

УДК 577.121.7

О ЛОКАЛЬНОМ СОПРЯЖЕНИИ СИСТЕМ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА И СИНТЕЗА АТФ В МИТОХОНДРИЯХ. ТЕОРИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТ

Обзор

© 2015 С.А. Еремеев*, Л.С. Ягужинский

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)939-0338,
электронная почта: s.ermeev@gmail.com,
yag@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 25.12.14
После доработки 25.01.15

В работе дано краткое описание главных смысловых направлений поиска и изучения предложенной Р. Вильямсом модели локального сопряжения дыхания и фосфорилирования. В процессе поиска были найдены условия, при которых удалось выявить характерные функциональные особенности фосфорилирующей системы митохондрий, которые, в соответствии с теорией, должны наблюдаться в эксперименте в тех случаях, когда эта система работает в режиме суперкомплекса. Доказана возможность существования двух режимов работы фосфорилирующей системы: режима П. Митчелла и режима Р. Вильямса. Продемонстрирована способность АТФ-синтетазы (F_1F_0) использовать в реакции синтеза АТФ в качестве источника энергии термодинамический потенциал кислоты Бренстеда. Методом двойного титрования при работе фосфорилирующей системы в режиме суперкомплекса доказано существование жесткой стыковки электрон-транспортной системы и АТФ-синтетазного комплекса. На модели БЛМ сформирована модельная система химического синтеза фракции мембраносвязанных ионов водорода (кислот Бренстеда), обладающих избытком свободной энергии, и найдены катализаторы, которые избирательно ускоряют отрыв протонов, входящих в эту фракцию. Зарегистрировано формирование фракции кислот Бренстеда, обладающих избытком свободной энергии, при работе протонных помп на мембранах митопластов и митохондрий. В экспериментальной части работы приведено краткое описание результатов исследования свойств новых типов разобщителей, которые направленно переводят систему фосфорилирования из режима локального сопряжения в режим трансмембранного переноса протонов и, тем самым, достоверно ускоряют дыхание митохондрий и снижают величину параметра АДФ/О.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: локальное сопряжение; фосфорилирующая система митохондрий; мембраносвязанные протоны, обладающие избытком свободной энергии; разобщители, отключающие локальное сопряжение.

В 1961 г. были предложены две модели протонного сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования митохондрий. Механизм П. Митчелла [1] в настоящее время считается общепринятым. В качестве начальной стадии трансформации энергии окислительных реакций он предполагает процесс индукции электрохимического потенциала ионов водорода на внутренней митохондриальной мембране, который осуществляется протонными помпами, путем трансмембранного переноса ионов водорода. Соглас-

но этой модели, автономно-функционирующая АТФ-синтетазная система использует энергию мембранного потенциала для синтеза АТФ (Митчелл). Механизм локального сопряжения (Р. Вильямс) [2] предполагает прямой перенос энергии от дыхательных протонных помп к АТФ-синтазе, протекающий с участием ионов водорода в составе мембранного суперкомплекса, включающего и H^+ -помпы, и АТФ-синтетазный комплекс.

В этой связи следует указать, что согласно Эйгену энергия полной сольватации протона в водной фазе составляет более 260 ккал/моль. Учитывая, что при синтезе одного моля АТФ запасается 7,3 ккал/моль [3], а на синтез одной молекулы АТФ расходуется 2,7–3,3 протона [4], можно заключить, что необходимая энергия для

Принятые сокращения: БЛМ – бислойная липидная мембрана; ТХФ- C_{15} – 2,4,6-трихлор-3-пентадецилфенол; SkQ3 – [10-(2,4,5-триметил-3,6-диоксоциклогексан-1,4-диен-1-ил)децил]трифенилфосфоний хлорид.

* Адресат для корреспонденции.

синтеза АТФ может быть с огромным избытком запасена за счет энергии реакции частичной дегидратации протона. Модель Вильямса допускает такой механизм запасаения энергии окислительных реакций, поскольку согласно этой модели при синтезе АТФ перенос энергии на АТФ-синтетазу осуществляется не «свободными», полностью гидратированными протонами, а связанными с мембранным суперкомплексом протонами – кислотами Бренстеда, которые хорошо экранированы от объема свободной водной фазы и поэтому могут переноситься на АТФ-синтетазу в частично дегидратированной форме.

Мы задались намерением проверить правильность гипотезы Вильямса. Для этого нам пришлось ответить на вопрос о том, насколько справедлива и модель Митчелла. После ряда неудачных попыток выполнить вторую, далеко не простую задачу, пришло решение, которое открыло путь к исследованию механизма локального сопряжения. Оказалось, что система окислительного фосфорилирования способна функционировать в двух формах – в диссоциированной форме, соответствующей модели Митчелла, и в форме суперкомплекса согласно модели Вильямса. В ходе этих исследований мы обнаружили, что при переходе к условиям низкоамплитудного набухания митохондрий при пониженной тоничности среды инкубации (120 мОсм) функциональные параметры системы соответствуют режиму ее работы в форме суперкомплекса [5, 6].

ОБНАРУЖЕНИЕ ДВУХ РЕЖИМОВ РАБОТЫ ФОСФОРИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ МИТОХОНДРИЙ

Изменения функциональных параметров фосфорилирующей системы митохондрий сопровождаются глубокой перестройкой ультраструктуры мембраны митохондрий, что было нами зарегистрировано на митохондриях с помощью электронной микроскопии [6], а также метода малоуглового рассеяния нейтронов на «живых» функционирующих митохондриях [7]. Кроме того, с помощью флуоресцентного зонда [6] были зарегистрированы сильно выраженные структурные изменения в белковой и липидной компонентах митохондриальной мембраны. При этом путем двойного ингибиторного анализа было показано, что в функционирующем суперкомплексе электрон-транспортная система ферментов и система синтеза АТФ жестко сопряжены друг с другом, так же как и элементы часового механизма, который прекращает свою работу при блокировке вращения любого элемента [5].

Итак, было установлено, что верными оказались оба варианта протонного сопряжения в фосфорилирующей системе. Это открытие позволило нам продолжить эксперименты, направленные на обнаружение и изучение условий образования и свойств мембраносвязанных ионов водорода, обладающих избытком свободной энергии (точнее, мембраносвязанных кислот Бренстеда). Опыты проводились как на митохондриях, так и в модельных системах.

В ходе этих исследований был проведен систематический поиск характерных функциональных признаков фосфорилирующей системы митохондрий, которые, в соответствии с теорией, должны наблюдаться в тех случаях, когда эта система работает в режиме суперкомплекса.

КИСЛОТЫ БРЕНСТЕДА КАК СУБСТРАТ АТФ-СИНТЕАЗЫ

На начальном этапе исследования было найдено решение ключевого вопроса, связанного с переносом энергии на АТФ-синтетазу при работе системы в режиме суперкомплекса. Положительный ответ на вопрос о том, может ли АТФ-синтетаза использовать термодинамический потенциал кислот Бренстеда в качестве источника энергии, был получен на бинарной системе октан–вода, в которой АТФ-синтетаза (F_1F_0), выделенная из митохондрий сердца, сорбировалась на межфазной границе (со стороны водной фазы). В водную фазу этой системы добавлялись субстраты фосфорилирования. При этом в качестве источника энергии в реакции синтеза АТФ на межфазной границе использовался термодинамический потенциал кислоты Бренстеда (пентахлорфенола), которая добавлялась в гидрофобную фазу октана [8].

ФОРМИРОВАНИЕ ФРАКЦИИ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ ИОНОВ ВОДОРОДА, ОБЛАДАЮЩИХ ИЗБЫТКОМ СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ, НА ПЛОСКОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ

Первая удачная попытка регистрации связывания протона с поверхностью мембраны при работе протонной помпы была описана Драчевым с соавт. [9] на модели родопсиновых бляшек. Авторы обнаружили, что в реакции диссоциации мембраносвязанных кислот Бренстеда, образующихся при работе протонных помп, существует достаточно высокий кинетический барьер, способствующий удержанию протона на поверхности родопсиновых бляшек.

В нашей лаборатории на модели бислойной липидной мембраны (БЛМ) была разработана модельная система протонного транспорта [10, 11], в которой процесс трансмембранного переноса ионов водорода лимитирован реакцией отрыва протона от поверхности липидного бислоя. При этом на *транс*-стороне БЛМ прямым методом было зарегистрировано образование фракции мембраносвязанных ионов водорода, обладающих избытком свободной энергии. Это согласуется с нашей гипотезой о возможности запасаения энергии окислительных реакций в форме частично дегидратированных мембраносвязанных протонов (точнее, кислот Бренстеда) [12]. Полученные в этой работе результаты позволяют говорить о возможности протекания специфической реакции дегидратации кислот Бренстеда в процессе их переноса через гидрофобный барьер липидного бислоя.

О КАТАЛИЗАТОРАХ РЕАКЦИИ ДИССОЦИАЦИИ КИСЛОТ БРЕНСТЕДА, СВЯЗАННЫХ С ПОВЕРХНОСТЬЮ МЕМБРАН

Анализ результатов работы Антоненко с соавт. [10] выявил необычное свойство слабых оснований – аниона лимонной кислоты (цитрата) и НЕРЕС, которые обычно рассматриваются как рН-буферы. Однако в условиях экспериментов, проведенных на БЛМ, они проявили себя как катализаторы реакции отрыва мембраносвязанных ионов водорода, обладающих избытком свободной энергии, от поверхности мембраны. В условиях поддержания постоянного значения рН в среде повышение концентрации цитрата (или НЕРЕС) снижает положительный поверхностный потенциал, индуцированный трансмембранным переносом протона в системе (потенциал измерялся методом компенсации внутреннего поля мембраны). Параллельно было показано, что слабые основания существенно усиливают скорость переноса протонов через бислой и тем самым, как показали прямые измерения, снижают рН в примембранном неперемешиваемом слое. Последний эффект по знаку противоположен тому, который должен ожидать в том случае, если цитрат функционирует в качестве буфера, поскольку повышение концентрации буфера должно снижать, а не повышать градиенты рН в системе. Таким образом, был продемонстрирован специфический каталитический эффект взаимодействия слабых оснований с мембраносвязанными кислотами Бренстеда в реакции их диссоциации на поверхности мембраны. Существование явления катализа в соче-

тании с наблюдаемым значительным увеличением трансмембранного потока протонов еще раз свидетельствует о неравновесности состояния и высокой свободной энергии мембраносвязанных протонов (кислот Бренстеда), образующихся в условиях эксперимента.

ФРАКЦИЯ «ЭНЕРГИЗОВАННЫХ» ПРОТОНОВ НА ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН МИТОПЛАСТОВ И МИТОХОНДРИЙ

Обнаружение катализаторов, избирательно ускоряющих реакцию диссоциации мембраносвязанных кислот Бренстеда, обладающих избытком свободной энергии, позволило легко обнаружить присутствие этой фракции на поверхности митохондриальных мембран [13–15]. На мембране митопластов в условиях работы дыхательных Н⁺-помп был экспериментально зарегистрирован эффект образования вышеуказанной фракции «энергизованных» протонов. В этих опытах с помощью дзетта-сайзера регистрировались изменения дзетта-потенциала на поверхности митопластов, вызванные включением работы Н⁺-помп и последующим добавлением катализатора отрыва «энергизованных» протонов (НЕРЕС) от поверхности мембраны [13].

Такой же эффект удалось наблюдать на фосфорилирующих митохондриях (в присутствии субстратов – сукцината, АДФ, фосфата) в условиях плотной стыковки внешней и внутренней мембран митохондрий в среде с пониженной тоничностью (120 мОсм) [15].

В наших работах было экспериментально показано возникновение мембраносвязанных кислот Бренстеда, обладающих избытком свободной энергии, на мембранах митопластов [13] и митохондрий [14, 15]. На основании этих экспериментов мы получили полное уравнение термодинамического потенциала ионов водорода (ΔG) как сумму электрохимического потенциала Митчелла ($\Delta\mu_H$) и сольватационного потенциала ($\Delta\mu_{\text{solv}}$), который обусловлен частичной дегидратацией протонов, связанных с мембраной:

$$\Delta G = \Delta\mu_H + \Delta\mu_{\text{solv}}$$

В работах Солодовниковой с соавт. [12] и Ягужинского с соавт. [16] было показано, что энергия сольватационного потенциала может быть использована для синтеза АТФ, при этом катализатор реакции отрыва протонов снижает параметр АДФ/О на 15–30%. Этот результат говорит о том, что фракция мембраносвязанных протонов участвует в синтезе АТФ.

**О ДВУХ НОВЫХ МЕХАНИЗМАХ
РАЗОБЩЕНИЯ ДЫХАНИЯ
И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
МИТОХОНДРИЙ, СВЯЗАННЫХ
С РАБОТОЙ ФОСФОРИЛИРУЮЩЕЙ
СИСТЕМЫ В РЕЖИМЕ ЛОКАЛЬНОГО
СОПРЯЖЕНИЯ**

В нашей лаборатории был направленно разработан класс протонифоров, избирательно взаимодействующих с фракцией поверхностно-связанных ионов водорода. Для этого нами было синтезировано поверхностно-активное производное фенола: 2,4,6-трихлор-3-пентадецилфенол (ТХФ-С₁₅) [17], который, исходя из данных экспериментов, избирательно взаимодействует с фракцией мембраносвязанных ионов водорода. ТХФ-С₁₅, как показано во многих сериях экспериментов [17, 18], в диапазоне концентраций от 10 нМоль до десятков мкМоль стимулирует дыхание митохондрий. Если с помощью катализатора [10] или путем включения системы транспорта фосфата [19] (рис. 1) убрать эту фракцию, разобщающий эффект данного соединения практически исчезает.

В работах, проведенных на модельной системе (бислойной мембране), было показано, что ТХФ-С₁₅ обладает свойствами слабого протонифора (рис. 2). При создании градиента рН между ячейками мы наблюдали возникновение трансмембранного потенциала в 45–48 мВ.

Параллельно нами проводились исследования с поверхностно активным соединением [10-(2,4,5-триметил-3,6-диоксоциклогексан-1,4-диен-1-ил)децил]трифенилфосфония хлоридом (SkQ3) [20, 21]. При проведении сравнительных исследований SkQ3 и ТХФ-С₁₅ на митохондриях были получены аналогичные результаты (рис. 3). Это, очевидно, связано с восстановлением SkQ3 до гидрохинона в мембранах митохондрий и может зависеть от присутствия жирных кислот в экспериментальной системе. Эксперименты на БЛМ проводились с заранее восстановленной формой SkQ3 (SkQ3Н₂) на мембране, сформированной из дифитонилфосфотидилхолина – аналога дифитонилфосфотидилхолина, в котором отсутствуют радикалы жирных кислот, и сложноэфирные связи заменены на связи простых эфиров. Результаты экспериментов показали наличие протонифорной активности SkQ3 (рис. 2). При создании градиента рН, равного 1, наблюдалась индукция трансмембранного потенциала, величина которого соизмерима с теоретическим значением и составляет ~40–45 мВ. Опыты проводились по стандартной методике в средах, содержащих 81 мМ

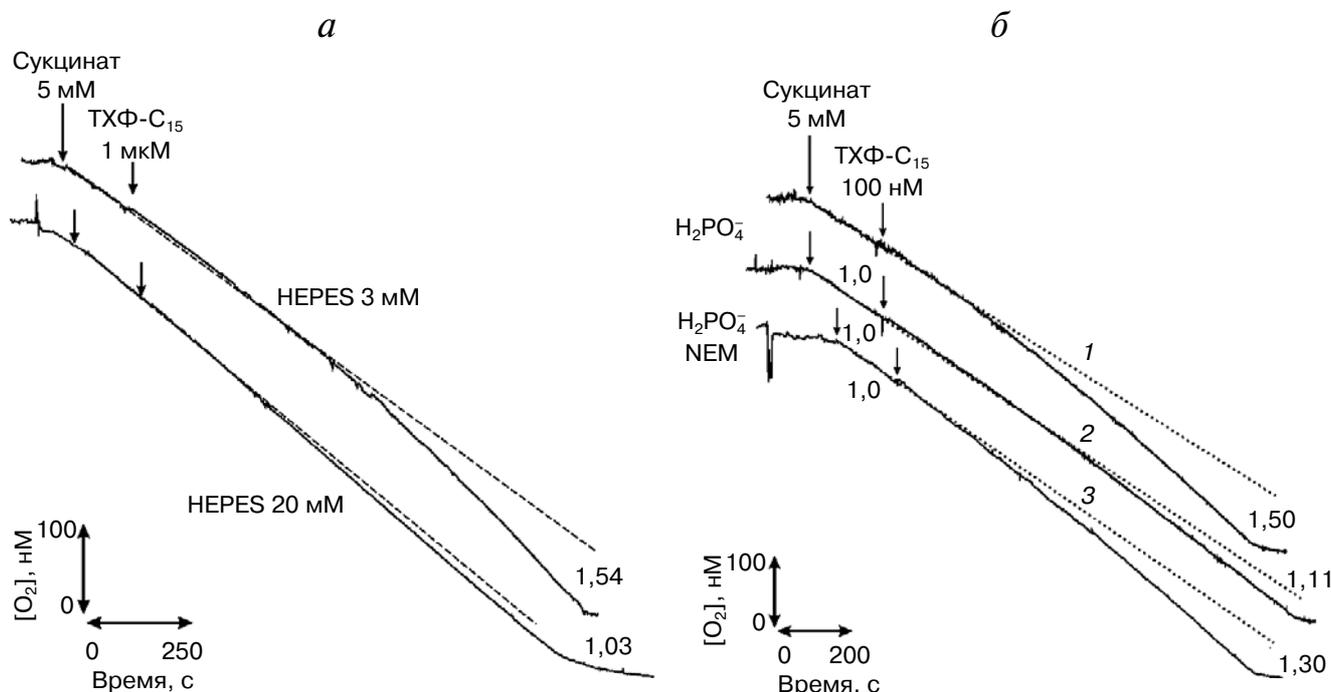


Рис. 1. Снятие эффекта стимуляции дыхания митохондрий печени крыс протонифором ТХФ-С₁₅ путем удаления с поверхности мембран митохондрий фракции энергизованных протонов катализатором НЕРЕS 20 мМ (а) и путем включения системы транспорта фосфата (б) [18] (печатается с разрешения Springer)

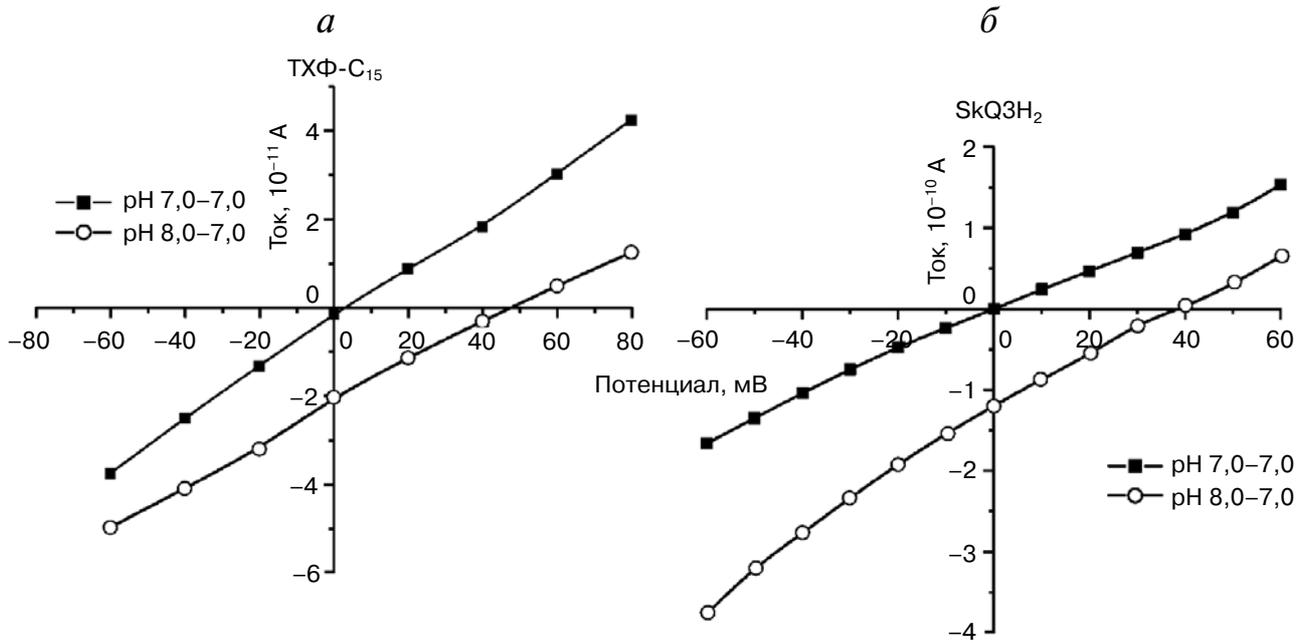


Рис. 2. Доказательство протонных свойств TXF-C₁₅ и восстановленной формы SkQ3H₂. Вольт-амперные характеристики поверхностно активных протонаторов в отсутствие и в присутствии градиента pH на БЛМ [23] (печатается с разрешения Springer)

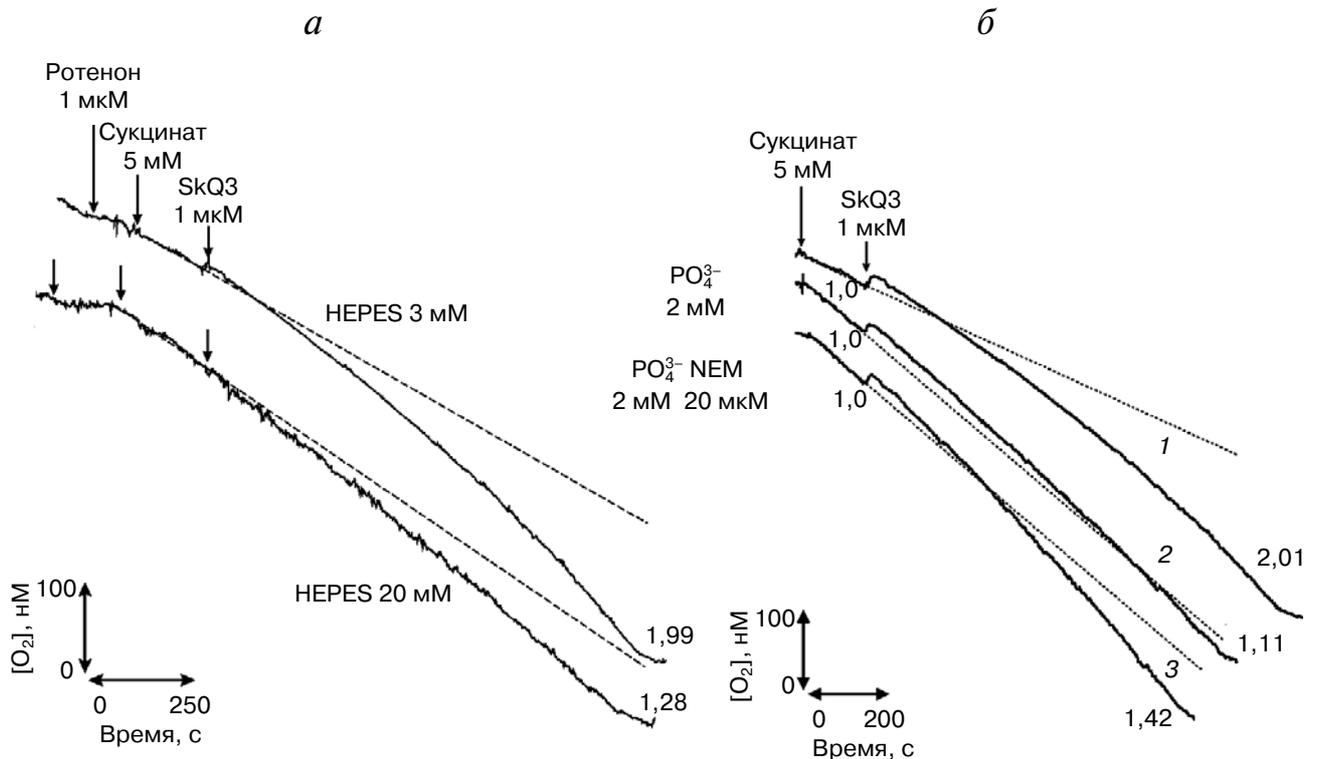


Рис. 3. Снятие эффекта стимуляции дыхания митохондрий печени крыс протонатором SkQ3 путем удаления с поверхности мембран митохондрий фракции энергизованных протонов путем добавления катализатора HEPES 20 mM (a) и путем включения работы системы транспорта фосфата (б) [21] (печатается с разрешения Springer)

KCl и 3 мМ HEPES при pH 7,0. В нашей предыдущей работе было показано, что $pK_{(SkQ3)} = 9,5$ [20]. Учитывая эффект снижения значения константы диссоциации на 1,0–1,5 рН при связывании поверхностно активных кислот на межфазной границе мембрана–вода, это соединение должно быть эффективным протонифором в условиях эксперимента. Полученный результат (рис. 2) не противоречит данным работы Северина с соавт. [22], согласно которым протонифорность производных SkQ связана с их способностью эффективно образовывать гетеродимеры с жирными кислотами. В работе этих авторов использовалась окисленная (хиноидная) форма SkQ, которая практически не взаимодействует с ионами водорода и поэтому в отличие от использованной нами свежеприготовленной восстановленной формы не обладает протонифорными свойствами.

Таким образом, было показано, что независимо от структуры молекулы поверхностно активные соединения обладают одинаковыми свойствами слабых разобщителей, избирательно взаимодействующих с фракцией протонов, связанных с мембраной, которая образуется на

поверхности мембраны митохондрий при работе H^+ -помп.

В процессе многолетних исследований, проведенных в нашей лаборатории, было установлено, что слабые непроницающие через мембраны основания могут выступать в роли слабых разобщителей окислительного фосфорилирования [12]. В нашей работе на БЛМ [10] было показано, что добавление катализатора увеличивает величину трансмембранного потока протонов, поскольку медленной стадией транспорта протона в условиях экспериментов является стадия отрыва протона от поверхности мембран. В работе Солодовниковой с соавт. [12] было продемонстрировано, что добавление катализатора (HEPES, 20 мМ) снижает эффективность работы фосфорилирующей системы (АДФ/О). Снижение параметра АДФ/О в этих экспериментах сопряжено с переключением фосфорилирующей системы из режима локального сопряжения, при котором используется сольватационный потенциал в реакции синтеза АТФ, на режим трансмембранного переноса протона.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-01-630а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, **191**, 144–148.
- Williams, R.J. (1961) Possible functions of chain of catalysts, *J. Theor. Biol.*, **1**, 1–17.
- Северин Е.С. (2004) *Биохимия* (2-е изд., исправленное), ГЭОТАР-МЕД, Москва.
- Ferguson, S.J. (2010) ATP synthase: from sequence to ring size to the P/O ratio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 16755–16756.
- Krasinskaya, I.P., Marshansky, V.N., Dragunova, S.F., and Yaguzhinsky, L.S. (1984) Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria, *FEBS Lett.*, **167**, 176–180.
- Krasinskaya, I.P., Litvinov, I.S., Zakharov, S.D., Bakeeva, L.E., and Yaguzhinsky, L.S. (1989) Relationships of respiratory chain and ATP-synthetase in energized mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **54**, 1550–1556.
- Murugova, T.N., Gordeliy, V.I., Islamov, A.K., Kovalev, Y.S., Kuklin, A.I., Vinogradov, A.D., and Yaguzhinsky, L.S. (2006) Structure of membrane of submitochondrial particles studied by small angle neutron scattering, *Materials Structure*, **2**, 68–70.
- Yaguzhinsky, L.S., Boguslavsky, L.I., Volkov, A.G., and Rakhmaninova, A.B. (1976) Synthesis of ATP coupled with action of membrane protonic pumps at the octane-water interface, *Nature*, **259**, 494–496.
- Drachev, A.L., Kaulen, A.D., and Skulachev, V.I. (1984) Reconstitution of biological molecular generators of electric current H^+ -ATPase, *FEBS Lett.*, **178**, 331–336.
- Antonenko, Y.N., Kovbasnjuk, O.N., and Yaguzhinsky, L.S. (1993) Evidence in favor of the existence of a kinetic barrier for proton transfer from a surface of bilayer phospholipid membrane to bulk water, *Biochim. Biophys. Acta*, **1150**, 45–50.
- Kovbasnjuk, O.N., Antonenko, Y.N., and Yaguzhinsky, L.S. (1991) Proton dissociation from nigerisin at the membrane-water interface, the rate-limiting step of K/W exchange on the bilayer lipid membrane, *FEBS Lett.*, **289**, 176–178.
- Solodovnikova, I.M., Yurkov, V.L., Ton'shin, A.A., and Yaguzhinsky, L.S. (2004) Local coupling of respiration processes and phosphorylation in rat liver mitochondria, *Biofizika*, **49**, 47–56.
- Моисеева В.С., Мотовилов К.А., Лобышева Н.В., Орлов В.Н., Ягужинский Л.С. (2011) Образование нестабильной связи ионов водорода с поверхностью митопластов, *Доклады Академии наук (Биохимия, Биофизика, Молекулярная биология)*, **438**, 555–558.
- Yurkov, V.I., Fadeeva, M.S., and Yaguzhinsky, L.S. (2005) Proton transfer through the membrane-water interfaces in uncoupled mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 195–199.
- Ерошенко Л.В., Мараховская А.С., Вангели И.М., Семенюк П.И., Орлов В.Н., Ягужинский Л.С. (2012) Кислоты Бренстеда на мембранах митохондрий как субстрат АТФ-синтетазы, *Доклады Академии наук (Биохимия, Биофизика, Молекулярная биология)*, **444**, 1–4.
- Yaguzhinsky, L.S., Yurkov, V.I., and Krasinskaya, I.P. (2006) On the localized coupling of respiration and phosphorylation in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 408–414.
- Мотовилов К.А., Юрков В.И., Волков Е.М., Ягужинский Л.С. (2009) Изучение свойств и поиск методов ис-

- следования неравновесных состояний ионов водорода на межфазных границах мембран митохондрий, возникающих в условиях работы протонных помп, *Биол. мембраны*, **26**, 408–418.
18. Ягужинский Л.С., Мотовилов К.А., Волков Е.М., Еремеев С.А. (2013) О взаимодействии поверхностно активного основания с фракцией мембраносвязанных протонов Вильямса, *Биофизика*, **58**, 117–125.
 19. Kramer, R. (1998) Mitochondrial carrier proteins can reversibly change their transport mode: the cases of the aspartate/glutamate and the phosphate carrier, *Exp. Physiol.*, **83**, 259–265.
 20. Еремеев С.А., Каргин В.И., Мотовилов К.А., Ташлицкий В.Н., Марков В.Ю., Коршунова Г.А., Сумбатян Н.В., Высоких М.Ю., Ягужинский Л.С. (2009) Молекулярные механизмы превращения митотропных хинонов ряда SkQ и поиск путей создания избирательно действующих «ловушек» свободных радикалов, *Биохимия*, **74**, 1368–1379.
 21. Еремеев С.А., Мотовилов К.А., Волков Е.М., Ягужинский Л.С. (2011) Новый представитель класса мембранотропных разобщителей – SkQ3, *Биол. мембраны*, **28**, 339–345.
 22. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vyssokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
 23. Джумашев Д.Б., Бывшев И.М., Еремеев С.А., Ягужинский Л.С. (2015) Специфика взаимодействия поверхностно-активного протонофора 2,4,6-трихлор-3-пентадецилфенола с искусственными и митохондриальными мембранами, *Биол. мембраны*, **32**, 11–19.

ON LOCAL COUPLING OF THE ELECTRON TRANSPORT AND ATP SYNTHESIS SYSTEM IN MITOCHONDRIA. THEORY AND EXPERIMENT

S. A. Eremeev*, L. S. Yaguzhinskiy

*M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(495)939-0338, E-mail: s.ermeev@gmail.com,
yag@genebee.msu.su*

Received December 25, 2014
Revision received January 25, 2015

A brief description of the principal meaningful directions of searching and investigating of the model of local coupling between respiration and phosphorylation, proposed by R. Williams, is given in this paper. We found conditions where it was possible to reveal typical functional features of the mitochondrial phosphorylating system. According to theory, such features should be observed in the experiment if the mitochondrial phosphorylating system operates in a supercomplex state. It was proved that the phosphorylating system is able to operate in two states: P. Mitchell state and R. Williams state. It was demonstrated that in the ATP-synthesis reaction ATP synthase (F_1F_0) is able to use thermodynamic potential of Bronsted acids as a source of energy. It was proved using a double-inhibitor titration technique that when the phosphorylating system operates in the supercomplex state, the electron-transport system and the ATP-synthesis system have rigid docking. The model system of chemical synthesis of membrane-bound proton fraction (Bronsted acids), carrying the excess of free energy, was developed on a BLM model. Catalysts selectively accelerating the proton detachment were also found. The formation of Bronsted acid fraction, carrying the excess of free energy, was registered during the operation of proton pumps on mitochondrial and mitoplast membranes. In the experimental part of the work, a brief description of the study of new uncoupler types that transfer the phosphorylation system from the local coupling state to the transmembrane proton transfer state is given. That is why they accelerate respiration of mitochondria and decrease the ADP/O parameter.

Key words: local coupling; phosphorylating system of mitochondria; membrane-bound protons carrying the excess of free energy; uncouplers deactivating local coupling