



УДК 576.311.347 : 543.422.27

ИССЛЕДОВАНИЕ СЕМИХИНОНА КОЭНЗИМА Q
В СУБМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЧАСТИЦАХ СЕРДЦА БЫКА
МЕТОДОМ ЭПР

Константинов А. А., Руге Э. К.

*Межфакультетская лаборатория им. А. Н. Белозерского
и физический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Предпринята попытка разделить сигналы ЭПР полувосстановленных форм флавинов и убихинона в СМЧ, используя различия в потенциалах полувосстановления этих компонентов дыхательной цепи. Обнаружено три типа свободнорадикальных сигналов в СМЧ сердца быка: 1) в СМЧ и митохондриях, восстановленных избытком субстрата (NADH, сукцинат), сигнал ЭПР ($S_{\text{фл}}$) шириной 12—15 Гс с характерными «затянутыми крыльями»; нечувствительный к ТТФА и этанолу и, вероятно, принадлежащий флавосемхинонам дегидрогеназ дыхательной цепи; 2) в СМЧ, уравновешенных с окислительно-восстановительным буфером сукцинат — фумарат при редоксипотенциале, близком к потенциалу полувосстановления коэнзима Q, более интенсивный узкий сигнал (9 ± 1 Гс), чувствительный к ТТФА, антимицину и этанолу (к последнему лишь при исследовании замороженных образцов). Предполагается, что он (S_{Q-1}) принадлежит семихинону Q, стабильная концентрация которого в данных условиях оценивается равной 0,001 нмоль/мг белка СМЧ; 3) в аэробной суспензии СМЧ в отсутствие добавленных субстратов дыхания сигнал S_{Q-2} шириной 10—11 Гс, чувствительный к этанолу и практически полностью подавляющийся ТТФА. Отличается от сигнала S_{Q-1} отсутствием насыщения при повышении уровня мощности сверхвысоких частот (вплоть до 200 мВт). Инкубация «окисленных» СМЧ с 1 мМ феррицианидом в значительной степени устраняет сигнал S_{Q-2} , а добавление к СМЧ сукцината сопровождается резким изменением релаксационных свойств свободнорадикального сигнала, так что сигнал S_{Q-2} заменяется сигналом S_{Q-1} . Постулируется, что аномальные релаксационные параметры сигнала S_{Q-2} обусловлены взаимодействием убисемхинона с компонентом дыхательной цепи, парамагнитным в окисленном состоянии. Высокий потенциал полувосстановления этого компонента и чувствительность сигнала S_{Q-2} к ТТФА позволяют предположить образование комплекса семихинона Q с высокопотенциальным железосульфопротендом сукцинатдегидрогеназы.

Роль коэнзима Q в работе дыхательной цепи митохондрий была предметом достаточно подробных исследований [1, 2]. Внимание исследователей, однако, было в основном направлено на реакции, протекающие при участии полностью восстановленной и окисленной форм этого дыхательного переносчика. Вместе с тем партнерами убихинона по дыхательной цепи являются цитохромы и негеминные железосульфопротениды, способные принимать и отдавать лишь один электрон [3]. В связи с этим обстоятельством возникновение полувосстановленной формы коэнзима Q

Сокращения: СМЧ — субмитохондриальные частицы, QH_2 , Q, Q' — восстановленная, окисленная и полувосстановленная формы убихинона, ТТФА — α -теноилтрифторацетон.

в ходе окислительно-восстановительных превращений этого двухвалентного переносчика не вызывает сомнений и постулировалось рядом авторов [4—6]. Представлениям о двухступенчатом окислении-восстановлении убихинона в дыхательной цепи митохондрий в последнее время уделяется значительное внимание. Существование в электрон-транспортной цепи двух самостоятельных реакций ($QH_2 \leftrightarrow Q^{\cdot}$ и $Q^{\cdot} \leftrightarrow Q$) привлечено для объяснения аномалий оксидоредукции цитохромов δ [4, 6—9], а в самое последнее время — для описания работы второго пункта энергетического сопряжения дыхательной цепи [7—9] в рамках хемисмотической концепции окислительного фосфорилирования.

Несмотря на интерес к роли семихинона Q , число экспериментальных работ, посвященных функционированию Q^{\cdot} , крайне невелико. Одна из возможных причин этого заключается в том, что семихинон Q весьма неустойчивое соединение, а концентрация его в биологических мембранах слишком низка, чтобы можно было следить за его превращениями в электрон-транспортной цепи препаративными или оптическими методами. Благоприятные возможности изучения Q^{\cdot} дает метод ЭПР. Создание высокочувствительных радиоспектрометров позволило вести наблюдения за свободнорадикальными состояниями, возникающими в дыхательной цепи [10—19]. Как правило, эти состояния приписывали семихинонам флавопротендов [11, 12]. В отдельных работах были получены указания, что заметный вклад в суммарный свободнорадикальный сигнал митохондрий [14], СМЧ [15] и бактерий [5] дает Q^{\cdot} , но разделения сигналов флаво- и убисемихинонов добиться не удавалось.

Регистрация спектров ЭПР митохондрий и СМЧ проводилась как при комнатной температуре, так и при замораживании образцов. Работа с замороженными препаратами позволяет в несколько раз увеличить объем образца и соответственно выиграть в чувствительности, а также дает возможность фиксировать интересующее функциональное состояние объекта. Вместе с тем при температуре жидкого азота и ниже, использовавшейся в прежних работах, наблюдение свободнорадикальных состояний дыхательной цепи было затруднено из-за наложения сигналов негеминовых железосульфопротендов и меди, а также вследствие насыщения свободнорадикальных сигналов на малом уровне мощности сверхвысоких частот. Избежать этих трудностей не удавалось даже в работах, специально направленных на исследование роли семихинонных форм дыхательных переносчиков [5, 15]. Большая же часть данных относительно сигнала ЭПР с $g \sim 2$, полученных в качестве «побочного продукта» исследований железо-серных центров дыхательной цепи (см., например, [20]), вряд ли может быть использована для описания функций свободнорадикальных состояний в электрон-транспортной цепи. В данной работе спектры ЭПР регистрировали при -30° . В этих условиях сигналы с $g \sim 2$ достаточно интенсивны и могут быть легко записаны при ненасыщающих уровнях мощности сверхвысоких частот. Вместе с тем при -30° негеминовые железосульфопротенды не дают заметного вклада в спектр ЭПР СМЧ вследствие сильной температурной зависимости релаксационных параметров их сигналов.

Значительный прогресс в изучении электрон-транспортной цепи был достигнут благодаря проведению экспериментов при контролируемом окислительно-восстановительном потенциале среды [3]. К сожалению, окислительно-восстановительные медиаторы, обычно используемые в потенциометрических титрованиях, мало пригодны для исследований свободнорадикальных состояний дыхательной цепи методом ЭПР, так как эти медиаторы дают тот или иной выход полувосстановленных семихинонных форм. Для уравнивания электрон-транспортной цепи СМЧ при определенном окислительно-восстановительном потенциале мы использовали два субстрата цикла Кребса: сукцинат и фумарат. Ранее было показано, что эта редоксипара (E_0' (рН 7) 24 мВ) быстро уравнивается с коэнзимом

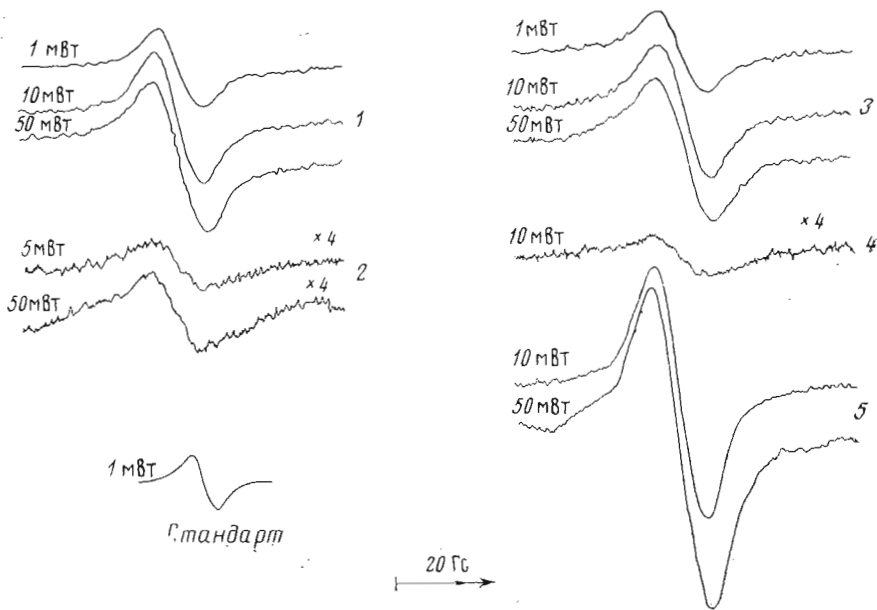


Рис. 1. Сигнал S_Q-1 в СМЧ, уравновешенных с редоксбуфером сукцинат — фумарат. СМЧ — 52 мг белка/мл в основной среде, дополненной в случае образцов 3—5 5 мМ цианидом. Образцы 1, 3 и 5 инкубировали с 5 мМ сукцинатом соответственно 5, 14 и 13 мин; спектры записаны при -30° . Спектры образцов 2 и 4 записаны при 24° через 10—15 мин после добавления 5 мМ сукцината. Спектр стандарта записан в условиях, идентичных спектрам 1, 3 и 5. Множители при спектрах 2 и 4 (а также на других рисунках) указывают усиление сигнала по отношению к стандарту

Q в СМЧ [21]; наблюдалась также определенная зависимость интенсивности свободнорадикального сигнала ЭПР в препаратах Кейлина — Хартри от соотношения концентраций [сукцинат] / [фумарат] [11].

Сочетание контролируемого окислительно-восстановительного потенциала с условиями ЭПР-спектроскопии, удобными для регистрации сигналов свободных радикалов, является существенным методическим моментом данной работы.

Свободнорадикальный сигнал в субмитохондриальных частицах, уравновешенных с окислительно-восстановительным буфером сукцинат — фумарат. К суспензии СМЧ в среде инкубации, содержащей 100 мМ фумарат, добавляли 5 мМ сукцинат и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение различных промежутков времени. В замороженных образцах наблюдался характерный свободнорадикальный сигнал ЭПР с $g \sim 2$ (рис. 1, 1), именуемый в дальнейшем S_Q-1 . Сигнал S_Q-1 практически симметричен и характеризуется расстоянием между экстремумами первой производной сигнала $\Delta H_M = 9 \pm 1$ Гс. Эти свойства S_Q-1 отличают его от свободнорадикальных сигналов флавинов и выделенных флавопротеидов ($\Delta H_M = 14-21$ Гс [22]), а также от слегка асимметричных сигналов с $g \approx 2$ и шириной 14—16 Гс, обычно наблюдававшихся в спектрах ЭПР митохондрий [14, 16—18].

Сигнал S_Q-1 легко насыщается при повышении мощности сверхвысоких частот (рис. 2, 1), но при мощностях < 5 мВт его величина пропорциональна амплитуде сверхвысоких частот в резонаторе, так что сигнал можно записать в ненасыщающих условиях.

Зависимость величины сигнала S_Q-1 от времени инкубации СМЧ с сукцинатом приведена на рис. 3, 2. После некоторого начального спада концентрация свободных радикалов в образце стабилизируется и сохраняется практически неизменной в течение 2 ч и более, соответствуя $\sim 0,6 \cdot 10^{13}$ спинов/мг белка СМЧ. При данном соотношении концентраций [сукцинат]/

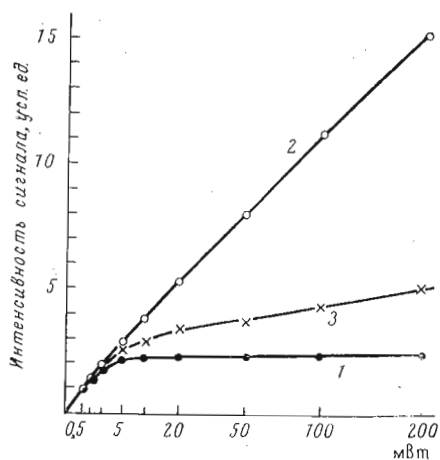


Рис. 2

Рис. 2. Релаксационные свойства различных свободнорадикальных сигналов в СМЧ. 1 — C_Q-1 ; 2 — C_Q-2 ; 3 — «смешанный» сигнал C_Q-1 и C_Q-2 . Объяснения в тексте. Кривые насыщения снимали при -30° . Амплитуду каждого из сигналов при мощности сверхвысоких частот 0,5 мВт условно принимали за единицу. Шкала оси абсцисс линейна относительно корня квадратного из мощности сверхвысоких частот

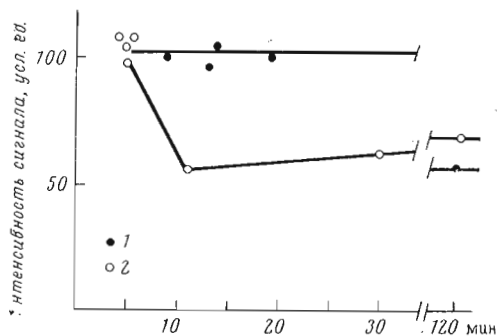


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость интенсивности сигнала C_Q-1 от времени инкубации СМЧ с сукцинатом. К суспензии СМЧ (52 мг белка/мл) в основной среде добавляли 5 мМ сукцинат и образцы инкубировали при комнатной температуре. 1 — в присутствии 5 мМ цианида, 2 — без цианида. Спектры ЭПР записывали при -30° , мощность сверхвысоких частот 10 мВт

[фумарат] указанная интенсивность сигнала хорошо воспроизводилась в опытах с несколькими препаратами СМЧ с содержанием белка от 25 до 52 мг/мл. Стабильность во времени и хорошая воспроизводимость позволяют предположить, что сигнал C_Q-1 соответствует равновесной концентрации семихинона Q, определяемой соотношением концентраций QH_2/Q в мембране СМЧ при данном редоксипотенциале пары сукцинат — фумарат и константой равновесия реакции диспропорционирования убихинона:



Сигнал C_Q-1 можно наблюдать и при комнатной температуре, не прибегая к замораживанию образца (рис. 1, 2); при этом ширина сигнала и его интенсивность в расчете на 1 мг белка СМЧ соответствуют наблюдающимся при анализе замороженного образца. Замораживание, таким образом, не вносит существенных искажений в оценку концентрации убисемихинона.

Влияние ингибиторов дыхательной цепи на сигнал C_Q-1 . Стабильный сигнал ЭПР C_Q-1 можно наблюдать не только в анаэробных условиях (в концентрированных суспензиях СМЧ истощение кислорода происходит практически мгновенно после добавления сукцината), но и в СМЧ, аэробно уравновешенных с редоксипарой сукцинат — фумарат в присутствии 5 мМ HCN (рис. 1, 3, 4). Регистрируемая при этом интенсивность сигнала C_Q-1 после 10—20-минутной инкубации частиц с сукцинатом, как правило, соответствовала величине сигнала, наблюдавшейся в первые минуты инкубации в анаэробных условиях (ср. 3 и 1 на рис. 1; рис. 3). При длительном стоянии образцов происходит уменьшение сигнала C_Q-1 до равновесного «анаэробного» уровня, что, возможно, обусловлено истощением кислорода в суспензии частиц за счет небольшого остаточного дыхания (5 мМ HCN ингибирует дыхание СМЧ на 98—99% [23]).

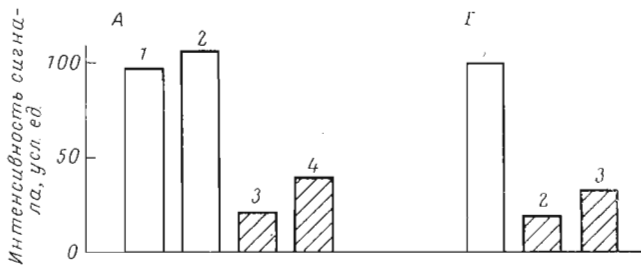


Рис. 4. Влияние ТТФА на интенсивность сигнала C_Q-1 в СМЧ. СМЧ (52 мг белка/мл) суспендировали в основной среде в отсутствие (А) или в присутствии (Б) 5 мМ цианида. Образцы инкубировали при комнатной температуре в следующих условиях: А. 1 — 5 мин с сукцинатом; 2 — 5 мин с диметилсульфоксидом и сукцинатом; 3 — 5 мин с ТТФА и сукцинатом; 4 — 30 мин с ТТФА и сукцинатом; Б. 1 — 10 мин с сукцинатом; 2 — 10 мин с сукцинатом + 30 сек с ТТФА; 3 — 10 мин с сукцинатом + 5 мин с ТТФА. Концентрации добавок: сукцинат — 5 мМ, ТТФА — 5 мМ, диметилсульфоксид — 1% по объему. Спектры записывали при -30° , мощность сверхвысоких частот 10 мВт

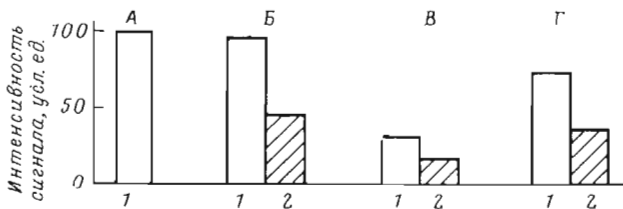


Рис. 5. Влияние антимицина на интенсивность сигнала C_Q-1 в СМЧ. СМЧ (52 мг белка/мл) суспендировали в основной среде, дополненной 5 мМ цианидом. После 17 мин инкубации при комнатной температуре с 5 мМ сукцинатом (А) к частицам добавляли 2 мкг/мг белка антимицина (1) либо равный объем диметилсульфоксида (2) и образцы сразу замораживали (Б), инкубировали 2 ч в анаэробных условиях (вакуум, аргон) (В) и в конце анаэробной инкубации аэрировали (Г). Спектры записывали при -30° , мощность сверхвысоких частот 10 мВт

Иногда в СМЧ, аэробно инкубированных с сукцинатом и фумаратом в присутствии цианида, обнаруживается сигнал существенно большей амплитуды (рис. 1, 5), особенно при использовании мощности сверхвысоких частот, превышающей 10 мВт. Релаксационные свойства подобного сигнала (рис. 2, 3) всегда носили промежуточный характер между C_Q-1 и C_Q-2 . Можно полагать, что в этом случае заметный вклад в наблюдаемый спектр ЭПР наряду с C_Q-1 давал «аномальный» сигнал C_Q-2 [24].

При исследовании влияния на свободнорадикальный сигнал C_Q-1 ТТФА и антимицина было показано, что ТТФА, добавленный к СМЧ как до, так и после сукцината в присутствии и в отсутствие цианида (рис. 4), сильно уменьшает интенсивность сигнала C_Q-1 . Этот факт согласуется с наблюдениями Райхмана и Блюменфельда [14], показавших, что чувствительность к этому ингибитору части суммарного свободнорадикального сигнала в митохондриях исчезает после экстракции убихинона. Снижение интенсивности сигнала C_Q-1 под влиянием ТТФА проявлялось наиболее четко, если образец замораживали после непродолжительной инкубации СМЧ с сукцинатом и ингибитором (рис. 4А, 3 и 4Б, 2). Остаточный сигнал ЭПР с $g \sim 2$ в этих условиях характеризовался большей шириной ($\Delta H_M \approx 13$ Гс) и, возможно, обусловлен в основном небольшим вкладом в сигнал C_Q-1 флавосемихинона сукцинатдегидрогеназы. Дальнейшая инкубация СМЧ с субстратом и ингибитором сопровождалась примерно двукратным увеличением интенсивности сигнала C_Q-1 (рис. 4А, 4 и 4Б, 3). Можно предположить, что в аэробных условиях ТТФА, с одной стороны, предотвращает восстановление (рис. 4А, 3) либо вызывает временное окисление (рис. 4Б, 2) дыхательных переносчиков, в том числе убихинона, по

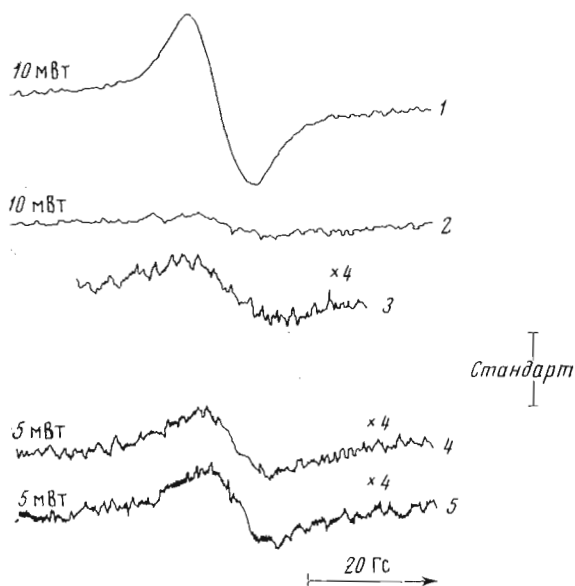


Рис. 6. Влияние этанола на сигнал S_{Q-1} в СМЧ. 1 — СМЧ (52 мг белка/мл) суспендировали в основной среде и инкубировали 5 мин с 5 мМ сукцинатом; 2 — то же в присутствии 1% этанола; 3 — спектр 2 при большем усилении. Спектры 1–3 записаны при -30° . 4 — СМЧ (43 мг белка/мл), спектр записан при 24° после 10 мин инкубации с 5 мМ сукцинатом; 5 — как 4, но в присутствии 1% этанола

кислородную сторону точки ингибирования и этот эффект на сигнал S_{Q-1} обращается при последующей инкубации (рис. 4А, 4 и 4Б, 3). С другой стороны, ингибитор может уменьшать стабильность убисемикхинона в мембране СМЧ, например вытесняя его из комплекса с негеминовым железосульфопротеидом сукцинатдегидрогеназы, и тем самым обуславливать снижение равновесной концентрации Q^* , необратимое во времени.

Антимицин влиял на амплитуду сигнала S_{Q-1} в меньшей степени, чем ТТФА (рис. 5). Во всех опытах этот ингибитор переноса электронов вызывал не более чем двукратное уменьшение величины свободнорадикального сигнала в СМЧ. Интересно, что эффект антимицина на сигнал S_{Q-1} не зависел от присутствия кислорода в суспензии СМЧ, тогда как наблюдавшееся в тех же условиях увеличение равновесной степени восстановленности цитохромов \bar{b} при добавлении антимицина происходило, в соответствии с литературными данными [6], лишь в среде, содержащей кислород (не показано). Таким образом, наши результаты не согласуются с гипотезой Викстрема и Бердена [6], согласно которой избыточное восстановление цитохромов \bar{b} дыхательной цепи в присутствии антимицина объясняется аэробным окислением семикхинона Q , являющегося в этих условиях единственным акцептором электронов для цитохромов \bar{b} .

В ходе экспериментов выяснилось (рис. 6, 1–3), что этиловый спирт, часто используемый в качестве растворителя для таких ингибиторов окислительного фосфорилирования, как антимицин и ТТФА, вызывает в концентрации 1 : 100 по объему практически полное исчезновение сигнала S_{Q-1} (остаточный сигнал по ширине и форме напоминает сигналы флавопротеидов), практически не влияя, как будет показано далее, на свободнорадикальный сигнал флавосемикхинонов дыхательной цепи СМЧ. Оказалось, что эффект этилового спирта проявляется лишь при исследовании спектров ЭПР замороженных образцов и не наблюдается при комнатной температуре (рис. 6, 4 и 5). Возможно, органический растворитель влияет на ход процессов, протекающих в мембране и примембранном слое при замораживании, от которых может сильно зависеть стабильность «раство-

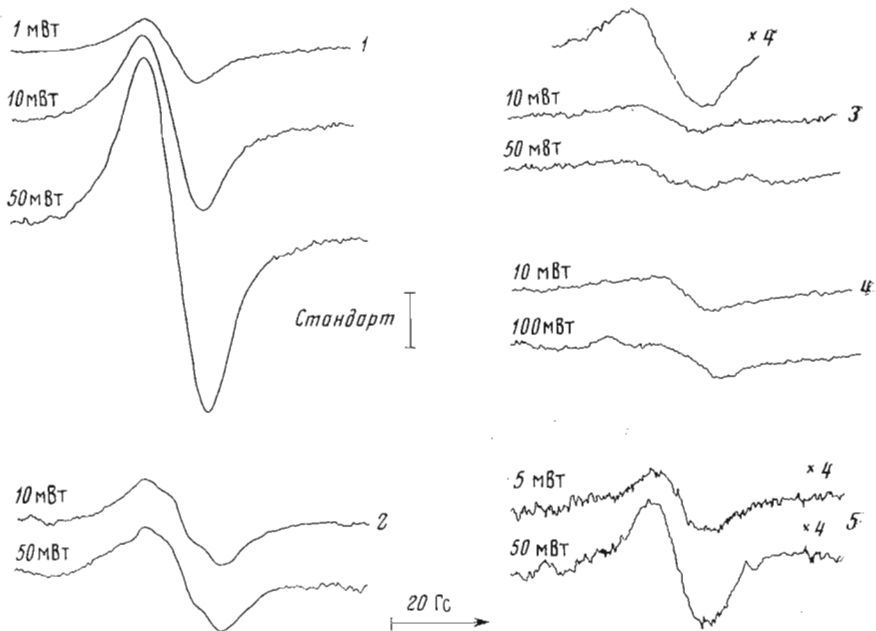


Рис. 7. Сигнал C_Q-2 , наблюдающийся в СМЧ в отсутствие субстратов дыхания. СМЧ (52 мг белка/мл, основная среда) инкубировали при комнатной температуре 6—10 мин. 1 — без добавлений, 2 — 1 мМ феррицианид, 3 — 5 мМ ТТФА, 4 — 1% по объему этанол, 5 — без добавлений (СМЧ 43 мг белка/мл, среда инкубации с 20 мМ фумаратом). Спектры 1—4 записаны при -30° , спектр 5 — при 24°

ренного» в мембране семихинона Q, но в меньшей степени стабильность прочно связанных с белками флаво семихинонов. Независимо от причин эффекта применение этанола может быть полезным для разделения сигналов ЭПР флаво- и убисемихинонов в электрон-транспортной цепи, но, очевидно, этиловый спирт не следует использовать в качестве растворителя для реактивов при работе с замороженными образцами. В дальнейшем мы использовали растворы антимицина и ТТФА в диметилсульфоксиде, который не оказывал существенного влияния на свободнорадикальные сигналы ЭПР в СМЧ.

Свободнорадикальный сигнал в окисленных СМЧ. В СМЧ, аэробно суспендированных в фумаратсодержащей среде инкубации в отсутствие сукцината, был обнаружен сигнал ЭПР с $g \approx 2$ (рис. 7, 1, 5), по форме и ширине близкий к сигналу C_Q-1 , но с существенно отличающимися релаксационными параметрами (ср. кривые 2 и 1 на рис. 2). Интенсивность этого сигнала, названного нами C_Q-2 [24], в различных экспериментах варьировала, составляя, как правило, $\sim 10^{13}$ спинов/мг белка СМЧ. Как видно из рис. 7 и 2, характерной чертой сигнала C_Q-2 является отсутствие насыщения при мощности сверхвысоких частот вплоть до 200 мВт. В отсутствие экзогенных восстановителей сигнал C_Q-2 относительно стабилен. Антимицин (2 мкг/мг белка) и малонат (40 мМ) не оказывали существенного влияния на интенсивность и не изменяли релаксационных свойств этого сигнала, тогда как ТТФА вызывал практически полное его исчезновение (рис. 7, 3). Более глубокое окисление СМЧ феррицианидом сопровождалось значительным снижением интенсивности свободнорадикального сигнала в «окисленных» СМЧ с одновременным изменением его ширины, формы и релаксационных свойств (рис. 7, 2). Так же как и C_Q-1 , сигнал C_Q-2 практически полностью ингибировался этанолом при исследовании образцов в замороженном состоянии (рис. 7, 4). Добавление сукцината к окисленным СМЧ сопровождалось сильным изменением релаксацион-

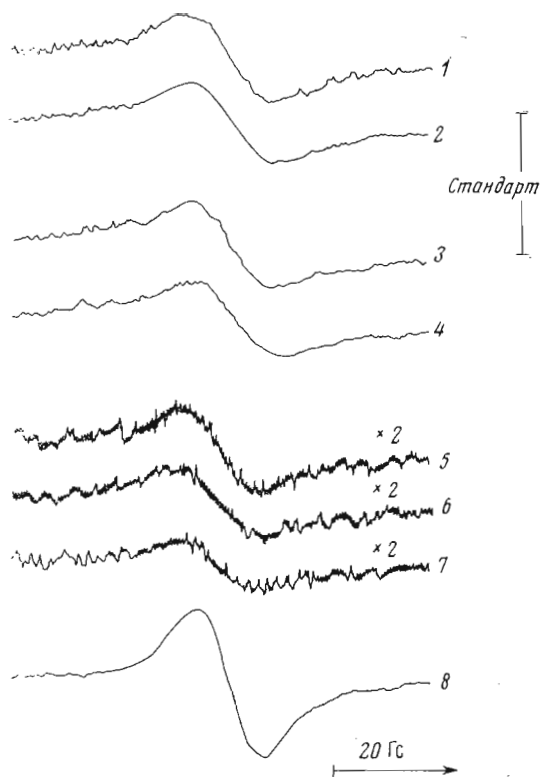


Рис. 8. Сигналы ЭПР с $g \approx 2$ в СМЧ и митохондриях, восстановленных избытком субстрата в отсутствие фумарата. 1 — митохондрии (70 мг белка/мл), 2,5 мМ сукцинат, 8 мМ глутамат, 4 мМ малат, 1,2 мМ NADH, инкубация 6 мин; 2 — то же в присутствии 1% этанола; 3 — СМЧ (54 мг белка/мл), 16 мМ сукцинат, 1,6 мМ NADH, инкубация 10 мин; 4 — то же в присутствии 1% этанола; 5 — СМЧ (36 мг белка/мл), 40 мМ сукцинат, инкубация 5 мин; 6 — то же, что и 5, но в присутствии 1% этанола; 7 — то же, что и 5, но в присутствии 5 мМ ТТФА; 8 — для сравнения приведен сигнал S_{Q-1} : СМЧ (43 мг белка/мл) в среде инкубации с 20 мМ фумаратом, 2,5 мМ сукцинат, инкубация 20 мин. Все спектры записаны при -30° , мощность сверхвысоких частот 1 мВт. Среда инкубации образцов 1—7 содержала 0,25 М сахарозу, 50 мМ НЕРЕС-буфер, рН 7,5

ных параметров свободнорадикального сигнала, и вместо сигнала S_{Q-2} появлялся сигнал S_{Q-1} .

Свободнорадикальные сигналы в СМЧ, восстановленных избытком субстрата в отсутствие фумарата. Свойства сигналов S_{Q-1} и S_{Q-2} указывали на то, что они принадлежат скорее Q^\cdot , чем семихинонам флавинов дыхательной цепи. Для сравнения представлялось интересным исследовать характеристики свободнорадикальных состояний электрон-транспортной цепи в условиях, благоприятствующих восстановлению флавопротеидов. На рис. 8 приведены спектры ЭПР митохондрий и СМЧ, восстановленных различными субстратами в среде, не содержащей фумарата. Наблюдающиеся сигналы ЭПР с $g \sim 2$ характеризуются типичной для флавопротеидов шириной 12—16 Гс и отличаются по форме от сигналов S_{Q-1} и S_{Q-2} (заметны некоторая асимметричность, «затянутые крылья», не наблюдающиеся для сигналов убисемихинона). В присутствии NADH этанол (рис. 8, 2, 4) и ТТФА (не показано) не оказывают заметного влияния на сигналы ЭПР флавосемихинонов дыхательной цепи. В СМЧ, восстановленных избытком сукцината, часть свободнорадикального сигнала проявляет чувствительность к спирту и ТТФА (рис. 8, 5—7), что согласуется с данными Бэкстрема и др. [15], наблюдавших в близких экспериментальных условиях примерно двукратное уменьшение интенсивности сигнала ЭПР с $g \sim 2$ в СМЧ после экстракции убихинона.

Прежде чем перейти к обсуждению результатов, следует отметить, что основная задача настоящей работы заключалась в подборе условий, позволяющих выявить сигнал ЭПР семихинона Q, и в исследовании некоторых его характеристик. Поскольку в состав электрон-транспортной цепи митохондрий входит ряд флавопротеидов, также способных в определенных условиях давать сигнал с $g \sim 2$, мы прежде всего пытались различить в спектрах ЭПР сигналы уби- и флавосемихинонов.

Имеется ряд оснований полагать, что наблюдавшийся нами сигнал S_{Q-1} принадлежит семихинону Q.

1. Ширина сигнала S_{Q-1} составляет 9 ± 1 Гс, тогда как наименьшая ширина сигнала полувосстановленных флавопротеидов равна 12 Гс в случае сукцинатдегидрогеназы [25] и 14—15 Гс для депротонированных форм прочих изученных флавиновых ферментов [22]. Полученные нами результаты согласуются с данными Бэкстрема и др. [15], показавших, что свободнорадикальный сигнал ЭПР в восстановленных сукцинатом СМЧ, из которых был экстрагирован коэнзим Q, имеет ширину 12 Гс в отличие от сигнала шириной 10 Гс, наблюдавшегося в исходных и реконструированных частицах.

2. Низкие соотношения концентраций [сукцинат]/[фумарат], использованные в наших опытах ($E = 35$ мВ), оптимальны для образования полувосстановленной формы убихинона (E_0' (рН 7,5) пары $QH_2/Q = 35$ мВ [21]), но неблагоприятны с термодинамической точки зрения для восстановления флавопротеидов дыхательной цепи, характеризующихся отрицательными потенциалами полувосстановления (-40 мВ для FAD сукцинатдегидрогеназы [26], ≈ -300 мВ для FMN NADH-дегидрогеназы). Так, равновесная концентрация семихинона FAD сукцинатдегидрогеназы снижается при отношении [сукцинат]/[фумарат] < 2 [27], в то время как для наблюдения сигнала S_{Q-1} нами были использованы отношения концентраций [сукцинат]/[фумарат] $\leq 0,05$. В ранних исследованиях Холлохера и Коммонера [11] было также показано, что при титровании редоксипарой сукцинат — фумарат максимальная величина свободнорадикального сигнала в мышечном препарате Кейлина — Хартри наблюдается при существенно более высоком редоксипотенциале, чем при титровании выделенной сукцинатдегидрогеназы, не содержащей коэнзима Q.

3. Сигнал S_{Q-1} полностью исчезал в присутствии этанола (при измерениях с замораживанием образцов), а также демонстрировал значительную чувствительность к ТТФА, тогда как ни один из этих агентов не оказывал заметного влияния на спектры ЭПР СМЧ, восстановленных избытком сукцината + NADH в отсутствие фумарата, т. е. в условиях преимущественного вклада в свободнорадикальный сигнал флавосемихинонов. Известно, что ТТФА не угнетает свободнорадикальный сигнал ЭПР FAD сукцинатдегидрогеназы [28].

Таким образом, все указанные свойства сигнала S_{Q-1} (симметричная форма и малая ширина, высокий редоксипотенциал, специфическая чувствительность к ТТФА и спирту) отличают его от сигналов флавосемихинонов, S_{fl} . Нам представляется наиболее вероятным, что сигнал S_{Q-1} принадлежит семихиноновой форме коэнзима Q.

Сравнение сигнала S_{Q-1} , записанного в условиях ненасыщающей мощности сверхвысоких частот со спектром стандарта «weak pitch» позволяет оценить «равновесную» концентрацию семихинона Q в СМЧ равной $\sim 0,01$ нмоль/мг белка. Это значение находится в соответствии с результатами исследований Холлохера и Коммонера [11]. Вместе с тем, по данным Бэкстрема и др. [15], концентрация Q' в СМЧ, восстановленных сукцинатом или NADH в присутствии цианида, на порядок больше. Авторы последней работы проводили измерения при температуре жидкого азота в условиях значительного насыщения сигналов ЭПР свободнорадикальной природы и наложения сигналов негеминных железосульфопропротеидов. Данное обстоятельство должно было значительно затруднить количест-

венную интерпретацию спектров. Кроме того, по нашим наблюдениям, кратковременная инкубация СМЧ с субстратом окисления в присутствии цианида (условия, как в работе [15]) сопровождается появлением сигнала с $g \sim 2$, величина которого при высоких мощностях сверхвысоких частот намного превышает величину «равновесного» сигнала S_Q-1 , наблюдаемого при более длительной инкубации или при кратковременной инкубации в отсутствие цианида. Этот эффект в значительной степени обусловлен вкладом в суммарное поглощение «аномального» сигнала S_Q-2 [24]. Поскольку сигналы S_Q-1 и S_Q-2 имеют существенно различающиеся релаксационные параметры, количественная оценка их вкладов в суммарный сигнал и абсолютных концентраций требует подробного анализа релаксационных характеристик, который не проводился Бэкстремом и др. [15].

Интересно отметить, что «равновесная» концентрация Q^* в СМЧ оказывается значительно меньшей, чем концентрация ряда компонентов дыхательной цепи, таких, как сукцинатдегидрогеназа, цитохромы b и c_1 (соответственно 0,2; 0,8 и 0,3 нмоль/мг белка, [29]), в отношении которых семихинон Q является субстратом или продуктом катализируемой реакции. Это означает, что в мембране митохондрий практически весь семихинон Q может находиться в связанном виде в местах своего образования и использования в отличие от окисленной и полностью восстановленной форм коэнзима Q , которые присутствуют в избытке над другими компонентами дыхательной цепи и, как полагают, свободно «плавают» в мембране [1], обеспечивая связь между различными дыхательными ансамблями.

Отдельного обсуждения заслуживает, с нашей точки зрения, «аномальный» свободнорадикальный сигнал S_Q-2 [24], который наиболее отчетливо выявляется в СМЧ в отсутствие субстрата окисления. Малая ширина, чувствительность к этанолу и ТТФА и высокий редоксипотенциал показывают, что, как и S_Q-1 , сигнал S_Q-2 принадлежит семихинону Q , отличаясь от S_Q-1 рядом особенностей, и в первую очередь релаксационными параметрами. Отсутствие насыщения сигнала S_Q-2 с ростом мощности сверхвысоких частот (вплоть до 200 мВт) аномально для свободных радикалов и может служить указанием на существование сильного взаимодействия между Q^* и каким-то парамагнитным центром. Сходная зависимость величины свободнорадикального сигнала от мощности сверхвысоких частот наблюдается, например, для флаво семихинона из *Azotobacter vinelandii* при добавлении в среду инкубации парамагнитных ионов Ni^{2+} [30]. Эффекты такого рода могут объясняться, в частности, быстрой обратимой реакцией комплексообразования между Q^* и парамагнитным металлом либо образованием комплекса диамагнитного металла с несколькими свободнорадикальными молекулами, так что реализуется взаимодействие $Q^* - Q$ [30].

Поскольку сигнал S_Q-2 весьма устойчив в окисленных СМЧ, но исчезает при добавлении к частицам первых порций сукцината (в присутствии 100 мМ fumarата), представляется вероятным, что в образовании подобных комплексов принимает участие окисленная форма дыхательного переносчика, обладающего достаточно высоким потенциалом полувосстановления (>70 мВ). Компонентом электрон-транспортной цепи, парамагнитным в окисленном состоянии, является высокопотенциальный железосульфопроteid (HiPIP) сукцинатдегидрогеназы [31] (центр S-3 [32]). Имеются указания, что именно этот негеминовый железосульфопроteid отвечает за восстановление сукцинатдегидрогеназой коэнзима Q [33]. Обращает на себя внимание специфическая чувствительность сигнала S_Q-2 к ингибитору этой реакции ТТФА, образующему, как принято считать, комплекс с негеминовым железосульфопротеидом сукцинатдегидрогеназы. Основываясь на этих соображениях, можно предположить, что «аномальный» сигнал S_Q-2 принадлежит фракции семихинона Q , образующей комплекс с окисленной формой центра S-3 сукцинатдегидрогеназы.

В условиях, близких к тем, в которых нами обнаруживался сигнал S_Q-2 , Байнерт [34], Ружичка и др. [35], а также Ингльдю и Овиши [33]

наблюдали расщепление сигнала ЭПР окисленного высокопотенциального негеминового железосульфопротеида сукцинатдегидрогеназы, которое было приписано взаимодействию центра S-3 с семихиноном Q. Результаты более поздних расчетов [35] показали, что «спутники» сигнала ЭПР центра S-3 могут быть также объяснены взаимодействием двух близкорасположенных свободных радикалов, например двух молекул Q[•], осуществление контакта между которыми происходит при участии окисленного высокопотенциального негеминового железосульфопротеида. Независимо от того, какое из этих объяснений верно, результаты, полученные нами, свидетельствуют в пользу существования комплекса между семихиноном Q и окисленным высокопотенциальным железосульфопротеидом сукцинатдегидрогеназы.

Экспериментальная часть

СМЧ выделяли из митохондрий сердца быка [36] в отсутствие марганца, следы которого значительно затрудняют измерения. Выделенные частицы промывали и суспендировали в основной среде инкубации, содержащей 100 мМ фумарат калия (Merck, ФРГ), 50 мМ НЕРЕС-буфер (Sigma, США), рН 7,5, и 2 мМ NAD⁺ (Reanal, Венгрия). Содержание белка определяли биуретовым методом.

К суспензии СМЧ, помещенной на лед, добавляли соответствующие реагенты, после чего реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение необходимого времени. После инкубации образцы объемом 0,30 мл помещали в кварцевые ампулы диаметром 3 мм и замораживали в жидком азоте. Для анаэробной инкубации частиц использовали специальные ампулы, снабженные переходным шлифом, позволяющим подсоединение вакуумного насоса и резервуара с аргоном. Спектры ЭПР замороженных образцов записывали при -30° в радиоспектрометре E-4 фирмы Varian (США), оборудованном термоприставкой. Для регистрации спектров СМЧ при комнатной температуре использовали плоскую кварцевую кювету с рабочим объемом 0,02 мл. Концентрацию неспаренных электронов в образцах оценивали, сравнивая их спектры ЭПР, записанные в условиях ненасыщающей мощности сверхвысоких частот, со спектром стандарта «weak pitch». Мощность сверхвысоких частот варьировали от 0,5 до 200 мВт, амплитуда высокочастотной модуляции (100 кГц) равна 2 (или 4) Гс, диапазон развертки магнитного поля 200 Гс, длительность развертки 8 мин при постоянной времени прибора 0,3 или 1,0 с. Усиление составляло $2,5 \cdot 10^3$ для замороженных образцов и $1 \cdot 10^4$ для измерений при комнатной температуре.

Среды выделения и инкубации готовили, используя дважды перегнанную из стекла воду. Антимидин (Serva, reinst, ФРГ) и ТТФА (BDH, Англия) использовали в виде растворов в перегнанном диметилсульфоксиде.

Авторы благодарны И. В. Григолаве, Ю. А. Каменскому, К. Ф. Субчинскому и А. Н. Тихонову за помощь в некоторых экспериментах, проф. В. П. Скулачеву и Л. С. Ягужинскому за полезные замечания, сделанные в ходе обсуждения результатов и при чтении рукописи статьи, а также проф. Л. А. Блюменфельду за постоянный интерес к этой работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kroger A., Klingenberg M. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 358—368.
2. Norling B., Glazek E., Nelson B. D., Ernster L. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **47**, 358—368.
3. Dutton P. L., Wilson D. F. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **346**, 165—212.
4. Baum H., Rieske J. S., Silman M. J., Lipton S. H. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 798—805.

5. Hamilton J. A., Cox G. B., Looney F. D., Gibson F. (1970) *Biochem. J.*, **116**, 319—320.
6. Wikström M. K. F., Berden J. A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **283**, 403—420.
7. Mitchell P. (1975) *FEBS Lett.*, **56**, 1—6.
8. Mitchell P. (1975) *FEBS Lett.*, **59**, 137—139.
9. Mitchell P. (1975) in *Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation* (Quagliariello E. et al., eds.), pp. 305—315, Amsterdam.
10. Commoner B., Hollocher T. (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **46**, 405—416.
11. Hollocher T., Commoner B. (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **46**, 416—427.
12. Beinert H., Sands R. H. (1960) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **3**, 41—46.
13. Sands R. H., Beinert H. (1960) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **3**, 47—52.
14. Райхман Л. М., Блюмфельд Л. А. (1967) *Биохимия*, **32**, 388—397.
15. Bäckström D., Norling B., Ehrenberg A., Ernster L. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **197**, 108—114.
16. Waldschmidt M., Mönig H., Schole J. (1968) *Z. Naturforsch.*, **23b**, 798—803.
17. Рууге Э. К. (1966) Канд. дис. «Исследование свободнорадикальных состояний клетки, субклеточных фракций и модельной системы аскорбиновая кислота — белок», МГУ.
18. Бржезская О. П., Каюлин Л. П., Кондрашова М. Н., Педелина О. С., Шекшеев Э. М. (1966) *Биофизика*, **11**, 1076—1082.
19. Чумаков В. М., Калинин Л. П., Калмансон А. Э. (1966) *Биофизика*, **11**, 910—913.
20. Lee J. Y., Slater E. C. (1974) in *Dynamics of Energy Transducing Membranes* (Ernster L. et al., eds.), pp. 61—75, Elsevier, Amsterdam.
21. Urban P. F., Klingenberg M. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **9**, 519—525.
22. Palmer G., Müller F., Massey V. (1971) in *Flavins and Flavoproteins* (Kamin H., ed.), pp. 123—140, Univ. Park Press, Baltimore.
23. Slater E. C. (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, 48—57.
24. Рууге Э. К., Константинов А. А. (1976) *Биофизика*, **21**, 586—588.
25. *Flavins and Flavoproteins* (1971) (Kamin H., ed.), General Discussion, p. 682, University Park Press, Baltimore.
26. Ereńska M., Wilson D. F., Mukai T., Chance B. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **41**, 386—391.
27. Hollocher T., Commoner B. (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **47**, 1355—1374.
28. Beinert H., Ackrell B. A., Kearney E. B., Singer T. P. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 185—194.
29. Green D. E., Wharton D. C. (1963) *Biochem. Z.*, **338**, 335—348.
30. Palmer G., Beinert H. (1965) *Adv. Enzymol.*, **27**, 105—198.
31. Ruzicka F. J., Beinert H. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **58**, 556—563.
32. Ingledew W. J., Ohnishi T. (1975) *FEBS Lett.*, **54**, 167—171.
33. Ackrell B. A. C., Kearney E. B., Mowery P. C., Singer T. P., Beinert H., Vinogradov A. D., White C. A. (1977) in *Iron and Copper Proteins* (Yasunoba K., ed.), Plenum Press, N. Y.
34. Beinert H. (1974) *Int. Conf. Magn. Resonance Biol. Syst.* 6-th, Kanderstag, Switzerland, Abstract c4.
35. Ruzicka F. J., Beinert H., Schepler K. L., Dunham W. R., Sands R. H. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2886—2890.
36. Beyer R. E. (1967) *Meth. Enzymol.*, **10**, 186—194.

Поступила в редакцию
27.X.1976.

ESR STUDIES OF THE COENZYME Q SEMIQUINONE IN SUBMITOCHONDRIAL PARTICLES FROM BEEF HEART

KONSTANTINOV A. A., RUUGE E. K.

A. N. Belozersky Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology, and Department of Physics, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The difference in the midpoint potentials of ubiquinone and flavoproteins was used to resolve the ESR signal of ubisemiquinone from that of flavosemiquinones in the respiratory chain. Three types of the free radical signals were found in beef heart submitochondrial particles (SMP). 1. In SMP and mitochondria reduced by the excess of substrate (NADH, succinate) the ESR signal is observed (S_{FI}) with a width of 12-15 gs. characteristic of flavosemiquinones, and typical «extended wings». S_{FI} is insensitive to α -thenoyltrifluoroacetone (TTFA) and ethanol and seems to belong to the flavosemiqui-

ones of the respiratory chain dehydrogenases. 2. In SMP poised with the succinate/fumarate redox buffer at a potential close to the midpoint potential of Coenzyme Q, the signal (S_Q-1) is found which is more narrow and intensive ($\Delta H = 9 \pm 1$ gs) and exhibits sensitivity to TTFA, antimycin and ethanol (to the latter in the frozen samples only). The signal is ascribed to semiquinone Q and may account for the «equilibrium» concentration of ubisemiquinone of approximately 1 pmol/mg protein. 3. The third type of the free radical signal, denoted as S_Q-2 , can be discovered in the suspension of SMP aerobically oxidized in the absence of added substrates. S_Q-2 has a width of 10-11 gs, is sensitive to ethanol and is completely suppressed by TTFA. The distinctive feature of S_Q-2 is that it cannot be saturated with microwave power up to 200 mW. Incubation of the «oxidized» SMP with 1 mM ferricyanide greatly abolishes S_Q-2 . Upon succinate addition to the aerobically oxidized SMP the free radical signal relaxation properties are drastically changed, so that S_Q-2 is replaced by S_Q-1 . The anomalous saturation behaviour of S_Q-2 is postulated to arise from the ubiquinone interaction with a respiratory component paramagnetic in the oxidized state. High midpoint potential of this component and S_Q-2 sensitivity to TTFA are consistent with the ubisemiquinone complex formation with the high potential iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase.
