

На правах рукописи

Юрков Владимир Игоревич

**Регистрация неравновесных состояний мембраносвязанных ионов
водорода в митохондриях и их роль в процессе окислительного
фосфорилирования.**

03.00.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2008

*Работа выполнена в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.*

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ягужинский Лев Сергеевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Зинченко Валерий Петрович
доктор биологических наук, профессор
Кобляков Валерий Александрович

Ведущая организация: Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН, г. Пущино

Защита состоится 27 октября на заседании диссертационного совета Д.501.001.71 при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, биологический факультет МГУ, ауд. .

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан .

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

М.В. Медведева

Регистрация неравновесных состояний мембраносвязанных ионов водорода в митохондриях и их роль в процессе окислительного фосфорилирования.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Известно, что мультиферментные системы клетки могут работать в двух качественно различных состояниях – в диссоциированном, когда ферменты работают независимо друг от друга, и в состоянии суперкомплекса (метаболона), когда ферменты тесно контактируют друг с другом. В первом случае продукты реакции выбрасываются в объем водной фазы, из которой избирательно захватываются активным центром следующего по цепи фермента. При образовании метаболона промежуточные продукты-субстраты не выбрасываются в водную фазу, а передаются по метаболической цепи от фермента к ферменту "из рук в руки". В случае мембранной системы окислительного фосфорилирования ключевым промежуточным продуктом окислительных реакций является ион водорода, обладающий избытком свободной энергии и выполняющий в митохондриях роль переносчика энергии окислительных реакций на АТФ-синтазный комплекс. Работа этой системы в форме суперкомплекса, когда ион водорода не выходит в водную фазу предполагает существование относительно высокого кинетического барьера в реакции отрыва ионов водорода от внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны. В настоящее время хорошо изучен и экспериментально обоснован первый механизм (модель Митчела). В этом случае ион водорода является основным промежуточным продуктом-субстратом реакции (который выполняет роль переносчика энергии окислительных реакций на АТФ-синтазный комплекс), выходит из мембраны в объем водной фазы (Mitchel, 1961). Второй механизм (модель Вильямса), предполагает возможность работы мультиферментных систем в форме суперкомплекса, при котором ионы водорода переносятся от дыхательной помпы на АТФ-синтазный комплекс в составе суперкомплекса дыхательная помпа-мембрана-АТФ-синтаза без выхода в объем водной фазы (Williams, 1961). Существование такого механизма работы системы окислительного фосфорилирования до последнего времени не было однозначно показано. Усилия многих

лабораторий направлены в настоящее время на выделение из митохондрий суперкомплексов, включающих основные элементы дыхательной цепи, а также АТФ-синтазу. В частности выделен суперкомплекс, включающий I, III и IV комплексы, входящие в состав дыхательной цепи митохондрий и предпринимаются также усилия для получения полного комплекса системы окислительного фосфорилирования (Stroh et al., 2004).

Ранее нам удалось обнаружить существование двух структурных состояний мембран митохондрий, переход между которыми контролировался системой осморегуляции (Krasinskaya et al., 1989). Кинетические параметры системы сопряжения дыхания и фосфорилирования в одном из этих состояний соответствуют модели мультиферментного суперкомплекса. Эти наблюдения рассматривались нами как указание на существование системы окислительного фосфорилирования в двух состояниях, в одном из которых реализуется делокализованное, в другом – локальное сопряжение дыхания и фосфорилирования. Необходимым условием работы системы окислительного фосфорилирования в режиме локального сопряжения является способность ионов водорода достаточно долго существовать в мембраносвязанном состоянии после того как дыхательные H^+ -помпы переносят его через гидрофобный изолирующий барьер мембраны. К настоящему времени на различных модельных системах показано, что реакция отрыва протона от поверхности липидных мембранных структур имеет при определенных условиях относительно высокий кинетический барьер, существование которого определяет возможность возникновения неравновесного состояния (пула) ионов водорода, связанных с поверхностью мембраны (Antonenko et al., 1993; Cherepanov et al., 2004). Обнаружение такого пула при трансмембранном переносе ионов водорода через БЛМ показало возможность латерального переноса протонов вдоль поверхности мембраны без выхода в водную фазу. Это наблюдение, сделанное в нашей лаборатории на модельной системе доказала принципиальную возможность реализации механизма локального сопряжения в митохондриях. Кроме того на модельной мембране (БЛМ) был найден катализатор отрыва H^+ -ионов от поверхности мембраны и описана химическая природа пула мембраносвязанных H^+ -ионов. Важно указать, что работ по изучению переноса протонов через межфазные границы внутренней мембраны митохондрий в условиях протекания процесса окислительного фосфорилирования до начала настоящего исследования не проводилось.

Цели и основные задачи исследования. Настоящая работа направлена на экспериментальное обоснование возможности переноса протонов от дыхательных H^+ -помп к АТФ-синтетазе в условиях работы системы окислительного фосфорилирования митохондрий в составе мембранного суперкомплекса (без выхода в водную фазу). Основное внимание было уделено изучению влияния катализаторов реакции отрыва ионов водорода от внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий на объем пула мембраносвязанных ионов водорода и на функционирование дыхательных H^+ -помп и АТФ-синтазы. В соответствии с целью работы были поставлены конкретные задачи: 1) на фосфорилирующих митохондриях продемонстрировать образование пула мембраносвязанных ионов водорода на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны в состоянии 3 по Чансу. 2) Показать участие пула мембраносвязанных ионов водорода в работе системы окислительного фосфорилирования. 3) Сравнить влияние катализаторов отрыва H^+ -ионов от поверхности мембраны на скорость дыхания в разобщенных и фосфорилирующих митохондриях. 4) Показать возникновение неравновесных состояний мембраносвязанных H^+ -ионов в разобщенных митохондриях.

Научная новизна работы. Разработан метод ковалентной пришивки рН-зонда (ФИТЦ) к митохондриям, при использовании которого практически полностью сохраняется фосфорилирующая функция этих органелл. На препаратах ФИТЦ-меченых митохондрий обнаружено явление катализа реакции отрыва ионов водорода от внешней поверхности внутренней мембраны.

На препаратах ФИТЦ-меченых митохондрий, в условиях фосфорилирования зарегистрировано образование пула мембраносвязанных ионов водорода с внешней стороны внутренней митохондриальной мембраны. Тем самым было показано существование относительно высокого кинетического барьера в реакции отрыва ионов водорода от внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий. Этот результат был подтвержден на препаратах интактных разобщенных митохондрий. Установлено, что мембраносвязанные ионы водорода принимают участие в процессе окислительного фосфорилирования. Найдена прямая корреляция между величиной неравновесного пула мембраносвязанных H^+ -ионов и, с другой стороны, скоростью фосфорилирующего дыхания и эффективностью фосфорилирования (параметром ADP/O).

Практическое значение работы. Полученные результаты показали возможность работы системы окислительного фосфорилирования в режиме мультиферментного суперкомплекса, что является принципиально новой фундаментальной информацией о свойствах одной из важнейших систем энергообеспечения клетки. В работе показана возможность направленного регулирования скорости и эффективности работы системы окислительного фосфорилирования путем воздействия на внешнюю поверхность внутренней митохондриальной мембраны. Результаты этих экспериментов открывают новые подходы для лекарственной терапии заболеваний, связанных с нарушениями митохондриальной энергетики, а также для разработки методов, позволяющих управлять митохондриальной энергетической системой.

Апробация. Результаты диссертационной работы были доложены на III съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), Международной конференции “Рецепция и внутриклеточная сигнализация” (Пушино, 2005), Международной конференции “Российская биоэнергетика: от молекул к клетке” (Москва, 2005), Международной конференции “Европейская конференция по биоэнергетике” (Москва, 2006), теоретическом семинаре отдела биоэнергетики НИИФХБ им. Белозерского МГУ (Москва, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 101 страницах и включает: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Приложение», «Список цитируемой литературы». В работе содержится 18 рисунков и 2 таблицы.

Материалы и методы исследования

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования из печени белых крыс по стандартной методике. Опыты проводились в гипотонических условиях (120 мОсм). Среда выделения содержала 210 мМ маннитола, 40 мМ сахарозы, 10 мМ Tris-HCl, 0,5 мМ ЭДТА (рН 7,5). Скорость дыхания митохондрий измеряли полярографическим методом с помощью кислородного электрода Кларка на полярографе LP-7E. Условия экспериментов: использовано несколько сред инкубации, которые содержали: 1) 0,093 М сахарозы, 3 мМ Hepes (рН 7,5), 0,25 мМ ЭДТА натрия, 1 мМ сульфата магния, 17 мМ KCl; 2) 0,068 М сахарозы, 20 мМ Hepes, (рН 7,5), 0,25 мМ ЭДТА натрия, 1 мМ сульфата магния, 3 мМ KCl.

Величина коэффициента АДФ/О определялась полярографически по методу Чанса. Концентрацию белка определяли биуретовым методом. Присутствие локального H^+ -градиента с наружной стороны внутренней мембраны митохондрий регистрировали по изменению степени диссоциации ковалентно присоединённого к митохондриям рН-зонда флуоресцеинизотионата (ФИТЦ) в ответ на добавление непроникающего катализатора реакции отрыва H^+ -ионов от поверхности митохондриальной мембраны (HEPES). Измерения поглощения ФИТЦ проводили на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) в дифференциальном режиме ($\lambda_{max} = 499$ нм). Метод получения препарата фосфорилирующих ФИТЦ-меченых митохондрий детально описан нами в работе (Солодовниковой И.М. и соавт., 2004, Биофизика, 49(1),47-56).

Изменения величины трансмембранного потенциала регистрировали при помощи ТФФ⁺-селективного электрода. Регистрацию величины локальных H^+ -градиентов при разных концентрациях непроникающего катализатора (HEPES), измерения скоростей дыхания и параметра АДФ/О, а также величины $\Delta\Psi$ проводили параллельно на одних и тех же препаратах ФИТЦ-меченых митохондрий в течение первых одного-двух часов после выделения. Стояние препарата митохондрий >1-2 часов при 0-4⁰С приводит к нарушению их интактности и обращению наблюдаемых эффектов. Скорости и значения параметров ADP/O при разных концентрациях катализатора были проведены также на интактных (немеченых ФИТЦ) митохондриях.

Результаты и обсуждение

Метод идентификации и химическая природа высокого кинетического барьера в реакции отрыва ионов водорода от внешней поверхности митохондриальной мембраны

(механизм катализа реакции отрыва H^+ -ионов от поверхности мембраны)

Ранее на модельной системе (БЛМ) в нашей лаборатории было показано, что в условиях трансмембранного переноса H^+ -ионов возникает неравновесный пул ионов водорода, связанных с поверхностью бислоя в форме протонированных карбоксильных групп фосфатидилсерина (ФС), входящего в состав мембраны (Antonenko et al., 1993). При отсутствии ФС в составе бислоя пул мембраносвязанных H^+ -ионов близок к нулевому

значению. Образование такого неравновесного состояния ионов водорода, связанных с основаниями Льюиса на поверхности мембраны свидетельствует о существовании относительно высокого кинетического барьера в реакции отрыва протона от поверхности мембраны в объем водной фазы. Высота этого барьера определяется фактически соответствующей энергией активации (E_0) диссоциации карбоксильных групп, в зоне межфазной границы (связанной с взаимодействием между основанием Льюиса (δ^-) и ионом водорода (δ^+) в переходном состоянии) (рис.1). Реакцию можно записать в виде (Ia):

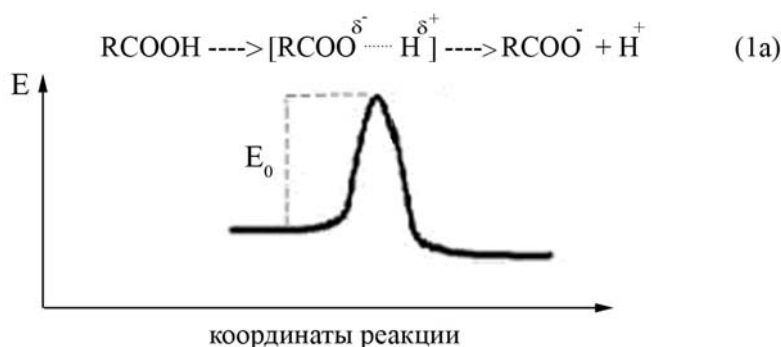
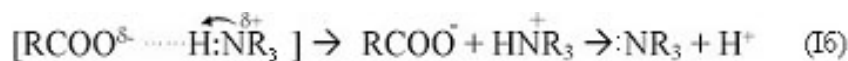


Рис. 1 Переходное состояние реакции отрыва протона от поверхности мембраны (R-мембраны).

Катализатор ($:\text{NR}_3$) обладает электронодонорными свойствами, он уменьшает положительный заряд на водороде в переходном состоянии, соответственно снижая высоту кинетического барьера ускоряя реакцию отрыва H^+ -ионов (Iб, Iв).



Наблюдающееся в таких условиях ускорение трансмембранного переноса H^+ -ионов говорит о том, что процесс переноса лимитирован стадией отрыва H^+ -ионов от границы БЛМ.

Обнаружение эффекта катализа реакции отрыва ионов водорода от внешней поверхности внутренней мембраны фосфорилирующих митохондрий

В настоящей работе, в опытах на фосфорилирующих митохондриях по существу был использован такой же подход, что и в работе на БЛМ с тем различием, что вместо прямого измерения тока H^+ -ионов через мембрану измерялась скорость дыхания, которая жестко

скоррелирована со скоростью потока электронов в дыхательной цепи и трансмембранным транспортом H^+ -ионов. В качестве катализатора отрыва H^+ -ионов от внешней поверхности внутренней мембраны было использовано слабое основание (HEPES), которое слабо проникает через митохондриальную мембрану. Поэтому такой катализатор избирательно ускоряет реакцию диссоциации H^+ -кислот (и в том числе рН-зонда ФИТЦ, ковалентно присоединенного к мембране) только с внешней поверхности мембраны митохондрий. Благодаря этому, мы смогли избирательно зарегистрировать снижение неравновесного пула мембраносвязанных ионов водорода на митохондриях, равномерно меченых ФИТЦ. Существование относительно высокого барьера в реакции отрыва протона от мембраны было показано нами двумя независимыми способами: путем регистрации увеличения степени диссоциации и соответственно экстинкции рН-зонда (ФИТЦ) на внешней поверхности мембраны в ответ на добавление катализатора в условиях работы дыхательных H^+ -помп, а также кинетическим методом – по изменению скорости дыхания митохондрий после добавления того же катализатора. В случае разобщенных митохондрий удалось увидеть, что скорость дыхания лимитирована реакцией отрыва H^+ -ионов от мембраны.

I. Регистрация возникновения неравновесного пула ионов водорода с внешней стороны внутренней митохондриальной мембраны в условиях работы дыхательных H^+ -помп.

Использование непроникающих катализаторов отрыва H^+ -ионов от мембраны позволило нам варьировать объем неравновесного пула мембраносвязанных ионов водорода с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий, возникающего при работе дыхательных H^+ -помп. В свою очередь это дало возможность проследить корреляцию между объемом указанного пула и скоростью дыхания в разобщенных и фосфорилирующих митохондрий. При этом была найдена корреляция между объемом пула и эффективностью (КПД) фосфорилирования – параметром ADP/O.

Регистрация изменений экстинкции ФИТЦ-зонда в препаратах митохондрий проводилась в дифференциальном режиме в двух параллельных пробах, содержащих разное количество катализатора (HEPES 3mM и 20 mM) в соответствии с протоколом, подробно описанным в разделе <<Материалы и методы исследования>>. О существовании пула мембраносвязанных протонов на внешней поверхности мембраны в условиях работы

дыхательных H^+ -помп судили по увеличению степени диссоциации ковалентно связанного рН-зонда (в равномерно меченых митохондриях) в ответ на повышение концентрации катализатора. Катализатор ускоряет реакцию отрыва H^+ -ионов от поверхности (см. выше реакция I) и тем самым увеличивает степень диссоциации H^+ -кислот на поверхности, (и в том числе степень диссоциации зонда ФИТЦОН) на поверхности мембраны (рис.2) (при этом возрастает степень диссоциации и, соответственно, экстинкции зонда - $\Delta ОП$).

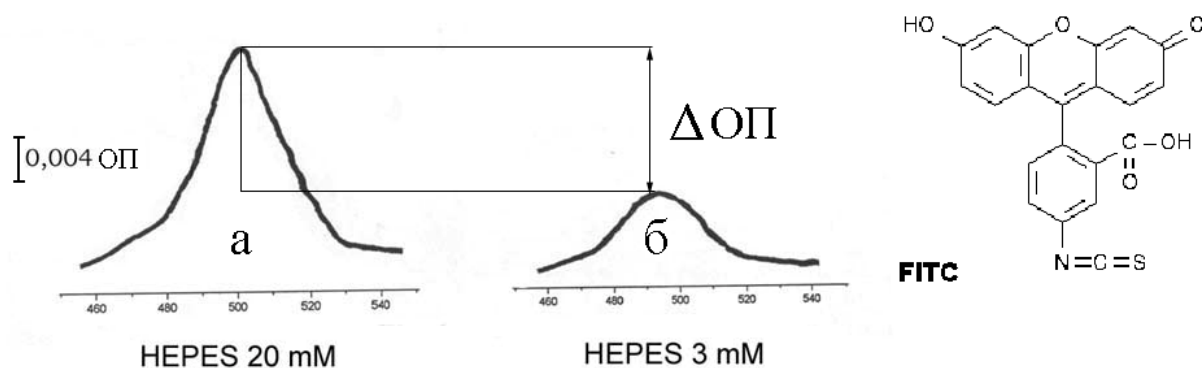


Рис.2 Дифференциальные спектры ФИТЦ-меченых митохондрий в условиях работы дыхательных H^+ -помп при высокой (а) и низкой (б) концентрациях непроникающего катализатора. Субстрат дыхания сукцинат, добавлен ротенон. В контрольной кювете добавлен ТТФА. Наблюдаемое увеличение поглощения, обусловленное повышением степени диссоциации зонда связано со снижением активности H^+ -ионов с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий после добавления высоких концентраций катализатора (HEPES) в среду инкубации. Падение локального H^+ -градиента под действием катализатора является свидетельством существования неравновесного пула мембраносвязанных H^+ -ионов.

Можно видеть, что экстинкция рН-зонда при высокой концентрации непроникающего катализатора (HEPES) (рис. 2а) выше, чем при низкой концентрации (рис. 2б). Наблюдаемое различие в величине абсорбции ФИТЦ-зонда показывает присутствие градиента активности H^+ -кислот с наружной стороны внутренней митохондриальной мембраны.

Результаты экспериментов, проведенных на митохондриях при разных концентрациях разбавителя (рис. 3) показывают, что степень снижения H^+ -активности с внешней стороны мембраны в условиях работы дыхательных H^+ -помп почти не зависит от концентрации разбавителя при высоких (рис.3 А, кривые 1,2) и низких концентрациях катализатора (рис.3 Б, кривые 1,2). Только те концентрации разбавителя, которые снижают величину пула мембраносвязанных H^+ -ионов, которые подавляют работу H^+ -помп (рис.3 А,Б, кривые 3) и подавляют скорость дыхания.

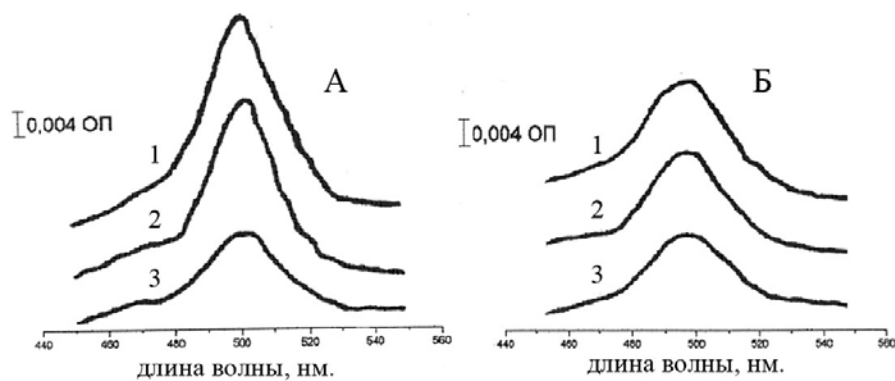


Рис.3 Измерение экстинкции (степени диссоциации) рН-зонда (ФИТЦ) при повышении концентрации разобщителя (ТТФВ). В обе кюветы добавлены ротенон (1 мкМ), в кювету “контроль” добавлен ТТФА (6 мкМ); 1) В обе кюветы добавлен ТТФВ (1 мкМ), 2) В кюветы добавлен избыток ТТФВ (3 мкМ), 3) В кюветы добавлен избыток ТТФВ (6 мкМ); А) концентрация NPPES 20 мМ, Б) концентрация NPPES 3 мМ. Результаты воспроизведены на восьми препаратах митохондрий. Сукцинат (2 мМ добавлялся в обе кюветы после записи нулевой линии, перед измерением.

Это показывает, что разобщитель в указанных концентрациях сам по себе, в отличие от катализатора слабо взаимодействует с мембраносвязанными протонами и практически при этом не влияет на величину локальных H^+ -градиентов. Повышение скорости дыхания говорит о том, что под влиянием разобщителя происходит ускорение трансмембранного переноса ионов водорода на разобщителе и ускорение работы дыхательных H^+ -помп. Наблюдается картина, которая говорит о том, что разобщитель, не изменяя объема пула мембраносвязанных H^+ -ионов стимулирует дыхание только за счет эффективного переноса ионов водорода из воды в воду. Это важный результат, поскольку он говорит о том, что зонд действительно регистрирует пул мембраносвязанных ионов водорода, которые качественно отличаются от H^+ -ионов в объеме водной фазы, так как химически связанные на мембране H^+ -ионы (рис.1) слабее взаимодействуют с анионом разобщителя.

Обсуждая это свойство пула мембраносвязанных ионов водорода следует указать на два важных обстоятельства: во-первых, теоретически ясно, что реакция взаимодействия мембраносвязанных ионов водорода с анионом разобщителя должна иметь более высокий активационный барьер, чем реакция “свободных” H^+ -ионов в водной фазе. Во-вторых, также надо принять во внимание то обстоятельство, что концентрация разобщителя в условиях опытов на 2-3 порядка ниже, чем концентрация катализаторов. Важно указать также, что качественно аналогичный результат был получен ранее в нашей лаборатории на модельной бислойной мембране. В этой системе, в условиях трансмембранного переноса протонов, было показано, что образование неравновесного состояния (пула) мембраносвязанных ионов водорода может наблюдаться в присутствии разобщителей.

Эффект повышения концентрации проникающего катализатора (Tris) на экстинкцию ФИТЦ-меченых митохондрий в состоянии 3 по Чансу

Опыты с “непроникающим” катализатором (HEPES) имеют тот недостаток, что проницаемость митохондриальной мембраны для катализатора может заметно возрастать во времени при продолжительном стоянии в открытом сосуде при 0^0 , возможно в результате открывания неспецифической поры (РТР) в митохондриях. Поэтому в качестве контроля представлялось важным определить, что происходит при попадании проникающего через мембрану катализатора в матрикс митохондрий. Этот вопрос имеет большое значение еще и потому, что в качестве катализаторов мы использовали слабо проникающие основания Льюиса (HEPES, MES), обладающие свойствами рН-буферов. В условиях работы H^+ - помп рН матрикса выше, чем рН внешней среды на 0,5-0,7 единицы. Поэтому проникновение буфера внутрь митохондрий должно снижать эту разницу. В условиях откачки протонов H^+ - помпой при попадании в матрикс буфера-катализатора в высокой концентрации в общем случае рН матрикса должен снижаться сильнее, чем при низкой концентрации буфера. Соответственно, повышение концентрации проникающего концентрированного буфера-катализатора должно с одной стороны снижать активность H^+ - ионов с внешней стороны мембраны за счет каталитических свойств и увеличивать экстинкцию наружной фракции зонда, но с другой стороны такой катализатор в высокой концентрации должен эффективнее повышать активность H^+ - ионов в матриксе за счет буферных свойств, что может приводить к уменьшению скорости дыхания митохондрий и, соответственно степени протонированности внешней фракции ФИТЦ. В предельном случае закисление матрикса может приводить к обращению эффекта – в концентрированном буфере наблюдаемая степень диссоциации (экстинкция) зонда может оказаться ниже, чем в слабом буфере за счет эффективного протонирования его матриксной фракции. Серия экспериментов с использованием проникающего через внутреннюю митохондриальную мембрану катализатора-буфера (Tris), подтвердила сделанное выше предположение. Опыты показали, что при повышении концентрации Tris в среде инкубации экстинкция ФИТЦ-зонда в митохондриях снижается (рис.4).

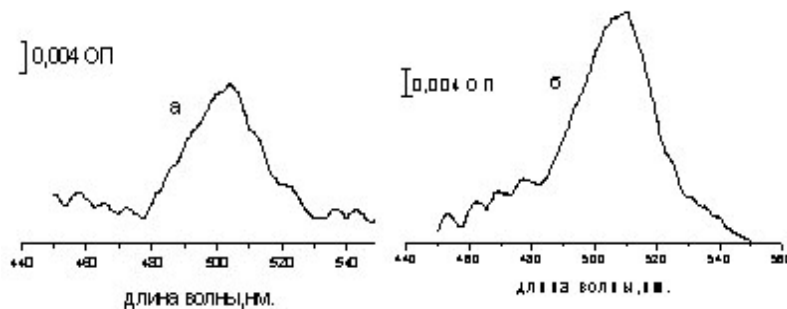


Рис.4 Влияние повышения концентрации проникающего в матрикс катализатора-буфера (Tris), на величину наблюдаемой экстинкции равномерно ФИТЦ-меченых митохондрий. а) среда инкубации содержит 20 мМ Tris, б) среда инкубации содержит 3 мМ Tris.

Такие же эффекты наблюдаются при использовании катализатора-буфера на препаратах митохондрий с высокой проницаемостью мембраны для НЕРЕС. Проницаемость наблюдается после длительного (1,5-2 часа) стояния митохондрий при 0-4⁰С, а также на свежих препаратах митохондрий, обладающих низким дыхательным контролем.

Эффект ускорения разобщенного дыхания митохондрий под влиянием непроникающего катализатора реакции отрыва H^+ от внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны.

Выше было показано, что в процессе трансмембранного переноса ионов водорода в митохондриях в условиях работы дыхательных H^+ -помп на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны происходит локальное повышение активности ионов водорода, что говорит о существовании относительно высокого кинетического барьера в реакции отрыва H^+ -ионов от поверхности мембраны в водную фазу.

Очевидно, что низкая скорость реакции отрыва H^+ -ионов может лимитировать процесс работы дыхательных H^+ -помп в полностью разобщенных митохондриях. Как показано выше, анионы разобщителя (в разобщающих концентрациях (рис.6б)) не способны эффективно снижать уровень неравновесного пула мембраносвязанных ионов водорода (рис.3А). В этом случае при добавлении катализатора, который ускоряет реакцию отрыва H^+ -ионов от мембраны следовало ожидать повышения скорости переноса протона через мембрану (также как в случае модельной системы) и, соответственно, повышения скорости разобщенного дыхания.

Действительно, удалось обнаружить эффект повышения скорости разобщенного дыхания в ответ на повышение концентрации катализатора (НЕРЕС) (рис.5).

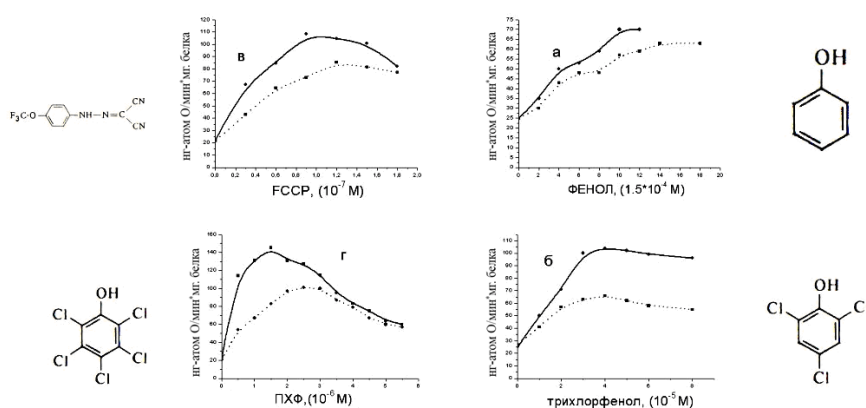


Рис.5. Увеличение скорости разобщенного дыхания митохондрий при повышении концентрации слабопроникающего катализатора (NEPES) реакции отрыва H^+ -ионов от поверхности мембраны. Добавки: сукцинат (2мМ), ротенон (1мкМ), pH 7,5; разобщители: а- фенол, б- трихлорфенол, в- FCCP, г- пентахлорфенол. Пунктирные линии – 3мМ Nepes, сплошные – 20мМ Nepes. Среда инкубации содержала 0,25 мМ ЭДТА, 1мМ сульфата магния, 10 мМ KCl, сахарозу добавляли в таких концентрациях, чтобы тоничность среды составляла 120 мОсм.

Результаты, приведенные на рис.5 показывают, что скорость работы дыхательных H^+ - помп лимитирована реакцией отрыва протона от внешней поверхности мембраны в условиях нашего эксперимента. Кроме того, из рис.5 следует, что изменение концентрации катализатора NEPES само по себе (в отсутствие разобщителей) не влияет на скорость дыхания митохондрий. В работе были использованы разобщители разного химического строения и с разной эффективностью: соединения ряда фенола – (фенол, трихлорфенол и пентахлорфенол); производное бензимидазола (ТТФБ), производное фенилгидразона (FCCP). Было показано, что полученные результаты имеют количественные различия для случаев разных разобщителей, однако основной эффект стимуляции дыхания катализатором не зависит от химического строения молекул разобщителей.

Влияние непроникающих катализаторов с разным химическим строением на скорость отрыва H^+ - ионов от внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны

Было показано также, что наблюдаемый эффект не связан с конкретной структурой катализатора. Параллельно поставленные опыты с двумя разными слабопроникающими катализаторами (NEPES и MES) (рис.6) показали, что использование различных по химической структуре катализаторов качественно не изменяет эффекта ускорения разобщенного дыхания в ответ на повышение концентрации катализатора.

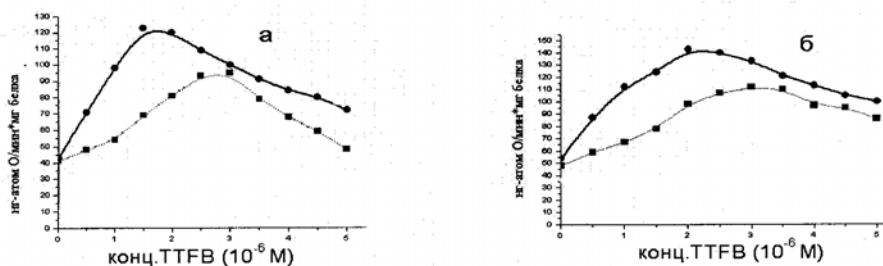


Рис.6. Влияние слабопроникающих катализаторов с разным химическим строением (HEPES, MES) на скорость дыхания митохондрий, разобщенных ТТФВ. а) Mes 3мМ (пунктир), 20мМ (сплошная линия), б) HEPES 3мМ (пунктир), 20мМ(сплошная линия). Условия измерения см. подпись к рис.5

О возможном участии транслокатора адениновых нуклеотидов в процессе ускорения разобщенного дыхания катализаторами реакции отрыва ионов водорода

В работах В.П. Скулачева показано, что при низких концентрациях разобщителя их анионы могут переноситься на ADP/ATP транслокаторе. Можно было предположить поэтому, что катализатор отрыва H^+ - ионов ускоряет работу транслокатора. Чтобы исключить эту возможность были проведены эксперименты с разобшителем и катализатором, в которых работа транслокатора нуклеотидов была подавлена с помощью карбоксиатрактилазида (catr). Как видно из рисунка 7, в этом случае также сохраняется качественно сходная картина – повышение концентрации катализатора (HEPES) усиливает разобщенное дыхание и, следовательно, наблюдаемый эффект не связан с влиянием HEPES на функционирование транслокатора нуклеотидов.

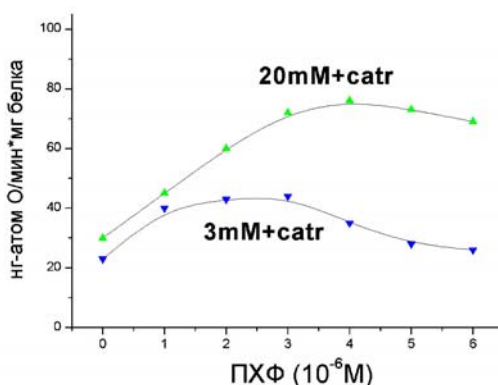


Рис.7. Увеличение максимальной скорости разобщенного дыхания митохондрий при повышении концентрации катализатора (HEPES) в присутствии карбоксиатрактилазида. Среда инкубации содержит: сукцинат (2мМ), ротенон (1мкМ), карбоксиатрактилазид (2мкМ), рН 7,5; детали см. подпись к рис.5

II. Регистрация образования неравновесных состояний мембраносвязанных ионов водорода на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны с помощью ФИТЦ-зонда в условиях фосфорилирования

Использование препарата меченых ФИТЦ-зондом фосфорилирующих митохондрий позволило зарегистрировать образование локального H^+ -градиента с внешней стороны внутренней митохондриальной мембраны в состоянии 3 по Чансу. В этих опытах использовалась та же методика, как и в случае разобщенных митохондрий. Повышение степени диссоциации рН-зонда под влиянием непроникающего катализатора реакции отрыва ионов водорода свидетельствует о присутствии локального H^+ -градиента с внешней стороны митохондриальной мембраны, который снижается под влиянием катализатора. Результаты этих измерений приведены на рис.8А.

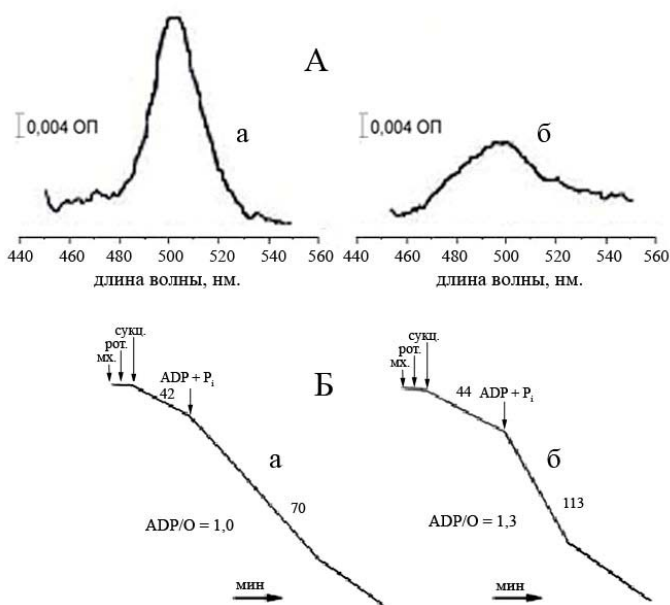


Рис. 8 (А) Регистрация изменения активности H^+ -ионов с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий под влиянием слабопроникающего катализатора реакции отрыва H^+ -ионов (в состоянии 3 по Чансу). Дифференциальные спектры ФИТЦ-меченых митохондрий в условиях фосфорилирования зарегистрированы в двух средах: а) при низкой (3мМ) и б) высокой (20мМ) концентрациях катализатора NHERF. При регистрации дифференциальных спектров в обе кюветы добавлены: ADP (1мМ), добавлен ротенон (1мкМ), в контрольной кювете – TTFA (6мкМ). После записи нулевой линии добавлен в обе кюветы сукцинат (2 мМ). (Б) Регистрация параметра ADP/O в ФИТЦ-меченых митохондриях печени при а) низкой (3 мМ) и б) высокой (20 мМ) концентрациях катализатора NHERF. “мх.”, “рот.”, “сукц.” – добавки в ячейку: митохондрий, ротенона и сукцината соответственно. ADP добавлено 200 мкМ. Цифрами на полярограммах обозначена скорость поглощения кислорода (в нг.ат.О в мин. на 1 мг белка). Представленная на рисунке картина наблюдалась на трех препаратах ФИТЦ-меченых митохондрий.

На том же препарате митохондрий было показано, что в суспензии митохондрий, суспендированных в среде с низкой концентрацией катализатора (HEPES) скорость дыхания (в состоянии 3 по Чансу) выше, чем в среде с повышенной концентрацией катализатора (рис.8Б). Иными словами, в отличие от дыхания разобщенных митохондрий которое ускоряется катализатором, в состоянии 3 последний замедляет дыхание фосфорилирующих митохондрий (Рис. 8Б, таблица1).

Опыты были повторены в условиях, когда трансмембранный градиент рН сведен к минимуму. В присутствии нигерицина экстинкция рН-зонда почти такая же, как без нигерицина (рис.8), а величина параметра ADP/O коррелирует с объемом пула мембраносвязанных ионов водорода. При повышении концентрации катализатора объем пула H^+ - ионов снижается (рис. 9 А,а) и коэффициент ADP/O падает (рис. 9Б,б, табл.1).

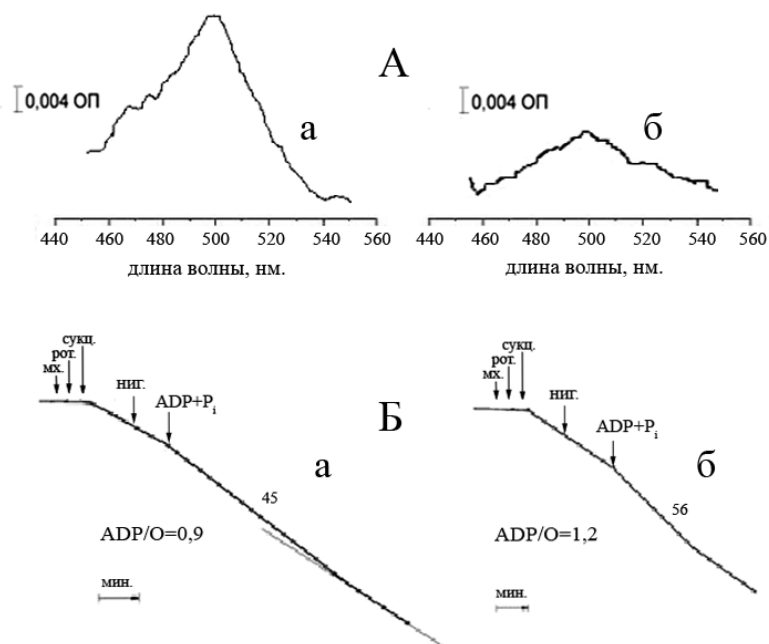


Рис.9. Опыты на ФИТЦ-меченых митохондриях по измерению локальных H^+ -градиентов и ADP/O в присутствии нигерицина при постоянном значении рН среды (7,5). Использована экспериментально установленная, максимальная концентрация нигерицина ($1 \cdot 10^{-9}M$), не ускоряющая дыхания митохондрий в состоянии 2 (4) по Чансу. Повышение степени диссоциации рН-зонда при возрастании концентрации катализатора (HEPES). А) Спектр ФИТЦ-меченых фосфорилирующих митохондрий при концентрации катализатора: а) 20 мМ, б) 3мМ. В обе кюветы добавлен нигерицин ($10^{-9}M$). В контрольной кювете добавлен ТТФА, субстрат – сукцинат. Б) Измерение скоростей дыхания и ADP/O в присутствии нигерицина в тех же условиях, а и б – разные концентрации катализатора. Результат, приведенный на рисунке наблюдался на 2-х образцах митохондрий.

Положительная корреляция между величиной пула мембраносвязанных протонов и величиной ADP/O и скоростью фосфорилирующего дыхания в препаратах интактных митохондрий.

Ранее в нашей лаборатории на БЛМ было показано, что образующийся при трансмембранном переносе H^+ - ионов неравновесный пул ионов водорода, связанных с поверхностью мембраны обладает избытком свободной энергии, которая может быть использована для совершения полезной работы (Антоненко и соавт., 1982). В принципе обнаруженный нами неравновесный пул H^+ - ионов в митохондриях также может быть использован для полезной работы, в частности для синтеза АТФ. Как отмечалось выше, эффективность и скорость синтеза АТФ в наших условиях коррелирует с объемом пула неравновесно связанных с внешней поверхностью внутренней мембраны ионов водорода. В таблице 1 приведены результаты, на основании которых сформулировано предположение о участии мембраносвязанных H^+ - ионов в процессе фосфорилирования. Можно видеть, что в суспензии митохондрий в средах с низкой концентрацией катализатора (HEPES), достоверно увеличен параметр ADP/O, что говорит о том, что в условиях, когда локальный H^+ - градиент повышен, параллельно повышается скорость синтеза АТФ.

Табл. 1. Возрастание величины ADP/O и скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 по Чансу от концентрации слабопроникающего катализатора (HEPES) в среде инкубации. Осмолярность 120 мосМ.

№ опыта	Концентрация HEPES, мМ	Параметры фосфорилирования Добавки субстратов, (скорости дыхания даны в нг-ат. О/мин * мг белка)		
		Сукцинат	Сукцинат, ADP	ADP/O
1	3	26	147	1.9
	20	23	133	1.6
2	3	15	88	1.2
	20	13	49	0.9
3	3	15	134	1.6
	20	12	112	1.1

Следует отметить, что в изотонических (250 мосМ) условиях отсутствует эффект замедления скорости фосфорилирующего дыхания при отрыве H^+ -ионов от поверхности мембраны. Это говорит о том, что при переходе от изотонических к гипотоническим условиям кинетические параметры системы сопряжения дыхания и фосфорилирования в митохондриях изменяются – они приходят в соответствие с моделью локального сопряжения.

В связи с наблюдаемой перестройкой более высокую эффективность использования энергии окислительных реакций в условиях образования пула мембраносвязанных ионов водорода заманчиво объяснить тем, что перенос энергии окислительных реакций происходит не только в форме электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), но также и термодинамического (сольватационного) потенциала ($\Delta\mu_{solv}$) ионов водорода, который обусловлен частичной дегидротацией ионов водорода, на которую затрачивается часть энергии окислительных реакций в митохондриях.

Заключение

Как отмечалось во введении, система осморегуляции может переключать процесс окислительного фосфорилирования из режима делокализованного в режим локального сопряжения. В последнем случае выполняется основной принцип работы мультиферментных систем, существующих в форме суперкомплексов (метаболонов) – согласно которому в цепи последовательных реакций передача промежуточных продуктов/субстратов от фермента к ферменту осуществляется “из рук в руки”, без выхода в объем водной фазы. В соответствии с данными нашего эксперимента, на схеме 1б показано, что в условиях локального сопряжения ион водорода пересекает гидрофобный барьер мембраны, что приводит к образованию электрохимического мембранного потенциала. Однако, в отличие от случая делокализованного сопряжения, основной поток энергии к АТФ-синтазе реализуется в форме переноса ионов водорода, связанных с внешней поверхностью мембраны в составе суперкомплекса - протонные помпы – мембрана – АТФ-синтаза (1б). На схемах транспорта энергии (ионов водорода) в митохондриях (1 а,б) даны не только направления основных потоков этих ионов в условиях локального сопряжения (схема 1 б, жирные стрелки), но также

и трансмембранные потоки, которые характерны для делокализованного сопряжения (рис. 1а и рис 1б, тонкие стрелки).

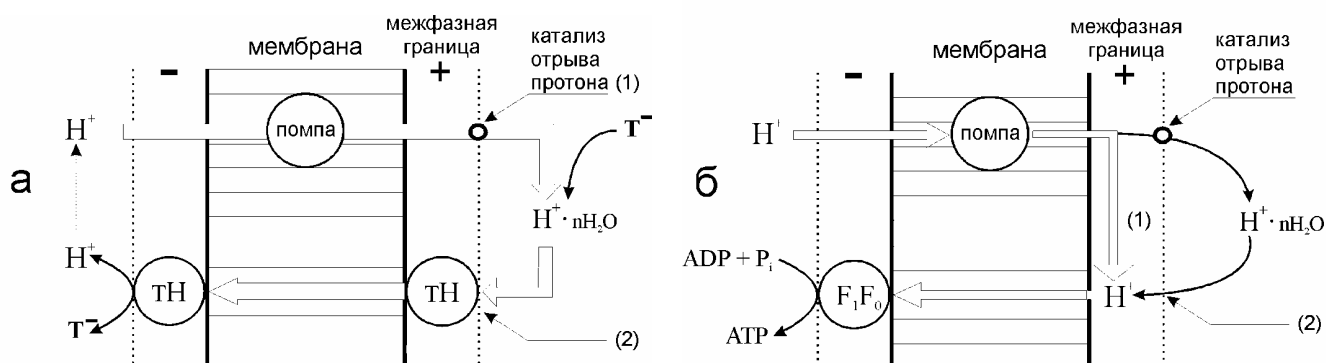


Схема 1. Модель транспорта ионов водорода в условиях (а) разобщения и (б) фосфорилирования.

Проведенные в работе эксперименты показали (рис.8, таб.1), что в условиях синтеза АТФ добавление катализатора реакции отрыва H^+ -ионов от внешней межфазной границы замедляет скорость фосфорилирующего дыхания и, соответственно, процесс фосфорилирования. В разобщенных митохондриях катализатор напротив, ускоряет дыхание (рис.5). Как видно на схеме, различие между этими процессами заключается в том, что в разобщенных митохондриях (схема 1а) через межфазную границу (и мембрану) в матрикс переносится не гидратированный ион водорода ($H^+ \cdot nH_2O$), а его связанная форма – кислота Бренстеда (ТН), в которой протон соединен с гидрофобным анионом разобщителя (T^-). Трансмембранный перенос такой молекулы протекает быстро, поэтому протонный цикл в разобщенных митохондриях лимитирован только реакцией отрыва ионов водорода, неравновесно связанных на поверхности мембраны H^+ -ионов. В процессе фосфорилирования добавление катализатора переключает локальное сопряжение на трансмембранный перенос ионов водорода (схема 1б, тонкие линии), свойственный для делокализованного сопряжения. В этих условиях процесс переноса протона через межфазную границу и его встраивание в протонный канал АТФ-синтазы затруднен вследствие гидратации этого иона, поэтому скорость фосфорилирующего дыхания лимитирована стадией присоединения протона к мембране. Экспериментальной базой для этой модели явилось, таким образом, наблюдаемое изменение знака эффекта катализатора на скорость дыхания при переходе от разобщенного к

фосфорилирующему состоянию митохондрий (см. рис.5, рис.8, таб.1), а также эффект замедления скорости фосфорилирующего дыхания при повышении концентрации непроникающего катализатора реакции отрыва H^+ -ионов от поверхности внутренней мембраны (таб.1). Схемы 1 а,б основаны на двух положениях: 1) анион разобщителя (в разобщающих концентрациях) эффективно не взаимодействует с мембраносвязанными ионами водорода, он преимущественно взаимодействует со свободными H^+ -ионами в водной фазе. Это было показано ранее на модельной бислойной мембране и в настоящей работе на митохондриях (рис. 3 а,б, кривые 1,2). 2) Полярные молекулы непроникающего катализатора (NEPES) ускоряют только отрыв *неравновесно* связанных ионов водорода (рис.1, реакция 1) и не могут поэтому эффективно ускорять обратную реакцию, поскольку при этом должен происходить сдвиг влево равновесия реакции 1 на рис.1.

Рисунок 1 предполагает, что мембраносвязанные ионы водорода взаимодействуют с изотропной, равномерно заряженной поверхностью мембраны. В рамках такой модели уравнение свободной энергии мембраносвязанных ионов водорода (ΔE_{ox}) может быть записано в следующем виде:

$$\Delta E_{ox} = \Delta \mu H^+ + \Delta \mu H^+_{solv} \quad (1)$$

Существование сольватационной компоненты подчеркивает то обстоятельство, что в выбранных нами условиях, при локальном сопряжении, энергия окислительных реакций может запасаться не только в форме электрохимического потенциала ионов водорода, но также в качественно иной форме, в форме энергии сольватации H^+ -ионов.

Выводы:

1. Разработан метод регистрации неравновесных состояний ионов водорода, связанных с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий, которые возникают при трансмембранном переносе H^+ -ионов в условиях работы дыхательных протонных помп.
2. Обнаружено явление катализа реакции отрыва неравновесно связанных H^+ -ионов от внешней поверхности внутренней мембраны фосфорилирующих митохондрий.
3. Зарегистрировано образование неравновесных состояний ионов водорода, возникающих с внешней стороны мембраны митохондрий при трансмембранном переносе этих ионов в условиях окислительного фосфорилирования.

4. На разобщенных митохондриях получены доказательства того, что в присутствии разобщителя скорость дыхания лимитирована стадией отрыва ионов водорода от внешней поверхности внутренней мембраны.
5. Установлено, что ускорение реакции отрыва протонов от внешней поверхности мембраны митохондрий, приводящее к уменьшению объема фракции ионов водорода, неравновесно связанных с поверхностью мембраны замедляет скорость фосфорилирования, а также и снижает эффективность фосфорилирования (параметр АДФ/О, тем самым показано участие пула мембраносвязанных ионов водорода в процессе фосфорилирования).
6. Предложена конкретная модель локального сопряжения непротиворечиво объясняющая полученные в работе данные.

Основные результаты диссертационной работы Юркова В.И. изложены в следующих публикациях:

1. В.И. Юрков, М.С.Фадеева, Л.С. Ягужинский. Перенос протона через межфазные границы мембрана-вода в разобщенных митохондриях, (2005), Биохимия, 241-245
2. Solodovnikova IM, Iurkov VI, Ton'shin AA, Iaguzhinskii LS. Local coupling of respiration processes and phosphorylation in rat liver mitochondria Biofizika. 2004 Jan-Feb;49(1):47-56.
3. L.S. Yaguzhinsky, V.I. Yurkov, I.P.Krasinskaya. On the local coupling of respiration and phosphorylation in mitochondria, BBA. 2006, May-Jun;1757(5-6):408-14
4. V.I. Yurkov, M.S. Fadeeva. About proton transfer through interfaces of inner membrane of the uncoupled mitochondria. сборник тезисов докладов международной конференции "Российская биоэнергетика: от молекул к клетке ", Москва, МГУ, 2005 г. С.68
5. Юрков В.И., Ягужинский Л.С., Регистрация локального Н-градиента в условиях фосфорилирования на препаратах митохондрий с ковалентно присоединенным рН-зондом (ФИТЦ). Сборник тезисов докладов III съезд биофизиков России, Воронеж, 2004, с. 481