

Основное предположение теории Митчелла состоит в том, что коэффициент прямого сопряжения окисления и фосфорилирования равен нулю ($L_{\text{фо}} = 0$). Иными словами, если $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}}$ поддерживается постоянным, то фосфорилирование должно быть независимым от окисления, и наоборот. В частности, при $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}} = 0$ разобщение полное и $J_{\text{ф}} = 0$, если $\mathcal{A}_{\text{ф}}^2 = 0$ при любом значении $J_{\text{о}}$, а также $J_{\text{о}} = 0$, если $\mathcal{A}_{\text{о}}^e = 0$ при любом значении $J_{\text{ф}}$.

Теория Митчелла — феноменологическая теория, не рассматривающая механизм процесса и не учитывающая электронно-конформационные свойства митохондриальной системы. Тем не менее, эта теория позволяет прийти к ряду конкретных выводов, подлежащих прямой экспериментальной проверке. Вместе с тем подлежит проверке и предполагаемая в теории Митчелла близость процесса к равновесию.

§ 6.5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ХЕМИОСМОТИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЯ

Подробное описание экспериментальных исследований хемиосмотического сопряжения дано в монографии Скулачева [46]. Здесь мы приводим лишь краткое изложение основных результатов.

Прежде всего необходимо было проверить основное положение теории Митчелла, согласно которому дыхательная цепь генерирует трансмембранный потенциал ионов H^+ . Прямые микроэлектродные измерения не подтвердили предполагаемое в теории Митчелла высокое сопротивление мембраны (10^7 — 10^8 Ом·см²) и дали значение мембранного потенциала 10—15 мВ со знаком, противоположным предполагавшемуся [49]. Однако эти результаты нельзя считать вполне достоверными (см. [46]). Более надежную информацию дает исследование транспорта специфических ионов через мембрану, вызываемого трансмембранным потенциалом.

Валиномицин вызывает поглощение ионов K^+ энергизованными митохондриями, т. е. митохондриями, способными к реализации сопряжения окисления и фосфорилирования [50]. При нарушении сопряжения митохондрии теряют накопленные ионы K^+ . Эти результаты согласуются с представлениями Митчелла, но не доказывают их однозначно [46]. Для обнаружения электрического поля, направленного поперек мембраны энергизованных митохондрий, было необходимо найти ионы, способные проникать через эти мембраны, перенос которых мог бы осуществляться ферментами — транслоказами без участия электрического поля. Либерман и его сотрудники изучили транспорт ряда специально синтезированных ионов (синтетические ионы) через искусственные фосфолипидные мембраны (см. стр. 140) [51, 52].

Наиболее подходящими оказались ионы с зарядом, экранированным гидрофобными заместителями (рис. 6.15). В присутствии этих ионов существенно повышается электропроводность системы, так как они быстро диффундируют сквозь мембраны. Далее исследовался транспорт этих ионов через митохондриальные мембраны и субмитохондриальные частицы (СМЧ), полученные

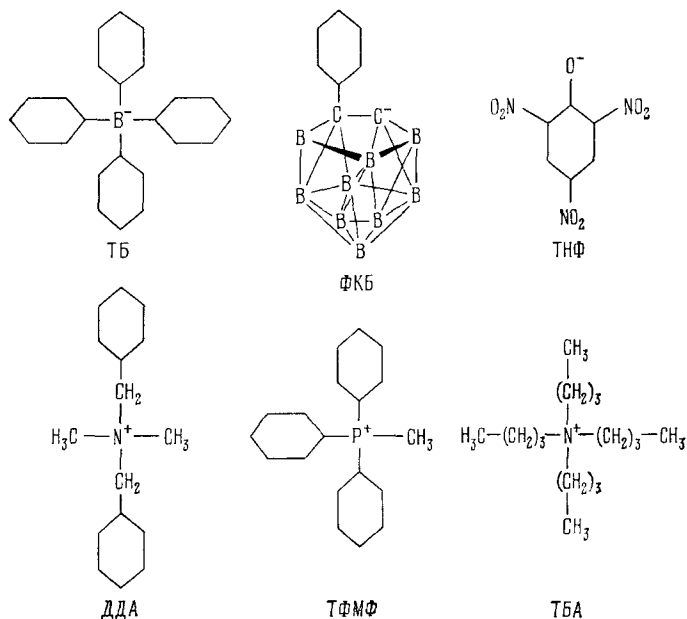


Рис. 6.15. Синтетические анионы и катионы.

ТБ — тетрафенилборат, ФКБ — фенилдикарбоундекаборат, ТНФ — тринитрофенол (пикрат), ДДА — дибензилдиметиламмоний, ТФМФ — трифенилметилфосфоний, ТБА — тетрабутил-аммоний.

путем обработки митохондрий ультразвуком. Мембраны митохондрий и СМЧ оказываются ориентированными противоположным образом. Наружная поверхность мембраны СМЧ покрыта структурными элементами, состоящими из шляпки, ножки и подставки (см. стр. 290), наружная поверхность мембраны митохондрии этих элементов не содержит. Цитохром *c* локализован на внешней стороне мембраны митохондрий и на внутренней стороне мембраны СМЧ. СМЧ «вывернуты» по сравнению с митохондриями. Можно думать, что внутримитохондриальное пространство заряжено отрицательно, а внутреннее пространство СМЧ имеет положительный заряд. Оказалось, что энергизация СМЧ добавкой АТФ вызывает поглощение анионов ФКБ (см.

рис. 6.15), а деэнергизация ингибитором дыхания (антимитохон) или разобщителем окислительного фосфорилирования ОКФ (*n*-трифторметоксикарбонилцианидфенилгидразон) вызывает выход анионов. В опытах с митохондриями наблюдается иная картина [46, 53—56]. Удалось показать, что транспорт электронов в мембранах СМЧ сопровождается поглощением анионов ФКБ [55, 57]. Транспорт ФКБ нарушается ингибиторами электронного транспорта, а также разобщителями окислительного фосфорилирования.

Аналогичные результаты получены и с другими синтетическими анионами [55, 58, 59].

В целом указанные опыты с синтетическими ионами, а также ряд других, доказывают, что в сопрягающих мембранах реализуется энергозависимый транспорт ионов, причем анионы и катионы движутся в противоположных направлениях. Механизм транспорта не зависит от структуры ионов, существенна лишь их способность проникать через фосфолипидные мембраны. Изменение ориентации мембраны относительно окружающей среды приводит к переориентации ионных потоков, направленных против градиентов концентрации ионов [46].

Эти электрофоретические свойства мембран нельзя объяснить высказанными ранее представлениями об ответственности специфического фермента — энергозависимой транслоказы — за транспорт ионов (см., например, [60]). Напротив, эти свойства согласуются с теорией Митчелла, исходящей из того, что химическая энергия реакции окисления и фосфорилирования может превращаться в электрическую энергию мембранного потенциала.

Согласно теории Митчелла (см. § 6.4), перенос протонов и электронов сквозь мембрану не приводит к большим изменениям рН. Транспорт электронов, т. е. окислительный процесс, прекращается под действием электрического поля, создаваемого избытком отрицательных зарядов на другой стороне мембраны. Перенос электронов активируется вновь при уменьшении поля, т. е. при уменьшении мембранного потенциала. Этого можно достичь перемещением катионов через мембрану. В результате должен возникнуть градиент рН, так как перенос каждого одновалентного катиона должен сопровождаться освобождением одного протона во внешней среде. В работах [3, 53—55] действительно показано, что добавление проникающих синтетических катионов ДДА, ТФМФ, ГБА (см. рис. 6.15) к митохондриям вызывает увеличение концентрации H^+ в среде. Изменения рН исчезают при добавке разобщителей. Сам Митчелл показал, что при работе дыхательной цепи среда подкисляется [42, 43].

Таким образом, установлено, что энергизация сопрягающей мембраны создает трансмембранный потенциал $\Delta\psi$ и ΔpH .

Из теории Митчелла следует, что энергия дыхания, трансформированная из химической формы в электрическую и осмотическую, может вновь перейти в химическую форму при синтезе АТФ или обратном переносе электронов. Митчелл постулирует, тем самым, обратимость биоэнергетического процесса. Это положение также подтверждено (см. [44]). Реализуется так называемое ионное фосфорилирование — синтез АТФ из АДФ и Φ_n за счет электрической или осмотической энергии, выделяемой при движении ионов через мембрану по концентрационному градиенту.

Хорошими тестами на трансмембранный потенциал являются изменения спектров поглощения цитохромов, вызываемые их окислением и восстановлением [61, 62]. При исследованиях поведения цитохромов в СМЧ может оказаться весьма полезным магнитооптическое вращение, аномальная дисперсия которого очень чувствительна к изменению состояния группы гема, содержащейся в цитохромах (см. [2], гл. 7). Удаётся наблюдать такую аномальную дисперсию для цитохрома *c* во взвеси СМЧ.

Снижение $\Delta\psi$ должно приводить к нарушению сопряжения окисления и фосфорилирования. К этому сводится действие разобщителей сопряжения. Таковыми являются динитрофенол

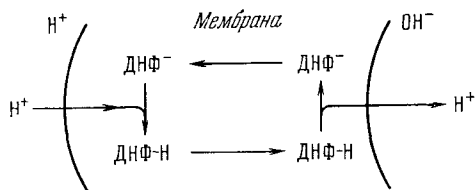


Рис. 6.16. Транспорт протонов разобщителем ДНФ.

Установлено, что разобщители действительно повышают протонную проводимость мембран митохондрий [63]. Сходные результаты были получены и на искусственных фосфолипидных мембранах [53, 64—66]. Выявлено далеко идущее сходство этих мембран с внутренними мембранами митохондрий. Найден новый класс сильных разобщителей — производных барена [52] (дальнейшие подробности см. в [46]).

По схеме Митчелла [42, 43] протоны и электроны шесть раз пересекают мембрану на пути от НАД-Н к O_2 . Стадии переноса H^+ и e^- чередуются. Для детального рассмотрения и аргументации этой схемы нужно иметь представление о локализации компонентов реакции. Установлено, что цитохром *c* локализован у внешней стороны мембраны митохондрий, а ферменты трансгидрогеназа, НАД-Н-дегидрогеназа и сукцинатдегидроге-

ДНФ, ФКФ и ряд других веществ. ДНФ, по видимому, действует как переносчик протонов, согласно схеме Митчелла, показанной на рис. 6.16. Очевидно, что если эта схема верна, то любые слабые кислоты и основания должны оказывать разобщающее действие.

наза — у внутренней ее стороны. В «вывернутых» СМЧ локализация обратная.

В работах лабораторий Либермана и Скулачева расположение дыхательной цепи определялось по ее способности образовывать мембранный потенциал, регистрируемый с помощью

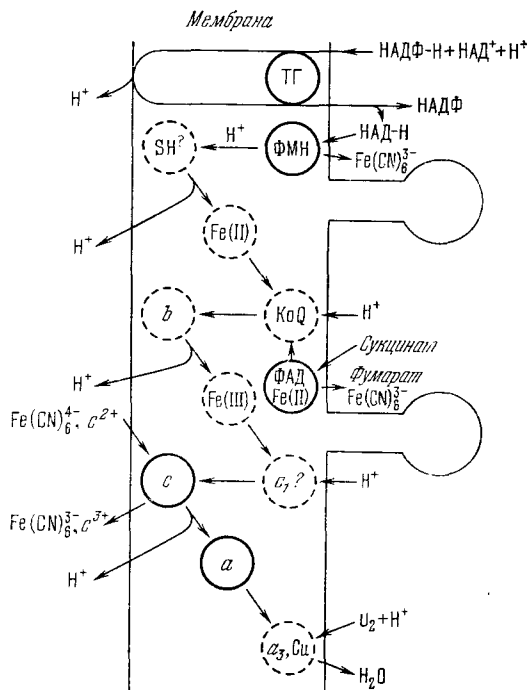


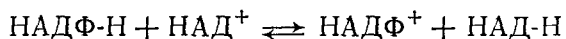
Рис. 6.17. Вероятная локализация дыхательной цепи в митохондриальной мембране [46].

ТГ — трансгидрогеназа, *a*, *a*₃, *c*, *c*₁, *b* — цитохромы, ФМН — флавиномононуклеотид, Fe — комплексы гегеминового железа, катализирующие перенос электрона, Cu — медьсодержащий белок.

ФКБ [55, 57, 59]. В среду вводились различные доноры и акцепторы электронов, не проникающие через мембрану. Оказалось, что эти вещества взаимодействуют лишь с цитохромом *c* в митохондриях. Компоненты, взаимодействующие с трансгидрогеназными звеньями цепи, не эффективные в митохондриях, поддерживают транспорт ФКБ в СМЧ. Проникающие доноры и акцепторы эффективны в обоих случаях. Эти опыты показывают, что происходит транспорт протонов и (или) электронов по дыхательной цепи. В других экспериментах как прямых, так и косвенных, установлена локализация ряда компонентов в мембране митохондрий [46]. На рис. 6.17 показано вероятное

расположение дыхательной цепи [46]. Схема эта в целом пока во многом гипотетична, но отдельные ее элементы можно считать установленными.

Методы тестирования мембранной разности потенциалов посредством синтетических ионов были с успехом применены также к изучению возникновения $\Delta\psi$ в ходе трансгидрогеназной реакции переноса водорода между двумя нуклеотидами. Эта реакция



также локализована в митохондриях. Опыт подтверждает представление Митчелла о том, что в указанной реакции происходит обратный перенос электронов, идущий с затратой энергии (см. [46]).

Согласно хемиосмотической гипотезе любая сопрягающая система должна создавать разность электрохимических потенциалов ионов H^+ . Действительно, опыты с проникающими синтетическими ионами показали возникновение $\Delta\psi$ в митохондриях, СМЧ, хлоропластах (см. гл. 7), мембранах бактерий независимо от степени сложности системы сопряжения и от используемого источника энергии [46].

Таким образом, ряд основных положений теории Митчелла подтвержден экспериментально. Однако, как указывает Скулачев [46], это еще нельзя считать однозначным доказательством справедливости теории. Теория постулирует существование пяти различных механизмов генерации $\Delta\psi$: АТФ-азу и четыре механизма энергетического сопряжения в дыхательной цепи. Нужно еще доказать, что альтернативные теории возникновения мембранного потенциала, в отличие от теории Митчелла, не согласуются с фактами. Соответствующий анализ проведен в монографии Скулачева, приходящего к выводу о непригодности других моделей и справедливости хемиосмотической теории [46]. В частности, отпадают, по-видимому, представления о том, что митохондрии содержат помимо АТФ еще какой-то нефосфорилированный высокоэнергетический предшественник АТФ (см. [67]). Основная форма энергии в клетке есть электрическая энергия, определяемая трансмембранным потенциалом протонов. Именно электрическая энергия ответственна за совершение различных типов химической и осмотической работы, а также за теплопродукцию митохондрий. Существенно то обстоятельство, что энергия, вырабатываемая в каком-либо участке митохондрии, доступна митохондрии в целом и может быть использована для совершения любого вида работы в любом другом участке. Общая схема путей превращения энергии в сопрягающих мембранах показана на рис. 6.18 [46].

Детальные исследования суспензий изолированных митохондрий (из сердца голубя) показали, что окислительно-восстановительные реакции, сопряженные с фосфорилированием, протекают в условиях, близких к равновесию [68]. Дыхательная цепь митохондрий состоит из трех изопотенциальных групп: НАД⁺/НАД-Н с потенциалом около $-0,34$ В (если окисляемый субстрат — сукцинат), цитохром *b* и кофермент *Q* с $\psi \approx 0$, цитохромы *c* и *a* и другие звенья с $\psi \approx 0,275$ В. Перенос восстанавливающих эквивалентов между двумя соседними группами

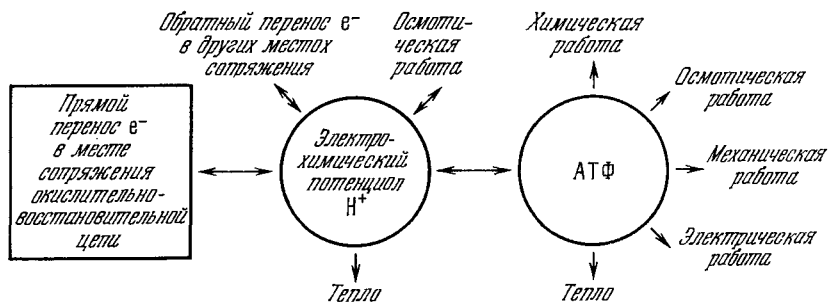


Рис. 6.18. Пути превращения энергии, освобождающейся при переносе электронов в сопрягающих мембранах [46].

сопряжен с синтезом АТФ. Изменение свободной энергии такого переноса от НАД-Н к цитохрому *c* равно расходу свободной энергии на синтез двух молей АТФ. Измеренные значения констант равновесия были близки к теоретическим. В ряде работ было показано, что на путях метаболизма имеется множество ферментативных стадий, близких к равновесию [69—71]. Как указывается в работе [68], суммарный метаболический процесс далек от равновесия вследствие наличия нескольких реакций, сильно смещенных от равновесия. Именно эти реакции осуществляют кинетический контроль над общим потоком метаболитов. Равновесные реакции образуют основную систему, на которую наложены необратимые процессы.

Несмотря на описанные факты, было бы преждевременным считать теорию Митчелла доказанной и полностью аргументированной (см. [111]).

Согласно исходным представлениям Митчелла, запасание энергии в АТФ происходит за счет накопления разноименных зарядов на стенках мембраны, создания мембранного потенциала и разности концентраций протонов. Это означает, что синтез АТФ может быть не эндергоническим, т. е. может протекать самопроизвольно — первичным макроэргом является сама

мембрана. Однако, как указано выше (см. стр. 286), величина свободной энергии фосфорилирования не равна нулю — необходим специальный механизм сопряжения, покрывающий дефицит свободной энергии. Соответственно, Митчелл далее вводит представление о синтезе в мембране предшественника АТФ — неизвестного пока вещества X с меньшим энергосодержанием (около 4,5 ккал/моль). Энергия нескольких молекул X передается одной молекуле АДФ при ее фосфорилировании. Это положение теории остается недоказанным. В целом пока нет полного ответа на основной вопрос — достаточно ли энергия протонов для фосфорилирования АДФ. Предположение об одновременном участии в синтезе АТФ других ионов в принципе может улучшить ситуацию, но проверка его связана с большими трудностями. Теория Митчелла в целом согласуется с представлением о квазиравновесии в сопряженных митохондриальных процессах. Однако из всего изложенного следует, что эта теория является феноменологической и не рассматривает молекулярные механизмы окислительного фосфорилирования. Она не учитывает, несомненно, наличествующих в системе электронно-конформационных взаимодействий (ЭКВ), ответственных в конечном счете за все ферментативные процессы в митохондриях. Мы еще мало знаем о сущности ЭКВ в цитохромах и других ферментах, участвующих в окислительном фосфорилировании. Между тем, именно при исследовании этого процесса концепция ЭКВ (см. [3], гл. 6) должна быть особенно эффективной, так как митохондриальная система реализует транспорт электронов.

§ 6.6. ЭЛЕКТРОННО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Самые общие соображения показывают, что перенос электрона, сдвиг электронной плотности в конденсированной среде должны сопровождаться изменениями положений атомов, атомных ядер среды. Все степени свободы молекулярной системы, т. е. системы, состоящей из ядер и электронов, взаимосвязаны. В биополимерной системе наименьших затрат энергии требуют повороты атомных групп, т. е. конформационные движения. Следовательно, в такой системе электронный транспорт сопряжен с конформационными движениями, и должны реализоваться *электронно-конформационные взаимодействия* (ЭКВ) (см. [3], § 6.7, [72]). Конформационные перестройки должны сопровождать и перемещение ионов. Движение электрона (и зарядовой плотности) в биополимерной системе, в частности, в мембране, сопряженное с конформационными движениями, может трактоваться как перемещение квазичастицы — *конформона* [73]. В надмолекулярной системе конформационные перестройки могут