации $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ дыхательной цепью митохондрий в качестве переносчика атомов водорода через сопрягающую мембрану в пункте сопряжения 3. Показано, что стандартный окислительно-восстановительный потенциал цитохрома c_1 в митохондриях, субмитохондриальных частицах и растворимой сукцинат-цитохром- c -оксидоредуктазе равен 245 ± 10 мВ и не зависит от рН среды в интервале 6,0—7,5. Исследование сукцинатферрицианидредуктазной активности митохондрий, дефицитных по цитохрому c , указывает на локализацию цитохрома c_1 на внешней поверхности митохондриальной мембраны. Таким образом, цитохром c_1 является переносчиком электронов, расположенным в митохондриях снаружи, и не может осуществлять трансмембранный перенос H-атомов в пункте сопряжения 3 дыхательной цепи.

Значительный прогресс в исследовании механизма окислительного фосфорилирования, достигнутый в последние годы, в первую очередь обусловлен экспериментальным подтверждением предположения Митчела о сопряжении дыхания и синтеза АТФ через трансмембранную разность электрохимических потенциалов ионов водорода [1]. В настоящий момент кроме первоначальной схемы Митчела предложен ряд альтернативных вариантов устройства цепи переноса электронов как генератора $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ на мембране митохондрий [2—4].

Экспериментальным подходом, позволяющим установить, какая из предложенных схем верна, является исследование природы редокс-эквивалентов, переносимых различными компонентами дыхательной цепи (электрон, атом водорода), и определение локализации этих компонентов в сопрягающей мембране по отношению к внешней и внутренней обводненным фазам митохондрий. Концепция организации электронтранспортной цепи по типу «митчеловских петель» испытывает серьезные затруднения в связи с отсутствием данных, позволяющих идентифицировать гипотетический дыхательный переносчик, катализирующий перенос электронейтрального атома водорода в пункте сопряжения 3 от внутренней поверхности мембраны митохондрий к цитохрому c , расположенному снаружи. Так, было установлено [5, 6], что коэнзим Q, которому Митчел отводил

Сокращения: X — n -бензохинон, ГХ — n -бензгидрохинон; СМЧ — субмитохондриальные частицы.

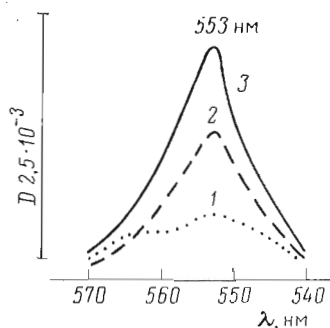


Рис. 1. Влияние рН среды на степень восстановленности цитохрома c_1 митохондрий, уравновешенных с эквимольной смесью бензохинона и бензогидрохинона, рН: 1 — 6,0; 2 — 7,1; 3 — 7,6

ного окислительно-восстановительного фермента в интервале рН, в котором он функционирует как переносчик водорода, выполняется зависимость $\Delta E_0'/\Delta \text{pH} \approx -60 \text{ мВ}$ [7], где E_0' — стандартный редоксипотенциал фермента при данном рН. Напротив, отсутствие зависимости E_0' фермента от рН будет указывать на то, что редокс-превращения этого дыхательного переносчика не сопряжены с обратимым присоединением протона и, следовательно, данный компонент дыхательной цепи не может осуществлять перенос атома водорода.

Ранее [8] сообщалось об отсутствии зависимости E_0' выделенного цитохрома c_1 от рН. Известно, однако, что ряд связанных с мембраной окислительно-восстановительных ферментов в ходе выделения утрачивает способность к переносу атомов водорода [7, 9], превращаясь в переносчики электронов. Это соображение, а также сугубо предвзятый характер имеющихся в литературе данных побудили нас изучить электрохимические свойства цитохрома c_1 , входящего в состав мембраны фосфорилирующих субмитохондриальных частиц. Для сравнения мы также исследовали свойства цитохрома c_1 в митохондриях сердца быка, солиubilизированных Триптоном X-100, и в растворимом препарате сукцинат-цитохром-с-оксидоредуктазы.

На рис. 1 представлены данные, качественно иллюстрирующие отсутствие зависимости E_0' цитохрома c_1 от рН среды. Растворенные в Триптоне X-100 митохондрии сердца быка, дефицитные по цитохрому c_1 , уравновешивались с эквимольной смесью *n*-бензохинона и *n*-бензогидрохинона при различных рН среды. При постоянном соотношении X/ГХ редоксипотенциал этого окислительно-восстановительного буфера в исследуемом интервале рН понижается на 59 мВ при увеличении рН на 1. Если бы цитохром c_1 обладал свойствами переносчика водорода, т. е. имел бы ту же зависимость $\Delta E_0'/\Delta \text{pH} \approx -60 \text{ мВ}$, что и пара X/ГХ, можно было бы ожидать, что степень его восстановленности при постоянном соотношении концентраций X и ГХ не будет зависеть от рН. Спектры, представленные на рис. 1, показывают, напротив, что восстановленность этого дыхательного переносчика с увеличением рН значительно возрастает и, следовательно, для цитохрома c_1 $\Delta E_0'/\Delta \text{pH} \ll -60 \text{ мВ}$.

Результаты экспериментов по определению E_0' цитохрома c_1 , связанного с интактной сопрягающей мембраной фосфорилирующих СМЧ (рис. 2), показывают, что ступенчатое окисление-восстановление этого дыхательного фермента при изменении соотношения концентраций X и

роль такого переносчика водорода, функционально локализован в другом участке дыхательной цепи — по субстратную сторону пункта сопряжения 2. Одним из кандидатов на роль трансмембранного переносчика атома водорода в пункте сопряжения 3 мог быть цитохром c_1 . Экспериментальной проверке этой возможности посвящено настоящее сообщение.

Способность фермента катализировать перенос электронейтрального восстановительного эквивалента — атома водорода, — как правило, бывает обусловлена значительным увеличением $\text{p}K_a$ какой-либо из протолитических групп фермента при его восстановлении, так что $\text{p}K_{a \text{ окисл}} \leq \text{pH} - 1$, а $\text{p}K_a \text{ восп} \geq \text{pH} + 1$. Это значит, что, получая электрон, фермент одновременно будет присоединять протон (например, из среды), а его окисление будет сопровождаться освобождением протона. Как известно, для подоб-

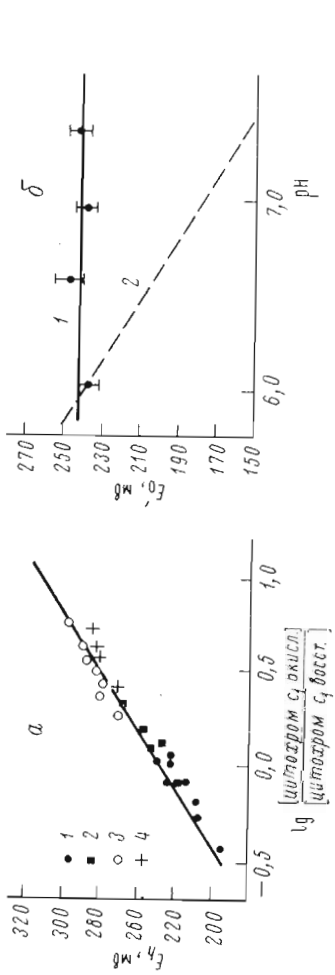


Рис. 2. Окислительно-восстановительные титрования цитохрома с₁ СМЧ при различных рН среды. а — через экспериментальные точки проведена теоретическая прямая для одноэлектронного переносчика ($n = 1$) с $E_0' = 245$ мВ; рН: 1 — 6,1; 2 — 6,6; 3 — 7,0; 4 — 7,4; б — теоретическая зависимость E_0' от рН для переносчика: 1 — электронов; 2 — водорода; потенциалы полуостановления цитохрома с₁ рассчитаны на основании данных, приведенных на рис. 2, а

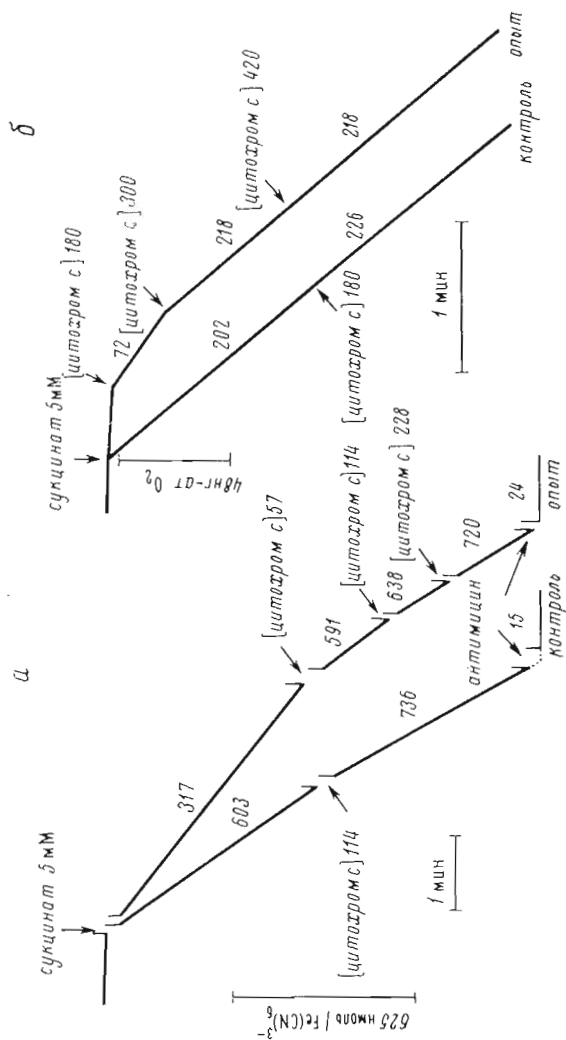


Рис. 3. Различия в чувствительности сукцината феррицианид-редуктазной (а) и сукцинатаксидазной (б) активностей митохондриаль к отмытому эндогенного цитохрома с. Среды инкубации: 50 мМ сахарозы, 75 мМ КСl, 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,5), 1 мМ ротенон и 2 мМ разбавителя (*m*-хлоркарбониланилидфенилгидразон); в опыте а инкубационную среду дополняли 4,5 мМ КСN, 2,3 мМ $K_3Fe(CN)_6$ и, где указано, антимицином (2 мкг/мл). Добавления прочих реагентов указаны на рисунке. Ключевая концентрация вводимого в инкубационную среду цитохрома с выражена в мкг/мл. Цифры около соответствующих участков кинетических записей означают скорости восстановления феррицианида (а) в ммоль/мин и кислорода (б) в $\mu\text{г}/\text{мин}$ в пересчете на 1 ммоль цитохромоксидазы митохондрий. Опыт — митохондрии печени крысы, отмытые от эндогенного цитохрома с. Контроль — исходные митохондрии

ГХ происходит в хорошем соответствии с уравнением Нернста для однопериодного переносчика, стандартный потенциал которого, E_0' , равен 245 ± 10 мВ (рис. 2, а) и не зависит от рН в исследованном интервале концентраций ионов водорода (рис. 2, б). Аналогичные результаты были получены в опытах с митохондриями, солиобилизованными в Тритоне Х-100 ($E_0' = 237$ мВ, $n = 1$, $\Delta E_0'/\Delta \text{pH} \approx 0$), и растворимой сукцинатцитохром-с-редуктазой ($E_0' = 245$ мВ, $n = 1$, $\Delta E_0'/\Delta \text{pH} \approx 0$). Измеренные на различных препаратах значения потенциала полувосстановления цитохрома c_1 близки между собой и хорошо согласуются с данными [7, 8, 10].

Некоторые дополнительные сведения об организации дыхательной цепи в области пункта сопряжения 3 были получены при исследовании доступности ее компонентов, функционирующих между точкой действия антимицина и цитохромом c_1 , для непроницающего акцептора электронов феррицианида. Ранее в нашей лаборатории было показано [6], что ферро- и феррицианид легко взаимодействуют с дыхательной цепью митохондрий в области цитохрома c , который, таким образом, был локализован на внешней стороне мембраны. В то же время ни один из дыхательных переносчиков, находящихся по кислородную сторону антимицинового блока, не был доступен для ферроцианида в «вывернутых» субмитохондриальных частицах.

Нами было исследовано взаимодействие феррицианида с дыхательной цепью митохондрий, дефицитных по цитохрому c . Митохондрии, выделенные из печени крысы и обработанные гипотоническим раствором КСl с последующей промывкой [17], в условиях наших опытов теряли более 95% эндогенного цитохрома c . Как показывает полярографическая запись (рис. 3, б), сукцинатоксидазная активность дефицитных по цитохрому c митохондрий в 30 раз возрастала при добавлении экзогенного цитохрома c , достигая скорости дыхания контрольного препарата. В то же время чувствительная к антимицину сукцинатферрицианидредуктазная активность этих же митохондрий оставалась на высоком уровне (рис. 3, а), снижаясь по сравнению с контролем менее чем в 2 раза. Сходные данные были получены ранее Эстабруком [11]. Мы также обнаружили, что сукцинатферрицианидредуктазная активность митохондрий, как интактных, так и дефицитных по цитохрому c , полностью нечувствительна к щелочному белку протамину, который с высокой эффективностью ингибирует взаимодействие цитохрома c с оксидазным [12] и редуктазным [13] участками дыхательной цепи митохондрий. Можно сделать вывод, что по меньшей мере один из компонентов дыхательной цепи на участке между точкой действия антимицина и цитохромом c доступен феррицианиду в митохондриях (и не доступен ферроцианиду в СМЧ [6]) и, следовательно, расположен на внешней поверхности мембраны митохондрий. На сегодняшний день известны лишь два дыхательных переносчика, функционирующих в этом звене электронтранспортной цепи: железосульфопротенд Риске и цитохром c_1 .

Сопоставляя наши результаты с данными Рэкера [14] о влиянии антител к цитохрому c_1 на перенос электронов в митохондриях и «вывернутых» СМЧ, можно предположить, что именно этот редокс-фермент и отвечает за взаимодействие дыхательной цепи с феррицианидом на внешней стороне мембраны митохондрий, дефицитных по цитохрому c .

Вопрос о природе переносчика водорода в третьей митчеловской петле по-прежнему остается открытым и приобретает особую остроту в силу того, что на эту роль может теперь претендовать лишь единственный оставшийся по кислородную сторону пункта сопряжения 2 редокс-фермент — железосульфопротенд Риске.

Недавно было показано [7], что негеминный железопротенд, входящий в состав электронтранспортной цепи *Rhodospseudomonas spheroides* и аналогичный по спектру ЭПР, стандартному редоксипотенциалу и функциональной локализации железосульфопротенду Риске, характеризуется

отсутствием зависимости E_0' от рН, т. е. является переносчиком электронов. Если это наблюдение будет воспроизведено в опытах с дыхательной цепью митохондрий, мы должны будем признать, что предложенный Митчелом механизм вряд ли может объяснить генерацию $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ в пункте сопряжения 2 и что следует обратиться к альтернативным схемам образования разности электрохимических потенциалов ионов H^+ дыхательной цепью [2—4].

Экспериментальная часть

Потенциал полувосстановления цитохрома c_1 при различных рН определяли методом окислительно-восстановительного титрования этого дыхательного переносчика редокс-парой X/ГХ [8]. Редоксипотенциал раствора, содержащего известные концентрации X и ГХ, рассчитывали по уравнению E_h (мВ) = $699 + 59 \lg \frac{[X]}{[ГХ]} - 59$ рН. Степень восстановления цитохрома c_1 при данном потенциале среды определяли, записывая абсолютный спектр исследуемого препарата на двулучевом дифференциальном спектрофотометре для мутных сред. Концентрация восстановленной формы цитохрома c_1 считалась пропорциональной амплитуде пика при 554 нм, взятой относительно опорной линии, соединяющей близкие к изобестическим точки спектра при 572 и 540 нм, с поправкой на вклад в поглощение при этой длине волны окисленных форм цитохромов b и c_1 . Общая концентрация цитохрома определялась по разности абсолютных спектров митохондрий, СМЧ или комплексов II + III, окисленных феррицианидом и восстановленных аскорбатом в присутствии N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамина.

Поскольку спектры поглощения цитохромов c и c_1 сильно перекрываются, мы выделяли «звуковые» субмитохондриальные частицы [15] из тяжелых митохондрий сердца быка [16], предварительно отмытых от цитохрома c на 85—90% [17]. Максимальный вклад оставшейся небольшой части цитохрома c в поглощение при 554 нм не превышал 5% вклада цитохрома c_1 и не мешал проведению измерений. В ходе экспериментов мы обнаружили, что добавление X/ГХ к суспензии СМЧ вызывало развитие окраски в кювете, обусловленное стабилизацией семихинонной формы бензохинона на белке [18]. Поглощение удалось скомпенсировать, добавляя в контрольную кювету, содержащую систему X/ГХ, раствор сывороточного альбумина. Как показали дальнейшие опыты, стабилизация бензосемихинона при этом обусловлена преимущественно примесью гемоглобина, содержащегося в препарате альбумина.

Опыты по изучению влияния рН среды на степень восстановленности цитохрома c_1 митохондрий, уравновешенных с эквимоллярной смесью бензохинона и бензогидрохинона (см. рис. 1), проводили следующим образом: митохондрии сердца быка, отмытые от эндогенного цитохрома c , солибилизировали в среде, содержащей Тритон X-100—0,3%, сахарозу — 0,2 М, фосфат калия — 25 мМ, KSCN — 1 мМ, ротенон — 5 мкМ, малонат — 1 мМ. К 2 мл суспензии добавляли 0,01 мл насыщенного при 25° раствора хингидрона. Кювета сравнения содержала среду инкубации и хингидрон, а также латекс и альбумин + гемоглобин для компенсации светорассеяния и неспецифического поглощения, обусловленного стабилизацией бензосемихинона на белке митохондрий. Концентрация митохондриального цитохрома c_1 в суспензии составляла 1,1 мкМ. Ту же среду инкубации, но без Тритона X-100 использовали при проведении окислительно-восстановительных титрований цитохрома c_1 СМЧ при различных рН (рис. 2). Опытная кювета содержала суспензию СМЧ, дефицитных по цитохрому c (3,3 мг белка/мл), кювета сравнения — латекс и альбумин + гемоглобин. Окислительно-восстановительный потенциал среды задавали, варьируя концентрации бензохинона и бензогидрохинона в интервале 0,3—5 мМ.

Скорость дыхания митохондрий измеряли полярографически с помощью закрытого платинового электрода кларковского типа, сконструированного сотрудником отдела биоэнергетики А. Трушановым. Сукцинат-феррицианидредуктазную активность определяли на спектрофотометре «Hitachi-356» по изменению разности оптических плотностей образца при 430 и 510 нм. Сукцинат-цитохром-с-оксидоредуктаза была выделена из митохондрий сердца быка согласно работе [19] и любезно предоставлена нам А. А. Кондрашиным.

Авторы благодарны В. П. Скулачеву, по инициативе которого была выполнена эта работа, за полезные замечания, сделанные в ходе обсуждения результатов и при чтении рукописи статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скулачев В. П. (1972) Трансформация энергии в биомембранах, «Наука», М.
2. Скулачев В. П. (1974) Успехи соврем. биологии, **77**, 125—154.
3. Papa S., Guerrieri F., Lorusso M., Simone S. (1973) *Biochimie*, **55**, 703—716.
4. Константинов А. А. (1975) Докл. АН СССР, **220**, 736—739.
5. Garland P. B., Lawford H. G. (1973) *Biochem. J.*, **136**, 711—720.
6. Grinius L. L., Guds T. I., Skulachev V. P. (1971) *J. Bioenerg.*, **2**, 101—114.
7. Dutton P. L., Wilson D. F. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **346**, 165—212.
8. Green D. E., Jarnefelt J., Tisdale H. D. (1959) *Biochim. et biophys. acta*, **31**, 34—46.
9. Dutton P. L., Leigh J. S., Wraight F. (1973) *FEBS Lett.*, **36**, 169—173.
10. Nelson B. D., Gellefors P. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **357**, 358—364.
11. Estabrook R. W. (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 3051—3057.
12. Константинов А. А., Маслов С. П., Северина И. И., Скулачев В. П. (1975) *Биохимия*, **40**, 401—407.
13. Machinist J. M., Das M. L., Crane F. L., Jacobs E. E. (1961—1962) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **6**, 475—481.
14. Racker E., Sheider D. L. (1971) *Fed. Proc.*, **30**, 1190.
15. Hansen M., Smith A. L. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **81**, 214—221.
16. Crano F. L., Glenn J. E., Green D. E. (1956) *Biochim. et biophys. acta*, **22**, 475—487.
17. Jacobs E. E., Sanadi D. R. (1960) *J. Biol. Chem.*, **235**, 531—534.
18. Фомин Г. В., Давыдов Р. М., Блюменфельд А. А., Сухоруков Б. П. (1967) в сб. *Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота* (под ред. Яковлева В. А.), с. 134—143, «Наука», М.
19. Yamashita S., Racker E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1220—1227.

Поступила в редакцию
18.VII.1975

STUDIES ON THE NATURE OF REDOX EQUIVALENTS TRANSFERRED BY CYTOCHROME c_1 AND LOCALISATION OF THIS RESPIRATORY CARRIER AT THE OUTER SIDE OF INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE

KISELEV A. V., KONSTANTINOV A. A.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

The hypothesis on cytochrome c_1 participation in the generation of $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ by mitochondrial redox chain as a hydrogen carrier across the membrane in coupling site 3 was investigated. It is shown that in mitochondria, submitochondrial particles and soluble succinate: cytochrome c oxidoreductase cytochrome c_1 has a midpoint potential of $245 \pm \pm 10$ mV, independently of the incubation medium pH in the range of 6,0—7,5. The assays of succinate: ferricyanide reductase activity of mitochondria, deficient in cytochrome c , provide an evidence for cytochrome c_1 location at the outer side of the inner mitochondrial membrane. Cytochrome c_1 thus proves to be an electron carrier operating at the outer surface of mitochondria and therefore seems not to be involved in hydrogen transfer across the membrane in coupling site 3.