

Н. В. ГОНЧАРОВА, В. Б. ЕВСТИГНЕЕВ

ОБРАЗОВАНИЕ АТФ В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ УЧАСТИИ КАТАЛАЗЫ И ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

(Представлено академиком А. И. Опариным 11 III 1975)

Несмотря на большое число исследований, вопрос о механизме образования пирофосфатных связей АТФ в процессе фотосинтетического и окислительного фосфорилирования во многом остается еще неясным. В нашем предыдущем сообщении ⁽¹⁾ на основании экспериментальных результатов, полученных при исследовании фотофосфорилирования на бесклеточных препаратах из анаэробных фотосинтезирующих серобактерий *Chromatium minutissimum*, было выдвинуто предположение, что образованию АТФ предшествует взаимодействие молекулы ортофосфата, находящегося в условиях реакции (рН 8) в форме дианиона, с акцептором электронов; отдав электрон, принадлежащий одному из отрицательно заряженных атомов кислорода, ортофосфат теряет гидроксильный радикал и превращается в метафосфат, который легко присоединяется к АДФ, образуя АТФ.

Акцептором электрона по отношению к иону фосфата может служить возбужденный светом хлорофилл. В водно-спиртовых растворах мы наблюдали фотосенсибилизированный хлорофиллом перенос электрона от фосфата на конечный акцептор электронов — метиловый красный ⁽¹⁾; в модельной фотофосфорилирующей системе освещение адсорбатов хлорофилла на окиси алюминия в фосфатном растворе, содержащем АДФ, приводило к образованию АТФ ⁽²⁾. Подходящим акцептором электронов для ионов фосфата является атомарный кислород, выделяющийся при электролизе фосфатных растворов. Наряду с другими продуктами окисления ортофосфата, в условиях электролиза происходит образование пирофосфата ⁽²⁾.

При разложении перекиси водорода каталазой выделяется молекулярный кислород, обладающий высокой окислительной способностью. Было обнаружено ⁽³⁾, что этот кислород находится в синглетном возбужденном состоянии. Каталаза широко распространена в организмах с аэробным обменом веществ, в значительных количествах находится в хлоропластах и митохондриях. Как было показано ⁽⁴⁾, перекись водорода образуется при работе дыхательной цепи митохондрий в аэробных условиях. Известно также, что перекись водорода образуется при окислении кислородом воздуха восстановленных переносчиков электронтранспортной цепи в хлоропластах ⁽⁵⁾. По мнению Манойлова и сотрудников, каталаза необходима для образования АТФ в митохондриях ⁽⁶⁾. Имеются ⁽⁷⁾ наблюдения, что прибавление каталазы, особенно в сочетании с перекисью водорода, к фотофосфорилирующим хлоропластам увеличивает образование АТФ. Возможно, каталаза принимает участие в образовании АТФ благодаря высокой окислительной способности синглетного кислорода, образующегося при разложении H_2O_2 ; можно предполагать, что в результате взаимодействия синглетного кислорода, как акцептора электрона, с ионом ортофосфата образуется метафосфат, который присоединяется к АДФ, давая АТФ.

В настоящей работе для выяснения этого вопроса мы использовали простую модельную систему. Реакционная смесь в объеме 3 мл содержала каталазу 0,1 мг (препарат фирмы «Reanal»), H_2O_2 200 мкмол., K_2HPO_4 30 мкмол. и АДФ 10 мкмол.

Фосфорилирование определяли по убыли неорганического фосфата в реакционной среде по сравнению с контролем (¹). Состав аденозинфосфатов анализировали путем восходящей хроматографии на бумаге (⁷).

На рис. 1 представлены результаты определения фосфорилирования, происходящего в присутствии каталазы и перекиси водорода в зависимости от рН среды при комнатной температуре и при 0°. Фосфорилирование происходит в области рН 6,5—8,3, с наибольшим выходом при рН 8,0 и 7,0. Зависимость реакции от рН среды отражает свойства участвующих компонентов. Фосфатные ионы обладают наибольшей электронодонорной способностью при рН 8, синглетный кислород наиболее активен в нейтральной

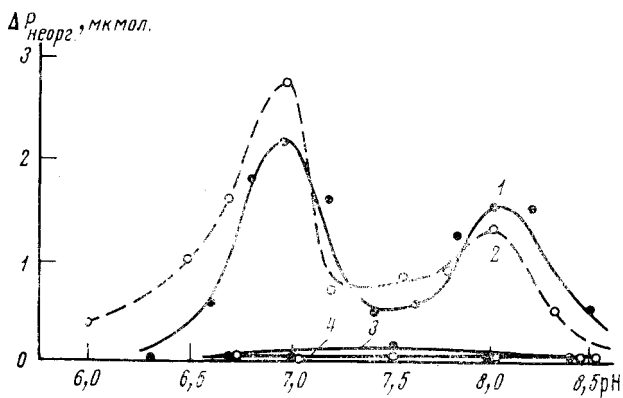


Рис. 1. Фосфорилирование при участии каталазы и H_2O_2 в зависимости от рН среды. 1 — при температуре 20°, 2 — 0°, 3 — реакционная смесь без H_2O_2 , 4 — без каталазы, температура 20°, 0°. Продолжительность реакции 10 мин.

среде. Снижение температуры раствора до 0° приводит к повышению концентрации кислорода в реакционной среде и увеличивает выход фосфорилирования при рН 7. В контрольных опытах без каталазы и перекиси водорода или при отсутствии одного из компонентов фосфорилирование не происходит.

На рис. 2 приведены результаты определения убыли неорганического фосфата во время реакции при разном содержании перекиси водорода в реакционной среде. При увеличении количества перекиси водорода от 50 до 200 мкмол. связывание неорганического фосфата значительно возрастает.

Использованные нами препараты АДФ содержали АМФ (примерно 25%) и незначительные количества АТФ (около 2%). Во время реакции, происходящей в присутствии каталазы и перекиси водорода, количество АТФ увеличивается, одновременно с этим уменьшается количество АМФ. Результаты одного из опытов представлены на рис. 3. На рисунке показано содержание аденозинфосфатов в начале опыта и в процессе реакции каталазы с перекисью водорода. Перекись водорода вносили по 200 мкмол. в начале опыта и затем через каждые 20 мин. реакции. Количество АТФ и сумма АТФ и АДФ возрастает с увеличением количества разложенной перекиси водорода. АМФ к концу опыта почти полностью исчезает, количество АТФ увеличивается на 2 мкмоль.

Экспериментальный материал, приведенный выше, показывает, что в модельной системе, содержащей каталазу, H_2O_2 , фосфат и АДФ, возможно образование АТФ. Так как фосфорилирование не происходит в присутствии одной каталазы без перекиси водорода, а также в присутствии одной перекиси водорода без каталазы, можно полагать, что образование пирофосфатных связей АТФ в данном случае зависит от синглетного кислорода, образующегося в результате разложения перекиси водорода каталазой.

Наряду с каталазой, в последнее время уделяется большое внимание пероксидазам и их возможной роли в образовании АТФ в хлоропластах (^{7,9}) и в митохондриях (¹⁰). Пероксидазы используют специфичные восстановленные соединения для восстановления перекиси водорода. Было обнаружено (¹¹), что в результате этой реакции, помимо гидроксильных воды, образуется сильный окислитель — гидроксильные радикалы ОН. Можно предполагать, что фосфорилирование, наблюдаемое в присутствии пероксидаз, зависит от гидроксильных радикалов, образующихся в результате

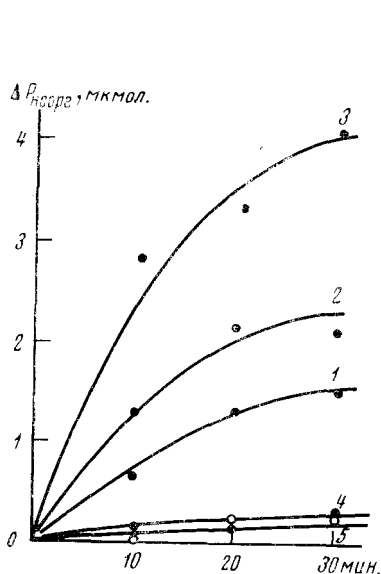


Рис. 2

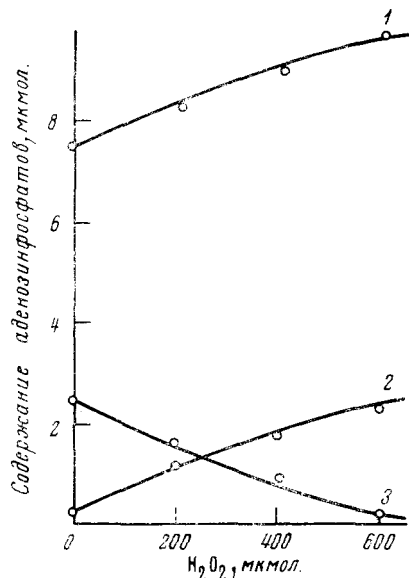


Рис. 3

Рис. 2. Ход фосфорилирования при разных концентрациях H_2O_2 . 1 — 50 мкмол. H_2O_2 в 3 мл реакционной смеси, 2 — 100 мкмол., 3 — 200 мкмол., 4 — реакционная смесь без H_2O_2 , 5 — реакционная смесь без каталазы, H_2O_2 200 мкмол., рН 7,0

Рис. 3. Образование АТФ в присутствии каталазы и H_2O_2 при постепенном добавлении H_2O_2 в реакционную среду. 1 — АДФ+АТФ, 2 — АТФ, 3 — АМФ

реакции пероксидазы с перекисью водорода. Гидроксильные радикалы могут служить акцептором электронов по отношению к ионам фосфата. Возможно, существуют и другие акцепторы электронов, взаимодействие которых с фосфатом может приводить к образованию пирофосфатных связей.

На основании данных, полученных нами при изучении фосфорилирования в простых модельных системах, можно предполагать, что взаимодействие фосфатного иона с акцептором электрона является обязательной стадией образования АТФ. Это представление находит подтверждение и в механике субстратного фосфорилирования, однако этот вопрос требует специального рассмотрения.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
11 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. В. Гончарова, В. Б. Евстигнеев, Биохимия, т. 36, 2, 311 (1971). ² Н. В. Гончарова, В. Б. Евстигнеев, Биохимия, т. 40, № 3 (1975). ³ М. Anbar, J. Am. Chem. Soc., v. 88, 24, 5924 (1966). ⁴ B. Chance, Science, v. 116, 3008, 202 (1952). ⁵ A. T. Jagendorf, Survey Biol. Progress, v. 4, 181 (1962). ⁶ С. Е. Манойлов, В кн.: Митохондрии. Биохимия и морфология, М., «Наука», 1967. ⁷ Е. А. Акулова, С. В. Мурзаева, Биохимия, т. 38, № 5, 901 (1973). ⁸ W. E. Cohn, C. E. Carter, J. Am. Chem. Soc., v. 72, 9, 4273 (1950). ⁹ Т. М. Иванова, Б. А. Рубин, М. А. Давыдова, ДАН, т. 190, № 1, 214 (1970). ¹⁰ Г. П. Миронов, Г. Д. Миронова, М. Н. Кондрашова, В кн.: Митохондрии. Биохимия и ультраструктура, М., «Наука», 1973. ¹¹ P. George, D. H. Irvine, Biochem. J., v. 52, 3, 511 (1952).