

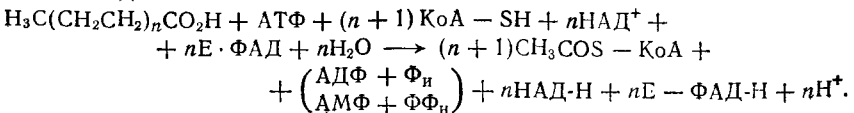
СОПРЯЖЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ

§ 6.1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

Биоэнергетические процессы, приводящие к синтезу АТФ, к зарядке «биологических аккумуляторов», протекают в специализированных мембранах митохондрий. Именно здесь локализованы и пространственно организованы молекулярные системы, ответственные за энергетику живых организмов. Синтез АТФ в митохондриях сопряжен с электронным и ионным транспортом и с механохимическими явлениями. Функции митохондриальных мембран весьма сложны и многообразны. Другой тип биоэнергетических сопрягающих мембран — мембраны хлоропластов растений, ответственные за фотосинтез, — рассматривается в гл. 7.

Источником энергии, расходуемой клеткой на биосинтез, активный транспорт, механическую и электрическую работу, является дыхание, т. е. окисление органических соединений кислородом воздуха. В 1780 г. Лавуазье показал, что дыхание и горение имеют единую природу. За последующие почти два столетия исследования химиков, биологов и физиков привели к раскрытию основных особенностей биологического окисления — одного из важнейших процессов (или, скорее, системы процессов), происходящих в живой природе.

Топливо, т. е. окисляемые вещества, поступает в организм животного с пищей в виде жиров, углеводов и белков. Жиры представляют собой триглицериды жирных кислот, главным образом многоатомных. Они расщепляются, т. е. гидролизуются в реакциях, катализируемых специальными ферментами. Жирные кислоты активируются с участием специфических ферментов и АТФ, превращаясь в ацилпроизводные так называемого кофермента А, КоА — SH, структура которого показана на рис. 6.1. Окисление ацилпроизводного КоА — SH происходит в ряде стадий, на каждой из которых образуется остаток жирной кислоты, содержащий на два атома углерода меньше, чем предыдущий [1, 2]. Полное уравнение реакции окисления жирной кислоты с четным числом атомов углерода до ацетил-S — КоА имеет вид



Здесь НАД — кофермент никотинамидениндинуклеотид (рис. 6.2), Е — фермент, ФАД — кофермент флавинадениндинуклеотид

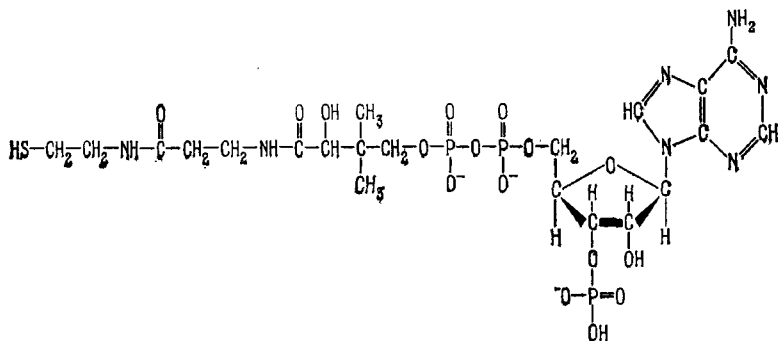


Рис. 6.1. Кофермент А.

(рис. 6.3), АДФ и АМФ — аденозиндифосфат и аденозинмонофосфат, F_n , F_nH — неорганические моно- и дифосфаты. Обратим внимание попутно на общность строения АТФ, КоА—SH, НАД и ФАД (см. [3], гл. 2). При разрушении жиров в конечном счете образуется ацетил-КоА, а также пропионил-КоА и глицерин.

Расщепление и окисление углеводов (в частности, крахмала) приводит к образованию триозофосфатов и пировиноградной кислоты (пирувата).

При разрушении белков, наряду с индивидуальными аминокислотами, используемыми в синтезе белков *de novo*, образуются ацетил-КоА, оксалацетат, α -кетоглутарат, фумарат и сукцинат. Эти процессы метаболизма детально изучены в современной биохимии (см. [1, 2]).

Основные продукты расщепления и окисления жиров, углеводов и белков претерпевают дальнейшие превращения в циклической системе реакций, именуемой *циклом лимонной кислоты* или *циклом Кребса*. Эта система локализована в митохондриях. Цикл Кребса, «образно говоря, та главная ось, вокруг которой вертится метаболизм почти всех существующих клеток... Цикл

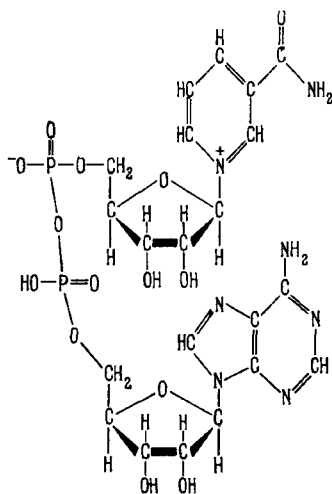


Рис. 6.2. Никотинамидениндинуклеотид (НАД).

Кребса является «фокусом», в котором сходятся все метаболические пути» [1].

Цикл Кребса изображен на рис. 6.4. За один оборот цикла, состоящего из восьми реакций, отмеченных на рисунке цифрами в кружках, происходит деградация одной молекулы ацетил-КоА

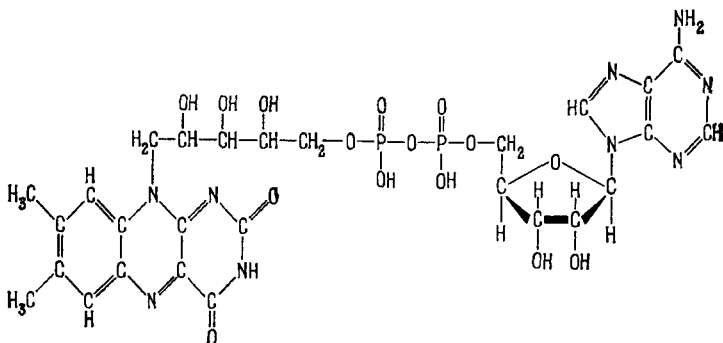
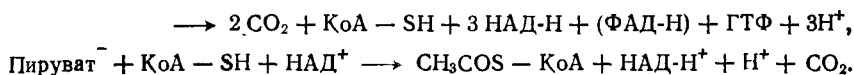


Рис. 6.3. Флавиадениндинуклеотид (ФАД).

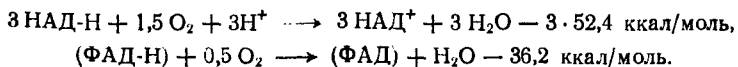
или одной молекулы пирувата до CO_2 и H_2O , т. е. «сгорание» этих молекул. Соответствующие суммарные реакции имеют вид



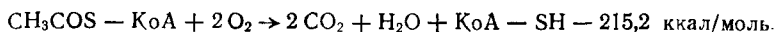
(Скобки обозначают, что ФАД тесно связан с белком.)

От цикла Кребса идут пути многих биосинтетических реакций — пути синтеза углеводов, липидов, пуринов, пиримидинов и порфиринов. Синтез белков также связан с циклом, в котором создаются предшественники ряда аминокислот. Вместе с тем, как мы увидим, биологическое окисление является источником энергии, запасаемой в АТФ и необходимой для биосинтетических процессов.

В реакциях цикла возникают CO_2 и ионы H^+ . Одновременно происходит восстановление коферментов НАД и ФАД. Для непрерывного и полного биологического окисления эти коферменты должны окисляться вновь. Окисление осуществляется совокупностью переносчиков электронов, образующих цепь переноса электронов (ЦПЭ), фиксированную в митохондриях. ЦПЭ обеспечивает следующие реакции:



Реакция ацетил-КоА имеет вид



ЦПЭ, иначе именуемая дыхательной цепью, представляет собой

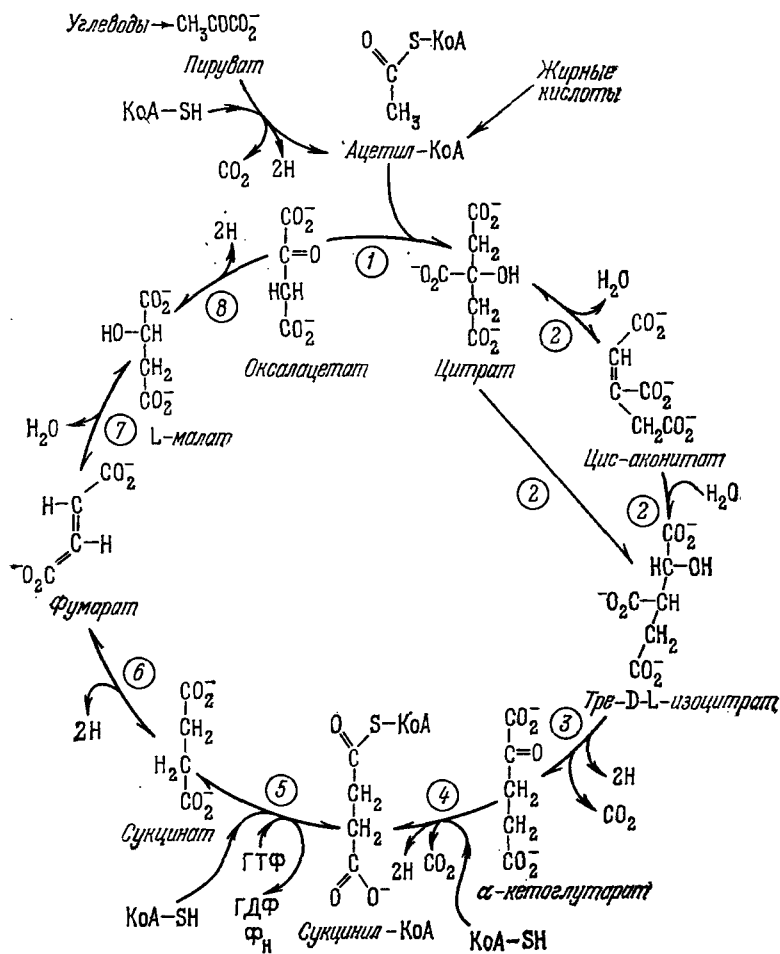
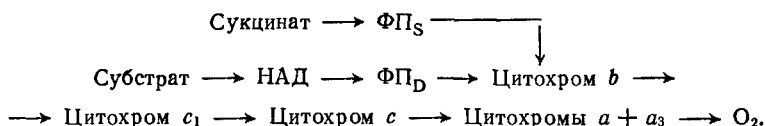


Рис. 6.4. Цикл Кребса.

полиферментную систему, акцептирующую электроны из цикла Кребса и цикла окисления жирных кислот.

Электрон переносится по следующей цепи [1, 2, 4]:



Флавопротеиды — специфические ферменты, содержащие флавиновые коферменты — ФАД (см. рис. 6.3) и флавиномононуклеотид ФМН, рибофлавин-5'-фосфат. Цитохромы содержат группу гема, атом железа которого при работе цепи подвергается окислению и восстановлению:



Перенос электронов в приведенной цепи происходит слева направо, завершаясь восстановлением кислорода, который соединяется с водородом и образует воду. Освобождаемый при окислении электрон соединяется со следующим звеном цепи. Перенос электронов сопровождается изменением свободной энергии, так как электроны перемещаются по каскаду возрастающих окислительно-восстановительных потенциалов. Их значения приведены в табл. 6.1 [1].

Таблица 6.1

Окислительно-восстановительные потенциалы некоторых систем

Система	ψ , В	Система	ψ , В
$\text{H}_2\text{O}/\frac{1}{2}\text{O}_2$	0,82	Восстановленный флавин/фла-вин	-0,185
Цит <i>a</i> $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	0,29	Лактат/пируват	-0,19
Цит <i>c</i> $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	0,23	НАД-Н/НАД	-0,32
Цит <i>c</i> ₁ $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	0,21	Малат/пируват	-0,33
Цит <i>b</i> $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$	0,05	$\frac{1}{2}\text{H}_2/\text{H}$	-0,42
Сукцинат/фумарат	-0,03	Ацетальдегид/ацетат	-0,60
Глутамат/ α -кетоглутарат	-0,14		

Перенос электронов по дыхательной цепи сопряжен с запасанием энергии в макроэргических молекулах АТФ. Иными словами, освобождаемая свободная энергия конвертируется в химическую энергию АТФ. Происходит окислительное фосфорилирование.

Это важнейшее явление было впервые открыто Энгельгардом в 1930 г. [5]. Белицер и Цыбакова [6] подробно изучили стехиометрические соотношения между окислением и фосфорилированием, провели первые определения коэффициента Φ_H : О. т. е. отношения числа молекул этерифицированного неорганиче-

ского фосфата к числу атомов поглощенного кислорода, и показали, что значение этого коэффициента не менее 2. В работе [6] были даны термодинамические оценки, показавшие, что энергия переноса электронов на кислород достаточно для образования двух или большего числа молекул АТФ на один атом поглощенного кислорода. Калькар установил, что аэробное фосфорилирование сопряжено с дыханием и не зависит от гликолитического фосфорилирования [7]. Количественные соотношения были уточнены Очоа [8]. Коэффициент $\Phi_n : O$ для окислительных реакций цикла Кребса и реакций с участием НАД равен 3. Ленинджер впервые установил, что процессы окислительного фосфорилирования локализованы именно в митохондриях [4, 9,

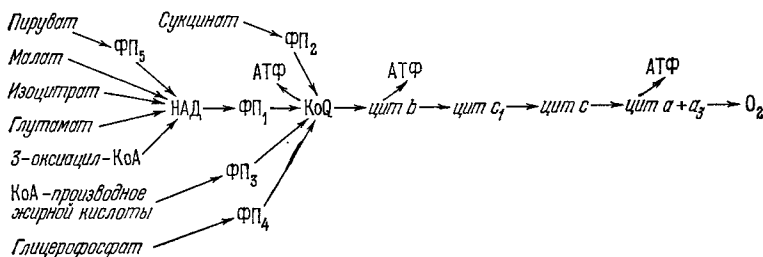
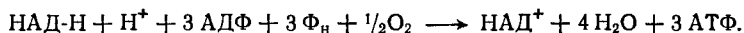


Рис. 6.5. Дыхательная цепь [1, 2].

Прямые стрелки показывают места вхождения электронов. ФП₁, ФП₂, ... — флавопротеиды. КоQ — кофермент Q.

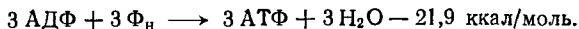
10], и в работах его лаборатории были найдены узловые пункты дыхательной цепи, в которых происходит фосфорилирование. Указанное значение $\Phi_n : O$ следует из уравнения



В этом уравнении суммируются экзергоническая реакция



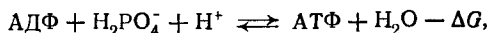
и эндергоническая реакция



Фосфорилирование $\text{АДФ} \rightarrow \text{АТФ}$ происходит в трех узловых пунктах — в участке цепи $\text{НАД-Н} \rightarrow$ флавопротеид, в участке цитохром $b \rightarrow$ цитохром c_1 и в участке цитохром $c \rightarrow$ цитохромы $a + a_3$.

Общая схема сопряжения окисления с фосфорилированием приведена на рис. 6.5.

Напишем вновь брутто-уравнение фосфорилирования



где ΔG — изменение свободной энергии. Имеем

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[\text{АДФ}] [\text{H}_2\text{PO}_4^-] [\text{H}^+]}{[\text{АТФ}] [\text{H}_2\text{O}]}, \quad (6.1)$$

ΔG^0 — стандартное изменение свободной энергии в калориях, т. е. значение ΔG при рН 7,0, 25°C и концентрациях всех компонентов, равных 1,0 М. Как известно,

$$\Delta G^0 = -RT \ln K, \quad (6.2)$$

где K — константа равновесия реакции. Для фосфорилирования $\Delta G^0 = 7,3$ ккал/моль. Наблюдаемое значение ΔG *in vivo* зависит от концентрации протонов по обе стороны мембраны и, следовательно, от мембранной разности потенциалов. ΔG зависит также от концентрации ионов Mg^{++} . При изменении рН от 6,0 до 9,0 при $[\text{Mg}^{++}] = 10$ мМ ΔG меняется от 6,17 до 9,29 ккал/моль (см. [79, 113]).

Изменение свободной энергии при переносе двух электронных эквивалентов по ЦПЭ от НАД-Н к O_2 определяется разностью окислительно-восстановительных потенциалов $0,82 - (-0,32) = 1,14$ В, т. е.

$$\Delta G^0 = z \Delta \phi = -2 \cdot 23,06 \cdot 1,14 \text{ ккал/моль} = -52,7 \text{ ккал/моль}.$$

Это обеспечивает с избытком синтез 3 молей АТФ из АДФ и F_n . Эффективность процесса выражается величиной $21,9/52,7$, т. е. примерно равна 40%.

Энергетический смысл дыхания состоит в синтезе АТФ. Энергия, аккумулированная в АТФ, используется клеткой для выполнения всех видов ее работы.

Раскрытие химизма биологического окисления — крупнейшее достижение биохимии. Здесь изложены лишь некоторые важнейшие сведения, подробное рассмотрение сложной биохимической системы окисления содержится в специальной литературе (см. [1—3, 11—13]).

Особенность системы окислительного фосфорилирования, отличающая ее от ряда ферментативных реакций, протекающих в растворе, состоит в строгой пространственной локализации звеньев многоступенчатого процесса. Окислительное фосфорилирование локализовано в митохондриях и непосредственно связано с транспортной и механохимической функциональностью их мембран. По-видимому, столь сложная система биохимических реакций принципиально требует пространственной неоднородности и не могла бы реализоваться в гомогенной среде.

Расшифровка кратко описанных здесь окислительно-восстановительных реакций была получена в результате применения тонких химических и физических методов. Здесь, в частности,

сыграли большую роль работы Чанса, посвященные спектроскопии переносчиков электронов (НАД, ФП, цитохромов) в интактных митохондриях. Эти переносчики обладают характерными полосами поглощения в видимой и близкой ультрафиолетовой областях спектра, и разностные спектры позволяют изучать кинетику их окисления и восстановления [14]. Были применены различные способы удаления из митохондрий специфических ферментов и тем самым, сохранения лишь определенных звеньев

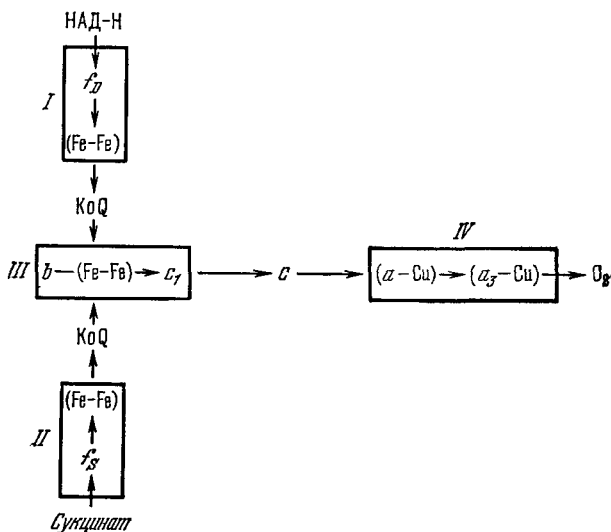


Рис. 6.6. Распределение белков по комплексам ЦПЭ I, II, III, IV. a , b , c , c_1 , a_3 — цитохромы, Cu — медьсодержащие белки, $(\text{Fe}-\text{Fe})$ — негемное железо, f_S — сукцинатдегидрогеназа, f_D — НАД-Н-дегидрогеназа.

процесса. Митохондрии подвергались расчленению, из субмитохондриальных частиц выделялись комплексы дыхательных ферментов, свободные от структурных белков. Такие комплексы оказалось возможным очищать и детально исследовать. Были проведены успешные опыты по восстановлению ЦПЭ из выделенных препаратов и растворимых ферментов. Наконец, очень ценная информация была получена в опытах по ингибированию отдельных стадий процесса и по разобщению окислительного фосфорилирования и переноса электронов (см. § 6.5).

Можно считать установленным, что переносчики ЦПЭ сгруппированы в четыре комплекса, именуемые *комплексами Грина* (см. [15]). Соответствующая схема приведена на рис. 6.6. Молекулярный вес каждого комплекса равен примерно $3 \cdot 10^5$. Он содержит около 64% белка и 36% липидов. Электрон-переносящий

комплекс определяется как минимальная единица ЦПЭ, сохраняющая способность переносить электрон со скоростью, сравнимой с этой скоростью в интактных митохондриях.

Изучение биологического окисления встречается с необходимостью решения ряда физических проблем, относящихся к различным уровням организации и функционирования системы.

Структура и функции молекулярных переносчиков электронов изучены еще недостаточно. В § 6.7 рассмотрены современные данные, относящиеся к строению и свойствам цитохрома *c*. Цитохром *c* исследовался очень детально, но его динамические свойства нельзя считать полностью установленными и объясненными.

Строение и функциональная организация митохондрий явились предметом интенсивного изучения. Тем не менее, многие важнейшие вопросы, сюда относящиеся, пока не имеют ответа. Специфическая мембранная структура митохондрий, присутствие в них автономной программы синтеза белков (ДНК), механохимическая активность митохондрий непосредственно связаны с их ролью «силовых станций» клетки. Дальнейшее развитие физики митохондрий требует целостного подхода.

Общая теория электронного транспорта в локализованной системе биологического окисления интенсивно развивается. Предложены содержательные кинетические модели, начаты теоретические исследования, основанные на рассмотрении электронно-конформационных взаимодействий. Эти проблемы представляют первостепенный интерес для биофизики.

Необходимо установить молекулярную природу биологического окисления, осуществляемого в результате сопряжения ферментативных, транспортных и механохимических процессов. Митохондрия есть место интегрирования широкой совокупности молекулярно-биологических явлений, целостная система, требующая всестороннего изучения — теоретической и экспериментальной разборки и сборки «черного ящика».

§ 6.2. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии фигурируют во всех аэробных клетках животных и растений, за исключением некоторых примитивных бактерий, где функции митохондрий выполняет плазматическая мембрана.

Число этих органоидов в клетке различно — от 20—24 в сперматозоидах до 500 000 в клетке гигантской амёбы *Chaos chaos*. В клетке *Escherichia coli* имеется лишь одна митохондрия. Число митохондрий характерно для клеток данного типа данного вида: по-видимому, при митозе происходит деление митохондрий и их правильное расхождение в дочерние клетки. Форма, структура