

нативен окислительному фосфорилированию. Тем самым Ca^{2+} действует как его *разобщитель*.

Малые количества Ca^{2+} , напротив, стимулируют дыхательный процесс. Транспорт Ca^{2+} связан с транспортом катионов H^+ , K^+ и Na^+ .

§ 13.3. Хемосмотическое сопряжение

Как уже сказано, окислительное фосфорилирование в митохондриях сопряжено с ионным транспортом. Это система сопряженных процессов, а не отдельная химическая реакция. Слэйтер (1953) предположил, что в результате окисления возникают *первичные макроэрги* — промежуточные вещества, обладающие избытком свободной энергии и участвующие в фосфорилировании. Такие вещества не были обнаружены и физический механизм предлагаемого процесса не ясен. Химическая гипотеза Слэйтера оставлена.

Широкое признание получила *хемосмотическая теория Митчелла* (1961). Она исходит из трех постулатов.

Во-первых, фосфорилирование происходит только в мембранах, содержащих замкнутые везикулы. Мембрана отделяет внутреннее пространство везикула от внешнего. Она имеет низкую проницаемость для протонов.

Во-вторых, предполагается, что перенос электронов между компонентами ЦПЭ сопровождается переносом протонов сквозь мембрану. Переносчики расположены асимметрично относительно обеих сторон мембраны. Первичным макроэргом является протондвижущая сила:

$$\begin{aligned} \Delta\tilde{\mu}_{\text{H}} &= \tilde{\mu}_{\text{H}}^{\text{вход}} - \tilde{\mu}_{\text{H}}^{\text{выход}} = \\ &= RT \ln [\text{H}^+]^{\text{вход}} / [\text{H}^+]^{\text{выход}} + \mathcal{F} \Delta\psi = -2,3RT \Delta p\text{H} + \mathcal{F} \Delta\psi. \end{aligned} \quad (13.2)$$

В-третьих, предполагается, что $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}}$ определяет синтез АТФ с помощью фермента, связанного с мембраной, — АТФ-синтазы. Фермент действует векторно, образует канал, по которому перемещаются протоны. Синтез одной молекулы АТФ требует прохождения многих протонов.

Фермент работает обратимо. При гидролизе АТФ протоны переносятся назад и мембрана энергизуется.

Прежде чем рассмотреть теорию Митчелла, остановимся на общем термодинамическом описании сопряжения.

При сопряжении двух процессов — окисления (о) и фосфорилирования (ф) — имеем (ср. с. 310)

$$\begin{aligned} J_o &= L_{11} \frac{\mathcal{A}_o}{T} + L_{12} \frac{\mathcal{A}_\phi}{T}, \\ J_\phi &= L_{12} \frac{\mathcal{A}_o}{T} + L_{22} \frac{\mathcal{A}_\phi}{T}. \end{aligned} \quad (13.3)$$

Находим

$$J_{\Phi}/J_0 = (q + lx)/(l^{-1} + qx), \quad (13.4)$$

где q — степень сопряжения

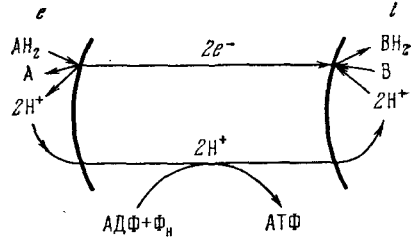
$$q = L_{12}/\sqrt{L_{11}L_{22}}, \quad (13.5)$$

$l = (L_{22}/L_{11})^{1/2}$, а x — отношение значений сродства:

$$x = \mathcal{A}_{\Phi}/\mathcal{A}_0. \quad (13.6)$$

При полном сопряжении $q = 1$ и $J_{\Phi}/J_0 = l$, независимо от x . Как мы видели, $\Phi/O = J_{\Phi}/J_0$, т. е. число молекул АТФ, синтезируемых при расходовании одного атома кислорода, равно трем. Сле-

Рис. 13.7. Схема хемиосмотического сопряжения по Митчеллу: i — внутренняя, e — внешняя стороны мембраны



довательно, $l = 3$. В отсутствие сопряжения $q = 0$ и $J_{\Phi}/J_0 = l^2x = 9 \mathcal{A}_{\Phi}/\mathcal{A}_0$. При неполном сопряжении $0 < q < 1$ и отношение Φ/O нелинейно зависит от x . Опыт дает значение q , близкое к 1.

Учитывая перенос протонов, нужно рассматривать три потока — еще и поток H^+ . Функция диссипации имеет вид

$$\sigma = T^{-1}(J_{\Phi}\mathcal{A}_{\Phi} + J_0\mathcal{A}_0 + J_H\Delta\tilde{\mu}_H), \quad (13.7)$$

где $\tilde{\Delta\mu}_H$ дается формулой (13.2). Химические реакции окисления и фосфорилирования сопряжены с векторным потоком протонов — коэффициенты L_{OH} и L_{FH} отличны от нуля.

Схема хемиосмотического сопряжения Митчелла показана на рис. 13.7. Сопрягающей системой является мембрана. Донор водорода AH_2 (например, аскорбат) окисляется переносчиком электронов (например, цитохромом c) у внешней стороны мембраны. Два электрона переносятся через мембрану по дыхательной цепи и посредством цитохромоксидазы передаются акцептору водорода B , т. е. кислороду. Акцептор присоединяет два протона из внутренней фазы митохондриального матрикса. Создается градиент концентраций протонов — их избыток во внешней и недостаток во внутренней жидкой фазе. Вследствие этого происходит перенос протонов через мембрану в противоположном направлении, в результате чего и реализуется фосфорилирование. Синтез одной молекулы АТФ приводит к поглощению двух протонов из внешней фазы и выделению двух протонов в матрикс. Митохондриальная мембрана работает как *топливный элемент*, в котором разность электрохимических потенциалов создается за счет окислительно-восстановительного процесса.

Теория Митчелла исходит из рассмотрения равновесных соотношений. Разность свободных энергий в системе складывается из химической и осмотической (транспортной) работы:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{хим}} + \Delta G_{\text{осм}}, \quad (13.8)$$

где

$$\Delta G_{\text{осм}} = \sum_j \nu_j (\tilde{\mu}_j - \mu_j^0) + \sum_i \nu_i (\tilde{\mu}_i - \mu_i^0). \quad (13.9)$$

Сумма по j есть сумма по всем продуктам, по i — по всем реагентам; μ_j^0 , μ_i^0 — стандартные химические потенциалы, ν_j , ν_i —

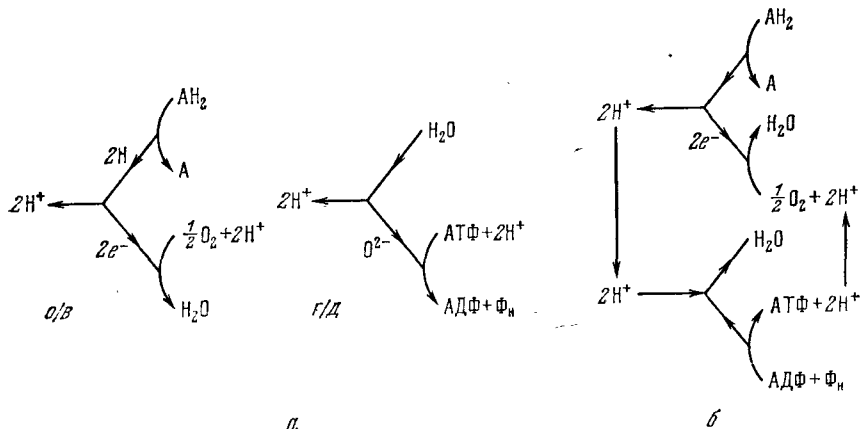


Рис. 13.8. Детализация схемы Митчелла: *a* — петли *o/v* и *g/d*; *б* — сопряжение обоих процессов

стехиометрические коэффициенты. Если переносится лишь один компонент, то обобщенная сила, действующая на него, есть

$$\Delta \tilde{\mu} = -\Delta G_{\text{осм}}/\nu. \quad (13.10)$$

Схему, показанную на рис. 13.3, можно считать состоящей из двух петель (рис. 13.8, *a*) — окислительно-восстановительной (дыхание, *o/v*-петля) и гидрогенизационно-дегидрогенизационной (дефосфорилирование, *g/d*-петля). Сопряжение обоих процессов посредством протонного транспорта показано на рис. 13.8, *б*. Согласно (13.10) имеем в равновесии

$$\Delta \tilde{\mu}_{\text{H}} = -\Delta G_{\text{осм}}/2 = \mathcal{F} \Delta \psi. \quad (13.11)$$

В процессах *o/v* и *г/д*

$$-(\Delta G_{\text{осм}})_{\text{o/v}} = -(\Delta G_{\text{осм}})_{\text{г/д}} = 2\Delta \tilde{\mu}_{\text{H}}. \quad (13.12)$$

Полный электрохимический потенциал каждого компонента равен

$$\tilde{\mu}_i = pV_i + z_i \mathcal{F} \psi + \mu_i^0 + RT \ln c_i, \quad (13.13)$$

где p — давление, V_i — молярный объем, z_i — заряд компонента, c_i — концентрация (активность). Так как член $V_i \Delta p$ относительно мал, полная обобщенная сила, приводящая к равновесию i -го компонента во внешней фазе и в матриксе, равна

$$\Delta \tilde{\mu}_i \approx z_i \mathcal{F} \Delta \psi + RT \Delta \ln c_i. \quad (13.14)$$

Для протонов, переходя к рН, получаем формулу (13.2):

$$\Delta \tilde{\mu}_H = -2,3RT \Delta \text{pH} + \mathcal{F} \Delta \psi.$$

В равновесии $\Delta \tilde{\mu}_H = 0$, и из (13.14) следует

$$\Delta \psi \equiv \varphi = \frac{RT}{z_i \mathcal{F}} \ln \frac{c_i^{(e)}}{c_i^{(i)}}, \quad (13.15)$$

т. е. уже известная нам формула Нернста — Доннана (с. 344).

При сопряжении синтеза АТФ с переносом двух зарядов электрона (это следует из экспериментально найденного отношения $\Phi_n/2e^- = 1$ для каждого центра фосфорилирования), необходимое значение не менее 200 мВ. При толщине мембраны

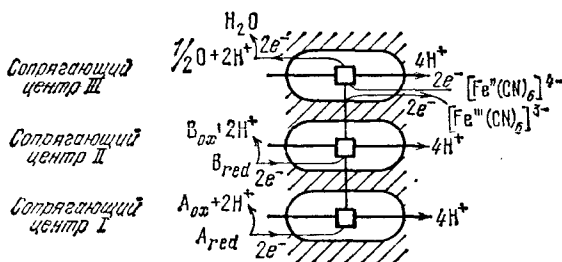


Рис. 13.9. Выделение протонов и разделение зарядов в трех центрах сопряжения. Квадраты указывают неизвестные механизмы сопряжения переноса e^- и H^+

порядка 10 нм напряженность электрического поля в ней должна быть не менее $2 \cdot 10^5$ В/см. Значение $\varphi = 200$ мВ эквивалентно вкладу $\Delta \text{pH} = 3,5$ в общую протондвижущую силу.

Митчелл рассмотрел также сопряжение потоков протонов и катионов, движущихся в противоположных направлениях («антипорт»), протонов и анионов, движущихся в одном направлении («симпорт»).

В недавних работах были проведены тщательные определения числа протонов, числа зарядов и числа молекул АТФ, приходящихся на каждый из трех центров сопряжения в ЦПЭ (ср. с. 427). С помощью различных доноров и акцепторов электронов были получены результаты, схематически показанные на рис. 13.9. Каждый центр сопряжения имеет *протонный насос*, разделяющий 4 заряда (4 протона выходят из цитоплазмы в матриксе) — отношение $H^+/\text{центр} = 4$ во всех трех центрах. При про-

хождений двух электронов (e^-) через центр I отделяются два заряда и синтезируется одна молекула АТФ, в центре II на $2e^-$ выделяется половина молекулы АТФ и отделяются два заряда, в центре III на $2e^-$ выделяются 1,5 молекулы АТФ и отделяются 6 зарядов.

При сопряжении синтеза АТФ с переносом $2e^-$ необходимое значение φ не менее 200 мВ. При толщине мембраны порядка 10 нм напряженность электрического поля в ней должна быть не менее $2 \cdot 10^5$ В/см. Значение $\varphi = 200$ мВ эквивалентно вкладу $\Delta pH = 3,5$ в общую протондвижущую силу.

Теория Митчелла получила ряд качественных подтверждений. Либерман и его сотрудники изучили транспорт ионов через искусственные фосфолипидные мембраны. В присутствии синтетических ионов, с зарядом, экранированным гидрофобными заместителями, например тетрабутиламмония $N^+[(C_4H_9)_3CH_3]_4$ или тетрафенилбората $B^-(C_6H_5)_4$, существенно повышается электропроводность системы. Эти ионы быстро диффундируют сквозь мембраны. Был изучен транспорт этих ионов через митохондриальные мембраны (ММ) и субмитохондриальные частицы (СМЧ), полученные путем обработки митохондрий ультразвуком. ММ и СМЧ оказываются ориентированными противоположным образом. Цитохром c локализован на внешней стороне ММ и на внутренней стороне мембраны СМЧ. Можно думать, что внутримитохондриальное пространство заряжено отрицательно, а внутреннее пространство СМЧ — положительно. Энергизация СМЧ добавкой АТФ вызывает поглощение синтетических анионов, а деэнергизация ингибитором дыхания (актиномицином) или разобщителем окислительного фосфорилирования (производное фенилгидразона) вызывает выход анионов. Транспорт электронов в мембранах СМЧ сопровождается поглощением синтетических анионов. В свою очередь их транспорт нарушается ингибиторами электронного транспорта и разобщителями окислительного фосфорилирования.

В целом эксперимент показывает, что в сопрягающих мембранах происходит энергозависимый транспорт ионов. Его механизм не зависит от структуры ионов, способных проникать через фосфолипидные мембраны. Изменение ориентации мембран относительно окружающей среды (ММ и СМЧ) приводит к переориентации ионных потоков, направленных против градиентов концентрации ионов.

Согласно теории Митчелла, 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 этого поля, т. е. мембранного потенциала. Этого можно достичь перемещением катионов через мембрану. В результате должен возникнуть градиент рН, так как перенос каждого одновалентного катиона должен со-

проводятся освобождением одного протона во внешней среде. Добавление проникающих синтетических катионов к митохондриям вызывает увеличение концентрации H^+ в среде. Изменения рН исчезают при добавлении разобщителей. При работе дыхательной цепи среда подкисляется. Таким образом, установлено, что энергизация сопрягающей мембраны создает трансмембранный потенциал $\Delta\psi$ и разность ΔpH .

Из хемиосмотической теории следует, что энергия дыхания, трансформированная из химической формы в электрическую и осмотическую, может быть вновь переведена в химическую форму при синтезе АТФ или обратном переносе электронов. Биоэнергетический процесс обратим, что подтверждается опытом. Реализуется ионное фосфорилирование за счет электрической или осмотической энергии, выделяемой при движении ионов через мембрану по концентрационному градиенту.

Снижение $\Delta\psi$ должно приводить к нарушению сопряжения окисления и фосфорилирования. К этому сводится действие разобщителей сопряжения. Таковыми являются динитрофенол (ДНФ) и другие вещества. ДНФ, по-видимому, действует как переносчик протонов. Если схема Митчелла верна, то любые слабые кислоты и основания должны оказывать разобщающее действие. Разобщители действительно повышают протонную проводимость ММ. Выявлено далеко идущее сходство искусственных фосфолипидных мембран с внутренними мембранами митохондрий.

В работах лабораторий Либермана и Скулачева расположение дыхательной цепи определялось по ее способности образовывать мембранный потенциал. В среду вводились различные доноры и акцепторы электронов, не проникающие сквозь мембрану. Оказалось, что эти вещества взаимодействуют лишь с цитохромом *c* в митохондриях. Установлено, что транспорт протонов и (или) электронов по дыхательной цепи действительно происходит. В других экспериментах определена локализация компонентов в мембране митохондрий. На рис. 13.10 показано вероятное расположение цепи. Согласно хемиосмотической гипотезе, любая сопрягающая система должна создавать электрохимический потенциал ионов H^+ . Действительно, опыты с проникающими синтетическими ионами показали возникновение $\Delta\psi$ в митохондриях, СМЧ, хлоропластах (см. гл. 14) и мембранах бактерий. В то же время теория Митчелла встречается с трудностями и вызывает возражения. Блюменфельд приводит аргументы, показывающие невозможность построения «машины Митчелла» в конденсированной фазе. В такой машине АТФ-синтетаза использует разность концентраций протонов в водной фазе по обе стороны мембраны для выполнения внешней работы. Это — энтропийная машина, получающая энергию из термостата в форме кинетической энергии протонов. Протоны движутся преимущественно по градиенту концентраций и передают свои импульсы подвижным частям машины; разность потенциалов $\Delta\psi$ расходуется на создание

«горячих» протонов с высокой энергией. Соответствующее отклонение от равновесия по Больцману маловероятно, так как релаксация возбужденных термических степеней свободы происходит быстро — за 10^{-11} — 10^{-12} с. Следовательно, АТФ-синтетаза должна быть энтропийной машиной другого типа: энергия, полученная из термостата при взаимодействии протона с синтетазой,

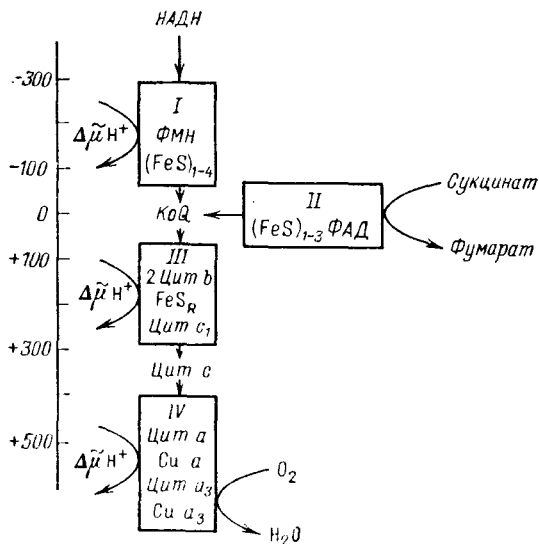


Рис. 13.10. Энергетическая схема электронного транспорта в митохондриях: ФМН — флавиномононуклеотид, $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ — трансмембранная разность электрохимических потенциалов протонов

превращается в локальное повышение потенциальной энергии. Внешняя работа может быть произведена, лишь если в элементарном акте на обеих сторонах мембраны возникает разность потенциалов $\Delta\psi$. АТФ-синтетаза, взаимодействующая с протонами, должна работать как водородный электрод и вся система использования разности концентраций протонов $\Delta\mu_{\text{H}}$ как концентрационный гальванический элемент. Единственный способ использовать оба компонента $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}}$ — создание общего электрического поля, и протоны, движущиеся внутри АТФ-синтетазы, должны накапливаться в аккумуляторе неизвестной природы, пока не наберется энергия, достаточная для синтеза одной молекулы АТФ. Нельзя, однако, использовать $\Delta\mu_{\text{H}}$ для сдвига химического равновесия — вся свободная энергия неравновесного состояния пошла на образование поля.

Остается также неясным, как электронно-донорный процесс (перенос протонов по градиенту μ_{H}) может обеспечить накопление энергии (в АТФ) без ее диссипации.

В недавних работах Блюменфельда (см. с. 440) показано, что образование АТФ в мембранах непосредственно связано с конформационной релаксацией, а не с разностью химических потенциалов протонов.

Независимо от этих исследований значение хемиосмотической теории велико. Она послужила мощным стимулом для глубокого изучения биоэнергетики сопрягающих мембран и предложила объяснение ряда фактов, относящихся к биоэнергетике и фотобиологии (см. § 14.3, 14.4, 14.8).

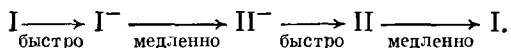
§ 13.4. Электронно-конформационные взаимодействия

Перемещение электронов в молекулярных системах всегда сопровождается перемещением атомных ядер. Как мы видели (гл. 6), в биополимерных системах реализуются электронно-конформационные взаимодействия (ЭКВ). Движение электрона и плотности зарядов в биополимерной системе, в частности, в мембране, сопряженное с конформационными движениями, может трактоваться как перемещение квазичастицы — *конформона* (с. 198). Есть весьма веские основания рассматривать окислительное фосфорилирование в ЦПЭ, исходя из этих представлений.

Грин и Джи (1972) предложили электромеханохимическую модель структуры и функции митохондрий. Элементарные частицы митохондрий (ЭЧМ) предполагаются существующими в основном неэнергизованном и в возбужденном энергизованном состояниях. Свободная энергия данного состояния складывается из химической, электрической и механической энергий. Взаимное превращение этих вкладов определяется ЭКВ. Конкретная модель Грина и Джи имеет, однако, гипотетический характер.

В работах Блюменфельда и сотрудников были установлены конформационные превращения в мембранах митохондрий (с помощью спектров ЭПР спин-меченых мембран, с помощью спектров люминесценции и т. д.). Доказана высокая кооперативность этих превращений и наличие термических структурных переходов в СМЧ.

Блюменфельд (1972) выдвинул гипотезу *релаксационных конформационных переходов* в митохондриальных мембранах. Допустим, что элементарный акт состоит в присоединении электрона к активному центру (скажем, к группе гема цитохрома). Нейтральной форме макромолекулы соответствует равновесная конформация I, заряженной (восстановленной) — другая конформация — II. Перенос электрона происходит много быстрее конформационного изменения. Следовательно, при протекании элементарного акта образуется неравновесное конформационное состояние — электрон перешел, но конформация не успела измениться. Затем происходит медленная релаксация к состоянию II. Весь переход можно представить схемой (минус обозначает электрон):



Энергия, выделяемая в элементарном акте, запасается в форме конформационной энергии в течение времени релаксации. За