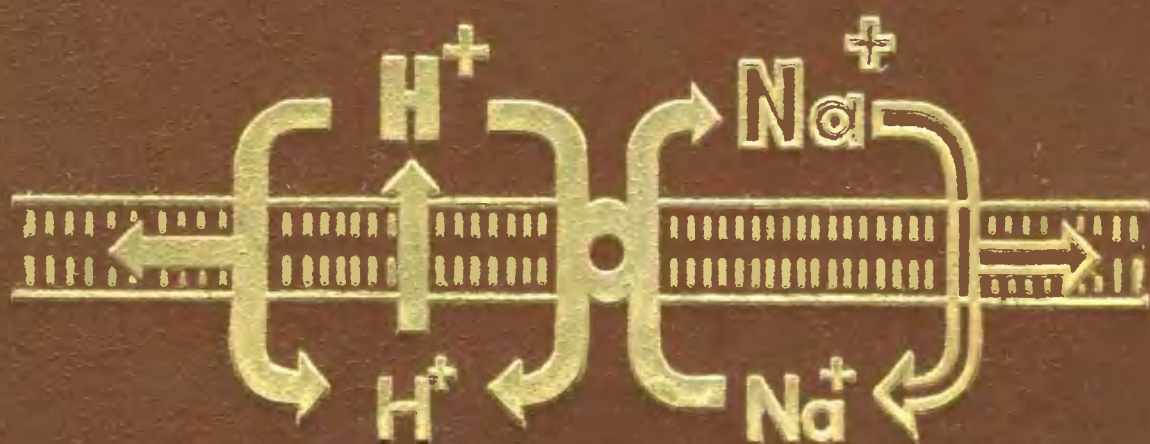
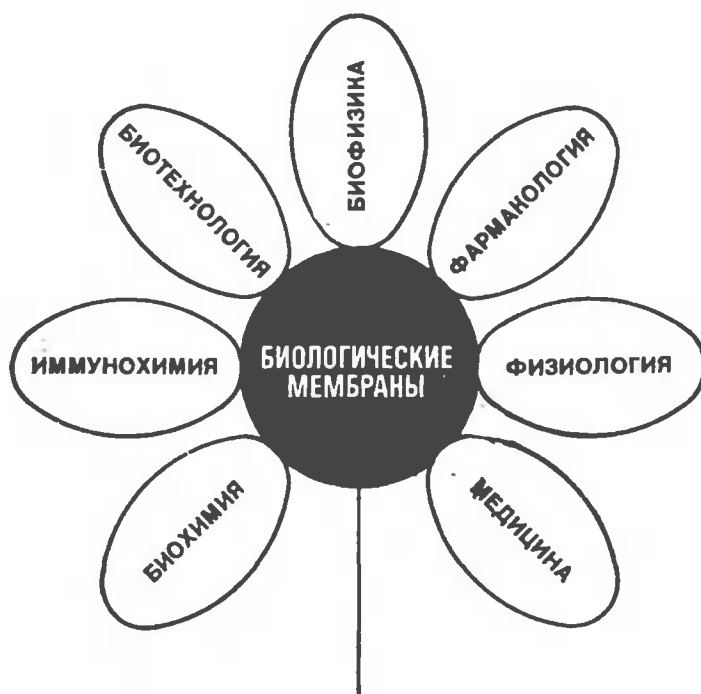


БИОХИМИЯ МЕМБРАН

В.П. СКУЛАЧЕВ

БИОЭНЕРГЕТИКА Мембранные преобразователи энергии





БИОХИМИЯ МЕМБРАН

Под редакцией
А.А. Болдырева

Книга 6

В.П.СКУЛАЧЕВ

БИОЭНЕРГЕТИКА

Мембранные преобразователи энергии

Допущено
Государственным комитетом СССР
по народному образованию
в качестве учебного пособия
для студентов биологических
и медико-биологических специальностей
высших учебных заведений



Москва

«Высшая школа» 1989

ББК 28.05
Б63
УДК 577.1

Рецензенты:

кафедра биохимии 2-го Московского государственного медицинского
института имени Н. И. Пирогова (зав. кафедрой чл.-кор. АМН СССР,
проф. А. И. Арчаков); д-р биол. наук Р. А. Звягильская (Ин-т
биохимии имени А. Н. Баха)

Б 1903010000(4309000000)—484 КБ—48—21—88
001(01)—89

ISBN 5-06-000467-8

© В. П. Скулачев, 1989

Список принятых сокращений

АДФ	— аденозин-5'-дифосфат
АМФ	— аденозин-5'-монофосфат
АТФ	— аденозин-5'-трифосфат
БАЛ	— британский антильюзит (2,3-димеркаптопропанол)
БФео	— бактериофеофитин
БХл	— бактериохлорофилл
(БХл) ₂	— димер бактериохлорофилла
(БХл) ₂ *	— возбужденный димер бактериохлорофилла
(БХл) ₂ ⁺	— катион-радикал димера бактериохлорофилла
ГДФ	— гуанозин-5'-дифосфат
ГМФ	— гуанозин-5'-монофосфат
ГТФ	— гуанозин-5'-трифосфат
ДБТФ	— дибромтимохинон
ДДА ⁺	— N,N-дифенил,N,N-диметиламмоний
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЦКД	— N,N'-дициклогексилкарбодимид
КоА	— коэнзим А
КоQ	— коэнзим Q, или убихинон
КоQ ⁻	— анион-радикал коэнзима Q
КоQH ₂	— восстановленный коэнзим Q, или дигидроубихинон
НАД ⁺	— никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	— восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ ⁺	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФН	— восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
Пц	— пластоцианин
РНК	— рибонуклеиновая кислота
ТБА ⁺	— тетрабутиламмоний
ТМПД	— тетраметил-пара-фенилендиамин
ТНФ ⁻	— тринитрофенол-анион
ТФБ ⁻	— тетрафенилборат
ТФФ ⁺	— тетрафенилфосфоний
ФАД	— флавинадениндинуклеотид
ФАДН ₂	— восстановленный флавинадениндинуклеотид
Фд	— ферредоксин
Фео	— феофитин
ФЕП	— фосфоенолпируват
ФКБ ⁻	— фенилдикарбаундекаборат
ФМН	— флавиномононуклеотид
ФМНН ₂	— восстановленный флавиномононуклеотид
ФМС	— феназинметосульфат
Фп	— флавопротеин

ХКФ	— <i>m</i> -хлоркарбонилцианидфенилгидразон
Хл	— хлорофилл
Хл *	— возбужденный хлорофилл
Хл $\dot{+}$	— катион-радикал хлорофилла
цАМФ	— циклический аденозин-3',5'-монофосфат
цГМФ	— циклический гуанозин-3',5'-монофосфат
ЭПР	— электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	— ядерный парамагнитный резонанс
$\Delta\mu\text{H}$	— разность электрохимических потенциалов ионов водорода
$\Delta\mu\text{I}$	— разность электрохимических потенциалов иона «I»
$\Delta\mu\text{K}$	— разность электрохимических потенциалов ионов калия
$\Delta\mu\text{Na}$	— разность электрохимических потенциалов ионов натрия
$\Delta\psi$	— разность электрических потенциалов
Δp	— протондвижущая сила
$\Delta p\text{H}$	— разность концентраций ионов водорода
$\Delta p\text{K}$	— разность концентраций ионов калия
$\Delta p\text{Na}$	— разность концентраций ионов натрия
DCMU	— 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина
FeS	— негемовый железосерный кластер
HQNO	— 2-гептил-4-оксихинолин-N-оксид
MQ	— менахинон
PQ	— пластохинон
$\text{PQ}^{\cdot-}$	— анион-радикал пластохинона
PQH_2	— пластогидрохинон

От автора

Вот уже двадцать пять лет я читаю студентам биологического факультета МГУ курс биоэнергетики. В разное время фрагменты этого курса были опубликованы в книгах «Аккумуляция энергии в клетке», «Трансформация энергии в биомембранах», «Рассказы о биоэнергетике» и «Энергетика биологических мембран». Последняя из названных книг, задуманная как исчерпывающий обзор главных аспектов новой отрасли физико-химической биологии и потому включившая наибольший объем информации, адресовалась научным работникам — биохимикам, биофизикам и цитологам. Данное пособие — сокращенный вариант, рассчитанный на более широкий круг читателей, прежде всего студентов-биологов. В изложении материала опущены многие детали, интересные лишь для узкого круга биоэнергетиков. В то же время структурные и функциональные особенности основных мембранных преобразователей энергии рассмотрены достаточно подробно, чтобы читатель получил цельное представление об устройстве и назначении этих биологических систем.

Пользуюсь случаем выразить свою искреннюю признательность О. О. Малаховской, М. И. Мокеевой и С. А. Богословскому за большую помощь в подготовке рукописи и публикации.

В. П. Скулачев

Введение

Биологические науки можно классифицировать по трем основным критериям: уровню сложности изучаемого объекта, природе биологической функции, подлежащей исследованию, и методологии исследования. Использование этих критериев в качестве трех пространственных координат позволило изобразить «здание биологии» (рис. 1). Как показано на рисунке, здание получилось восьмиэтажным при условии, что каждый уровень сложности занимает свой этаж.

На самом верхнем этаже располагаются исследования *биосферы*. Под ним — *экология*, изучающая сообщества различных видов живых существ. Следующий, шестой этаж отведен группе биологических наук, изучающих отдельные виды животных, растений и бактерий и их систематику в целом. Среди этих наук — классическая зоология, ботаника, микробиология и вирусология. Все их можно объединить названием «*биология видов*», чтобы отличить от наук, размещенных на более высоких и более низких этажах. Далее располагаются *анатомия и физиология* — науки, изучающие структуру и жизнедеятельность индивидуального организма и его органов. Следующий очень важный уровень — *живая клетка*, соответствующая наука — клеточная биология, или цитология. Исследования на внутриклеточных органеллах и их фрагментах, гомогенатах, «тенях» клеток и других бесклеточных надмолекулярных системах могут быть определены термином «*субклеточная биология*». Изучение функционирующих макромолекул и их комплексов составляет предмет *молекулярной биологии*. Это последний, самый простой уровень, где еще не утрачена биологическая функция.

Структура и физико-химические характеристики веществ, составляющих живой организм, изучаются на первом этаже. В подавляющем большинстве случаев объектом исследования служат органические соединения. Поэтому соответствующая наука получила название *биоорганической химии*. Некоторые из веществ биологического происхождения относятся к неорганическим. Применительно к таким системам можно было бы говорить о *бионеорганической*

химии, однако это направление вряд ли оправдано выделять в особую науку ввиду малочисленности объектов исследования.

Такова классификация «горизонтальных» наук, отличающихся по уровню организации изучаемой системы; «вертикальные» науки классифицируются по функциональному принципу.

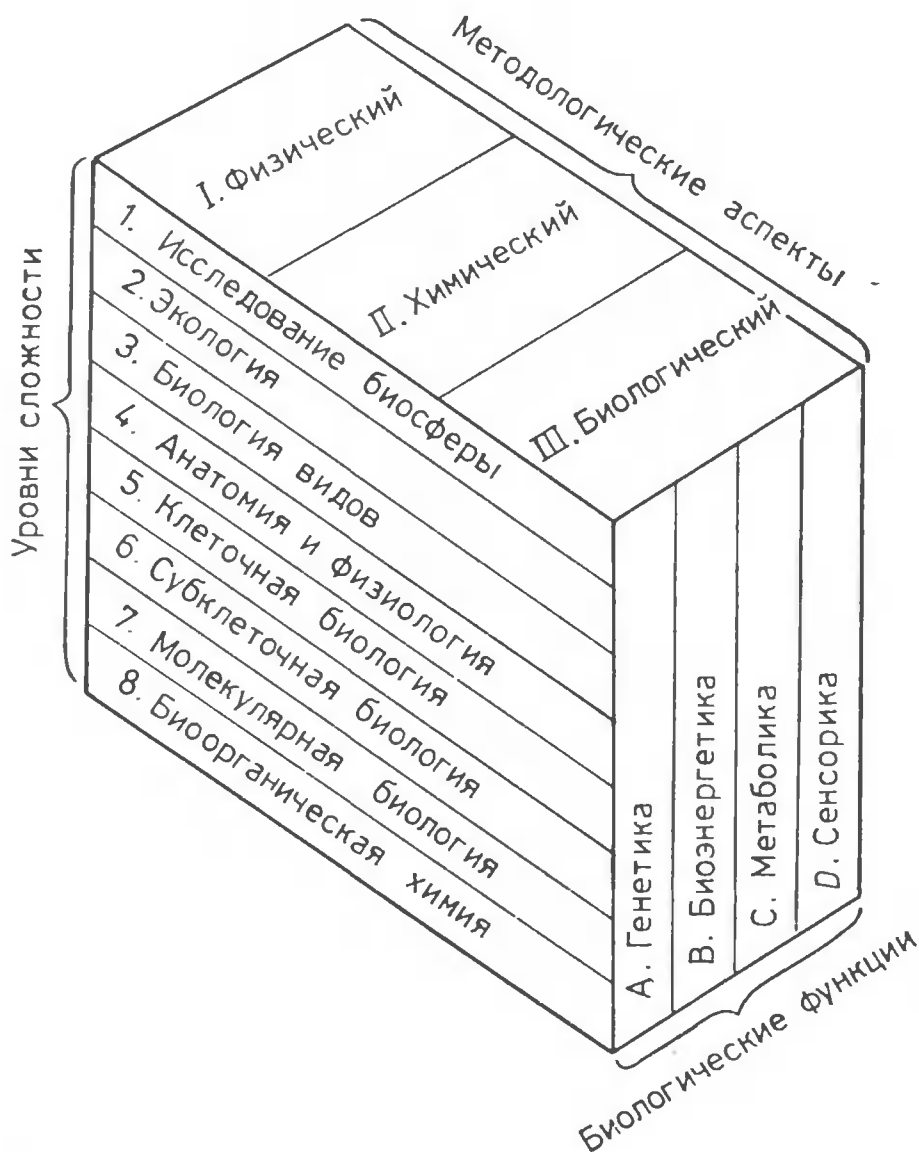


Рис. 1. «Здание биологии» (соотношение различных биологических наук)

К наиболее важным функциям, присущим всем живым существам, можно отнести следующие:

- 1) *самовоспроизведение* — запись, хранение и использование генетической информации;
- 2) *энергообеспечение* — получение энергии за счет внешних энергетических ресурсов;

3) *превращение веществ* — использование химических соединений окружающей среды для образования компонентов своего тела;

4) *раздражимость* — способность принимать и обрабатывать сигналы, поступающие из внешней и внутренней сред организма, и адекватно отвечать на эти сигналы.

Каждую из этих функций можно изучать на объектах различной степени сложности.

Науку, изучающую функцию энергообеспечения, можно определить как *биоэнергетику*.

В этом смысле *биоэнергетика есть отрасль функциональной биологии, изучающая превращение энергии внешних ресурсов в биологически полезную работу*.

В соответствии с таким определением следует различать молекулярную биоэнергетику, биоэнергетику клетки, целостного организма, биоценоза и биосферы.

Продолжая функциональную классификацию, необходимо определить науку, изучающую обеспечение живых систем веществами и превращения этих веществ. Названную область обычно рассматривают как часть биохимии или, в более узком смысле, энзимологии и т. п.

Если, однако, принять во внимание огромное значение функциональной биологии, которая, по существу, интегрирует знания, полученные «горизонтальными» биологическими науками, то окажется оправданным присвоение ранга самостоятельной науки каждому из четырех направлений, связанных с исследованием перечисленных выше важнейших биологических функций. По аналогии с генетикой и биоэнергетикой науку, исследующую метаболизм как превращение веществ, можно было бы назвать «*метаболик*». Соответственно, будущая наука, призванная объединить биохимические, физиологические и прочие исследования по восприятию, передаче и обработке сигналов различных сенсорных систем, могла бы получить имя «*сенсорика*».

Еще один способ классификации биологических наук основывается на *методологии исследования*. Здесь нужно выделить три главных направления: физическое, химическое и биологическое. В первом случае соответствующая наука определяется как биофизика, во втором — как биохимия. Что касается собственно биологической методологии, то ее можно иллюстрировать такими подходами, как эволюционный, фило- и онтогенетический, учение об естественном отборе и т. п.

«Здание биологии», показанное на рис. 1, при необходимости может быть достроено. Например, увеличение роли математического подхода должно в будущем привести к необходимости выделить не три, а четыре методологических раздела.

Схема, изображенная на рис. 1, рассматривает лишь фундаментальные аспекты биологии. Для прикладной биологии, или биотехнологии, необходимо сконструировать отдельное здание.

Любое биологическое исследование фундаментального плана может найти свое место в обсуждаемой схеме. В частности, предметом данной книги служит рассмотрение проблем, расположенных в «помещениях» В, I—III, 5—8. Эти координаты означают физический, химический и биологический аспекты биоэнергетики на уровнях организации от клетки до органических и неорганических молекул биологического происхождения.

В дальнейшем изложении внимание будет сконцентрировано на мембранных биоэнергетических системах, поскольку именно они занимают центральное положение в процессах получения конвертируемой энергии, которая утилизируется живой клеткой.

Основные понятия мембранной биоэнергетики

1

1.1. Мембраны с точки зрения биоэнергетики

Биологические мембраны представляют собой природные пленки толщиной 5—7 нм, состоящие из белков и липидов. *Липидный компонент* биомембран более или менее стандартен: это фосфолипиды или (реже) глико- и сульфолипиды. *Белок* — тот компонент, который, как правило, определяет специфику мембраны.

Среди мембранных белков можно найти многие ферменты, переносчики, пигменты и рецепторы. Взаимодействие процессов, осуществляемых всеми этими биологически активными компонентами, лежит в основе функционирования мембранных структур клетки.

Важнейшей функцией многих биомембран служит превращение одной формы энергии в другую. Эта функция осуществляется специальными белками, которые встроены в особого типа мембрану, называемую *энергопреобразующей*. Такая мембрана не проницаема для подавляющего большинства веществ, находящихся в растворах по обе ее стороны.

Любая мембрана, выполняющая энергетическую функцию, способна к превращению *химической энергии* окисляемых субстратов или АТФ, либо *энергии света* в электрическую энергию, а именно в *трансмембранную разность электрических потенциалов* ($\Delta\psi$) или в *энергию разности концентраций веществ*, содержащихся в разделенных мембраной растворах. Энергию, заключенную в разности концентраций растворенных веществ, часто называют *осмотической энергией*.

Некоторые энергопреобразующие мембраны могут превращать электрическую или осмотическую энергию в механическую, как это наблюдается у подвижных прокариот. Определенные ткани теплокровных животных, а также некоторые растения превращают накопленную энергию в тепло в целях терморегуляции, что оказывается биологически оправданным при понижении окружающей температуры.

Среди энергопреобразующих мембран, имеющих наибольшее биологическое значение, можно назвать такие структуры, как *внутреннюю мембрану митохондрий, внутреннюю (цитоплазматическую) мембрану бактерий, внешнюю мембрану клеток эукариот, мембрану бактериальных хроматофоров, тилакоидов хлоропластов и цианобактерий, вакуолярную мембрану (тонопласт) растений и грибов.*

Не все биомембраны могут превращать одну форму энергии в другую. Некоторые из них не обладают энергетическими функциями. Таковы, в частности, внешние мембраны митохондрий и грам-отрицательных бактерий. В обеих названных мембранах содержится особый белок — *порин*, образующий в них довольно большие поры, проницаемые для низкомолекулярных соединений. Внешние мембраны митохондрий и бактерий служат барьером, не проницаемым для белков, растворенных в пространстве между внешней и внутренней мембранами. Кроме того, внешние мембраны содержат некоторые якорные белки, специфически связывающие наподобие рецепторов определенные компоненты цитозоля (в случае митохондрий) или внешней среды (в случае бактерий). Некоторые из рецептор-подобных белков были идентифицированы с поринами.

В животных клетках порин обнаружен только во внешней мембране митохондрий. Однако по меньшей мере еще одна мембрана в этих клетках напоминает внешнюю митохондриальную, будучи проницаема (*in vitro*) для небольших гидрофильных молекул. Это мембрана пероксисом (возможно, однако, что данное свойство есть артефакт выделения пероксисом).

Внешняя мембрана оболочки хлоропласта, по-видимому, гомологична внешней мембране митохондрий и бактерий.

Традиционно мембраны эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, а также мембраны клеточного ядра считают не способными к трансформации энергии. Однако недавно были получены указания на то, что в аппарате Гольджи энергия АТФ может использоваться для создания градиента рН между цитозолем и внутренним объемом этих замкнутых мембранных структур. Это наблюдение заставляет вернуться к вопросу о возможной энергопреобразующей функции мембран эндоплазматической сети и ядра, родственных мембранам аппарата Гольджи.

Современное состояние проблемы биоэнергетической классификации мембран животной клетки представлено на рис. 2.

1.2. Сопрягающие ионы

В огромном большинстве случаев преобразование энергии в биомембранах описывается следующей общей схемой:

Энергетические ресурсы $\rightarrow \Delta\bar{\mu}I \rightarrow$ работа, (1)

где $\Delta\bar{\mu}I$ — трансмембранная разность электрохимических потен-

циалов иона I . (Физическая природа $\Delta\mu I$ будет рассмотрена ниже, применительно к $\Delta\mu H$; см. разд. 1.3.) Схема (1) означает, что энергетические ресурсы, потребляемые мембранной системой, сначала используются для транспорта иона I через мембрану против сил электрического поля и в направлении большей концентрации I . Этот процесс называют *энергизацией мембраны*. Затем энергия, накопленная в электрической и осмотической формах, используется в качестве движущей силы, чтобы совершать ту или иную полезную работу.

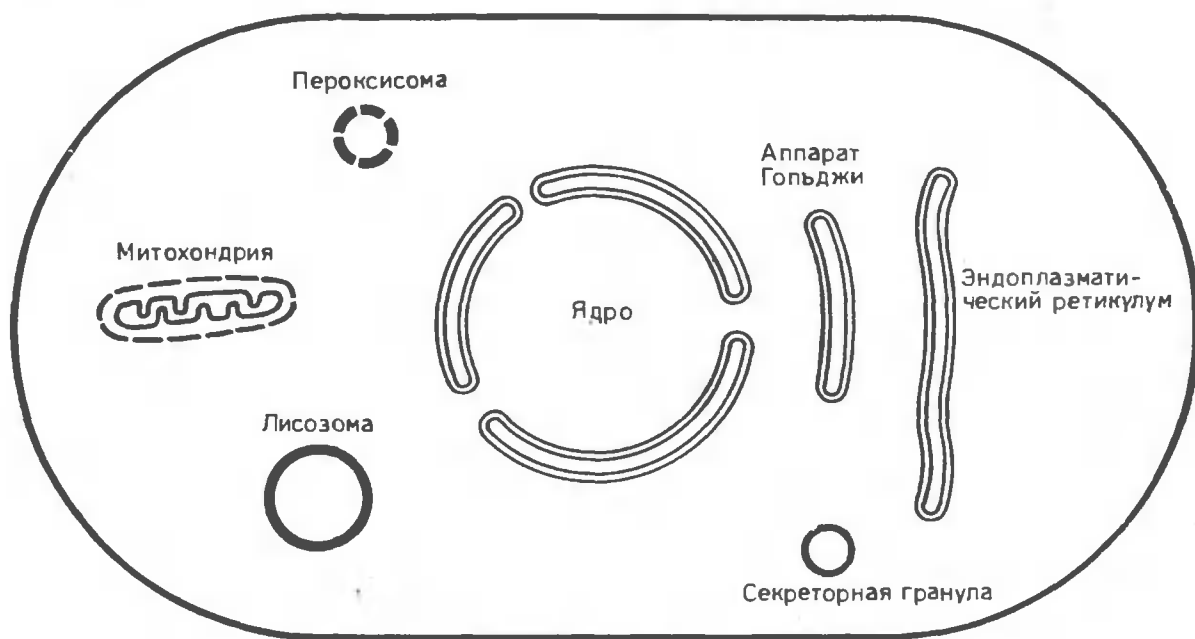


Рис. 2. Мембранные структуры животной клетки:

темными сплошными контурами показаны мембраны, преобразующие энергию, темными прерывистыми — свободные от энергетических функций, светлыми — мембраны, участие которых в превращениях энергии недостаточно ясно

Таким образом, процессы утилизации внешней энергии и совершения за ее счет работы оказываются сопряженными через образование и использование $\Delta\mu I$. Поэтому ион I может быть назван *сопрягающим ионом*.

До недавнего времени общепринятым было мнение о том, что в энергопреобразующих мембранах роль сопрягающего иона играет H^+ (как это было постулировано Питером Митчелом, 1961). Единственным исключением считали внешнюю мембрану животной клетки, которая использует не H^+ , а Na^+ в качестве иона, сопрягающего гидролиз АТФ с аккумуляцией различных метаболитов внутри клетки.

Однако недавние исследования показали, что Na^+ заменяет H^+ в процессах энергизации мембраны определенных бактерий, а $\Delta\mu Na$ может использоваться для осуществления всех тех типов полезной

работы, для которых требуется мембрана. Следовательно, H^+ не уникален в качестве сопрягающего иона (см. гл. 7).

Известно еще несколько ионов, помимо H^+ и Na^+ , которые также могут транспортироваться через мембрану против силы их электрохимического градиента. Например, в эндоплазматическом ретикулу-**ме** мышц и ряде других тканей, а также во внешней мембране многих клеток содержится Ca^{2+} -АТФаза, переносящая ионы Ca^{2+} с использованием энергии АТФ. Однако роль этого процесса ограничивается понижением концентрации Ca^{2+} в цитозоле, а образующаяся $\Delta\mu_{Ca}$ никогда не используется для совершения какой-либо работы. Это же справедливо для ионов K^+ , транспортируемых Na^+/K^+ -или H^+/K^+ -АТФазой (см. разд. 4.5.3 и 7.1.3), а также для ионов Cl^- , переносимых галородопсином (см. разд. 3.5.7).

Классификация мембран приведена ниже. В группах А и Б перечислены *сопрягающие мембраны*. Все эти структуры специализированы на сопряжении освобождающих и потребляющих энергию процессов посредством образования и использования $\Delta\mu_H$ (группа А) или $\Delta\mu_{Na}$ (группа Б). В группе В объединены мембраны, для которых образование $\Delta\mu_I$ представляется конечным событием процесса преобразования энергии. Это наблюдается в тех случаях, когда функция мембраны состоит в перекачке иона из одного отсека в другой. В группе Г указаны мембраны, для которых можно с уверенностью исключить какие-либо энергетические функции. **Случаи**, когда вопрос о возможных энергетических функциях остается открытым, перечислены в группе Д.

Биоэнергетическая классификация мембран

А. Энергопреобразующие мембраны, использующие H^+ как сопрягающий ион

1. Внутренняя мембрана митохондрии
2. Мембрана тилакоидов хлоропластов
3. Внутренняя мембрана оболочки хлоропласта
4. Внутренняя (цитоплазматическая) мембрана многих бактерий
5. Мембрана бактериальных хроматофоров
6. Внешняя мембрана клеток растений и грибов
7. Мембрана вакуолей (тонопласт) растений и грибов
8. Мембрана хромаффинных и некоторых других секреторных гранул животной клетки

Б. Энергопреобразующие мембраны, использующие Na^+ как сопрягающий ион

1. Внешняя мембрана животной клетки
2. Внутренняя (цитоплазматическая) мембрана некоторых морских щелочестойчивых аэробных бактерий и морских анаэробных бактерий

В. Энергопреобразующие мембраны, роль которых ограничивается созданием ионного градиента

1. Мембраны лизосом и, вероятно, также аппарата Гольджи ($ATP \rightarrow \Delta pH$)
2. Внешняя мембрана некоторых животных клеток, например, клеток слизистой желудка ($ATP \rightarrow \Delta pH$)
3. Саркоплазматический ретикулум и другие пузырьки, накапливающие Ca^{2+} ($ATP \rightarrow \Delta pCa$)

Г. Мембраны, не способные к превращению энергии

1. Внешняя мембрана митохондрии
2. Внешняя мембрана оболочки хлоропласта
3. Внешняя мембрана бактерий
4. Мембрана пероксисом *in vitro*

Д. Мембраны, энергетические функции которых не доказаны, но и не исключены

1. Эндоплазматический ретикулум (микросомы)
2. Мембрана клеточного ядра

1.3. Конвертируемые энергетические «валюты» живой клетки

Энергетические превращения, протекающие в живой клетке, могут быть подразделены на две группы: одни из них локализованы в мембранах, а другие — в немембранных отделах протоплазмы. В каждой из групп используется своя «валюта» для оплаты энергетических затрат. В мембранах это $\Delta \bar{\mu}H$ или $\Delta \bar{\mu}Na$, в немембранных отделах — ATP или другие высокоэнергетические вещества.

Энергия $\Delta \bar{\mu}H$ и $\Delta \bar{\mu}Na$ может обратимо превращаться в энергию ATP . Процессы такого рода катализируются H^+ - ATP -синтазой (H^+ - ATP азой) в «протонных» мембранах, создающих $\Delta \bar{\mu}H$, и Na^+ - ATP -синтазой (Na^+ - ATP азой) или Na^+/K^+ - ATP азой в «натриевых» мембранах, поддерживающих $\Delta \bar{\mu}Na$.

На рис. 3 приведена схема энергетики живых клеток, которые используют $\Delta \bar{\mu}H$ в качестве мембранной формы конвертируемой энергии. Согласно схеме свет или энергия субстратов дыхания могут утилизироваться ферментами фотосинтетической или дыхательной редокс-цепей или (у галобактерий) бактериородопсином. В результате образуется $\Delta \bar{\mu}H$, которая затем используется для совершения работы, в частности для синтеза ATP . Субстратное фосфорилирование служит альтернативным механизмом образования ATP , который не требует $\Delta \bar{\mu}H$. Такое фосфорилирование наблюдается в цепи реакций гликолиза и при окислительном декарбоксилировании α -кетоглутаровой кислоты.

$\Delta\bar{\mu}H$ -Зависимое образование АТФ — главный, но не единственный процесс трансформации $\Delta\bar{\mu}H$ в химическую работу. К тому же типу энергетических превращений относятся синтез неорганического пирофосфата и перенос восстановительных эквивалентов в направлении более отрицательных редокс-потенциалов. Таковы обратный перенос электронов в дыхательной цепи и трансгидрогеназная реакция.

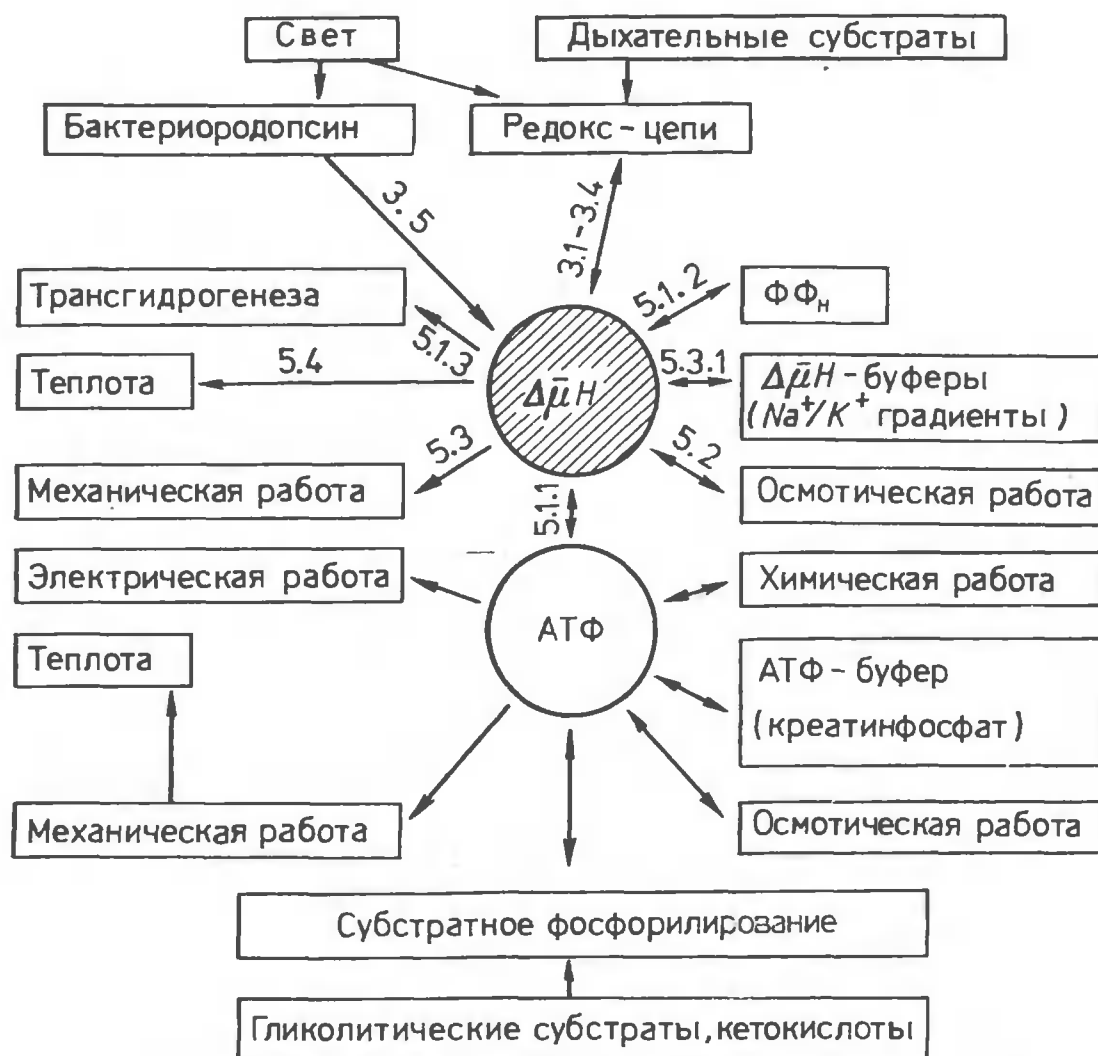


Рис. 3. Схема энергетики клетки, использующей $\Delta\bar{\mu}H$ в качестве мембранной конвертируемой формы энергии:

цифрами у стрелок обозначены разделы книги, где рассматривается данный $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимый процесс

Зависящий от $\Delta\bar{\mu}H$ транспорт через мембрану различных веществ в сторону большей их концентрации представляет собой трансформацию энергии по типу $\Delta\bar{\mu}H \rightarrow$ осмотическая работа, а вращение бактериального жгутика за счет энергии $\Delta\bar{\mu}H$ служит примером превращения $\Delta\bar{\mu}H \rightarrow$ механическая работа. Образование

теплоты митохондриями животных в ответ на понижение окружающей температуры описывается превращением типа $\Delta\bar{\mu}\text{H} \rightarrow$ теплопродукция.

Для немембранных частей клетки также описаны все перечисленные выше типы энергетических превращений. Здесь они поддерживаются энергией АТФ и других высокоэнергетических соединений.

Существуют системы, специализированные на стабилизации (забуферивании) уровней $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ и АТФ. Для $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ эту роль играют градиенты ионов Na^+ и K^+ , для АТФ — креатинфосфат.

У некоторых бактерий вместо $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ образуется $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$. Источником энергии могут служить дыхание или неокислительное декарбоксилирование карбоновых кислот. Образованная $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ используется для производства химической, осмотической и механической работы (см. гл. 7).

Наиболее сложный характер носит энергетика клетки животного. Фактически здесь в ходу три различные энергетические «валюты»: $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ в митохондриях, $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ на внешней клеточной мембране и АТФ в прочих частях клетки.

1.4. Разность электрохимических потенциалов ионов H^+ и Na^+ ($\Delta\bar{\mu}\text{H}$ и $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$)

Как показано на рис. 3, трансмембранная разность электрохимических потенциалов ($\Delta\bar{\mu}\text{H}$, или *протонный потенциал*) занимает *центральное положение в системе процессов трансформации энергии*, происходящих в «протонных» мембранах. $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ состоит из двух компонентов: электрического и химического (иначе концентрационного, или осмотического). Первый из них — трансмембранная разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$), второй — трансмембранная разность концентраций ионов водорода ($\Delta p\text{H}$). Рис. 4 иллюстрирует эти два понятия.

Если между двумя отсеками, разделенными мембраной, существует разность электрических потенциалов, образованная, например, электрической батареей, то энергетически выгодным оказывается перемещение ионов H^+ из отсека, заряженного положительно, в отрицательно заряженный отсек (рис. 4, А). Другой способ достичь той же цели — закислить содержимое левого отсека относительно правого. В этом случае протонный ток слева направо также будет идти «под гору» (рис. 4, Б).

Потенциальная энергия, накопленная в виде $\Delta\psi$ или $\Delta p\text{H}$, может быть утилизирована полезным образом, если поместить в мембрану устройство, сопрягающее перенос протонов «под гору» с совершением какой-либо полезной работы.

Энергия, накопленная в форме $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, может быть рассчитана по уравнению (2):

$$\Delta\bar{\mu}\text{H} = F\Delta\psi + RT \ln \frac{[\text{H}^+]_p}{[\text{H}^+]_n}, \quad (2)$$

где $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, F — число Фарадея, $[\text{H}^+]_p$ и $[\text{H}^+]_n$ — молярные концентрации ионов H^+ в соответственно положительно заряженном (или более кислом) и в отрицательно заряженном (или более щелочном) отсеках.

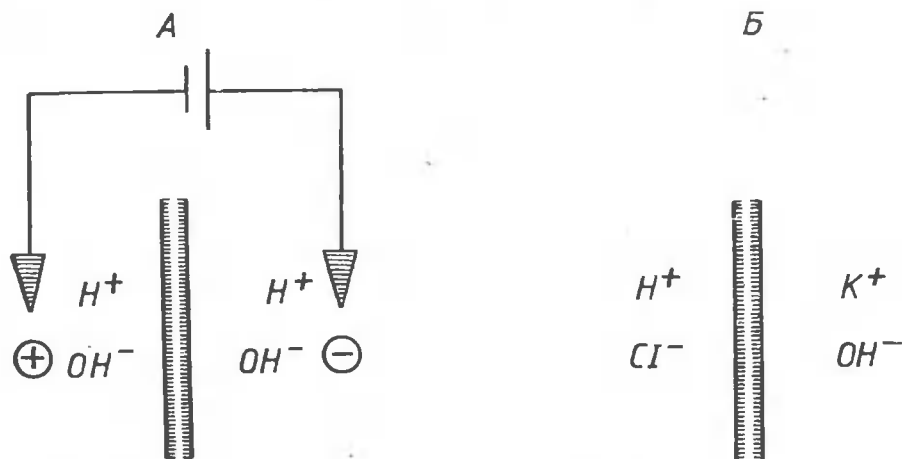


Рис. 4. $\Delta\psi$ (А) и ΔpH (Б) между двумя отсеками, разделенными мембраной

$\Delta\bar{\mu}\text{H}$ вычисляется в единицах джоуль·моль⁻¹. Для перевода величины $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ в вольты это значение необходимо разделить на число Фарадея. Полученное частное П. Митчел предложил называть *протон-движущей силой* по аналогии с электродвижущей силой и обозначил ее символом Δp . Величина Δp может быть рассчитана для 25°C по уравнению (3):

$$\Delta p = \frac{\Delta\bar{\mu}\text{H}}{F} = \Delta\psi - 0,06\Delta\text{pH}. \quad (3)$$

Знак *вычитания* между $\Delta\psi$ и ΔpH обусловлен тем, что pH — *отрицательный* логарифм концентрации водородных ионов. Применительно к рис. 4 это обстоятельство иллюстрируется фактом, что $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ будет тем больше, чем *выше* положительный заряд и чем *ниже* pH в левом отсеке.

Согласно уравнению (3) ΔpH , равная 1, эквивалентна $\Delta\psi$, равной 0,06 В, или 60 мВ. Та же величина, выраженная в килоджоулях·моль⁻¹, будет равна 5,7 (1,37 ккал·моль⁻¹).

Аналогичные уравнения можно применить также и к натриевой энергетике. В этом случае в уравнение (3) вместо $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ надо подставить $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, а вместо Δp — «натрий-движущую силу», которую мож-

но обозначить Δs (от лат. *sodium*):

$$\Delta s = \frac{\Delta \bar{\mu} \text{Na}}{F} = \Delta \psi - 0,06 \Delta p \text{Na}. \quad (4)$$

1.5. Аденозинтрифосфат

Концепция, рассматривающая АТФ в качестве конвертируемой энергетической «валюты», была выдвинута Ф. Липманом еще в 1941 г., т. е. задолго до того, как стала понятной аналогичная роль $\Delta \bar{\mu} \text{H}$.

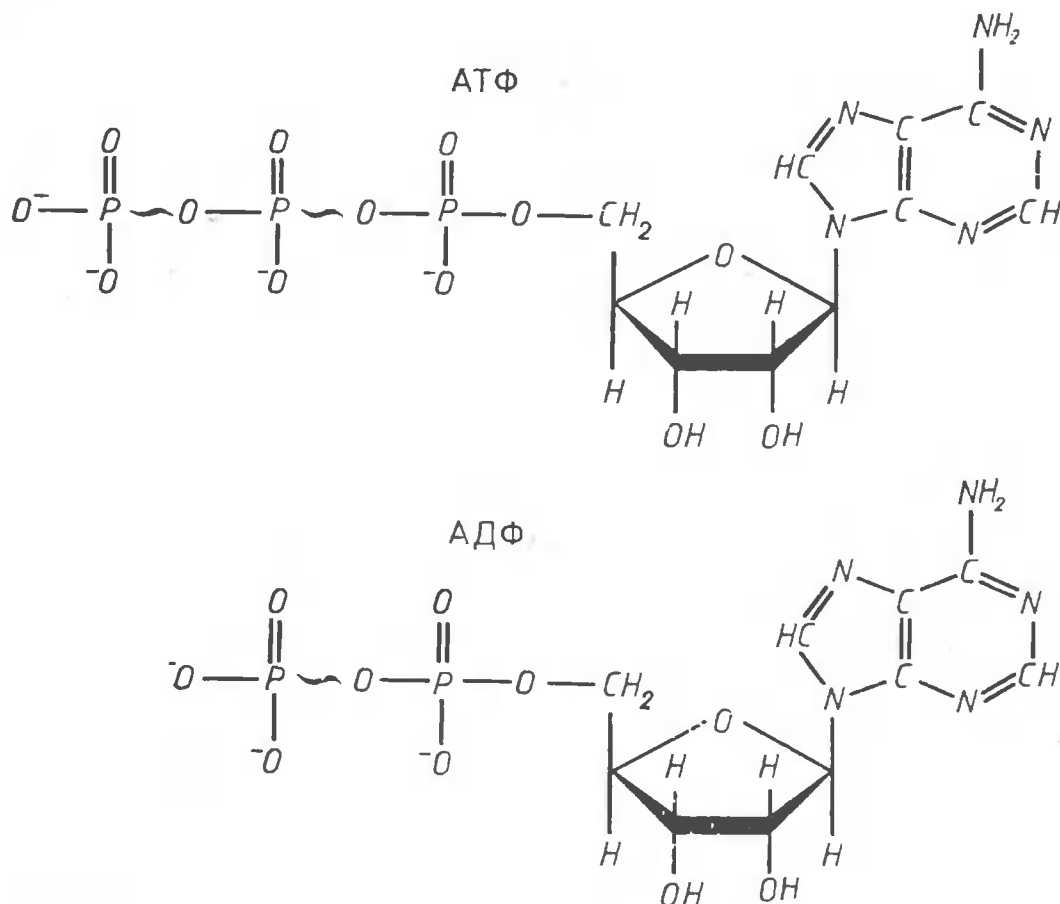


Рис. 5. Аденозинтрифосфат и аденозиндифосфат:

высокоэнергетические связи показаны волнистой линией

АТФ (рис. 5) образуется из АДФ и неорганического фосфата системами фотосинтетического, дыхательного и субстратного фосфорилирования. Некоторое количество АТФ расходуется мембранными АТФазами для совершения осмотической или электрической работы при транспорте ионов «в гору», т. е. в сторону большей их концентрации. Остальное используется в качестве источника энергии при многочисленных эндэргонических процессах, протекающих вне мембран. Таковы прежде всего АТФ-зависимые биосинтезы и связанные с ними реакции, сократительные АТФазные системы и т. д.

В некоторых случаях организм использует не АТФ, а какой-либо другой нуклеозидтрифосфат. Так например, работа рибосом обеспечивается энергией ГТФ. Однако ГТФ обычно образуется из ГДФ за счет переноса концевой фосфатной группы с АТФ. Процесс катализируется нуклеозиддифосфаткиназой:



Следовательно, также и в этом случае эндэргоническая реакция связана с энергодаяющим процессом через АТФ.

АТФ и все вещества, способные образовывать АТФ в ферментативных реакциях переноса групп, объединяются термином *высокоэнергетические соединения*. Изменение свободной энергии при гидролизе таких соединений всегда не меньше, чем таковое для аденозинтрифосфата, т. е. около $42 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ (при физиологических условиях); при стандартных условиях эта величина составляет около $30 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$.

Следует подчеркнуть, что термин «высокоэнергетические соединения» имеет скорее биологический, чем химический смысл. Эту мысль можно пояснить следующим примером. Креатинфосфат служит высокоэнергетическим соединением у позвоночных, располагающих ферментом креатинфосфокиназой, катализирующей обратимый перенос фосфорила между АТФ и креатином. В то же время у некоторых беспозвоночных, где роль буфера для АТФ играет аргининфосфат, а креатинфосфокиназа отсутствует, креатинфосфат уже не высокоэнергетическое соединение, если следовать определению, данному выше.

Было бы ошибочным считать высокоэнергетические соединения какой-то особой «биологической» формой энергии. Все они — обычные вещества. Нет ничего «мистического» в величине их энергии гидролиза (порядка $42 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$). В химическом смысле низкоэнергетические соединения не отделены от высокоэнергетических иным барьером, кроме возможности находиться в равновесии с АТФ. По энергиям гидролиза разнообразные химические вещества образуют непрерывный ряд. Если энергия гидролиза заметно меньше $42 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ (как, например, у 2-фосфоглицериновой кислоты), АТФ не может быть образован в реакции переноса фосфатной группы. Чтобы стать предшественником АТФ, 2-фосфоглицериновая кислота должна быть окислена в фосфоенолпировиноградную кислоту.

При использовании энергии АТФ этот нуклеотид сначала сорбируется на соответствующем ферменте, а затем гидролизуется. Иногда энергия выделяется при сорбции АТФ, а не при гидролизе; при этом сорбированный («распятый» на ферменте) АТФ выступает как низкоэнергетическое соединение (см. разд. 5.1.1). В подобных случаях сродство АТФ к ферменту оказывается много большим, чем сродство АДФ и фосфата, и роль гидролиза связанного АТФ ограничивается удалением продуктов реакции из активного центра фермента.

Существует два пути гидролиза АТФ:



Гидролиз терминального фосфата в АТФ происходит в тех случаях, когда эндэргонический процесс, движимый расщеплением АТФ, требует энергии *меньшей* или *равной* 42 кДж·моль⁻¹.

Так же происходит обеспечение процессов, требующих *много* более 42 кДж·моль⁻¹. В таких случаях существует особый механизм, позволяющий использовать энергию многих молекул АТФ для совершения одного функционального акта (примером тому может быть актомиозин).

В реакциях, когда потребность в энергии лишь *несколько больше* 42 кДж·моль⁻¹, АТФ гидролизуеться до АМФ и неорганического пирофосфата.

В стандартных условиях обе ангидридные связи в молекуле АТФ имеют близкие энергии гидролиза. Однако *in vivo* в клетке выход энергии при гидролизе АТФ до АМФ и ФФ_н на 10—15 кДж превосходит таковой при его гидролизе до АДФ и Ф_н.

Данный эффект обусловлен намного более низкой концентрацией неорганического пирофосфата по сравнению с неорганическим фосфатом вследствие гидролиза образующегося ФФ_н растворимой пирофосфатазой.

Таким образом, использование в качестве конвертируемой «валюты» аденозинтрифосфата, а не аденозиндифосфата сообщает дополнительную гибкость биологической системе энергообеспечения.

Возникает вопрос — почему эту функцию осуществляет соединение, относящееся к разряду *нуклеотидов*? По-видимому, названное обстоятельство есть следствие более общего принципа, утверждающего, что жизнь базируется на специфических взаимодействиях белков с моно- и полинуклеотидами.

Сходный вопрос: почему используется аденозинтрифосфат, т. е. почему именно фосфорил служит высокоэнергетической группировкой? В этой связи можно лишь отметить, что замена атома Р на близкий по свойствам атом As дает АДФ-арсенат — аналог АТФ, который оказывается весьма неустойчивым и спонтанно гидролизуеться при физиологических условиях.

Почему среди нуклеозидтрифосфатов эволюция выбрала именно аденозинтрифосфат? Одной из причин могло быть то, что аденин в ряду других азотистых оснований обладает промежуточными электрон-донорными и электрон-акцепторными свойствами. Другие азотистые основания либо сильные доноры, либо сильные акцепторы. Быть может, именно поэтому АТФ способен взаимодействовать с более широким кругом партнеров, чем другие нуклеозидтрифосфаты.

Другую причину можно искать в эволюции живых систем. Среди азотистых оснований аденин наиболее стабилен к разрушительному действию ультрафиолетового света. Не исключено, что это свойство было существенным на заре становления жизни на Земле, если в те времена атмосфера Земли была проницаема для ультрафиолетовых лучей или если жизнь возникла за пределами Земли в какой-то области космоса, богатой ультрафиолетом ¹.

1.6. Липидный компонент биомембран

Наиболее типичным представителем мембранных липидов служит *фосфолипид*. Подавляющее большинство фосфолипидов принадлежит классу фосфатидов. Они содержат два остатка жирных ацилов, C_nH_mCO- (у некоторых бактерий жирных алкилов C_nH_m-), глицерин и фосфат. Обычно при фосфатном остатке находится какой-либо гидрофильный заместитель (рис. 6, А).

Число углеродных атомов в жирных ацилах (n) варьирует, как правило, от 12 до 20, причем чаще оно равно 16 или 18 (табл. 1).

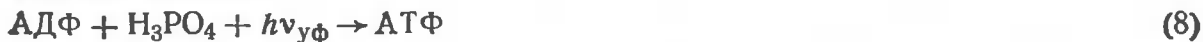
В типичном случае фосфолипид содержит по одному остатку насыщенной и ненасыщенной жирных кислот, которые располагаются соответственно при первом и втором углеродных атомах глицерина. Однако бывают и исключения из этого правила. Так, у термофильных бактерий оба гидрофобных остатка представлены насыщенными разветвленными алкилами.

В табл. 2 приведены структуры гидрофильных остатков (R) при фосфате фосфолипидов. У одного из фосфатидов, а именно фосфатидной кислоты, остаток R — это H .

У животных фосфолипид кардиолипин обнаружен только во внутренней мембране митохондрий. Замещенные производные фосфатидилглицерина присущи внутренней бактериальной мембране.

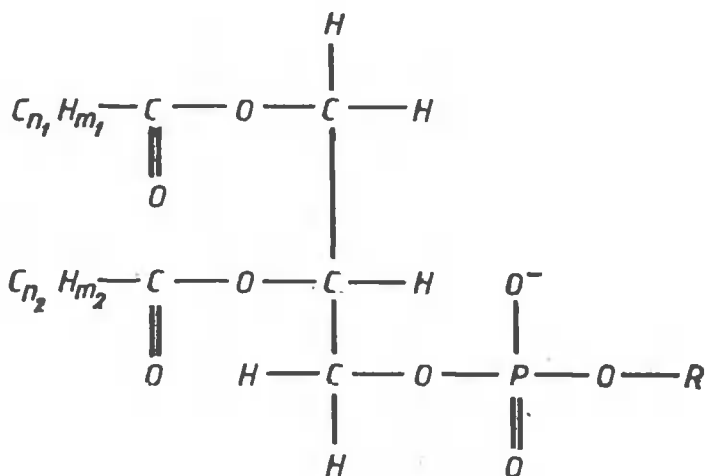
В фосфатидилинозите спиртовые гидроксилы могут быть фосфорированы. Образующийся таким образом фосфатидилинозит-5,6-дифосфат играет важную роль в передаче гормональных сигналов.

¹ Интригующая возможность состоит в том, что АДФ служил первичным преобразователем энергии у первых живых организмов, участвуя в следующем процессе:

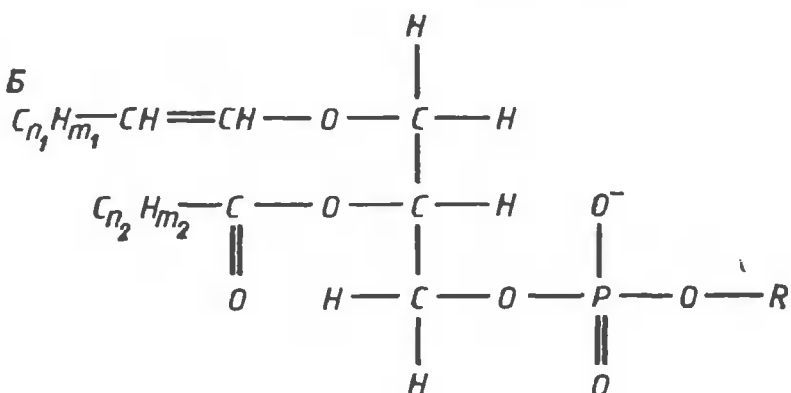


Кванты ультрафиолетового излучения средней длины волны, поглощаемые аденином, несут наибольший запас энергии, который еще не разрушает необратимо абсорбирующие их вещества. Возбуждение могло бы повысить реактивность какой-либо из функциональных групп (например, аминогруппы) к H_3PO_4 и тем самым индуцировать ее фосфорилирование. Перенос фосфорила с аминогруппы АДФ на концевой фосфат той же молекулы может облегчаться тем обстоятельством, что в одной из возможных конформаций АДФ между аминогруппой аденина и терминальным фосфатом остается место, по размеру в точности равное еще одному фосфатному остатку.

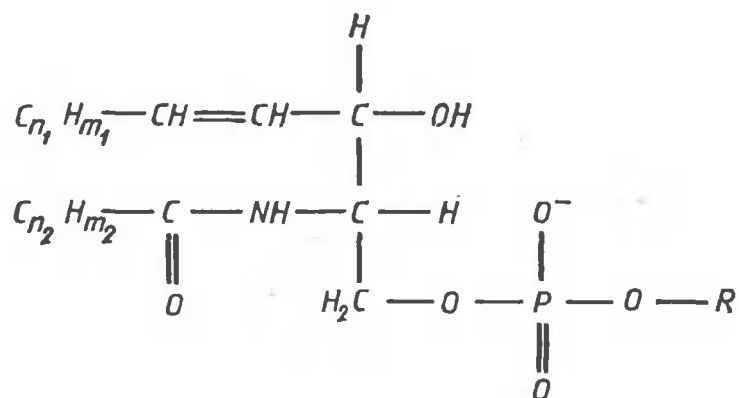
4



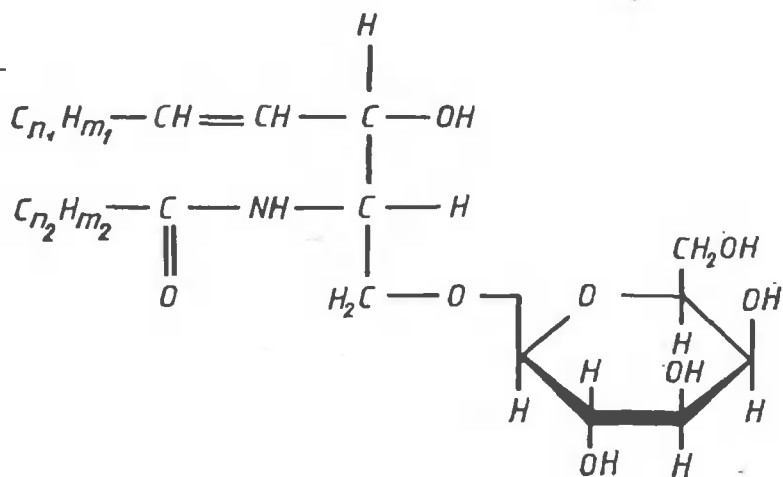
Б



В



Г



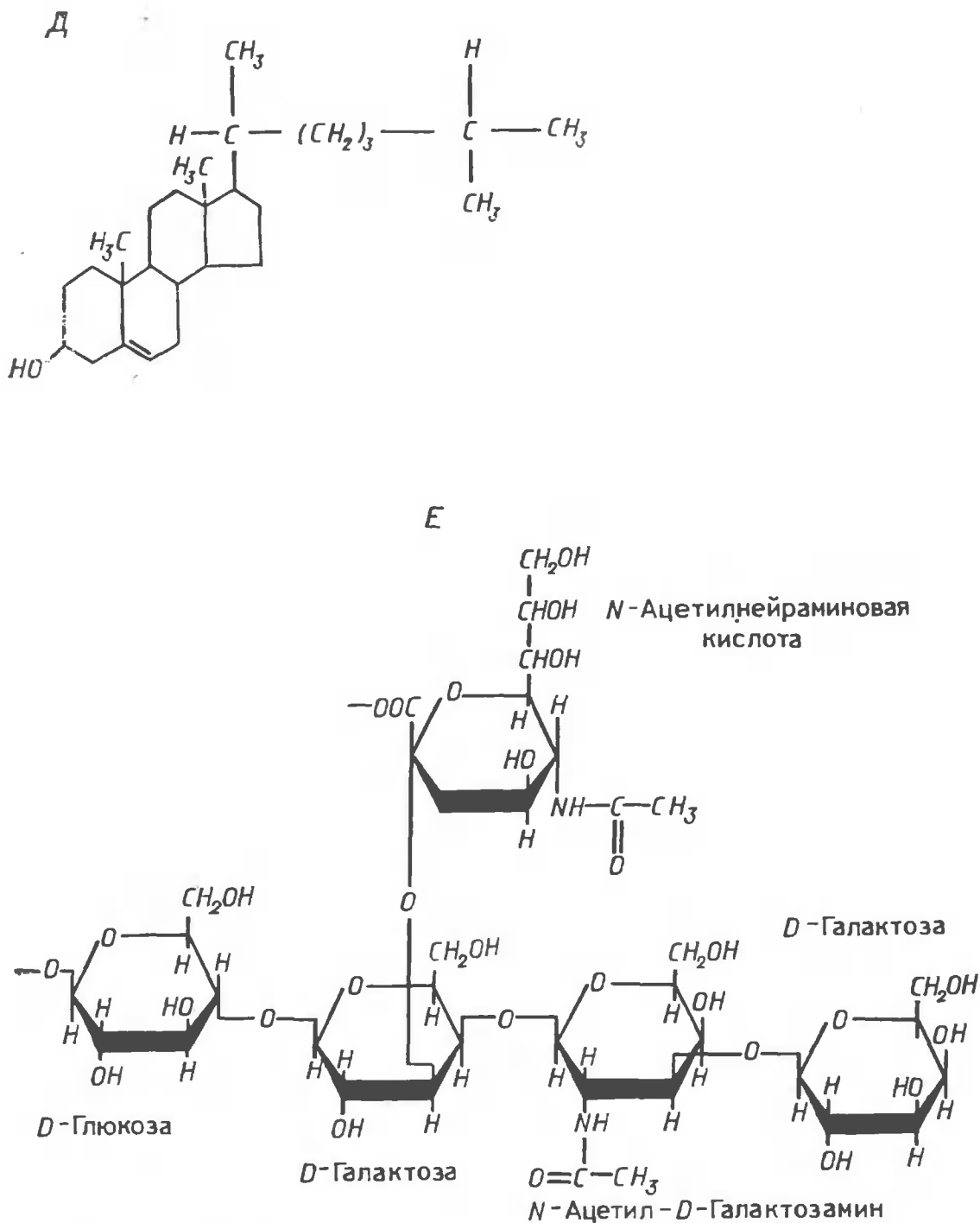
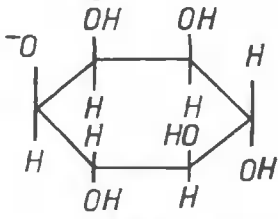
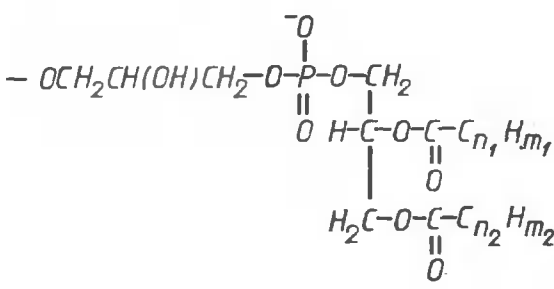


Рис. 6. Структуры некоторых липидов биологических мембран. А — общая структура большинства фосфолипидов; Б — плазмалоген; В — сфингомиелин; Г — цереброзид, Д — холестерин, Е — пример олигосахарида, входящего в состав ганглиозида

Таблица 1. Типичные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов

Название	Число атомов С: число двойных связей	Структура
<i>Насыщенные</i>		
Лауриновая	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Миристиновая	14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Пальмитиновая	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Стеариновая	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Арахидиновая	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
<i>Ненасыщенные</i>		
Пальмитолеиновая	16 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Олеиновая	18 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Линолевая	18 : 2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Линоленовая	18 : 3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Арахидоновая	20 : 4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Таблица 2. Заместители при фосфатной группе фосфолипидов

Фосфолипид	Заместитель
Фосфатидилхолин	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$
Фосфатидилэтаноламин	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Фосфатидилсерин	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Фосфатидилинозит	
Фосфатидилглицерин	$-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
Кардиолипин	

В фосфолипидах, называемых плазмалогенами, жирный ацил при С-1 глицерина замещен на производное α , β -ненасыщенного жирного спирта (рис. 6, Б).

Родственные соединения принадлежат к группе сфинголипидов, найденных у животных и растений. Наиболее распространены сфингомиелины (рис. 6, В) и цереброзиды (рис. 6, Г).

В молекуле цереброзида фосфат заменен на галактозу. Иногда на месте галактозы может быть глюкоза или олигосахарид (рис. 6, Е). В последнем случае гликолипид называется ганглиозидом.

Среди нейтральных липидов биомембран следует упомянуть стероиды. В большинстве мембран животных клеток содержится довольно много холестерина (рис. 6, Д).

Исключение составляет внутренняя мембрана митохондрий, где уровень холестерина очень низок. Его нет в мембранах бактерий. У растений и грибов холестерин заменен его аналогами (соответственно фито- и микостеринами).

1.7. Липидный бислой

Известно, что фосфолипиды способны к спонтанному образованию *бислойных мембран*. Такую мембрану можно получить, поместив каплю фосфолипидов, растворенных в углеводороде — декане, на маленькое отверстие в тефлоновой перегородке, разделяющей два отсека с водными растворами. Толщина мембраны соответствует удвоенной длине углеводородных остатков фосфолипидов, что меньше длины волны видимого света. Бислойная мембрана не преломляет свет и потому невидима, поэтому ее часто называют *черной*. Если каждый из углеводородных остатков содержит по 16 углеродных атомов, то толщина гидрофобного слоя мембраны оказывается около 4 нм. Это означает, что мембранные фосфолипиды в гидрофильном окружении ориентированы по принципу «хвост к хвосту». Такая структура обладает минимумом энергии и для ее образования не требуется ничего, кроме фосфолипидов.

Минимальная площадь, занимаемая, например, молекулой фосфатидилхолина в бислое, равна 0,75 нм².

Молекулы фосфолипидов легко перемещаются в плоскости мембраны, двигаясь в пределах монослоя. В то же время скорость перехода фосфолипида из одного монослоя в другой крайне мала. Описана ситуация, когда этот процесс вообще невозможен, так как два образующих мембрану монослоя ковалентно связаны. Показано, что мембраны термоацидофильной археобактерии *Caldariella acidophila*, растущей при кислых рН и температуре вплоть до 90°C, содержат в качестве липидного компонента тетраэфиры 16, 16'-бифитонилглицерина. Простейший из таких биполярных липидов включает в свой состав две гидрофильные группы (остатки глицерина) по краям, а между ними — два разветвленных углеводородных скелета, каждый из которых может пересечь всю гидрофобную область обычной бислойной мембраны.

1.8. Мембранные белки

Белки могут быть интегрированы с мембраной двумя способами: *сорбцией на ее поверхности* или *погружением в гидрофобный слой*.

Сорбция — легкообратимый процесс, поэтому она часто ускользает от внимания мембранологов. Неудивительно, что список белков, способных образовывать лабильные связи с мембранами, становится все обширнее по мере увеличения числа исследований на эту тему. Сегодня в этом списке уже можно найти гексокиназу и цитрат-синтазу, т. е. ключевые ферменты гликолиза и цикла Кребса — процессов, происходящих, как было принято считать, в водной фазе клетки. В случае гексокиназы показано, что специфическое связывание этого фермента осуществляется порином, локализованным во внешней митохондриальной мембране.

Белок-белковые взаимодействия ответственны также за связывание каталитической части H^+ -АТФ-синтазы (фактора F_1) мембранным сектором того же фермента (фактором F_0) (см. разд. 5.1.1). Цитохром *c*, который, подобно гексокиназе или фактору F_1 , хорошо растворим в воде, образует солевые связи с нерастворимым в воде мембранным белком — цитохромоксидазой. Цитохром *c* — щелочной белок, а тот участок цитохромоксидазы, который с ним взаимодействует, несет несколько кислотных групп.

Описан пример того, как фосфолипид, а не белок, служит специфическим мембранным партнером, ответственным за лабильное связывание фермента с поверхностью мембраны. Было выяснено, что креатинфосфокиназа может связываться с внутренней (но не внешней) митохондриальной мембраной. Причиной этого оказалось присутствие во внутренней мембране кардиолипина. Взаимодействие фермента с митохондриями блокировал адриамицин, связывающий кардиолипин. Креатинкиназу удалось сорбировать на липосомах при условии, что в их состав входил кардиолипин. Подобный эффект, по-видимому, обусловлен особенностями структуры кардиолипина, который состоит из двух остатков фосфатидной кислоты, соединенных гибкой связкой (глицерином). Возможно, что кардиолипин прикрепляет белок к мембране, погружая два своих жирных ацила в гидрофобный домен белка, в то время как два других жирных ацила остаются в фосфолипидном бислое.

Многие мембранные белки связываются с мембраной без помощи какого-либо специфического партнера. Примеры такого рода связывания показаны на рис. 7. В некоторых случаях почти вся молекула белка состоит из последовательностей гидрофобных аминокислот, образующих α -спиральные колонны, ориентированные поперек мембраны. Только короткие связки между колоннами и небольшие концевые участки составлены из гидрофильных аминокислот (рис. 7, А).

Хорошо известный пример подобного белка — бактериородопсин. Этот белок укреплен в мембране, как кирпич в стене. Из 248 аминокислотных остатков, образующих бактериородопсин, только

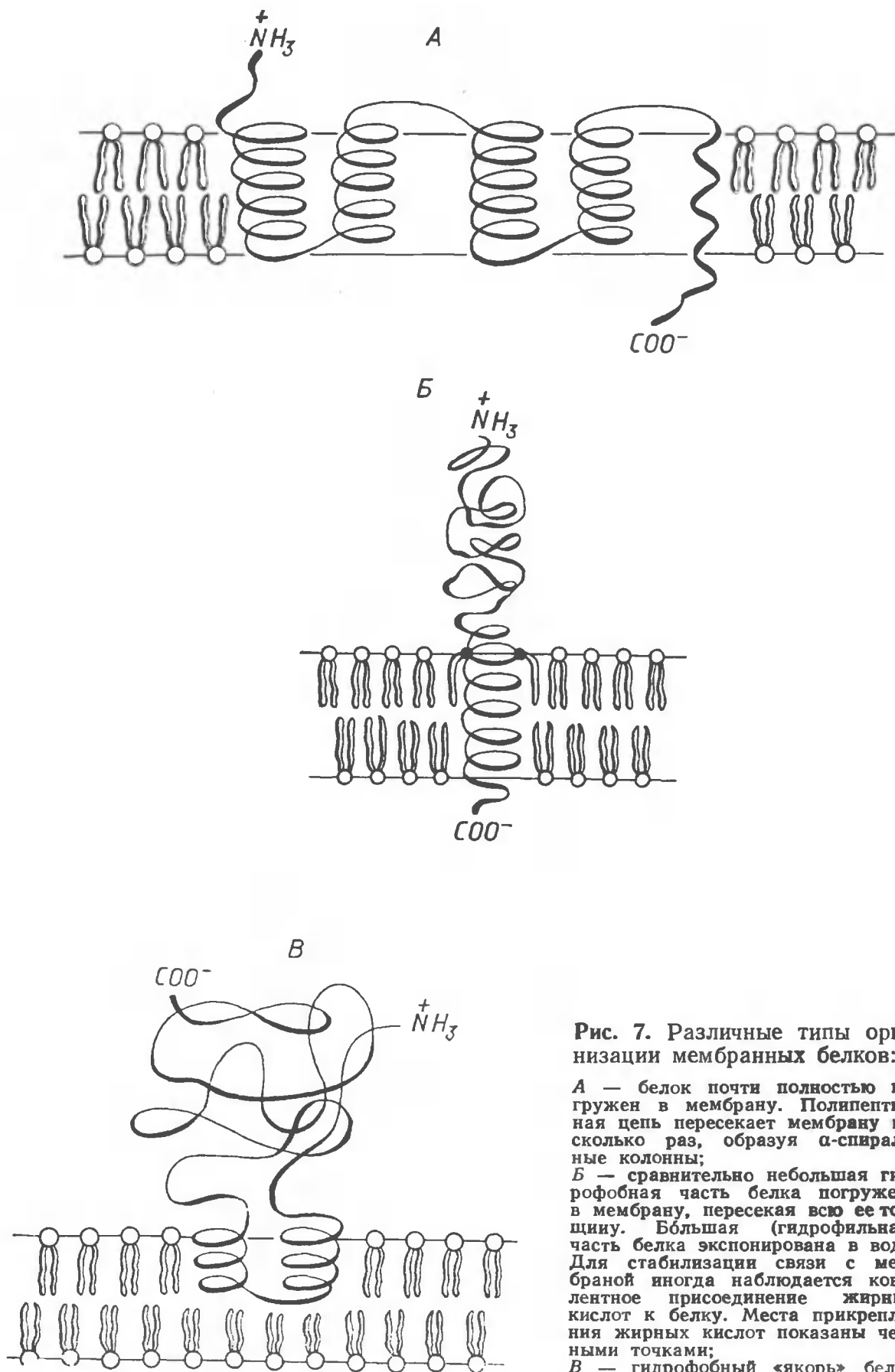


Рис. 7. Различные типы организации мембранных белков:

А — белок почти полностью погружен в мембрану. Полипептидная цепь пересекает мембрану несколько раз, образуя α -спиральные колонны;

Б — сравнительно небольшая гидрофобная часть белка погружена в мембрану, пересекая всю ее толщину. Большая (гидрофильная) часть белка экспонирована в воду. Для стабилизации связи с мембраной иногда наблюдается ковалентное присоединение жирных кислот к белку. Места прикрепления жирных кислот показаны черными точками;

В — гидрофобный «якорь» белка проникает только на расстояние фосфолипидного монослоя

27 удается отщепить обработкой протеиназами. Протеиназы не только не удаляют бактериородопсин из мембраны, но даже не тормозят его активность как светозависимого протонного насоса.

Подобная организация типична для мембранных белков, взаимодействующих с гидрофобными субстратами или с теми из гидрофильных субстратов небольшого размера, содержание которых в омывающем мембрану растворе достаточно велико. Если эти условия не выполняются, то субстрат-связывающий домен мембранного фермента сильно выступает из мембраны в водную фазу. В таких случаях связь с мембраной может осуществляться за счет особого гидрофобного домена — «якоря» (рис. 7, Б, В). Для увеличения гидрофобности в некоторых случаях наблюдается специфическая модификация якорного домена: аминокислотные остатки, содержащие гидроксильные группы, ацилируются жирными кислотами. Этот процесс происходит в аппарате Гольджи.

Другим местом модификации может быть N-концевая аминокислота полипептидной цепи. Так, N-концевой остаток глицина в молекуле НАДН-цитохром b_5 -редуктазы ацилирован миристиновой кислотой $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$. Это дополнительно увеличивает сродство липиду N-концевой последовательности фермента, образуемой гидрофобными аминокислотами. Муреиновый липопротеин, прикрепленный к внешней мембране *E. coli*, модифицирован пальмитатом, присоединенным по NH_2 -группе к N-концевому остатку цистеина. Еще одна молекула фосфолипида соединена с тем же остатком цистеина через глицерин посредством тиоэфирной связи.

Белки могут составлять от $1/6$ до $2/3$ вещества мембраны. В первом случае они легко перемещаются в плоскости липидного бислоя, который служит главной составной частью мембраны. Движение белка прекращается при температуре ниже критической для углеводородной сердцевины бислоя. Скорость латерального движения белков сильно снижается, если белки становятся главной составной частью мембраны, что наблюдается во внутренней мембране митохондрий.

* *

*

В этой главе не были рассмотрены такие общие физико-химические понятия, как свободная энергия, окислительно-восстановительные, доннаны, нернстовы, поверхностные потенциалы и т. п. Их можно найти в учебниках биохимии и биофизики, а применительно к мембранной биоэнергетике — в монографии Д. Никольса «Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию» (1985).

Специфические методы мембранной биоэнергетики

2

В мембранной биоэнергетике используют практически все основные методы биоорганической химии, молекулярной биологии, генетики, биохимии и биофизики. Кроме того, целый ряд методических приемов разработан специально для этой отрасли биологических наук. Наиболее существенные из них будут рассмотрены в настоящей главе.

2.1. Измерение мембранного потенциала ($\Delta\psi$)

Электрический мембранный потенциал ($\Delta\psi$) является той первичной формой энергии, которая вырабатывается $\Delta\mu\text{I}$ -генераторами — протонными или натриевыми насосами.

Образующаяся $\Delta\psi$ тормозит работу $\Delta\mu\text{I}$ -генератора, если $\Delta\mu\text{I}$ не используется каким-либо из потребителей. Это явление, которое можно назвать в общей форме *ионным контролем* (а конкретно — *протонным* или *натриевым контролем*), возникает задолго до того, как будет создан градиент концентрации транспортируемого иона ($\Delta p\text{I}$). Такие соотношения суть следствие сравнительно малой электрической емкости мембраны. По этой причине измерение $\Delta\psi$ является одной из важнейших задач при исследовании мембранных энергопреобразующих систем.

Чтобы измерить $\Delta\psi$, образуемую $\Delta\mu\text{I}$ -генератором, необходимо преодолеть по меньшей мере две трудности.

1. Важнейшие объекты исследования — органеллы эукариотических клеток или бактерии столь малы, а сопротивление их мембраны столь велико, что оказывается невозможным надежное применение микроэлектродной техники, разработанной физиологами в опытах с крупными клетками животных, растений и грибов.

2. Несмотря на малый размер, органеллы и бактериальные клетки располагают множеством систем ионного транспорта, все детали которого в настоящее время просто невозможно учесть. Поэтому приходится прибегать к различного рода допущениям, применяя косвенные методы слежения за $\Delta\psi$.

Традиционный энзимологический подход — очистка исследуемого фермента — сам по себе не достаточен, чтобы преодолеть эту трудность. Ведь очистка фермента — генератора или потребителя $\Delta\mu\text{I}$ — с неизбежностью предполагает разрушение природной мембраны.

Чтобы измерить генерацию $\Delta\psi$ очищенным ферментом, необходимо его вновь встроить в мембрану, обладающую высоким электрическим сопротивлением. Эту проблему может решить реконструкция протеолипосом.

2.1.1. Протеолипосомы

Термин «протеолипосома» был предложен для обозначения замкнутых мембранных пузырьков, образованных самосборкой из

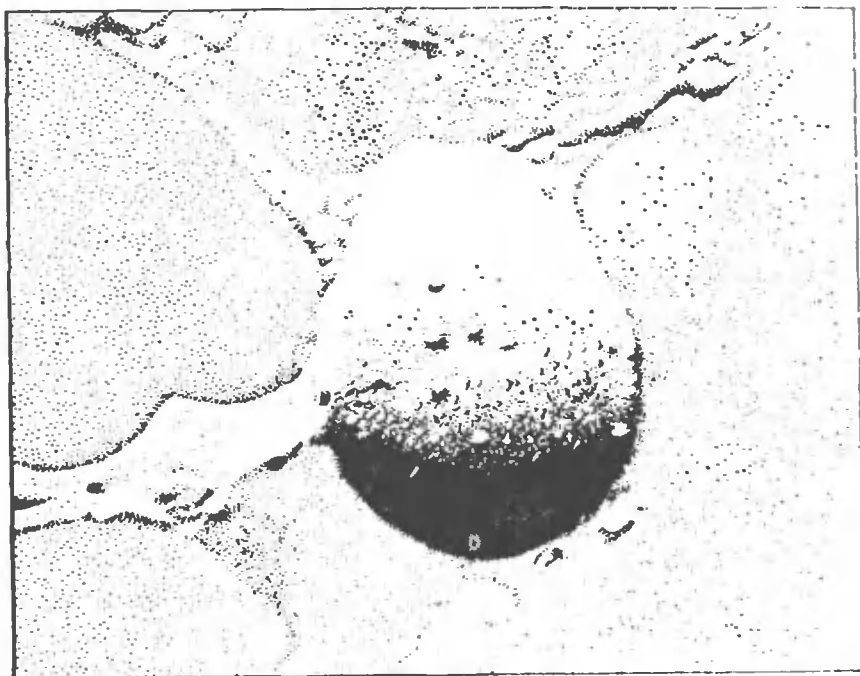


Рис. 8. Цитохромксидазная протеолипосома (метод замораживания и скалывания; электронная микроскопия, увеличение — 100 000) (по P. Nicholls, 1983):

крупные молекулы цитохромоксидазы выступают из мембраны протеолипосомы

фосфолипидов и белков (В. П. Скулачев, 1973). В то время протеолипосомы применили в опытах по доказательству хемиосмотической гипотезы энергетического сопряжения. В 1971 г. Я. Кагаве и Э. Ракеру удалось реконструировать замкнутые пузырьки из соевых фосфолипидов и одного из потребителей $\Delta\mu\text{H}$, а именно H^+ -АТФ-синтазы.

Авторы фракционировали смесь белков митохондриальных мембран таким образом, что водорастворимый сектор H^+ -АТФ-синтазы (фактор F_1) и мембранный сектор (F_0) были получены в индивидуальном виде. Затем фактор F_0 растворили в детергенте (холате

натрия) и полученный раствор смешали с фосфолипидами, также растворенными в холате. На следующем этапе детергент медленно удалили диализом. Понижение концентрации детергента при диализе сопровождалось самосборкой одноmemбранных замкнутых пузырьков наподобие липосом Бангхема, но содержащих в своей мембране помимо фосфолипидов еще и белок (фактор F_0). Последний этап — добавление водного раствора фактора F_1 к F_0 -протеолипосомам. Это имело следствием присоединение фактора F_1 к протеолипосомам в силу его высокого сродства к фактору F_0 . Полученный комплекс F_0F_1 , встроенный в мембрану протеолипосом, оказался способным к расщеплению АТФ. Скорость гидролиза ускорялась агентами, разряжающими $\Delta\bar{\mu}H$, как если бы АТФазная реакция генерировала $\Delta\bar{\mu}H$.

Позднее многие другие генераторы и потребители $\Delta\bar{\mu}H$ были очищены и встроены в протеолипосомы.

Изображение цитохромоксидазных протеолипосом приведено на рис. 8.

2.1.2. Прямое измерение генерации $\Delta\psi$ протеолипосомами, сорбированными на коллодиевой пленке

Л. А. Драчевым и сотрудниками в МГУ разработан метод, позволяющий измерять непосредственно вольтметром генерацию $\Delta\psi$ ферментами, встроенными в протеолипосомы. *Протеолипосомы сорбировали на одной из поверхностей коллодиевой пленки, пропитанной декановым раствором фосфолипидов.*

Как показали эксперименты, сорбция протеолипосом происходит таким образом, что содержащийся внутри них раствор не перемещивается с наружным раствором. По-видимому, при сорбции на той стороне протеолипосомы, которая контактирует с пленкой, мембрана растворяется пропитывающим пленку деканом, а на другой ее стороне — сохраняется, отделяя омывающий пленку раствор от раствора внутри протеолипосом.

Генерация $\Delta\psi$ на мембране сорбированных протеолипосом может быть зарегистрирована двумя электродами, которые помещены по обе стороны коллодиевой пленки и соединены с вольтметром. Временное разрешение такой системы составляло 50 нс, что значительно короче времени однократного срабатывания любого $\Delta\bar{\mu}H$ -генератора. Вот почему этим методом удастся следить не только за валовым процессом генерации $\Delta\psi$, но и за его отдельными этапами. Иными словами, можно регистрировать перемещение заряда (H^+ или электрона) внутри молекулы белка-генератора. Этот подход важен для понимания механизма генерации $\Delta\bar{\mu}H$. Он особенно плодотворен в тех системах трансформации энергии, которые могут быть очень быстро приведены в действие. Таковы светозависимые $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы.

Система «протеолипосомы — коллодиевая пленка», первоначально разработанная для изучения бактериородопсина, была затем использована при исследовании целого ряда других мембранных преобразователей энергии.

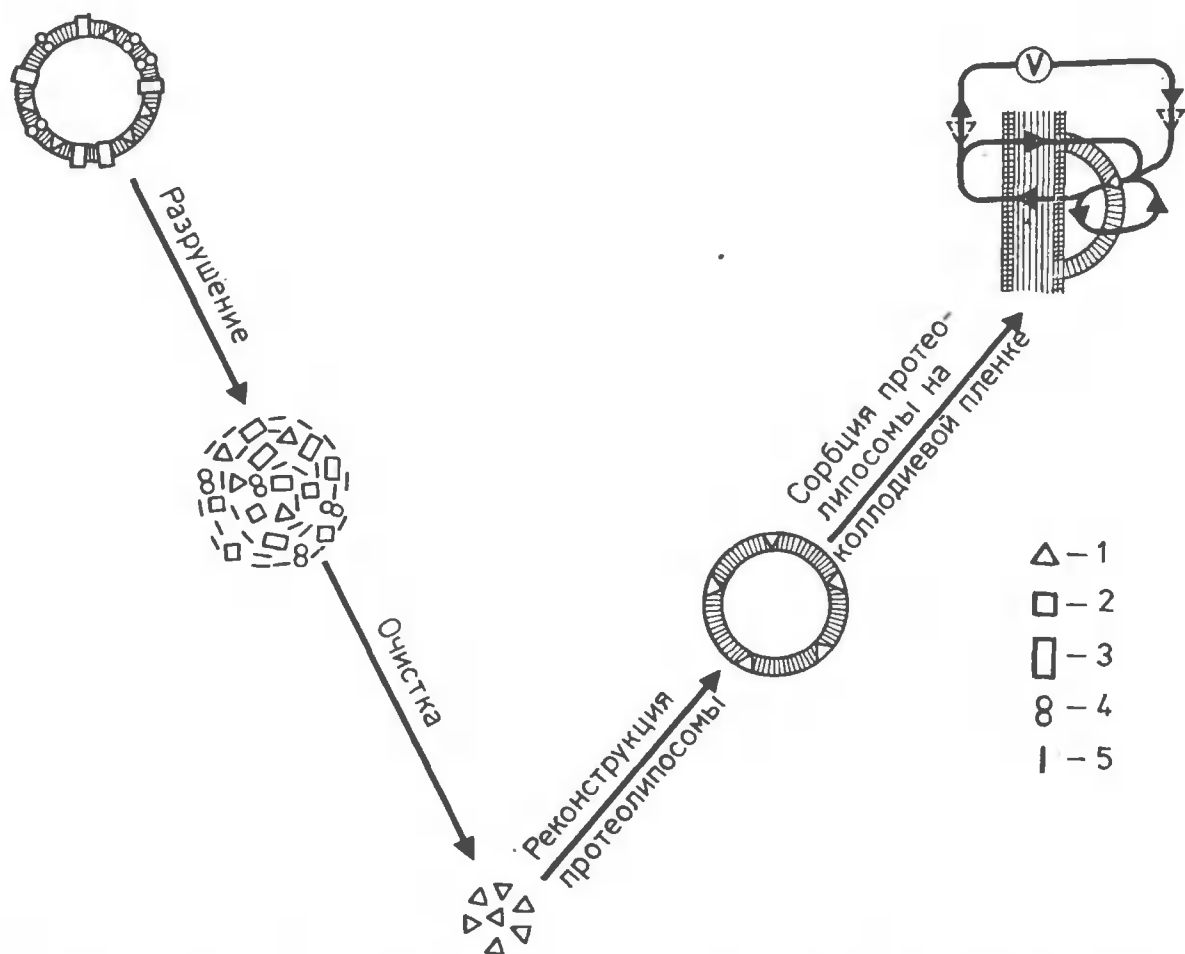


Рис. 9. Схема очистки и самосборки систем генерации $\Delta\bar{\mu}H$ и прямого измерения их активности:

1 — изучаемый $\Delta\bar{\mu}H$ -генератор; 2, 3, 4 — другие мембранные белки, 5 — фосфолипид

На рис. 9 дана общая схема изучения $\Delta\bar{\mu}H$ -генерирующих устройств клетки, включающего их очистку и самосборку и завершающегося прямым измерением преобразования ими световой или химической энергии в электрическую форму.

2.1.3. Измерение $\Delta\psi$ в интактных клетках и органеллах

Микроэлектродный метод. Прямое измерение мембранного потенциала на природных мембранах возможно только в очень ограниченном числе случаев. Электрод удастся ввести лишь в крупные эукариотические клетки, с тем чтобы измерить $\Delta\psi$ на их внешней мембране. С другой стороны, бактерии, митохондрии и хлоропла-

ты, т. е. объекты, наиболее интересные с точки зрения биоэнергетики, слишком малы для применения микроэлектродного метода. По образному выражению Э. Ракера, ввести микроэлектрод в митохондрию — это все равно как попытаться засунуть бейсбольную биту в кошку. Кроме того, сопротивление внутриклеточных энергопреобразующих мембран обычно очень высоко (гораздо выше, чем внешней мембраны животной клетки), и даже небольшое увеличение проводимости приводит к практически полному рассеянию $\Delta\psi$. Именно этот эффект, видимо, не позволял Г. Тедески в течение многих лет измерить $\Delta\psi$ электродом, введенным в митохондрию.

Однако применительно к другим биологическим системам в литературе можно найти указания на положительный результат измерения микроэлектродами $\Delta\psi$. Хронологически первым среди них было сообщение А. А. Булычева и соавторов (1972). Авторы ввели микроэлектрод в гигантский хлоропласт клетки эукариотической водоросли и измерили светозависимую генерацию $\Delta\psi$. Позднее Д. Хэдер провел аналогичные измерения на крупных многоклеточных цианобактериях. Однако подобные системы не стали общепринятой моделью ввиду экзотичности объектов.

Коллодиевая пленка не может быть использована в опытах с интактными бактериями, митохондриями и хлоропластами, так как во всех этих случаях прямому контакту с внутренней мембраной мешает клеточная стенка или внешняя мембрана клетки (органеллы). Эта трудность, по-видимому, критична и для так называемого метода «пэтча», когда микроэлектрод прикасается к исследуемой мембране, не прокалывая ее.

Ионофоры. Пытаясь проверить постулат хемиосмотической теории о генерации $\Delta\psi$ на сопрягающих мембранах, П. Митчел измерял распределение ионов K^+ между инкубационной средой и митохондриями или бактериями. Для повышения калиевой проницаемости мембран добавляли ионофор *валиномицин*. Электрофоретическое поглощение ионов K^+ митохондриями или бактериями регистрировали по уменьшению в среде концентрации K^+ , измеряемой чувствительным к K^+ стеклянным электродом. В некоторых более поздних работах ион K^+ был заменен ионом радиоактивного Rb^+ . Аккумуляцию последнего измеряли по включению радиоактивности в митохондрии (бактерии).

Недостаток этих обоих методов заключается прежде всего в том, что и митохондриальная и бактериальная мембраны содержат K^+/H^+ -антипортеры. Они могут маскировать транспорт K^+ под действием электрического поля.

Другая трудность состоит в том, что бактерии и органеллы могут располагать АТФазными механизмами аккумуляции ионов K^+ . K^+ -транспортирующая АТФаза была обнаружена, например, в клетках *E. coli*, выращенных в среде с очень низкой концентрацией K^+ .

Еще одно ограничение метода, использованного П. Митчелом, — это невозможность его применения к мембранным образованиям, внутренний объем которых заряжается положительно, а не отрица-

тельно (как в случае митохондрий и бактерий). Таковы тилакоиды хлоропластов, бактериальные хроматофоры, а также «вывернутые» субмитохондриальные и суббактериальные пузырьки. При включении $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов все они электрофоретически выбрасывают K^+ из своего внутреннего объема наружу, где K^+ сильно разбавляется инкубационной средой, объем которой обычно превосходит более чем в 1000 раз суммарный объем исследуемых мембранных пузырьков в пробе.

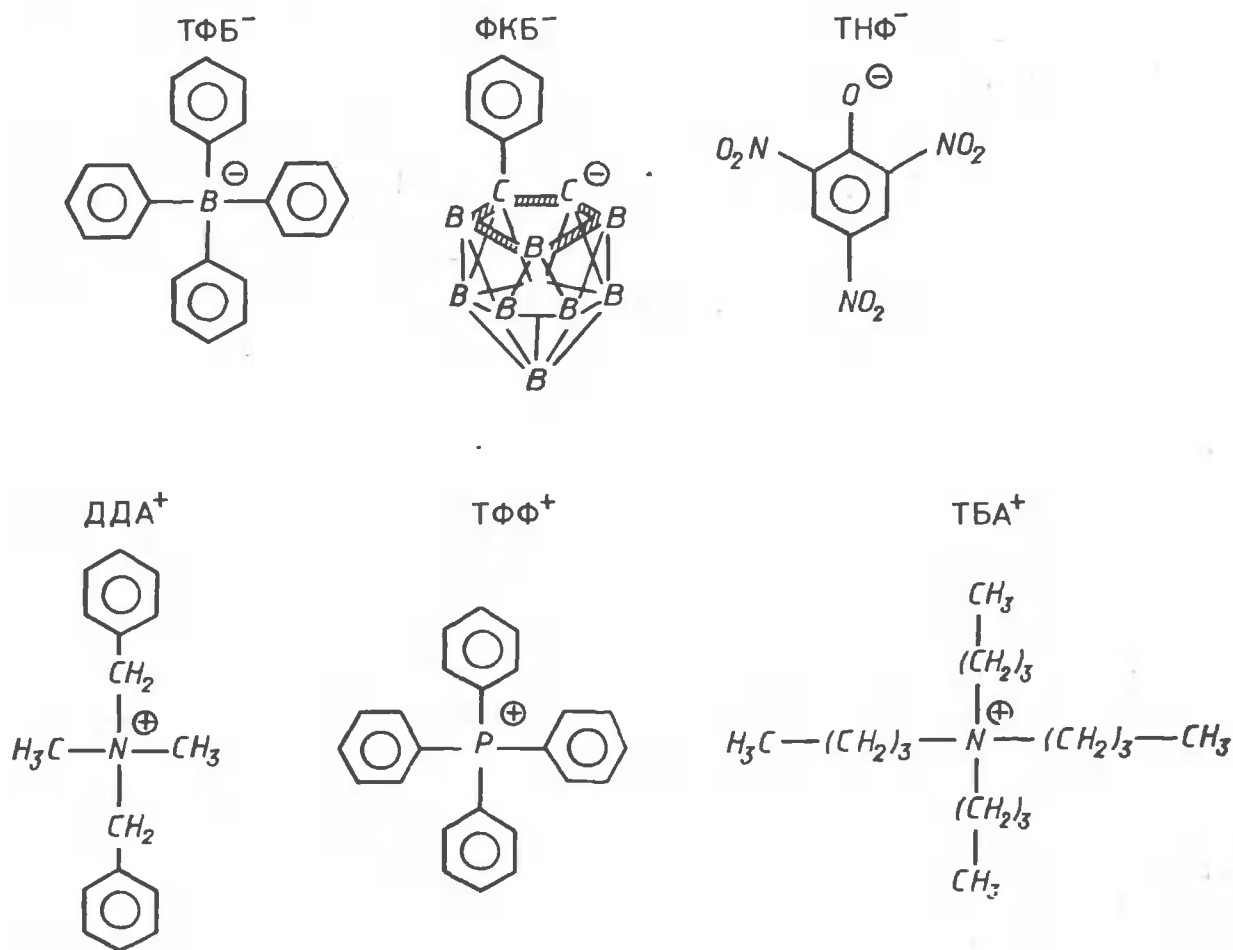


Рис. 10. Синтетические проникающие ионы

Синтетические проникающие ионы. Трудности, перечисленные выше, можно обойти, если использовать синтетические проникающие ионы вместо природного K^+ или близкого к нему по свойствам Rb^+ . При поиске таких ионов главная проблема сводилась к тому, чтобы преодолеть непроницаемость энергопреобразующих мембран для гидратированных ионизированных соединений. Мембраны этого типа пропускают лишь очень узкий набор природных ионов, для которых есть специальные переносчики или каналы. Чужеродные ионы не имеют своих переносчиков, и потому гидрофобная сердцевина мембраны служит для них практически непреодолимым барьером.

Чтобы решить проблему, требовалось найти ионы с низкой степенью гидратации и потому с высокой растворимостью в липиде. Как показали исследования (Е. А. Либерман и др., 1968), такие свойства присущи определенным синтетическим ионам, заряд которых делокализован по всей ионизованной молекуле или экранирован гидрофобными заместителями.

Для выявления таких веществ было проверено в опытах с черными мембранами большое число соединений. Предполагали, что добавление соли проникающего катиона (X^+) и непроникающего аниона (например, Cl^-) в один из отсеков, разделенных мембраной, должно создавать диффузионный электрический потенциал (отрицательное заряджение отсека, содержащего XCl). Этот эффект должен был возникать вследствие движения X^+ из отсека, куда он был добавлен, в противоположный отсек. В случае соли непроникающего катиона и проникающего аниона можно было ожидать появления потенциала обратного знака.

В опытах, поставленных по этому плану, было обнаружено несколько синтетических веществ, отвечающих приведенным выше требованиям. Формулы некоторых из них приведены на рис. 10.

Наиболее демонстративным оказалось сравнение тетрафенилфосфония и тетрафенилбората — соединений, отличающихся только ионизованным атомом (P^+ в первом случае и B^- во втором). Оба иона генерировали разность диффузионных потенциалов, направление которой свидетельствовало, что производное P^+ — проникающий катион, а производное B^- — проникающий анион.

Проникающие ионы были отобраны и испытаны на митохондриях и вывернутых субмитохондриальных пузырьках, имеющих противоположную митохондриям ориентацию мембраны. Можно было надеяться, что синтетические проникающие ионы будут диффундировать сквозь те участки митохондриальной мембраны, которые представляют собой фосфолипидный бислой, аналогичный черной мембране. В этом случае ионы должны были бы распределяться, например, между митохондрией и средой в соответствии с $\Delta\psi$, генерируемой этой органеллой или ее вывернутыми частицами, т. е. катионы должны были накапливаться в митохондриях, а анионы — в вывернутых частицах. Именно такие соотношения и были обнаружены в опытах.

Для измерения концентраций проникающих ионов в инкубационной среде Е. А. Либерман и сотрудники предложили использовать ту же черную мембрану, которая была применена для поиска проникающих ионов. Митохондрии добавляли в один из двух отсеков тефлоновой ячейки, разделенной перегородкой с отверстием, затянутым черной мембраной. В оба отсека вносили проникающий катион. Энергизация митохондрий, например, при включении дыхания вызывала поглощение катиона органеллами. В результате концентрация катионов в отсеке с митохондриями снижалась, что вызывало перемещение катионов через черную мембрану из того отсека, где митохондрий не было. Диффузионный потенциал, воз-

никающий вследствие этого на черной мембране, регистрировали электродами, погруженными в оба отсека.

Этот метод был впоследствии усовершенствован (Л. А. Драчев и др., 1979), когда нестабильную черную мембрану заменили миллипоровым фильтром, пропитанным декановым раствором фосфолипидов (рис. 11). Недавно были изготовлены ионоселективные электроды, чувствительные к тетрафенилфосфонии и тетрафенилборату. Это еще более упростило процедуру измерения $\Delta\psi$.

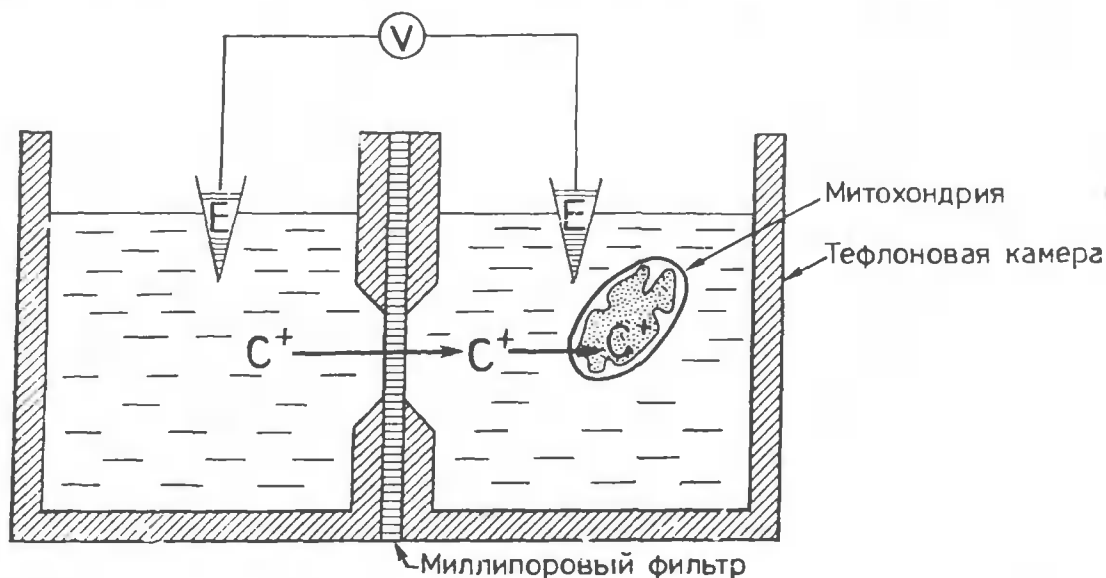


Рис. 11. Устройство для измерения мембранного потенциала в митохондриях посредством синтетического проникающего иона (C^+) (по Е. А. Либерману, 1969):

густота линий условно указывает на концентрацию C^+ . Электрофоретическое поглощение ионов C^+ митохондриями, добавленными в правый отсек ячейки, приводит к снижению концентрации C^+ в этом отсеке и образованию градиента ионов C^+ между двумя отсеками, разделенными фильтром, который пропитан раствором фосфолипидов в декане. Этот градиент вызывает образование диффузионного потенциала ионов C^+ на фильтре, проникаемом для C^+ (ионы C^+ движутся через фильтр слева направо, чтобы компенсировать уменьшение $[C^+]$ в правом отсеке). Диффузионный потенциал измеряется вольтметром V , соединенным с электродами E .

Когда стали доступны радиоактивные проникающие ионы, оказалось возможным определять $\Delta\psi$ по включению метки, например, во фракцию митохондрий.

В течение последнего десятилетия метод проникающих ионов был применен для обнаружения $\Delta\psi$ во многих работах на митохондриях, бактериях, хромофорах, тилакоидах и их частицах, а также других природных и реконструированных системах. Такая универсальность не удивительна, так как основное требование к объекту исследования сводится к наличию участков фосфолипидного бислоя в исследуемой мембране. Это требование всегда выполняется в случае как природных, так и модельных мембранных образований.

В следующих случаях метод синтетических ионов оказывается неприменимым.

1. Синтетический ион сильно тормозит исследуемый $\Delta\mu H$ -генератор; это явление встречается сравнительно редко, так как в силу

высокой чувствительности метода можно использовать низкие концентрации ионов.

2. Ион метаболизируется органеллой или взаимодействует с каким-либо из переносчиков, присутствующих в клетке либо органелле. Так, было показано, что тетрафенилборат может служить донором электронов для фотосистемы II в хлоропластах. У одного из видов дрожжей трифенилметилфосфоний переносится системой транспорта тиамина. Существует косвенное указание на энергозависимый выброс этого катиона из клеток *Acinebacter calcoaceticus* и *E. coli*.

3. Объект исследования содержит две сопрягающие мембраны, генерирующие $\Delta\psi$ противоположного знака. Именно так обстоит дело у некоторых фотосинтезирующих бактерий, содержащих суспендированные в цитозоле хроматофоры. В этом случае как цитоплазматическая мембрана, так и мембрана хроматофора несут $\Delta\psi$ со знаком «—» в цитозоле.

Флуоресцирующие ионы. В лаборатории Л. Чена и независимо в группе автора был разработан метод наблюдения за образованием $\Delta\psi$ в отдельной клетке или митохондрии. С этой целью применили флуоресцирующие производные проникающих синтетических катионов, а именно *этилродамин* и *метилродамин* (родамин 123).

Принцип метода состоит в следующем. При энергизации митохондрии или бактерии аккумулируют любой проникающий катион, поскольку их внутренний объем заряжается отрицательно. Если катион способен флуоресцировать, можно наблюдать флуоресценцию отдельной бактериальной клетки или митохондрии под микроскопом.

Эксперименты Д. Б. Зорова и И. И. Севериной показали, что катионные формы упомянутых выше производных родамина пересекают черную мембрану в катионной форме, генерируя диффузионный потенциал; алкилродамин вызывает прижизненную окраску митохондрии в различных типах животных клеток; в клетках культуры человеческих фибробластов, прокрашенных этилродамином, светятся только митохондрии, причем в определенных условиях, когда митохондрии имеют нитчатую форму, можно наблюдать свечение всех без исключения митохондрий в исследуемом образце.

Флуоресцентный метод создает уникальную возможность наблюдать непосредственно в живой клетке за энергизацией тонких нитчатых митохондрий, не видимых в световой микроскоп любым другим способом. Это и не удивительно, так как флуоресцирующая частица будет видна как источник света даже в том случае, если ее размер меньше длины волны видимого света. Так, ночью мы видим свет звезд, хотя они слишком мелки, с точки зрения земного наблюдателя, чтобы быть видимыми днем как тела, поглощающие свет.

Каротиноидный сдвиг. У некоторых фотосинтезирующих бактерий и хлоропластов образование $\Delta\psi$ вызывает небольшой сдвиг максимума поглощения каротиноидов, а также хлорофилла. Этот

электрохромный эффект может быть показан как при естественной (энзиматической), так и при искусственной генерации $\Delta\psi$. Преимущество метода состоит в том, что он позволяет регистрировать изменения $\Delta\psi$ способом, не требующим никаких внешних воздействий на исследуемую систему. Однако метод имеет и свои ограничения. При измерении электрохромного сдвига невозможно отличить трансмембранное поле, направленное поперек мембраны, от локальных полей, электрический вектор которых может быть наклонен под любым углом к плоскости мембраны. Например, показано, что изменения поверхностного потенциала вызывают каротиноидный сдвиг. Кроме того, этот метод не применим к протеолипосомам и к громадному большинству природных мембран.

Измерение ΔpH . Если «протонная» энергопреобразующая мембрана проницаема для любого иона, кроме H^+ , то первичная форма $\Delta\mu H$ (электрический потенциал) превращается в разность pH между двумя объемами, разделенными мембраной. Простейший способ следить за ΔpH состоит в измерении концентрации водородных ионов снаружи клеток, органелл или протеолипосом.

Например, если $\Delta\mu H$ -генераторы митохондрий экспортируют H^+ из матрикса в инкубационную смесь, то увеличение концентрации H^+ в этой смеси может быть зарегистрировано стеклянным pH -электродом при условии, что концентрация pH -буфера в среде низкая. В таком случае митохондрии выделяют количество H^+ , достаточное для измеримого сдвига pH в инкубационной среде, несмотря на сильное разбавление выделяющихся ионов, которое происходит из-за того, что объем митохондриального матрикса составляет обычно не более 0,1% от общего объема смеси. Такое измерение оказывается возможным благодаря большой буферной емкости матрикса. Подобные соотношения характерны и для бактерий. В случае протеолипосом приходится добавлять непроникающий pH -буфер в смесь для их реконструкции. Затем внешний буфер отмывают переосаждением протеолипосом в среде без буфера.

Чтобы измерять сдвиги pH быстрее, чем это делает стеклянный электрод, применяют непроникающие pH -индикаторы. По изменению поглощения света индикатором (или его флуоресценции) при протонировании можно судить, например, о выделении H^+ -ионов энергизованными митохондриями. Среди непроникающих pH -индикаторов, отвечающих на изменение pH спектральным сдвигом, можно упомянуть *p*-нитрофенол и пиранин. Умбеллиферон может служить примером флуоресцирующего pH -индикатора.

Зная величину изменения pH снаружи пузырька, можно рассчитать сдвиг pH в его внутреннем объеме. Для такого расчета необходимо измерить объем пузырька и pH -буферную емкость заключенного в нем раствора.

Другой способ следить за вариациями внутреннего pH связан с измерением распределения проникающих слабых кислот или оснований между средой и пузырьком. Защелачивание внутренности

пузырька ведет к поглощению слабой кислоты, если ее нейтральная (протонированная) форма проникает, а ионизованная (депротонированная) форма не проникает через мембрану. Поэтому при закислении пузырька будет происходить накопление в нем слабого основания при условии, что из двух его форм только нейтральная (протонированная) способна пересечь мембрану.

В качестве проникающей слабой кислоты можно использовать C^{14} -уксусную, бензойную или салициловую кислоты. В последнем случае применяют также специальный электрод, чувствительный к салицилату. Если в ту же экспериментальную камеру поместить еще и ТФФ⁺-чувствительный электрод, то можно следить одновременно за $\Delta\psi$ и ΔpH .

В тех случаях, когда для измерения ΔpH требуется слабое основание, можно взять C^{14} -метиламин. Существует также оптический метод, позволяющий следить за накоплением проникающего слабого основания. Мембранные пузырьки, накапливающие ионы H^+ , поглощают флуоресцирующее слабое основание *атебрин*. При аккумуляции атебрина внутри пузырька молекулы этого вещества собираются в комплексы, что сопровождается гашением флуоресценции.

Атебрин нельзя использовать для измерения ΔpH обратного знака (защелачивание внутреннего объема). Выходя из пузырька, атебрин разбавляется в инкубационной смеси и образование комплексов не происходит.

2.2. Измерение быстрых процессов протонирования — депротонирования

Любой процесс переноса ионов H^+ через мембрану складывается из поглощения H^+ с одной стороны мембраны, транслокации H^+ сквозь гидрофобный барьер и выделения H^+ на противоположной стороне мембраны. Следить за перемещением протонов или электронов внутри мембраны можно, измеряя $\Delta\psi$ (см. разд. 2.1). Что же касается переноса H^+ из воды в мембрану и из мембраны в воду, то здесь применяют быструю регистрацию спектральных сдвигов pH -индикаторов.

Для этого требуется одновременное срабатывание всех молекул $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов в исследуемой системе. В случае светозависимых $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов тока эффект может достигаться применением лазерной вспышки с длительностью меньшей, чем время одного оборота генератора. Например, однократное срабатывание бактериородопсина происходит за 10 мс, причем две главные электрогенные стадии процесса протекают примерно за 0,1 и 10 мс.

Для изучения этого $\Delta\bar{\mu}H$ -генератора был применен лазер с временем вспышки порядка 30 нс. Чтобы следить за кинетикой выделения и поглощения ионов H^+ бактериородопсином, измеряли поглощение света pH -индикатором *p*-нитрофенолом в суспензии пурпур-

ных бляшек — открытых фрагментов цитоплазматической мембраны галобактерий, содержащих бактериородопсин. Поскольку отщепление H^+ от бактериородопсина под действием света происходит на два порядка быстрее, чем последующее присоединение H^+ с другой стороны бляшки, рН-ответ на одиночную вспышку лазера выглядел как временное закисление среды, появляющееся за 0,1 мс и исчезающее за 10 мс. Важный технический момент обнаружился при исследовании быстрых изменений рН. Оказалось, что при временах короче 1 мс скорость ответа рН-индикатора лимитируется диффузией H^+ -ионов от бактериородопсина к *p*-нитрофенолу. Как показали опыты, этот процесс резко ускоряется в присутствии рН-буфера. Поэтому инкубационная смесь при измерении рН-ответов бактериородопсина была дополнена небольшим количеством (4 мМ) MES-буфера.

Проблема измерений кинетики транспорта H^+ резко усложняется в случае $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов, использующих химическую энергию, а не свет. Чтобы быстро включить такой генератор, требуется светочувствительное вещество, служащее либо предшественником субстрата (или активатора), либо ингибитором исследуемого фермента. Применение такого подхода ограничивается требованием, чтобы процесс превращения предшественника в субстрат под действием света сам по себе не сопровождался изменением рН. Это ограничение не критично, если измеряют не выделение или поглощение H^+ , а $\Delta\psi$.

Многие мембранные преобразователи энергии содержат разного рода группы, поглощающие свет. Таковы не только пигменты фотосинтеза, но и гемы цитохромов, флавины и некоторые другие группировки редокс-ферментов. Измерение спектров поглощения или флуоресценции этих групп служит полезным орудием анализа быстрой кинетики транспорта зарядов. В некоторых случаях с той же целью измеряют поглощение или флуоресценцию ароматических аминокислотных остатков в белках-преобразователях энергии.

Первичные $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы

Первичными $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторами называются системы, образующие протонный потенциал за счет энергетических ресурсов, поступающих в клетку извне: таких, как свет или субстраты окисления и кислород. Эти системы следует отличать от вторичных $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов, использующих АТФ, пирофосфат, градиенты растворимых веществ, предварительно образованные за счет использования $\Delta\bar{\mu}H$ и т. д.

3.1. Циклическая светозависимая редокс-цепь фотосинтезирующих бактерий

У бактерий энергия света может быть использована для образования $\Delta\bar{\mu}H$ посредством одного из трех механизмов: циклической редокс-цепи, нециклической редокс-цепи или бактериородопсина. В этой главе будет рассмотрена первая из названных систем.

3.1.1. Основные компоненты и принцип их действия

У пурпурных фотосинтезирующих бактерий (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rps. viridis*, *Chromatium vinosum* и некоторых других) описан циклический светозависимый процесс, единственным полезным продуктом которого является $\Delta\bar{\mu}H$. Этот процесс локализован в цитоплазматической мембране или в хроматофорах, мелких сферических мембранных пузырьках диаметром около 50 нм, взвешенных в цитозоле бактериальной клетки.

Свет поглощается магний-порфирином бактериохлорофилла (рис. 12), связанным с особым белком (этот комплекс называется светособирающей антенной), или дополнительными пигментами — каротиноидами, локализованными в той же мембране и передающими энергию возбуждения на бактериохлорофилл антенн. Возбуждение мигрирует по молекулам антенного бактериохлорофилла, пока

не достигнет так называемой «специальной пары» — димера бактериохлорофилла, связанного с другим белком в комплекс.

Этот комплекс содержит, помимо димера, две молекулы мономерного бактериохлорофилла, две молекулы бактериофеофитина

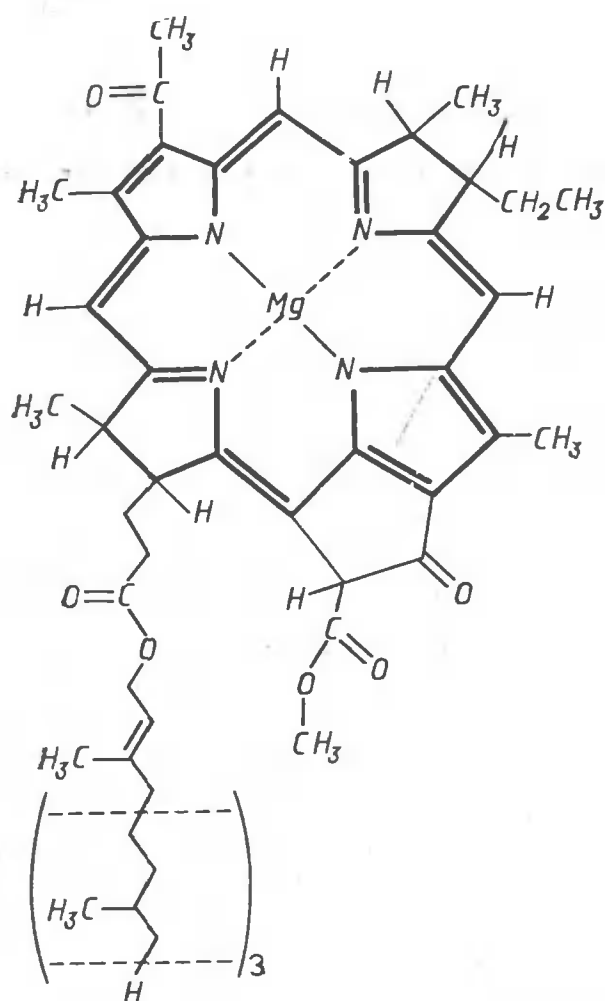
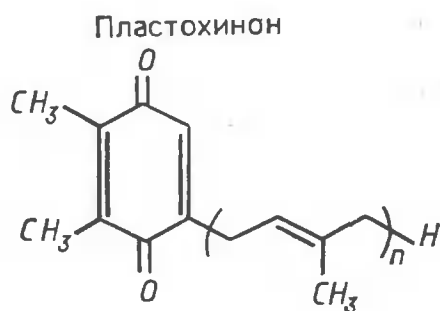
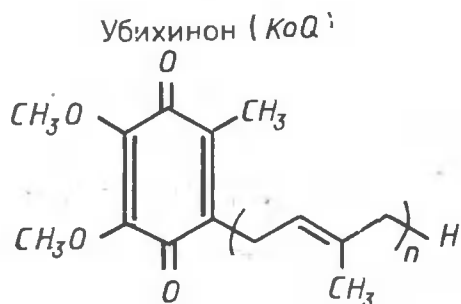


Рис. 12. Бактериохлорофилл *a* (сложный эфир производного магний-порфирина и гидрофобного двадцатиуглеродного спирта фитола):

жирными линиями выделен порфирин



Менахинон (Витамин K_2)

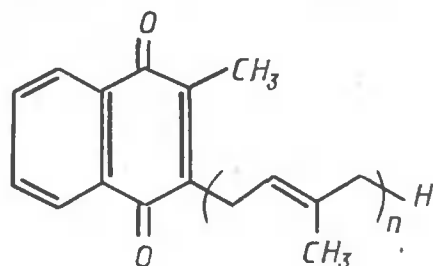


Рис. 13. Производные хинона, участвующие в ферментативных окислительно-восстановительных процессах:

число изопrenoидных остатков (n) варьирует у разных видов от 6 до 10; уби- и менахиноны найдены в мембранах бактерий и митохондрий, пластохинон — в мембранах тилакоидов хлоропластов и цианобактерий

(аналога бактериохлорофилла, лишённого иона Mg^{2+}) и две молекулы убихинона (KoQ) либо одну молекулу убихинона и одну молекулу менахинона (рис. 13). Все это в целом называется комплексом фотосинтетических реакционных центров. Количество реакцион-

ных центров обычно на два порядка ниже, чем антенного бактериохлорофилла.

Возбужденный димер бактериохлорофилла отдает электрон убихинону. Этот процесс ориентирован поперек мембраны и протекает в направлении ее цитоплазматической стороны. Он включает ряд промежуточных этапов, на которых происходит последовательное восстановление и окисление мономера бактериохлорофилла,

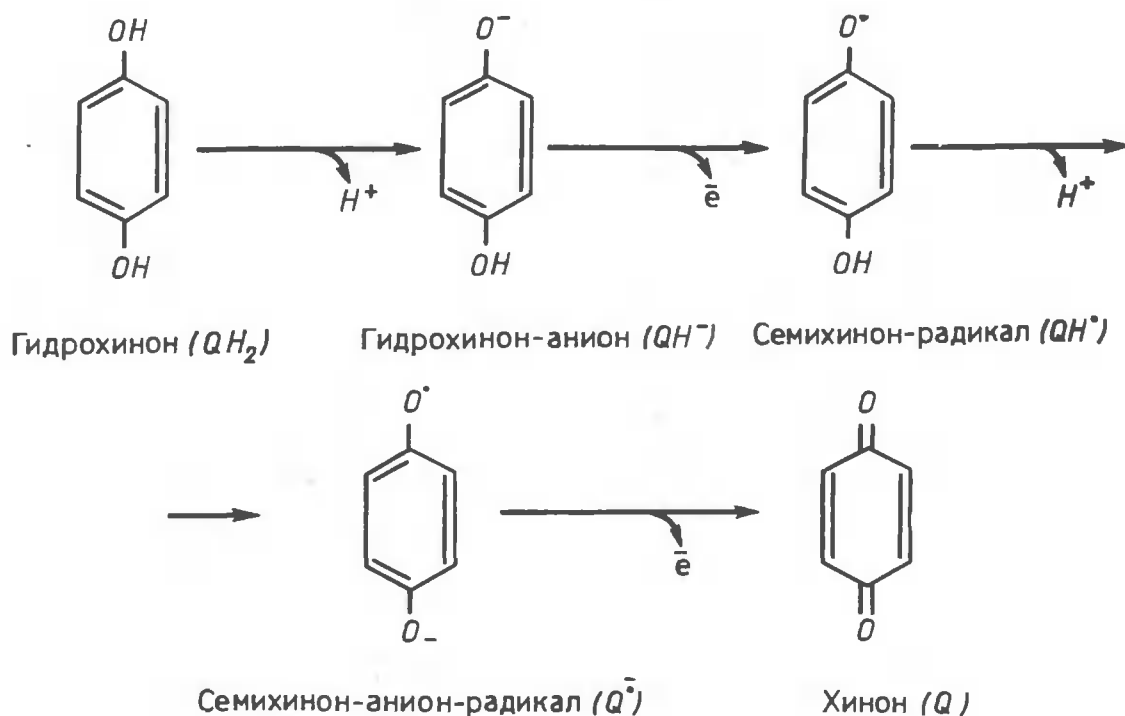


Рис. 14. Этапы превращения гидрохинона в кинон

бактериофеофитина и связанных мена(уби)-хинонов. На схеме циклической редокс-цепи (см. рис. 16) эти этапы соответствуют реакциям 1—4.

Для восстановления KoQ должен присоединить два электрона и два протона (рис. 14). В стационарных условиях работы один из электронов поставляется реакционным центром, а другой гемом b цитохрома b (рис. 15). (Цитохромами называются гем-содержащие белки, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Цитохромы, имеющие идентичные гемы, но разные белковые части, обычно обозначают одной и той же буквой, но разными цифровыми индексами.) Приняв электроны, KoQ присоединяет и протоны, которые черпаются из ближайшей водной фазы (на рис. 16 — над мембраной; образование $KoQH_2$ описывается реакцией 5).

Образовавшись, $KoQH_2$ перемещается в направлении противоположной стороны мембраны (рис. 16, реакция 6). Примерно на полпути от одной поверхности мембраны к другой $KoQH_2$ окисляется в семихинонную форму (реакция 7) посредством негемового

железосульфопротеина, сокращенно обозначаемого FeS (структура различных FeS центров показана на рис. 17). $KoQH_2$ теряет при окислении два протона, которые затем переносятся в воду, расположенную (на рис. 16) под мембраной.

Электрон, перешедший с $KoQH_2$ на FeS, используется в конечном итоге для восстановления диаметра бактериохлорофилла, окис-

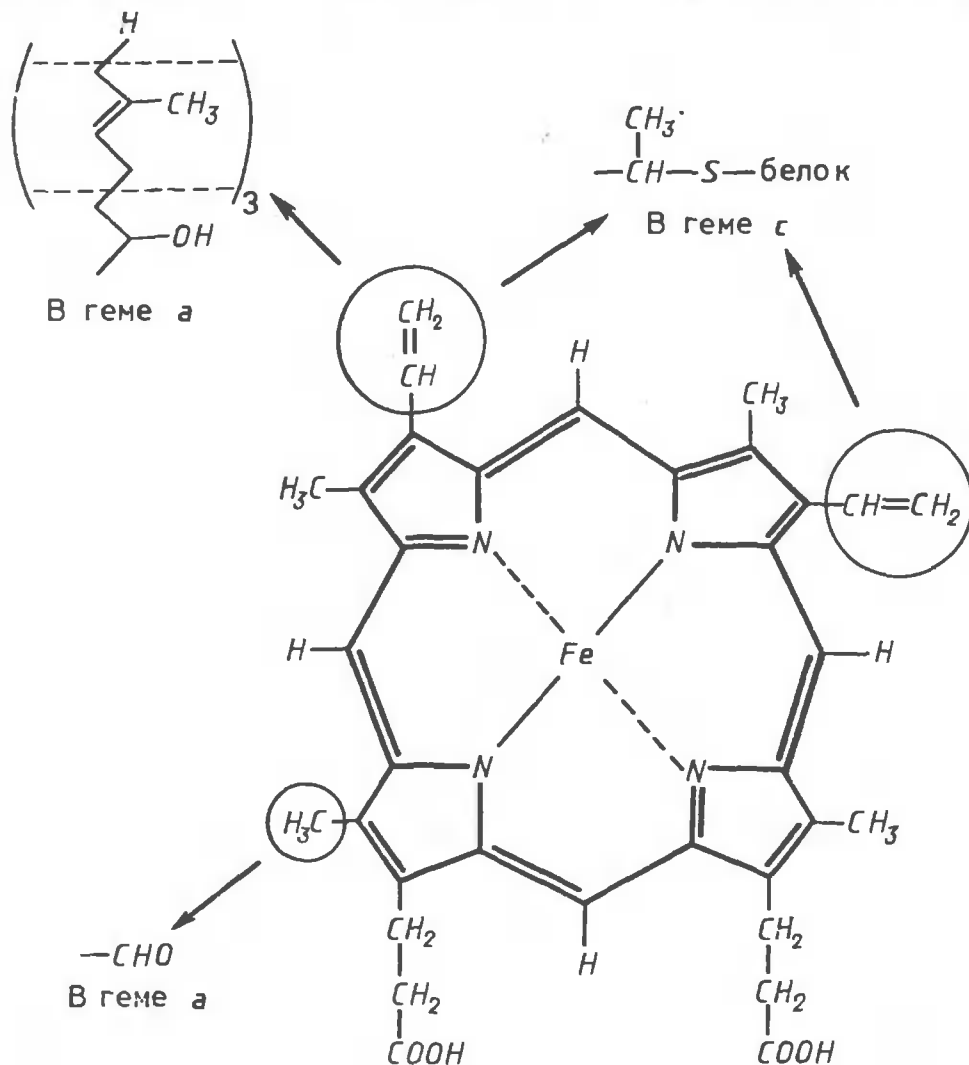


Рис. 15. Протогем, или гем b — производное железопорфирина, входящее в состав цитохромов b :

жирными линиями показан порфирин. Тот же гем содержится в гемоглобине. Гемы a и c , найденные соответственно в цитохромах групп a и c , отличаются от цитохрома b заместителями при пиррольных кольцах (указаны на рисунке)

ленного на первом этапе цикла. В переносе электрона от FeS к $(BXL)_2^+$ (реакции 8—10) участвуют цитохромы типа c (для *Rh. rubrum*, где данная реакция хорошо изучена, это цитохромы c_1 и c_2).

KoQ^+ , получающийся из $KoQH_2$ при потере последним одного электрона и двух протонов, восстанавливает гем b_1 (реакция 11). Гем b_1 передает электрон предварительно окисленному гему b_h

(реакция 12). Цикл завершается диффузией образованного KoQ к верхней поверхности мембраны (реакция 13).

Общим итогом процесса оказывается генерация $\Delta\mu H$ вследствие переноса через мембрану двух ионов H^+ на каждый поглощенный фотон.

Энергетика цикла «оплачивается» фотонами, поглощенными бактериохлорофиллом. Последний, перейдя в возбужденное состояние под действием света, резко изменяет свой редокс-потенциал, который становится около -950 мВ по сравнению с $+440$ мВ в невозбужденном состоянии. Все дальнейшие реакции переноса электронов протекают с выделением энергии, будучи направленными в сторону положительных редокс-потенциалов (рис. 18).

Белки, катализирующие циклический перенос электронов, удается разделить на два комплекса, состоящих из нескольких полипептидов: комплекс реакционных центров и bc_1 -комплекс.

3.1.2. Комплекс реакционных центров

Белковый состав. Комплекс реакционных центров из *Rh. rubrum* состоит из трех белковых субъединиц: тяжелой (H), средней (M) и легкой (L) в стехиометрическом соотношении 1:1:1. H -субъединицу удается отделить от комплекса без потери им способности к светозависимому переносу электронов. Обработка протеиназой удаляет также и небольшую часть M -субъединицы. Получающийся при этом комплекс, который содержит интактную L -субъединицу и большую часть M -субъединицы, все еще может окислять цитохром c_2 под действием света.

Комплекс реакционных центров *Rps. viridis* содержит кроме H -, M - и L -субъединиц еще и прочно связанный цитохром, имеющий четыре гема c -типа. Молекулярные массы этого цитохрома, H -, M - и L -субъединиц, полученные посредством электрофореза в доде-

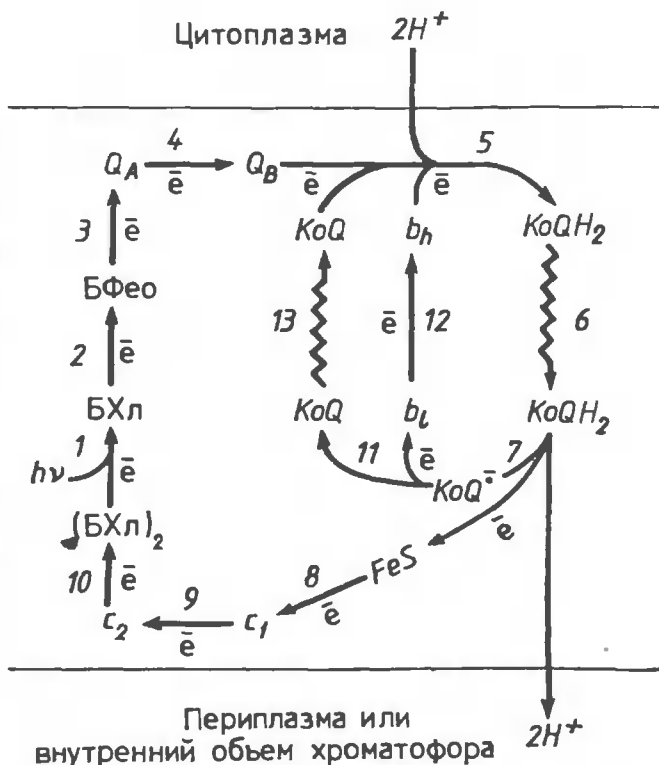


Рис. 16. Циклическая редокс-цепь пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rh. rubrum*:

Q_A и Q_B — две молекулы убикинона, связанного с белками реакционных центров; b_h и b_l — высоко- и низкопотенциальные гемы цитохрома b ; FeS — негемовый железосеропротеин, c_1 и c_2 — соответствующие цитохромы

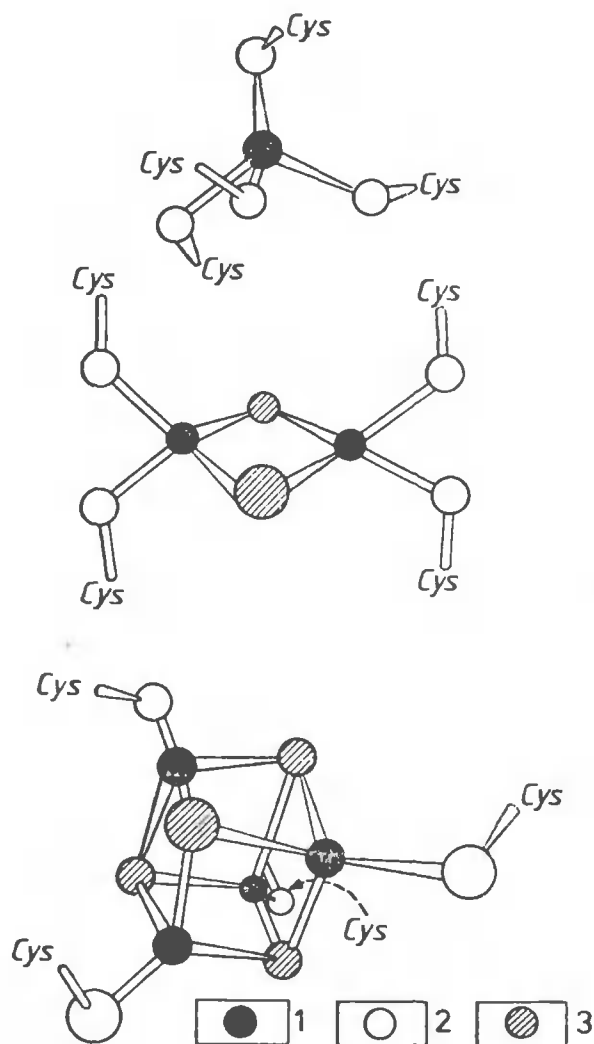


Рис. 17. Три примера железосерных кластеров негемовых FeS-протеинов:

кластер, содержащий один атом Fe (1) был описан в рубредоксине из *Clostridium pasteurianum*. Однако, как правило, атомов железа больше — два или четыре. Такие FeS-протеины найдены у многих бактерий, митохондрий и хлоропластов. В рубредоксине все атомы серы (2) принадлежат остаткам цистеина белка. В «двужелезных» системах в образовании комплекса наряду с четырьмя остатками цистеина участвуют еще два атома серы (3) в форме сульфида (S^{2-}). В кластерах с четырьмя атомами Fe количество S^{2-} и остатков цистеина равно четырем

четырехгемовый цитохром *c*, а другой — *H*-субъединица) и центральной части, образованной главным образом *M*- и *L*-субъединицами. Именно эти группы несут бактериохлорофиллы и феофитины *b*-типа, хиноны и негемовое железо. Сопоставление рентгеноструктурных данных с результатами, полученными ранее другими методами, позволяет утверждать, что цитохром *c* локализован на периплазматической стороне мембраны, *H*-субъединица — в основном на цитоплазматической ее стороне, а *M*- и *L*-субъединицы интегрированы в гидрофобный слой мембраны.

цилсульфате натрия, оказались, соответственно, 38, 35, 28 и 24 кДа. Однако определение первичной структуры, сделанное впоследствии Дж. Дайзенхофером и сотрудниками (1985), дало величины 40,5; 28,3; 35,9 и 30,6 кДа (336, 258, 323 и 273 аминокислотных остатка).

Построение профиля гидрофобности аминокислотной последовательности *M*-субъединицы показало, что белок содержит пять очень гидрофобных сегментов, составленных, по крайней мере, из 20 аминокислот. Каждый из сегментов образует α -спираль.

Это заключение недавно было прямо подтверждено данными рентгеноструктурного анализа комплекса реакционных центров из *Rps. viridis* (Х. Микель и др., 1984). Авторам удалось получить кристаллы диаметром 0,5—1 мм путем высаливания комплекса сульфатом аммония из раствора, содержащего детергент.

Рентгеноструктурное исследование кристаллов позволило впервые увидеть *трехмерную структуру мембранного преобразователя энергии* с разрешением 0,3 нм. Было найдено, что комплекс длиной 13 нм состоит из двух периферических доменов (один из которых —

На рентгеноструктурном изображении комплекса реакционных центров удается выявить одиннадцать α -спиральных колонн, направленных параллельно длинной оси комплекса и локализованных в средней (предположительно мембранной) его части. *H*-субъединица имеет только одну α -спиральную колонну, в то время как *M*- и *L*-субъединицы, подобные по аминокислотным последовательностям и пространственным структурам, содержат по пять та-

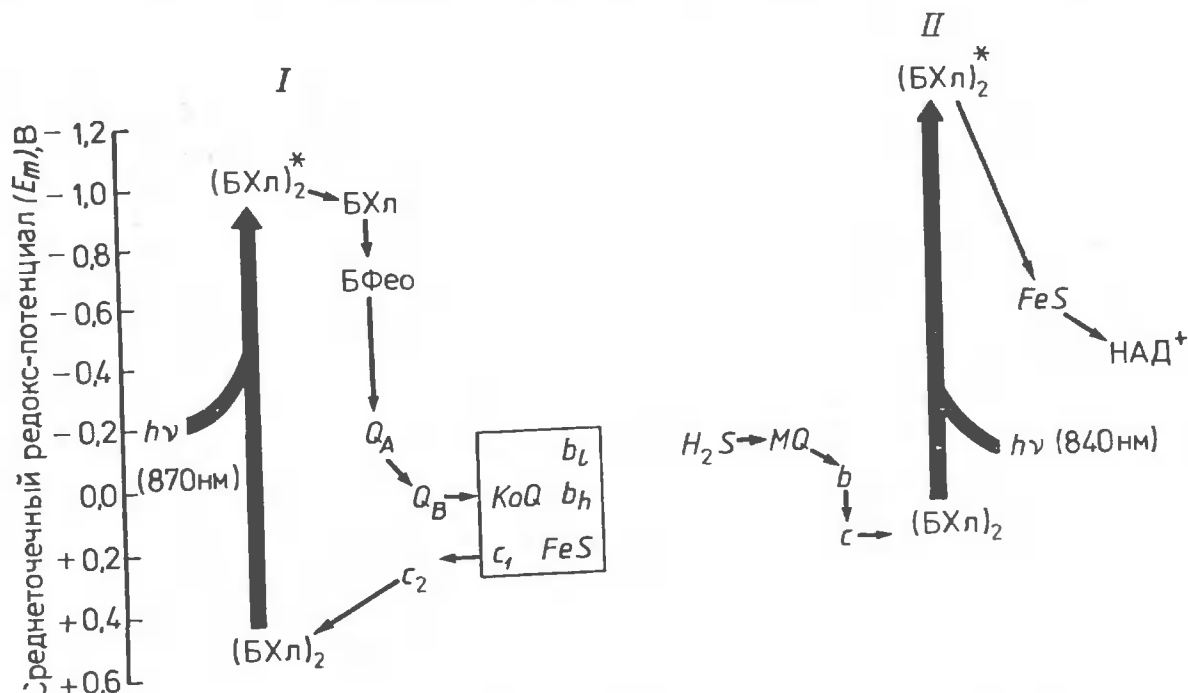


Рис. 18. Редокс-потенциалы переносчиков электронов, участвующих в фотосинтетических системах пурпурных (I) и зеленых (II) бактерий

ких колонн, расположенных симметрично относительно продольной оси комплекса (рис. 19).

Единственная гидрофобная α -спираль *H*-субъединицы служит как бы якорем, прикрепляющим этот гидрофильный полипептид к мембране. Что касается другой периферической субъединицы — цитохрома *c*, то она удерживается на мембране взаимодействием с другими субъединицами, а также двумя жирными ацилами, ковалентно связанными с глицерином, который образует тиоэфирную связь с SH-группой N-концевого остатка цистеина этого цитохрома.

При рассмотрении упаковки полипептидных цепей субъединиц *H*, *M* и *L* в мембране заметно полное отсутствие заряженных аминокислот в трансмембранных α -спиральных колоннах. Такие аминокислоты сосредоточены на поверхностях мембраны, причем на внешнюю поверхность вынесены в основном отрицательно заряженные остатки, а на внутреннюю — остатки, заряженные положительно. Это наводит на мысль, что упаковка полипептидов в мембране достигается за счет электрофореза определенных белко-

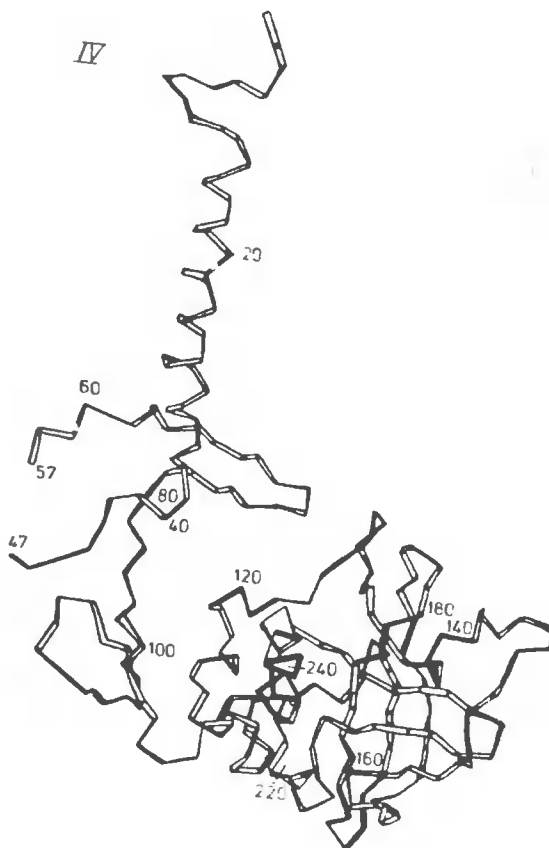
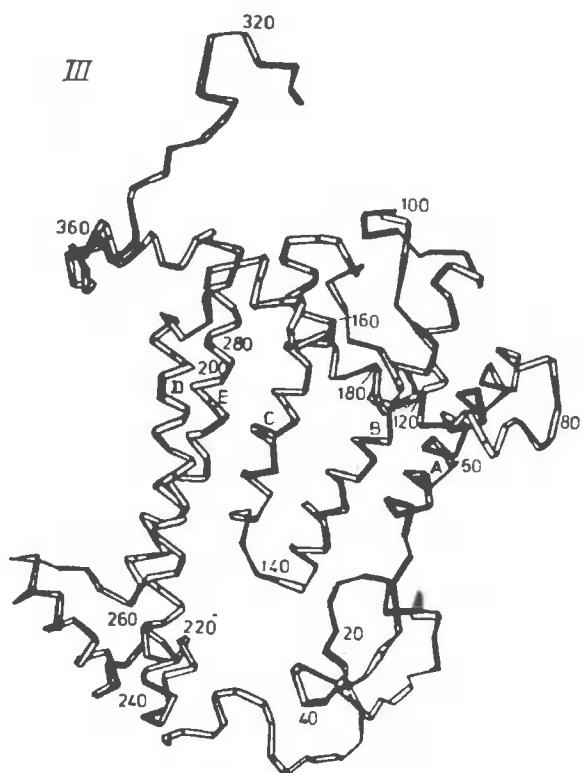
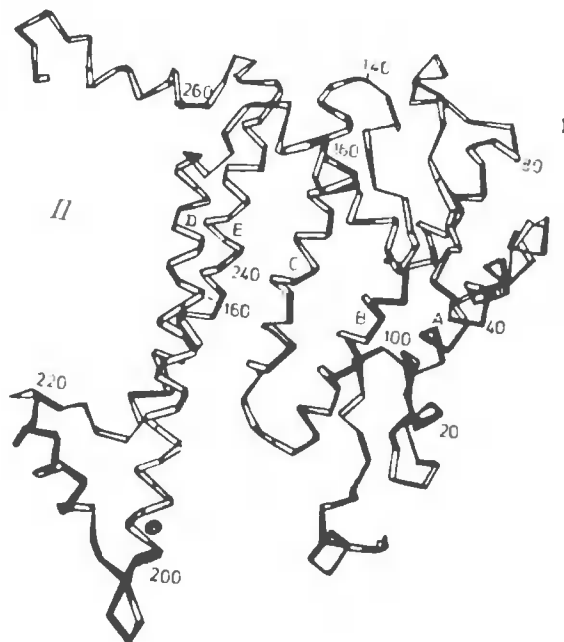
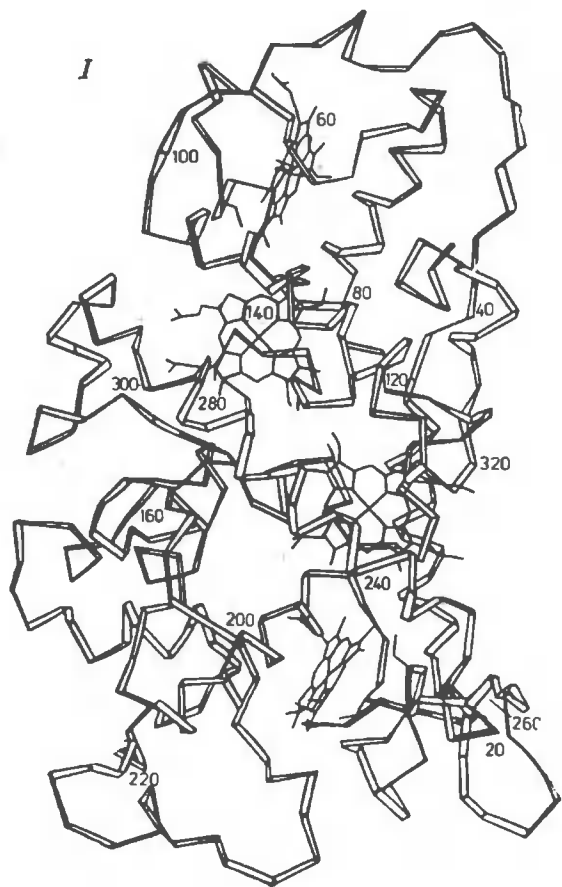




Рис. 19. Структура белковых субъединиц реакционного центра *Rps. viridis* (по J. Deisenhofer et al., 1985):

I, II, III, IV — цитохром *c*, *L*-, *M*- и *H*-субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа; *A—E* — пять трансмембранных α -спиральных колонн субъединиц *M* и *L*; *V* — общий вид комплекса реакционного центра; *VI* — расположение α -спиральных колонн (вид сверху). Заштрихована область, где расположены хромофоры. Все колонны не-

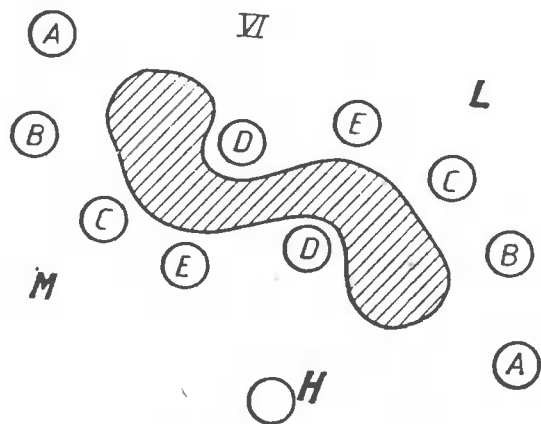


Рис. 19. (продолжение)

сколько наклонены по отношению к плоскости мембраны — на 38° (колонны D) и $<25^\circ$ (прочие колонны). При этом колонны сближаются у цитоплазматической стороны мембраны и расходятся вблизи периплазматической ее стороны. На рисунке представлен срез, прошедший предположительно через середину гидрофобного слоя мембраны

вых доменов под действием $\Delta\psi$ (в условиях энергизации мембраны внутренний объем бактерии заряжен отрицательно).

Кристаллизация мембранных белков представляет собой чрезвычайно сложную задачу. Успех опытов по кристаллизации комплекса реакционных центров из *Rps. viridis* явился, вероятно, следствием того, что гидрофобная центральная часть этого комплекса (M - и L -субъединицы) экранирована гидрофильными полипептидами — цитохромом c и H -субъединицей.

Есть основания полагать, что структура, описанная для *Rps. viridis*, может иметь отношение не только к другим бактериям-

фотосинтетикам, но также и к фотосистеме II в хлоропластах. Так, выявлена существенная гомология аминокислотных последовательностей M - и L -субъединиц и пластохинон-связывающих белков с массой 39 и 39,5 кДа, входящих в состав фотосистемы II.

Расположение редокс-групп. Наиболее важным результатом рентгеноструктурного анализа реакционных центров *Rps. viridis* явилось выяснение *расположения окислительно-восстановительных простетических групп*. На рис. 20 результаты этого анализа представлены таким образом, чтобы были видны только простетические группы. Четыре гема цитохрома c располагаются друг за другом над димером бактериохлорофилла. Расстояние между атомами железа двух соседних гемов колеблется от 1,4 до 1,6 нм. Атом железа гема, ближайшего к $(B\chi l)_2$, находится на расстоянии 2,1 нм от двух ионов магния, входящих в состав $(B\chi l)_2$. Димер ориентирован параллельно длинной оси комплекса реакционного центра. Он как бы зажат между α -спиральными колоннами D , принадлежащих субъединицам M и L (соответственно D_M и D_L). Каждая из этих колонн несет остаток гистидина, имидазольная группа которого служит лигандом для Mg^{2+} в $(B\chi l)_2$.

Два мономера бактериохлорофилла ($B\chi l$) закреплены несколько ниже димера под углом $\sim 70^\circ$ к последнему. Расстояние между ионами Mg^{2+} в $(B\chi l)_2$ и $B\chi l$ равно 1,3 нм. Лигандами Mg^{2+} в $B\chi l$ служат имидазолы остатков гистидина, входящих в состав связок между колоннами C_M и D_M , C_L и D_L (рис. 21). Мономеры бактериохлорофилла находятся в контакте с бактериофеофитинами ($B\Phi eo$). Расстояния и углы равны, соответственно, 1,1 нм и 64° . Фитольные остатки участвуют в образовании такого контакта. На 1,8 нм ниже той из молекул $B\Phi eo$, которая связана с L -субъединицей, видна

молекула менахинона, лежащая на остатке *Trp-252* *M*-субъединицы. Симметричное место под другой молекулой БФео, по всей вероятности, предназначена для *KoQ*, который менее прочно связан с комплексом реакционных центров (отмывается в процессе выделения и кристаллизации комплекса). Этот *KoQ* мог бы расположиться на остатке *Phe-216* и *L*-субъединицы.

На полпути между менахином и местом связывания *KoQ* находится атом негемового железа. Он связан с белком иначе, чем в FeS-протеинах. Четыре лиганда железа были идентифицированы как имидазольные группы гистидиновых остатков колонн *D_M*, *E_M*, *D_L* и *E_L*. Железо прямо не контактирует с хинонами, но один из гистидинов, упомянутых выше, располагается рядом с местом для *KoQ*. Наименьшее расстояние между хином и железом равно 0,7 нм.

Связки между колоннами *A_M* и *B_M*, *C_M* и *D_M*, *A_L* и *B_L*, *C_L* и *D_L*, а также четыре из пяти первых (от N-конца) аминокислотных остатков в субъединице *H* участвуют в образовании контакта с цитохромом *c*. *Tyr-L162* располагается между (БХл)₂ и ближайшим к нему гемом. Предполагают, что он может участвовать в переносе электронов с этого гема на окисленный (БХл)₂. В транспорте протонов из цитоплазмы к *KoQ* может участвовать *Glu-H177*, который имеет доступ в полость, где предположительно находится *KoQ*. Удаление *H*-субъединицы, несущей этот остаток, резко нарушает функцию *KoQ* в реакционном центре.

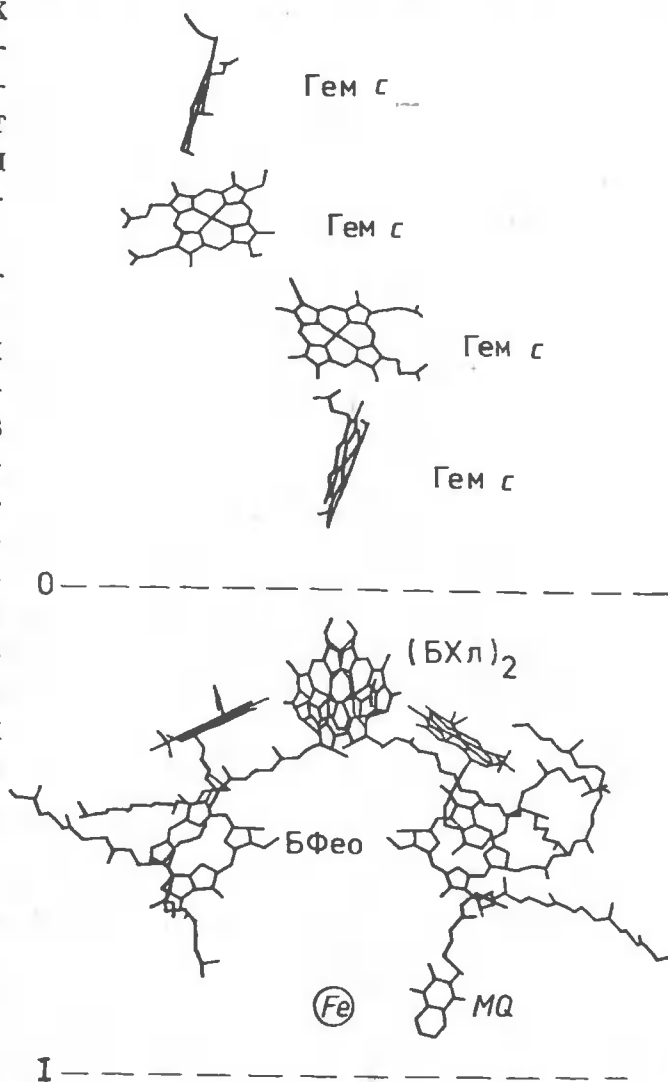


Рис. 20. Расположение протетических групп в комплексе реакционных центров из *Rps. viridis* по данным рентгеноструктурного анализа (по J. Deisenhofer et. al., 1984):

пунктирными линиями 0 и 1 обозначены соответственно предполагаемая внешняя (периплазматическая) и внутренняя (цитоплазматическая) поверхности мембраны *Rps. viridis*. Видны четыре гема, димер бактериохлорофилла и два мономера бактериохлорофилла, два бактериофеофитина, менахинон и негемовое железо (Fe) комплекса реакционных центров

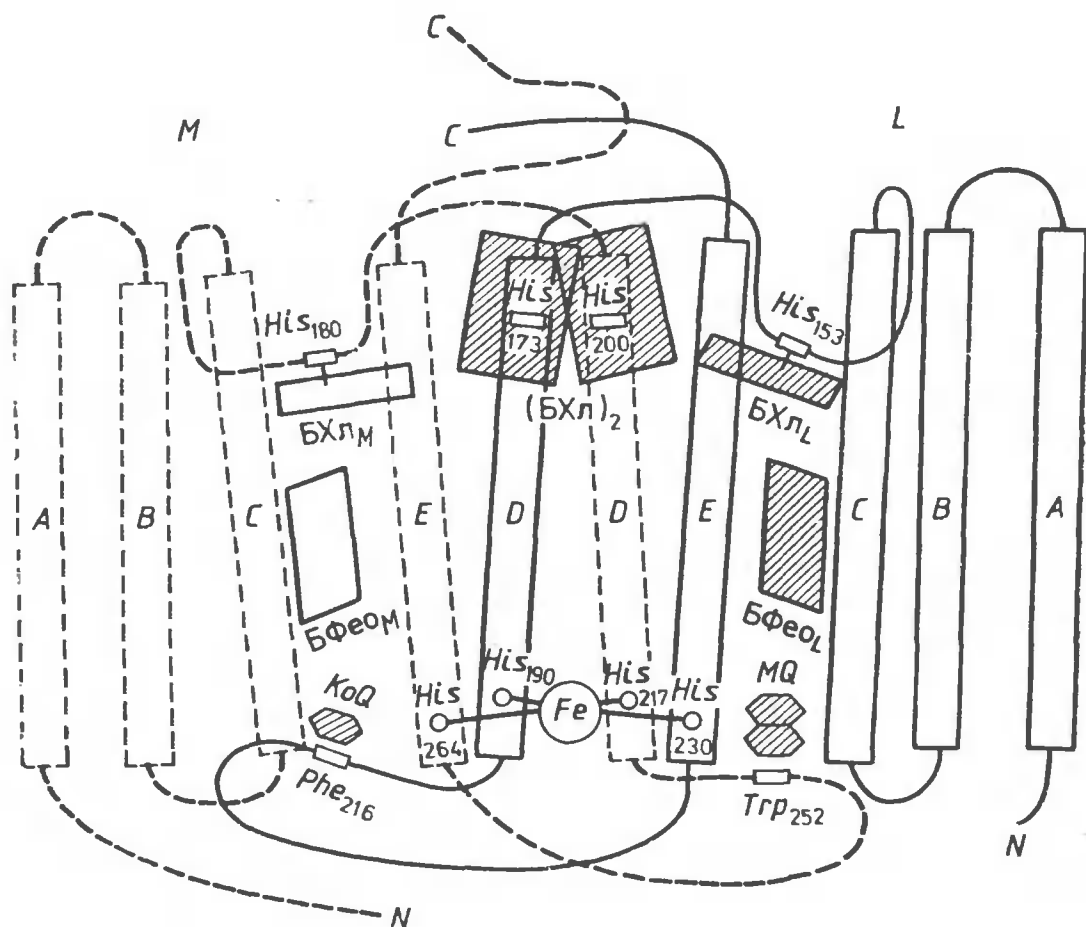


Рис. 21. Соотношение полипептидных и хромофорных компонентов комплекса реакционных центров *Rps. viridis* (схема В. А. Шувалова по J. Deisenhofer et al., 1984).

Субъединицы *L* и *M* обозначены соответственно сплошной и прерывистой линиями, заштрихованы редокс-группы, участвующие в переносе электронов

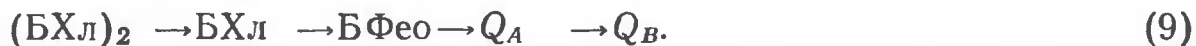
Согласно данным, полученным оптическими методами, $(\text{БХл})_2$ закреплен перпендикулярно к плоскости цитоплазматической мембраны *Rps. viridis*. Вот почему представляется весьма вероятным, что длинная ось комплекса реакционного центра расположена поперек мембраны. Расстояние между атомами Mg в $(\text{БХл})_2$ и менахиноном равно приблизительно 3,0 нм, так что электрон, перенесенный от $(\text{БХл})_2$ к менахинону, должен пересечь большую часть гидрофобного барьера мембраны.

В целом система, составленная из бактериохлорофиллов, бактериофеофитинов и хинонов, выглядит как два параллельных пути переноса электронов. Можно было бы предположить, что один электрон, восстанавливающий KoQ до KoQ^- , транспортируется правой ветвью, т. е. через MQ , а другой электрон, необходимый для восстановления KoQ^- , поставляется левой ветвью, т. е. без участия MQ . Однако опыты показали, что один из путей (предположительно левый) вообще не участвует в переносе электронов на KoQ .

Этот очевидный парадокс ожидает своего объяснения.

В заключение этого раздела необходимо отметить, что данные рентгеноструктурного анализа фактически подтвердили схему расположения хромофоров, постулированную В. А. Шуваловым и А. А. Асадовым (1979) на основании оптических наблюдений.

Последовательность реакций переноса электронов. После выяснения пространственного расположения редокс-групп в комплексе реакционных центров можно считать доказанным следующую цепь реакций переноса электронов, включенных между бактериохлорофиллом и KoQ :



Именно такая последовательность событий была постулирована на основании данных по спектральным изменениям бактериохлорофиллов и бактериофеофитина в ответ на пикосекундную вспышку лазера. Было показано, что вызванное вспышкой окисление $(BХл)_2$ сопровождается восстановлением $BХл$ и $BФео$. Все эти процессы завершаются в течение 20 пс.

Следующий этап — восстановление менахинона посредством $BФео$ — происходит с $t_{1/2}$ около 230 пс, а $t_{1/2}$ восстановления $(BХл)_2^+$ до $(BХл)_2$, в случае *Rps. viridis*, оказывается величиной порядка 270 нс.

Изучение реакционных центров *Rps. viridis*, проведенное автором и сотрудниками, показало, что донором электронов для восстановления $(BХл)_2^+$ служит один из гемов четырехгемового цитохрома *c*, характеризующийся α -максимумом поглощения при 559 нм и редокс-потенциалом +380 мВ. Можно предположить, что именно этот гем располагается непосредственно над $(BХл)_2$ в комплексе реакционных центров. Гем₅₅₉ в свою очередь получает электрон от другого гема (поглощение при 556 нм, редокс-потенциал +310 мВ), а тот — от водорастворимого цитохрома c_2 . Роль еще двух гемов цитохрома *c* (редокс-потенциалы +30 мВ и —50 мВ) остается неясной.

Чрезвычайно высокая скорость первичных процессов фотосинтетического переноса электронов заслуживает специального обслуживания. Названные процессы представляют собой *самые быстрые химические реакции среди всех известных в биологии*. По-видимому, благодаря столь высоким скоростям удается предотвратить окисление возбужденного бактериохлорофилла кислородом. Дело в том, что редокс-потенциалы этих двух компонентов столь сильно различаются, что их взаимодействие представляется термодинамически очень выгодным.

У *Rps. viridis* анион-радикал MQ^- — первый промежуточный продукт, чье время жизни сравнимо с таковым для интермедиатов большинства ферментативных процессов. Окисление MQ^- связанным KoQ протекает примерно за 0,1 мс. Поэтому MQ часто называ-

ют *первичным акцептором электронов*. В некоторых бактериях эту роль играет не MQ , а KoQ . В таких случаях каждый комплекс реакционных центров содержит две молекулы KoQ : первичный акцептор KoQ_A и вторичный акцептор KoQ_B .

Перенос электронов на уровне хинонов некоторым образом связан с присутствием негемового железа. При этом оно не претерпевает окисления и восстановления, все время находясь в форме Fe^{2+} . Показано, что Mn^{2+} вполне успешно заменяет Fe^{2+} .

Одна из точек зрения на механизм переноса электронов комплексом реакционных центров состояла в том, что KoQ_B^- служит конечным продуктом процесса, катализируемого комплексом:



Другая, более вероятная возможность сводится к тому, что не только Q_B , но и Q_B^- восстанавливается посредством Q_A^- [см. уравнение (11)]. В пользу этого варианта указывает тот факт, что Q_B^- в отличие от Q_B и Q_BH_2 очень прочно связан с L -субъединицей комплекса реакционных центров.

Двухэлектронное восстановление KoQ_B сопровождается *присоединением двух протонов*:



Механизм генерации $\Delta\mu H$. Существует целый ряд свидетельств тому, что *цитохром c_2 и хинон локализованы на противоположных сторонах мембраны*, поэтому перенос восстановительных эквивалентов происходит через мембрану в направлении ее цитоплазматической поверхности. Если от цитохрома c_2 к хинону переносится электрон, то цитоплазма должна заряжаться отрицательно относительно периплазмы или внутреннего объема хроматофора.

Такое предположение было подтверждено целым рядом опытов, где измеряли генерацию $\Delta\psi$ реакционными центрами. Для этой цели применяли практически все известные тесты на $\Delta\psi$.

Метод коллодиевой пленки позволил измерить генерацию $\Delta\psi$ в микросекундной и наносекундной временных шкалах. Оказалось, что основной вклад в генерацию $\Delta\psi$ вносит процесс, скорость которого больше, чем 50 нс (разрешение измерительной аппаратуры). В цепи событий, происходящих в реакционных центрах, столь быстрые реакции локализованы между $(BXL)_2$ и Q_A . Сопоставив это наблюдение с данными по трансмембранному расположению редокс-групп реакционных центров, можно заключить, что перенос электронов от $(BXL)_2$ к Q_A имеет электрогенный характер, т. е. движение электрона поперек мембраны электрически не компенсировано перемещением какого-либо другого заряда.

Недавно Г. В. Триссл и сотрудники (1986) измерили электрический ответ клеток *Rps. viridis* с еще большим временным разрешением, используя разработанный ими же метод светового гра-

диента. Измерение $\Delta\psi$ этим методом дает величины хотя и заниженные (примерно на два порядка), но с разрешением 40 пс. Было выявлено две электрогенные фазы ($\tau_1 \leq 40$ пс и $\tau_2 = 125$ пс) примерно одинаковой амплитуды. Первая фаза соответствовала восстановлению БФео посредством (БХл)₂, вторая — окислению БФео посредством MQ .

Более медленные электрогенные стадии были обнаружены при исследовании протеолипосом с реакционными центрами, сорбированными на коллодиевой планке (С. М. Драчева и др., 1988). Одна из них возникала при добавлении KoQ_{10} в декановый раствор фосфолипидов, используемый для пропитки коллодиевой пленки. Амплитуда этой стадии составляла около 5% от общей $\Delta\psi$, генерируемой на вспышку лазера; полувремя медленной стадии — около 400 мкс, т. е. несколько медленней, чем скорость восстановления Q_B . Эффект оказался чувствительным к *o*-фенантролину, тормозящему восстановление Q_B . На основании этих данных было сделано заключение, что обнаруженная электрогенная стадия связана с восстановлением Q_B . По-видимому, декан экстрагирует Q_B из мембраны хроматофоров или протеолипосом, прикрепленных к пропитанной этим углеводородом коллодиевой пленке, а добавление KoQ предотвращает этот эффект.

Возможны два различных механизма медленной электрогенной стадии. 1. Q_B локализован к цитоплазматической поверхности мембраны ближе, чем Q_A , так что перенос электронов с Q_A на Q_B имеет электрогенный характер. 2. Существует H^+ -проводящий путь от поверхности мембраны к Q_B ; ионы H^+ движутся по этому пути к восстановленному Q_B и протонируют его с образованием QH_2 .

Чтобы сделать выбор между этими вариантами, исследовали эффект двух последовательных лазерных вспышек длительностью 30 нс. Если верен первый вариант, обе вспышки должны вызывать появление медленной электрогенной стадии. В альтернативном случае такая стадия будет возникать только при второй вспышке, так как KoQ_B^- , образующийся в результате первого однократного срабатывания реакционного центра, не протонируется при физиологических значениях рН. Протонирование происходит после присоединения второго электрона, для чего необходима вторая вспышка.

Как показали опыты, только вторая вспышка дает медленную электрогенную стадию. Это означает справедливость второго варианта, предполагающего перенос H^+ из воды к месту локализации Q_B внутри комплекса реакционных центров. Допустив постоянство диэлектрических свойств гидрофобного барьера мембраны по всей ее толщине, можно оценить, какую часть этого барьера проходит H^+ . Так как медленная стадия составляет 5% от всего электрического ответа, обусловленного трансмембранным переносом зарядов, можно было бы принять, что протон переносится на 1/20 часть толщины мембраны. Дальнейшее исследование, однако, показало, что реальная ситуация не столь проста.

Для оценки вклада цитохрома *c* были использованы условия, при которых два гема цитохрома *c* (c_{556} и c_{559}) восстановлены. *KoQ* не добавляли, чтобы избежать появления электрогенных стадий, сопровождающих протонирование KoQ^{2-} . Было показано, что вспышка лазера, вызывающая фотоокисление $(B\dot{X}l)_2$, приводит к временному окислению этих гемов (полувремени около 300 нс для гема c_{559} и 3 мкс для гема c_{556}). Окисление гемов сопровождается генерацией $\Delta\psi$, которая также носит двухфазный характер. Кинетика каждой из фаз соответствует таковой окисления гемов. Вклады быстрой и медленной цитохромных электрогенных фаз в общую $\Delta\psi$ оказались соответственно 15 и 5%.

На рис. 22 приведена схема, иллюстрирующая структурно-функциональные характеристики реакционных центров *Rps. viridis*. Расстояния между редокс-группами соответствуют данным рентгеноструктурного анализа. Поверхности мембраны проведены достаточно условно, поскольку точных сведений по этому поводу пока нет. Вследствие этого нельзя ответить, например, на вопрос, почему перенос H^+ от цитоплазматической стороны мембраны к *KoQ* дает всего лишь 5% общего $\Delta\psi$: то ли путь протона (из воды к *KoQ*) короче, чем путь электрона (от цитохрома *c* к *KoQ*), то ли H^+ переносится через менее гидрофобную часть комплекса. Вероятнее всего играют роль оба эти фактора. Именно такова, по-видимому, ситуация на тех этапах, где переносится электрон.

Расстояния между Q_A и $(B\dot{X}l)_2$, $(B\dot{X}l)_2$ и c_{559} , c_{559} и c_{556} по оси вертикальной к плоскости мембраны равны соответственно 2,9, 2,1 и 1,2 нм. Если бы вклад каждой из этих стадий в общий электрогенез определялся только расстоянием между редокс-группами, то вклады относились бы как 1:0,7:0,4. В действительности они относятся как 1:0,2:0,07. Это означает, что вклад тем больше, чем глубже данный этап переноса электрона погружен в мембрану. Такая закономерность становится понятной, если учесть, что величина диэлектрической постоянной в мембране должна возрастать по мере приближения к водной фазе.

Когда П. Митчел в 60-е годы формулировал хемиосмотическую гипотезу, он предположил, что электрон, двигаясь от цитохрома *c* к *KoQ* через бактериохлорофилл, пересекает гидрофобный барьер мембраны — электрон-транспортная «полупетля». Это предположение, в то время чисто умозрительное, сегодня прямо доказано. Единственный новый момент, выявленный в результате экспериментальной проверки гипотезы, состоит в том, что существует небольшая, но измеримая электрогенная стадия, обусловленная не переносом электрона, а встречным движением протона, необходимого для образования $KoQH_2$.

3.1.3. *KoQ*-Цитохром *c*-редуктаза

KoQ-Цитохром *c*-редуктаза (комплекс bc_1) была открыта и детально изучена при исследовании дыхательной цепи митохондрий

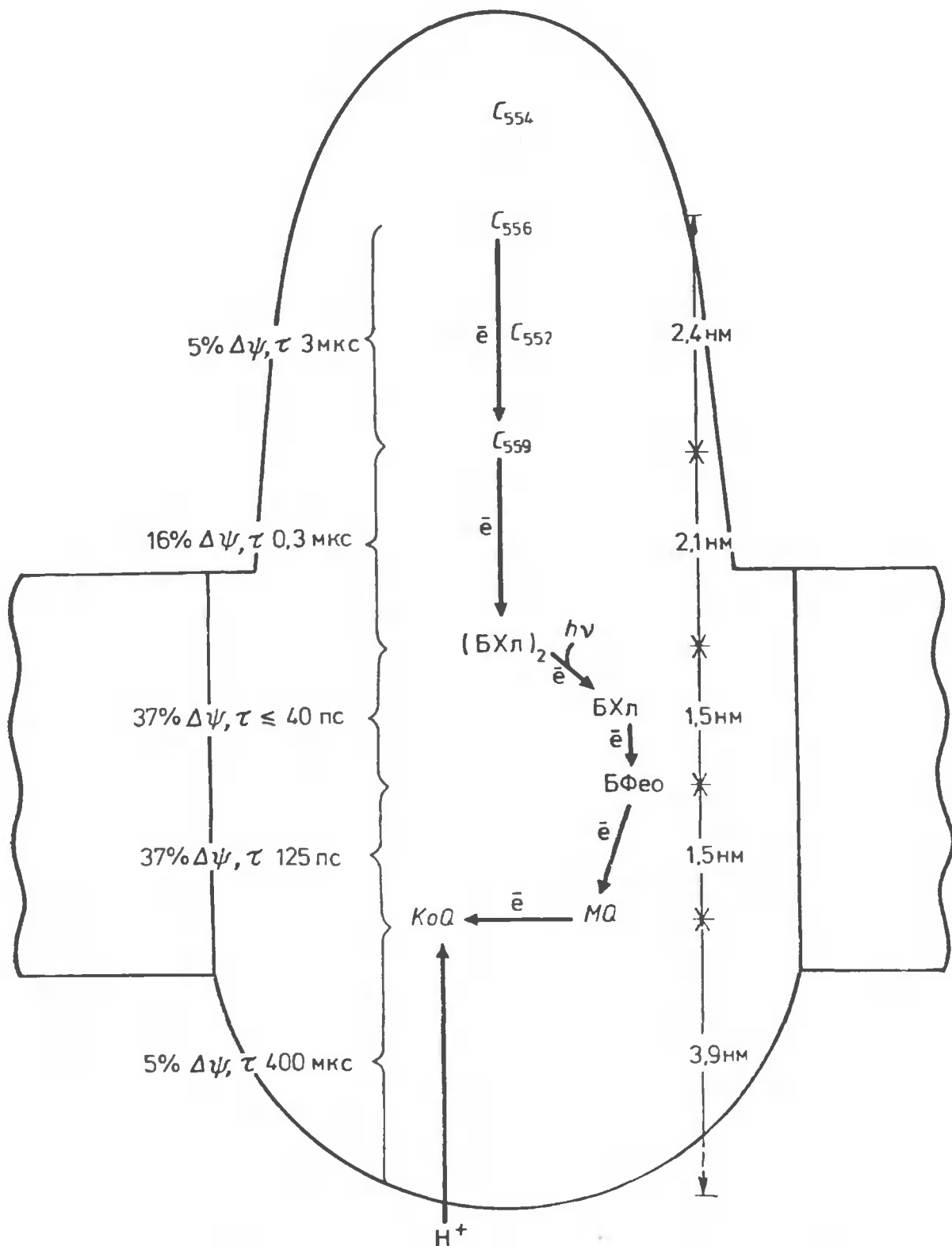


Рис. 22. Механизм и соотношение электрогенных стадий (выделены жирными линиями) в образовании $\Delta\psi$ комплексом реакционных центров *Rps. viridis*

(см. разд. 3.4.4). Информация относительно молекулярных свойств компонентов этого комплекса у пурпурных фотосинтезирующих бактерий более ограничена, однако все, что известно, в значительной степени напоминает митохондриальную систему. Поэтому в данном разделе мы лишь вкратце рассмотрим структуру бактериального комплекса bc_1 , так как более подробно этот $\Delta\mu\text{H}$ -генератор будет разбираться ниже.

Комплекс bc_1 включает один цитохром b , содержащий два гема: низкопотенциальный b_l (синоним — b_{566} , по α -максимуму спектра поглощения) и высокопотенциальный b_h (или b_{560}); один негемовый железосерный центр (FeS); один цитохром c_1 и несколько бесцветных белковых субъединиц разной молекулярной массы, не имеющих простетических групп. KoQH_2 и цитохром c_2 служат, соответственно, восстановителем и окислителем комплекса bc_1 . Цитохром c_2 — водорастворимый цитохром, подобный цитохрому c митохондрий (см. разд. 3.4.5). В реконструированных системах митохондриальный цитохром c успешно заменяет цитохром c_2 . Редокс-потенциалы компонентов комплекса представлены на рис. 18.

KoQ -Цитохром c -редуктаза представляет собой самый медленный компонент фотосинтетической редокс-цепи. Максимальная скорость его работы *in situ* обычно не превышает 10 мс.

По аналогии с митохондриями можно предположить, что генерация $\Delta\mu\text{H}$ этой системой отчасти обусловлена переносом электрона поперек мембраны от гема b_l и b_h , как это показано на рис. 16. Этот процесс направлен в сторону цитоплазматической поверхности бактериальной мембраны. Установлено, что электрон, перемещаясь от гема b_l к гему b_h , пересекает 35—40% толщины мембраны. Можно полагать, что остальную часть пути проходят протоны, двигаясь в направлении, противоположном электрону (см. рис. 16). Окисление гема b_h происходит, по-видимому, вблизи цитоплазматической поверхности мембраны.

Остается неясным, KoQ , KoQ^- либо они оба служат акцепторами электронов для b_h . Если такую роль выполняет только какой-то один из этих двух компонентов, то образование полностью восстановленной формы убигидрохинона (KoQH_2) должно включать реакцию дисмутации ($2\text{KoQ}^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{KoQ} + \text{KoQH}_2$). Другим источником электронов для восстановления KoQ до KoQH_2 служит комплекс реакционных центров. Для устойчивой работы системы, необходимо, чтобы из каждых двух молекул KoQ , восстановленных до KoQH_2 , одна образовывалась за счет переноса электронов с реакционных центров, а другая — для b_h . В любом случае ионы водорода, необходимые наряду с электронами для превращения KoQ в KoQH_2 , черпаются из цитоплазмы.

Образовавшись, KoQH_2 пересекает часть гидрофобного барьера мембраны, чтобы окислиться железосульфопротеином. В результате образуются KoQ^- , восстановленный FeS и 2H^+ . Послед-

ние переносятся через оставшуюся часть гидрофобного барьера, чтобы оказаться в периплазме или внутреннем пространстве хромофора. В случае *Rh. rubrum* и *Rps. sphaeroides* перенос электрона с Fe на (БХл)₂ через цитохромы *c*₁ и *c*₂ завершает цикл, как это показано на рис. 17. У *Rps. viridis* тетрагемовый цитохром *c* включен в перенос электронов от цитохрома *c*₂ и (БХл)₂.

Последовательность процессов, катализируемых КоQ-цитохром *c*-редуктазой (рис. 17), по существу представляет собой конкретный вариант Q-цикла, постулированного П. Митчелом в 1975 г. Ключевой постулат этой схемы состоял в том, что пути каждого из двух электронов, приходящих на КоQ или уходящих с КоQH₂, оказываются различными. На сегодня это предположение твердо доказано, по крайней мере, для окисления КоQH₂. Установлено, что роль КоQH₂-оксидазы играет FeS, а КоQ^{•-}, образующийся из КоQH₂, окисляется затем гемом *b*₁ цитохрома *b*. Существует чисто химическая предпосылка того обстоятельства, что КоQH₂ и КоQ^{•-} окисляются разными ферментами: потенциалы хинона и семихинона существенно различны.

По мнению ряда авторов, связывание КоQH₂ и FeS происходит таким образом, что гидрохиноновая «головка» оказывается вблизи некоторой положительно заряженной группировки (предположительно Fe³⁺). Это вызывает сдвиг рК гидрохинона в кислую сторону, что облегчает его депротонирование. Потеряв протон, КоQH₂ превращается в КоQH⁻, который и окисляется посредством FeS. Депротонирование необходимо для окисления КоQH₂, так как редокс-потенциал пары КоQH₂/КоQH₂⁺ выше +850 мВ, а пары КоQH⁻/КоQH[•] около +190 мВ (данные для раствора КоQ в 80%-ном этаноле).

3.1.4. Пути использования ΔμН, образованной циклической редокс-цепью

В хромофорах протонный потенциал, образованный циклической редокс-цепью, может использоваться для совершения четырех видов химической работы. Среди них: 1) образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата посредством H⁺-АТФ-синтазы (см. разд. 5.1.1); 2) образование неорганического пирофосфата из двух молекул фосфата под действием H⁺-пирофосфатазы (см. разд. 5.1.2); 3) катализируемый НАДН-КоQ-редуктазой обратный перенос восстановительных эквивалентов от доноров водорода с редокс-потенциалом около нуля к НАД⁺; 4) восстановление НАДФ⁺ посредством НАДН под действием трансгидрогеназы (см. разд. 5.1.3).

НАДН-КоQ-редуктаза представляет собой первый из трех ΔμН-генераторов, включенных в дыхательную цепь (см. разд. 3.4.3). Действуя в обратном направлении (КоQH₂→НАД⁺), этот фермент в хромофорах становится потребителем ΔμН, образуе-

мой фотосинтетической редокс-цепью. Он делает возможным восстановление НАД⁺ (редокс-потенциал —320 мВ) за счет таких доноров водорода, как H₂S (редокс-потенциал около 0). Образующийся НАДН затем используется в восстановительных биосинтезах.

Один из путей использования НАДН — восстановление НАДФ⁺ в трансгидрогеназной реакции. Фермент трансгидрогеназа служит потребителем ΔμН. Он локализован, в частности, в мембране хроматофоров. Трансгидрогеназа, используя ΔμН, резко увеличивает редокс-потенциал пары НАДФН/НАДФ⁺, что благоприятствует тем восстановительным синтезам, где используется НАДФН в качестве донора водорода.

В темноте НАДН-КоQ-редуктаза может действовать в прямом направлении (НАДН → КоQ), генерируя ΔμН. Образующийся КоQH₂ окисляется комплексом bc₁ с восстановлением цитохрома c₂. Последний восстанавливает цитохром o, который переносит электроны на O₂. Известны наблюдения, что восстановление O₂ посредством цитохрома o сопряжено с генерацией ΔμН (см. разд. 3.4.5). Если это так, то пурпурные фотосинтезирующие бактерии располагают дыхательной цепью с тремя ΔμН-генераторами.

В цитоплазматической мембране фотосинтезирующих бактерий существует целый ряд дополнительных потребителей ΔμН, отсутствующих в хроматофорах. Среди них: 1) H⁺-моторы, вращающие бактериальные флагеллы; 2) H⁺, метаболит-симпортеры, обеспечивающие накопление метаболитов в бактериальной клетке; 3) системы транспорта Na⁺ и K⁺, ответственные за поддержание асимметричного распределения этих катионов между клеткой и средой. Градиенты ионов Na⁺ и K⁺ действуют как ΔμН-буфер. Аналогичную роль может, по-видимому, играть и пирофосфат (см. разд. 6.3.1, 5.1.2).

Общая схема превращения энергии света в различные типы работы мембраны пурпурных фотосинтезирующих бактерий представлена на рис. 23.

3.2. Нециклическая светозависимая редокс-цепь зеленых бактерий

В предыдущем разделе было упомянуто, что пурпурные фотосинтезирующие бактерии могут восстанавливать НАД⁺ посредством H₂S за счет энергии света, которая предварительно превращена в ΔμН циклической редокс-цепью. Зелеными фотосинтезирующими бактериями-анаэробами используется другой механизм. Он устроен таким образом, что свет одновременно вызывает генерацию ΔμН и восстановление НАД⁺ сероводородом.

Это простейший вариант так называемой нециклической фотосинтетической редокс-цепи. Схема обсуждаемого механизма при-

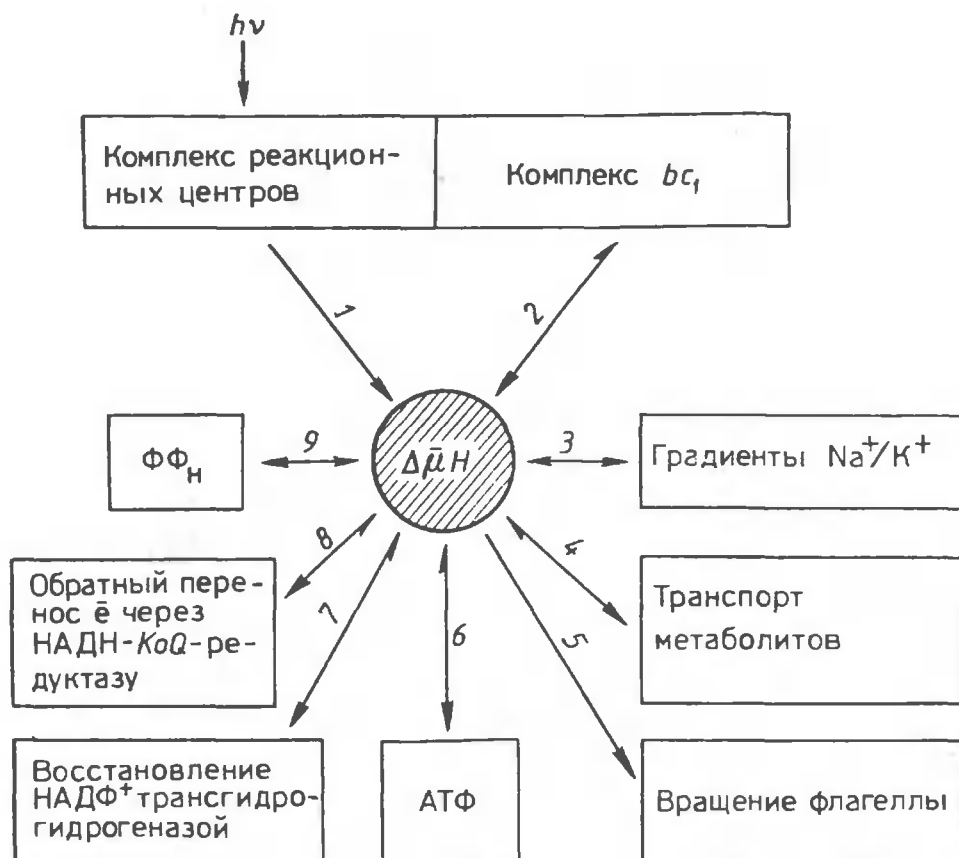


Рис. 23. Пути (1—9) трансформации энергии света в цитоплазматической мембране пурпурных фотосинтезирующих бактерий:

в хроматофорах тех же бактерий действует упрощенная схема, где отсутствуют пути 4, 5 и, возможно, 3

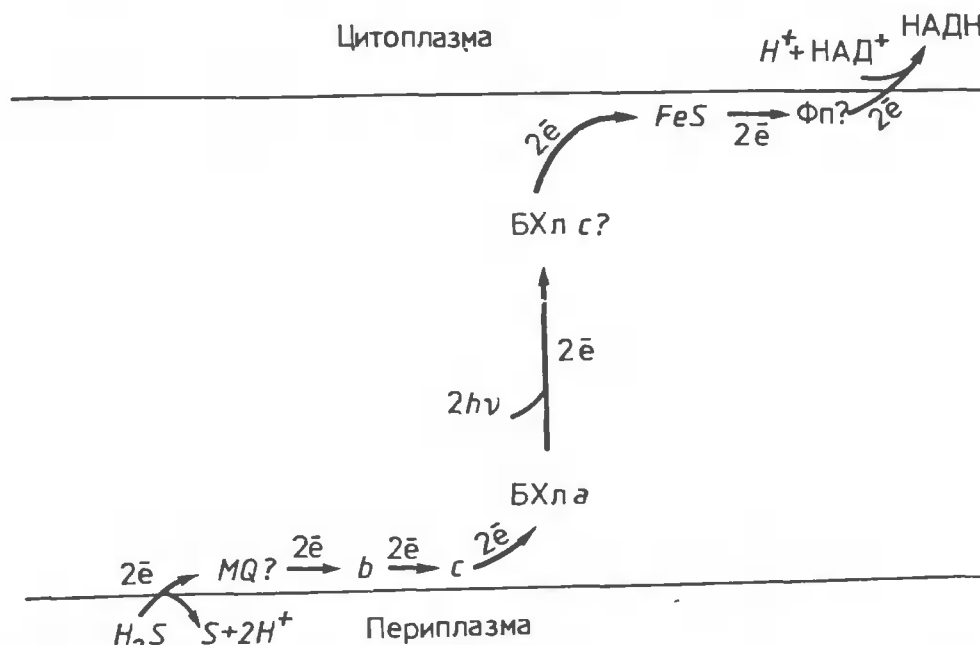


Рис. 24. Нециклическая фотосинтетическая редокс-цепь зеленых бактерий:

b , c — цитохромы, БХл a и БХл c — соответствующие бактериохлорофиллы, специфичные для зеленых бактерий, FeS — негемовый железопротейн, жирными линиями выделены предполагаемые электрогенные стадии

ведена на рис. 24. Ряд стадий переноса электронов в этой цепи остается неясным. Твердо установлено, что свет вызывает фотоокисление бактериохлорофилла, относящегося к типу *a*. Неизвестно, в какой форме: димерной и олигомерной — находится БХл. Непосредственным окислителем для БХл *a* служит, по-видимому, другая молекула бактериохлорофилла.

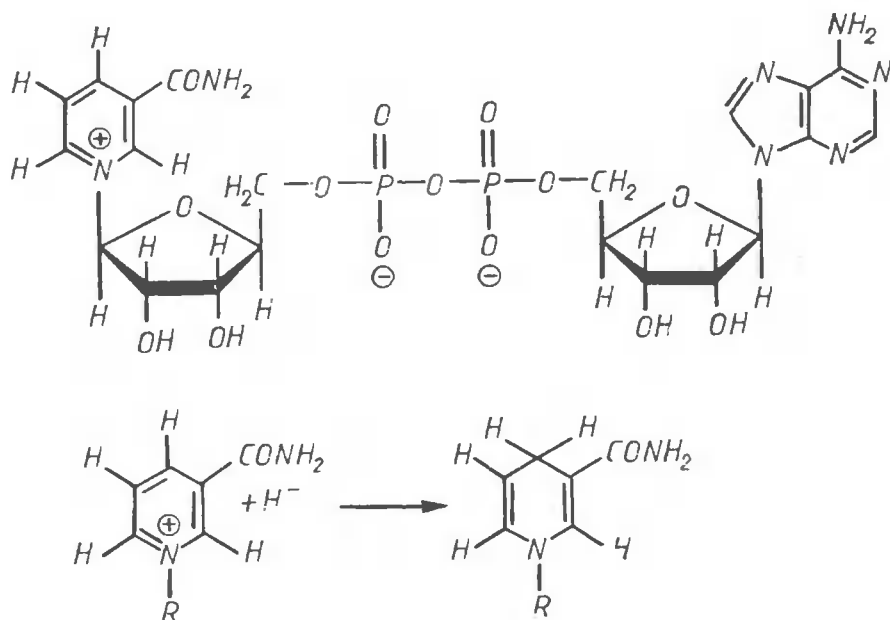


Рис. 25. Структура НАД⁺ и механизм его восстановления до НАДН, требующий присоединения двух электронов и одного протона:

в НАДФ(Н) содержится дополнительный фосфатный остаток при С-2 рибозы аденилатной части динуклеотида

Показано, что первичный стабильный акцептор электронов у *Chlorobium* имеет редокс-потенциал — 540 мВ, напоминая этим ферредоксин в фотосистеме I хлоропластов (см. разд. 3.3.2).

От FeS электроны переносятся к НАД⁺. По аналогии с другими системами такого типа можно предполагать участие в этом процессе флавинсодержащего белка. Структура и механизм восстановления НАД⁺ и флавина показаны на рис. 25 и 26.

Фотоокисленный БХл *a* восстанавливается донорным сегментом редокс-цепи, берущей начало от H₂S. Этот участок содержит цитохром типа *b* и, по-видимому, два цитохрома типа *c*. Считают вероятным участие механинона и еще некоторых редокс-компонентов. Редокс-потенциалы основных компонентов цепи зеленых бактерий были указаны выше (см. рис. 18).

Показана светозависимая генерация Δψ мембранными фрагментами зеленых бактерий, сорбированными на плоской фосфолипидной мембране (В. Д. Самуилов, 1977). Вероятная природа этого эффекта может объясняться, как и в случае других хлорофилл-содержащих ΔμН-генераторов, переносом электронов поперек мем-

браны. Если перенос электронов происходит так, как это показано на рис. 24, то он должен приводить к освобождению ионов водорода во внешнюю среду из-за окисления H_2S до S электрондонорным сегментом редокс-цепи, который, как предполагают, расположен вблизи внешней поверхности цитоплазматической мембраны. На противоположной (внутренней) стороне мембраны

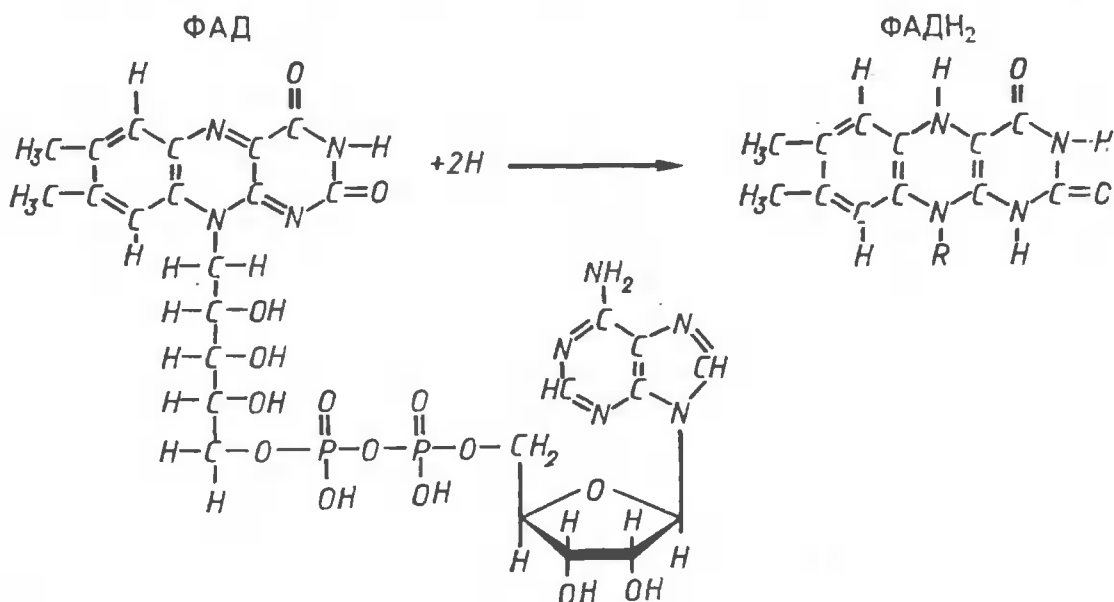


Рис. 26. Структура и механизм восстановления флавинадениндинуклеотида (ФАД):

во флавиномононуклеotide (на рисунке не показан) отсутствует остаток АМФ

должно происходить поглощение ионов H^+ , так как НАД^+ восстанавливается бактериохлорофилльной системой, транспортирующей электроны, но не протоны. Чтобы образовать НАДН из НАД^+ , присоединение двух электронов должно сопровождаться присоединением одного протона (см. рис. 25).

Итак, на внешней поверхности мембраны зеленой бактерии происходит следующий процесс:



в то время как события, происходящие на внутренней стороне мембраны, описываются как



где А^- — восстановленная форма первичного акцептора.

Таким образом, схема переноса электронов у зеленых бактерий предполагает, что и генерация $\Delta\mu\text{H}$, и восстановление НАД^+ осуществляются одной и той же светозависимой редокс-цепью.

Следует отметить, что схема, представленная на рис. 24, применима лишь к анаэробным зеленым бактериям. В то же время

известно, что зеленые бактерии, относящиеся к факультативным аэробам, имеют циклическую редокс-цепь, напоминающую таковую пурпурных бактерий.

3.3. Нециклическая светозависимая редокс-цепь хлоропластов и цианобактерий

Нециклическая светозависимая редокс-цепь цианобактерий и хлоропластов до известного предела аналогична цепи зеленых бактерий. В обоих случаях свет используется для генерации $\Delta\mu\text{H}$ и восстановления $\text{НАД}(\Phi)^+$ посредством донора электронов с более положительным, чем у $\text{НАД}(\Phi)^+$, редокс-потенциалом. Главное отличие цианобактерий и хлоропластов от зеленых бактерий состоит в том, что донором электронов для первых служит вода. Разность редокс-потенциалов между $\text{НАД}(\Phi)^+$ и H_2O составляет около 1,2 В, что намного больше, чем разность потенциалов между НАД^+ и H_2S , используемых зелеными бактериями (0,3 В). Поэтому транспорт одного электрона по редокс-цепи хлоропластов (цианобактерий) сопряжен с поглощением двух фотонов, а не одного, как у зеленых бактерий.

В растительных клетках фотосинтетическая редокс-цепь локализована во внутривнутрихлоропластных мембранах, в основном в *тилакоидах* — замкнутых сплюснутых мембранных пузырьках, собранных в пачки (*граны*). Тилакоиды обнаружены также у многих цианобактерий.

3.3.1. Принцип действия

На рис. 27 показана светозависимая редокс-цепь в тилакоидной мембране хлоропластов. Она включает два типа реакционных центров (здесь они называются фотосистемами I и II), а также несколько ферментов, катализирующих темновые реакции окисления воды, Q-цикла и восстановления $\text{НАД}\Phi^+$.

Процесс начинается поглощением фотона хлорофиллом антенны. Возбуждение мигрирует от хлорофилла антенны к хлорофиллу одной из фотосистем. Если это *хлорофилл фотосистемы II* (максимум поглощения при 680 нм), он окисляется *феофитином*. От феофитина электроны переносятся на связанный *пластохинон* (PQ_A ; его формулу см. на рис. 13). Подобно Q_A в бактериальном фотосинтезе, этот хинон некоторым образом связан с негемовым железом.

Затем электрон достигает другой молекулы связанного пластохинона (PQ_B). Катион-радикал окисленного хлорофилла (Хл_{680}^+) принимает электрон от неидентифицированного донора Z , который, в свою очередь, восстанавливается электронами, отнятыми у молекулы H_2O посредством довольно сложной *марганец-содержащей системы расщепления воды* (СРВ). При расщеплении воды наряду с электронами образуются молекулярный кислород и про-

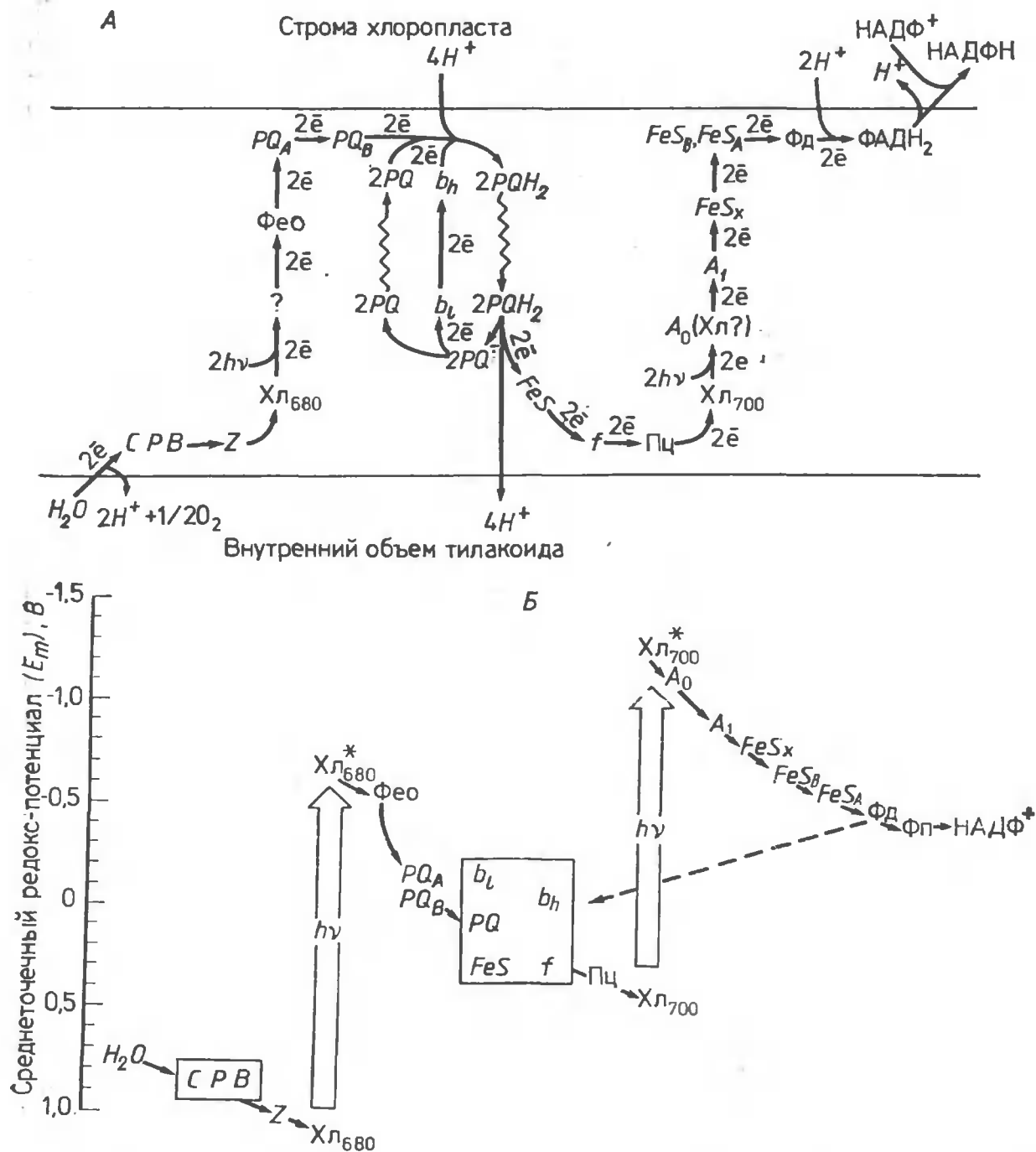


Рис. 27. Нециклическая светозависимая редокс-цепь хлоропластов (по R. E. Blankenship, R. C. Prince, 1985):

CPB — система расщепления воды, Z — неизвестный донор электронов фотосистемы II, $Xл_{680}$ — хлорофилл фотосистемы II. PQ_A и PQ_B — пластохиноны, связанные с фотосистемой II; PQ — свободный пластохинон; b_H и b_L — высоко- и низкпотенциальные гемы цитохрома b_6 ; f — цитохром f; $Xл_{700}$ — хлорофилл фотосистемы I; A_0 и A_1 — промежуточные акцепторы электронов фотосистемы I; FeS_x — первичный стабильный акцептор электронов фотосистемы I; FeS_A , FeS_B — два железосерных кластера, прочно связанные с фотосистемой I;

А: рисунок составлен с учетом вероятного расположения редокс-центров в мембране тилакоида.

Б: переносчики восстановительных эквивалентов расположены в соответствии с их редокс-потенциалами; пунктиром показан перенос электронов от ферредоксина к b_6f -комплексу, циклизующий фоторедокс-цепь

тоны. Последние высвобождаются в раствор внутри тилакоидов. Восстановленный PQ окисляется PQH_2 -пластоцианин-редуктазой, или комплексом b_6f (это хлоропластный аналог комплекса bc_1). Комплекс b_6f включает двугемовый цитохром b (гемы b_l и b_h), FeS и цитохром f , который функционально аналогичен цитохрому c_1 .

Считают, что комплекс b_6f катализирует Q -цикл, подобный тому, который описан у пурпурных бактерий и митохондрий. Если это действительно так, то перенос одного электрона с PQ на цитохром f оказывается сопряженным с транслокацией одного заряда через мембрану тилакоида, поглощением двух H^+ из стромы и высвобождением двух H^+ во внутритилакоидное пространство. Поглощение протонов происходит на внешней поверхности мембраны тилакоида, их выделение — на внутренней.

От цитохрома f электрон движется к медь-содержащему белку пластоцианину, который восстанавливает катион-радикал хлорофилла фотосистемы I (максимум поглощения при 700 нм). $Хл_{700}^+$ образуется при окислении возбужденного $Хл_{700}$. Электроны, отнятые от $Хл_{700}^*$, переносятся через неизвестные редокс-центры A_0 и A_1 на некоторый железосерный центр FeS_x , играющий роль первичного стабильного акцептора в фотосистеме I .

На следующем этапе электрон транспортируется на другие железосерные кластеры (FeS_B , FeS_A , ферредоксин) и далее на флавопротеин, содержащий ФАД в качестве простетической группы. От ФАД восстановительные эквиваленты поступают на НАДФ $^+$. Образованный в результате НАДФН окисляется водорастворимой системой ферментов, восстанавливающих CO_2 до сахара, $(-CHON-)_n$.

Согласно схеме, представленной на рис. 27, эффективность нециклической редокс-цепи хлоропластов и цианобактерий должна составлять $6H^+$ на $4h\nu$, что соответствует отношению H^+/e , равному 3 (имеется в виду отношение количества протонов, перенесенных через мембрану, к количеству электронов, прошедших весь путь от H_2O до CO_2). Таким образом, редокс-цепь тилакоидов содержит три $\Delta\mu H$ -генератора: фотосистему I , фотосистему II и комплекс b_6f .

3.3.2. Фотосистема I

Субъединичный состав. Фотосистема I из хлоропластов включает по крайней мере четыре различных полипептида с молекулярными массами 83,2; 82,5; 18 и 15 кДа. Опыты с антителами показали, что субъединица I значительно выступает из мембраны.

Расшифрованы первичные структуры крупных полипептидов фотосистемы I . Показана их гомология, достигающая 45%. Есть указания, что $Хл_{700}$ и промежуточные акцепторы электронов A_0 и A_1 связаны с двумя крупными субъединицами, а FeS_x , FeS_A и FeS_B — с мелкими гидрофобными субъединицами фотосистемы I .

Механизм переноса электронов. Первичным светоиндуцированным процессом, происходящим в фотосистеме I, служит сдвиг электронов от Хл^*_{700} (роль которого, по-видимому, играет димер хлорофилла *a*) к промежуточному акцептору A_0 . Есть основания полагать, что функцию A_0 выполняет другой хлорофилл *a*. Практически нет данных о природе следующего редокс-центра — A_1 . Возможно, его роль играет витамин K_1 . Считают, что окислительно-восстановительные потенциалы у A_0 и A_1 более отрицательны, чем у первичного стабильного акцептора FeS_x ($-0,73$ В).

FeS_x представляет собой кластер, содержащий четыре иона железа и четыре иона сульфида (см. рис. 16). Кроме этого компонента в фотосистеме I находят еще два $4\text{Fe}-4\text{S}$ кластера (FeS_A и FeS_B). Их редокс-потенциалы равны соответственно $-0,53$ и $-0,58$ В.

Вероятная последовательность реакций в этой части редокс-цепи следующая: $\text{FeS}_x \rightarrow \text{FeS}_B \rightarrow \text{FeS}_A$. Последний компонент служит, по-видимому, восстановителем ферредоксина — водорастворимого FeS -белка (11 кДа), который принимает участие в переносе электронов на флавопротеин, восстанавливающий НАДФ^+ (34 кДа).

Другой водорастворимый переносчик электронов играет роль восстановителя фотоокисленного Хл_{700} . Это медь-содержащий белок пластоцианин. В первичной структуре пластоцианина обнаружена гомология с субъединицей II цитохромоксидазы — конечного фермента дыхательной цепи, содержащего медь и железо (см. разд. 3.4.5).

Восстановителем пластоцианина является цитохром *f*, принадлежащий комплексу b_6f . Последний осуществляет перенос электронов от фотосистемы II к фотосистеме I.

Существует альтернативный способ функционирования фотосинтетической редокс-цепи в хлоропластах: циклический перенос электронов с участием фотосистемы I и комплекса b_6f , но без фотосистемы II. Такой механизм *in vitro* можно продемонстрировать, блокировав фотосистему II диуроном и добавив искусственный переносчик электронов ФМС. В некоторых условиях циклический перенос электронов можно наблюдать и *in vivo*. В этом случае восстановительные эквиваленты транспортируются от ферредоксина не к НАДФ^+ , а назад к Хл^+_{700} . В этом процессе принимают участие пластохинон и комплекс b_6f . Предполагают, что ферредоксин восстанавливает PQ , так что фотосистема II становится ненужной для регенерации Хл_{700} из Хл^+_{700} . Подобный механизм аналогичен циклической светозависимой редокс-цепи пурпурных бактерий, образующей $\Delta\mu\text{H}$ без фотолиза воды и восстановления НАДФ^+ .

Механизм генерации $\Delta\mu\text{H}$. Нет сомнений, что фотосистема I способна генерировать $\Delta\mu\text{H}$. Этот комплекс был встроен в про-

теолипосомы, которые на свету создавали ΔpH до 3 единиц. Чтобы включить циклический перенос электронов, в инкубационную среду добавили ФМС и аскорбат. Включение очищенной H^+ -АТФ-синтазы в те же протеолипосомы давало систему, катализирующую фотофосфорилирование.

Механизм генерации $\Delta \bar{\mu}H$ фотосистемой I, по всей вероятности, подобен таковому в бактериальных реакционных центрах. Наносекундная вспышка лазера вызывает генерацию $\Delta \psi$ с $\tau < 100$ нс, что много быстрее всех процессов, происходящих в фотосистеме I, кроме переноса электронов на этапе $Xl^*_{700} \rightarrow FeS_x$. Эта $\Delta \psi$ составляет большую часть электрогенного ответа, так что все прочие этапы переноса электронов в фотосистеме I могут внести лишь сравнительно малый вклад в трансформацию энергии на этом участке фотосинтетической редокс-цепи.

Такие соотношения вряд ли удивительны, если учесть хорошо известные факты, касающиеся локализации в мембране компонентов фотосистемы I. Показано, что пластоцианин, восстанавливающий фотосистему I, расположен на внутренней стороне мембраны тилакоида, а ферредоксин и ферредоксин-НАДФ⁺-редуктаза, окисляющие фотосистему I, обращены наружу. Поэтому транспорт восстановительных эквивалентов через фотосистему I должен быть направлен поперек мембраны.

3.3.3. Фотосистема II

Фотосистема II состоит из шести типов полипептидов с молекулярными массами 56; 52; 39,5; 39; 9,5 и 4,5 кДа. Недавно была определена последовательность аминокислот во всех этих субъединицах.

Xl_{680} , входящий в состав фотосистемы II, относится к группе хлорофиллов *a*. Возможно, что Xl_{680} является димером. Раньше считали, что он связан с тяжелыми субъединицами фотосистемы II. Однако это предположение было поколеблено после выяснения аминокислотных последовательностей. Оказалось, что субъединицы массой 39 и 39,5 кДа похожи на *M*- и *L*-субъединицы комплекса бактериальных реакционных центров. Подобно этим субъединицам, они несут центры связывания первичного и вторичного хинонов (в этом случае PQ_A и PQ_B). 39 кДа-субъединица специфически связывает гербициды.

Две наиболее легкие субъединицы (9,5 и 4,5 кДа) образуют цитохром типа *b* с максимумом α -пика при 559 нм (цитохром b_{559}). Каждая из субъединиц содержит по одному остатку гистидина, образующему координационную связь с гемом.

Отличительной чертой фотосистемы II является очень высокий редокс-потенциал основной формы пигмента, т. е. пары Xl_{680}/Xl_{680}^+ . Он равен +1,1 В. Вот почему Xl_{680}^+ может служить акцептором электронов для воды (редокс-потенциал пары H_2O/O_2

при нейтральном рН равен $+0,82$ В). В то же время редокс-потенциал возбужденного хлорофилла-680 находится в отрицательной области (менее $-0,6$ В). Промежуточным акцептором электронов между Хл^*_{680} и первичным стабильным акцептором служит феофитин (редокс-потенциал $-0,61$ В).

Первичный стабильный акцептор является хиноном (PQ_A), который некоторым образом связан с негемовым железом. Еще одна молекула связанного хинона (PQ_B) участвует в дальнейшем переносе электронов по фотосинтетической редокс-цепи. Как и у пурпурных бактерий, этот этап блокируется *о*-фенантролином.

Нет ясности в вопросе о том, что за компонент служит первичным донором электронов для Хл^+_{680} . Это гипотетическое соединение восстанавливает Хл^+_{680} за времена порядка 50—500 нс.

В качестве восстановителя Z используется специальная система расщепления воды (СРВ). Она действует таким образом, что расщепление двух молекул H_2O приводит к восстановлению четырех Хл^+_{680} через компонент Z и образованию одной молекулы O_2 и четырех ионов H^+ . Четыре интермедиата были постулированы в этом четырехквантовом процессе. Их природа во многом остается неизвестной.

СРВ включает полипептиды с массами 34, 23 и 16 кДа и еще один белок, содержащий четыре иона Mn^{2+} . Последние принимают участие в переносе электронов СРВ.

Роль цитохрома b_{559} , обнаруженного в фотосистеме II, также остается загадкой. Существует предположение, что он участвует в особом циклическом переносе электронов в области фотосистемы II.

Механизм генерации $\Delta\mu\text{H}$ фотосистемой II может, по-видимому, быть описан по аналогии с более изученным комплексом бактериальных центров и фотосистемой I.

Вероятно также, что и в этом случае происходит трансмембранный светозависимый перенос электронов (от Хл^*_{680} к PQ_A , расположенному по другую сторону гидрофобного барьера, как это показано на рис. 27, А).

3.3.4. PQH_2 -Пластоцианин-редуктаза

Система реакций Q -цикла катализируется в хлоропластах PQH_2 -пластоцианин-редуктазой (комплексом b_6f). Комплекс содержит по крайней мере четыре полипептида. Три из них снабжены редокс-центрами. Это цитохром f (32 кДа), дугемовый цитохром b_6 (23 кДа) и FeS -белок (20 кДа). Четвертая субъединица (17 кДа) прямо не участвует в переносе электронов. Субъединичный состав комплекса b_6f , а также фотосистем I и II приведен в табл. 3.

Оба гема в цитохроме b_6 характеризуются спектральным α -максимумом при 563 нм. Они отличаются по редокс-потенциа-

Таблица 3. Полипептидный состав фотосистем I, II и комплекса b_6f (по Д. Мерфи, 1986)

Комплекс	Название, функция	Субъединицы (молекулярные массы), кДа
Фотосистема I	A_1 и A_2 , связывание пигментов	{ 83
	FeS_x	{ 82,5
	FeS_A	{ 18 ¹
	FeS_B	{ 15 ¹
Фотосистема II	?	56
	?	52
	Связывание пигментов, $PQ_A PQ_B$	{ 39,5
		{ 39
b_6f	Цитохром b_{559}	{ 9,5
	Цитохром f	{ 4,5
	Цитохром b_6	32
	FeS_{III}	23
	Белок, связывающий цитохром b_6	20 ¹
		17

¹ Молекулярные массы рассчитаны не по данным аминокислотных последовательностей, а по электрофорезу в додецилсульфате натрия, что может приводить к ошибке до 20%.

лам. Гемы b_l и b_h имеют среднеточечные потенциалы (E_m) соответственно 150 и —30 мВ.

Сравнение аминокислотной последовательности цитохрома b_6 из хлоропластов шпината с таковыми цитохромов b из митохондрий животных, растений и грибов выявило сходство в первых (считая от N-конца) 200 остатках. В то же время существует и явное различие, состоящее в том, что цитохром b_6 существенно короче (211 остатков), чем митохондриальные цитохромы b (330—385 остатков). При этом обнаруживается гомология между 17 кДа-субъединицей комплекса b_6f и остатками 260—353 митохондриального цитохрома b . Поэтому можно полагать, что некая функция, присущая С-концевой части митохондриального цитохрома b , в хлоропластах выполняется 17 кДа-субъединицей.

Цитохром b_6 содержит пять остатков гистидина, четыре из которых участвуют в координировании гемов b_l и b_h . Эти остатки в положениях 82, 96, 283 и 198 (в митохондриях —197) полностью консервативны, т. е. встречаются как в цитохроме b_6 , так и во всех цитохромах b митохондрий из разных царств живых организмов. Эти остатки гистидина всегда локализованы в гидрофобных сегментах полипептидной цепи. Именно им приписывают участие в связывании гемов b_l и b_h .

Анализ распределения гидрофобных и гидрофильных аминокислот вдоль полипептидной цепи цитохрома b_6 выявил наличие

пяти гидрофобных участков, связанных четырьмя гидрофильными отрезками. Была предложена модель трехмерной структуры цитохрома b_6 , согласно которой его полипептид образует пять α -спиральных колонн, пересекающих мембрану.

В этой модели четыре инвариантных остатка гистидина локализованы во второй и пятой колоннах, считая от N-конца. Они занимают такое положение, что два гема оказываются в гидрофобной части мембраны, будучи ориентированы перпендикулярно ее поверхности.

Каждый гем b содержит два отрицательно заряженных остатка пропионата. В рассматриваемой модели эти группы находятся против консервативных остатков аргинина, заряженных положительно (рис. 28).

Расстояние между краями гемов, согласно модели, равно 1,2 нм, а между атомами железа — 2,0 нм. Следовательно, электрон, чтобы переместиться с гема b_i на гем b_h , должен пересечь около половины гидрофобного барьера мембраны.

Партнером цитохрома b_6 в реакции окисления PQH_2 служит железосерный белок комплекса b_6f , который функционально аналогичен компоненту FeS_{III} дыхательной цепи. Он еще мало изучен; следующий переносчик электронов — цитохром f — изучен очень хорошо.

Последовательность из 285 аминокислот, образующих цитохром f , содержит фрагмент $Cys-X-Y-Cys-His$, характерный для места ковалентного связывания гема в цитохромах типа c . Он расположен в области 21—25 от N-конца. $His-25$ и $Lys-145$ или $Lys-222$ служат лигандами железа, входящего в гем. Гем локализован в большом N-концевом домене (остатки 1—250), экспонированном в водное пространство внутри тилакоида. Остатки 251—270 имеют выраженный гидрофобный характер и, по-видимому, образуют α -спиральную колонну, которая, пересекая мембрану, могла бы играть роль «якоря». Остальные 15 аминокислот от C-конца локализованы на внешней поверхности тилакоидной мембраны и могут быть удалены протеазами. Участок 190—249 богат кислыми аминокислотами, обращенными внутрь тилакоида. Они участвуют, как полагают, во взаимодействии с кластером основных аминокислот цитохрома b_6 . Десять консервативных основных аминокислот на отрезке 58—154, вероятно, участвуют в связывании следующего переносчика электронов — пластоцианина.

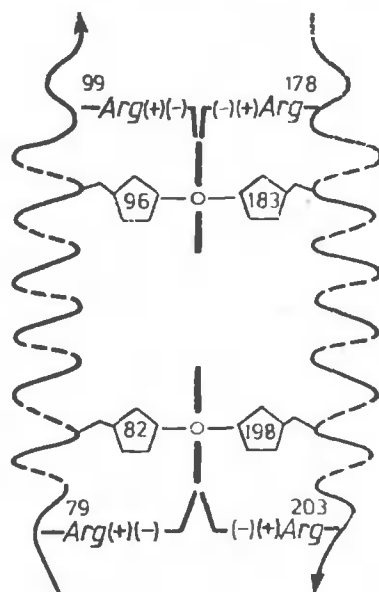


Рис. 28. Гипотетическое трансмембранное расположение двух гемов (выделены жирными линиями) цитохрома b_6 (по W. A. Cramer et al., 1985):

верхний и нижний гемы — соответственно b_i и b_h , показана возможная стабилизация отрицательно заряженных (—) пропионатных групп гемов наиболее консервативными аргининовыми остатками (+)

Спектр цитохрома f имеет α -максимум при 555 нм. Редокс-потенциал этого цитохрома равен +365 мВ.

Средний диаметр комплекса b_6f составляет величину порядка 8,5 нм. Комплекс склонен к димеризации. *Полагают, что в природной мембране комплекс существует в виде димера.*

Следует отметить, что PQH_2 -пластоцианин-редуктаза — медленное и наиболее уязвимое звено фотосинтетической редокс-цепи. Вход в Q-цикл от фотосистемы II блокируется мощным гербицидом дихлорфенилдиметилтиомочевинной (диуроном). Определенные этапы Q-цикла чувствительны к дибромтимохинону и N-оксиду 2-гептил-4-оксихинолина. Последние два яда тормозят Q-цикл также в митохондриях и бактериях.

Ингибиторный анализ редокс-цепи тилакоидов осложняется существованием путей переноса электронов, альтернативных главной нециклической цепи (см. рис. 27). Наряду с циклическим переносом электронов вокруг фотосистемы I, а также, возможно, и фотосистемы II следует упомянуть возможность того, что две фотосистемы могут быть связаны друг с другом и без участия Q-цикла. Для этого достаточно предположить, что в некоторых условиях оба электрона, поступающие на PQ, поставляются фотосистемой II и оба электрона, снимаемые с PQH_2 акцептируются фотосистемой I. Такое предположение не кажется невозможным, если учесть, что $Хл^{*}_{680}$ — сильный восстановитель, а $Хл^{+}_{700}$ — мощный окислитель.

3.3.5. Судьба $\Delta\bar{\mu}H$, образованной фотосинтетической редокс-цепью хлоропластов

Тилакоиды хлоропластов выполняют лишь две функции: восстановление $НАДФ^{+}$ и синтез АТФ, опосредованный образованием и использованием $\Delta\bar{\mu}H$. Поэтому можно думать, что энергия $\Delta\bar{\mu}H$ количественно превращается в энергию АТФ посредством H^{+} -АТФ-синтазы.

Для тилакоидов нет необходимости совершать осмотическую работу по транспорту метаболитов, поскольку внутритилакоидное водное пространство является по существу «энзиматически пустым». Единственный значительный процесс, происходящий на внутренней поверхности тилакоидной мембраны, — фотолиз воды с образованием молекулярного кислорода. Мембрана не может быть барьером ни для субстрата этой реакции (H_2O), ни для ее продукта (O_2). Что касается превращения АДФ и Φ_H в АТФ и $НАДФ^{+}$ в $НАДФH$, то оба эти процесса локализованы на внешней поверхности тилакоида.

Обратный перенос электронов против градиента редокс-потенциала в тилакоидах отсутствует, поскольку проблему генерации «восстановительной силы» они решают, образуя $НАДФH$ нециклической цепью. В хлоропластах нет таких потребителей $\Delta\bar{\mu}H$,

как H^+ -моторы, вращающие флагеллы бактерий (о возможном исключении из этого правила см. разд. 5.3.4).

Коль скоро в тилакоидах есть только одна $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимая функция, отпадает необходимость стабилизировать $\Delta\bar{\mu}H$ в той степени, как это обычно происходит у бактерий. Тем не менее тилакоиды располагают возможностью стабилизировать до известной степени уровень $\Delta\bar{\mu}H$. Дело в том, что их мембрана прони-

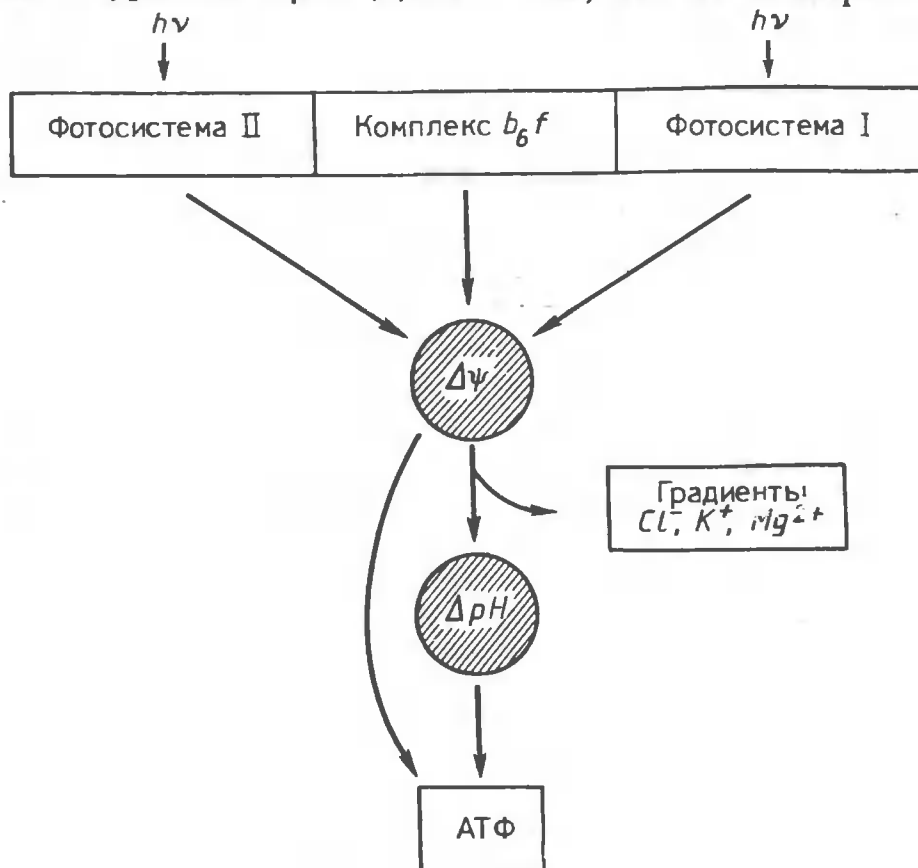


Рис. 29. Превращение энергии в мембранах тилакоидов

цаема для ионов Cl^- , K^+ и Mg^{2+} . Транспорт этих ионов по электрическому градиенту, образуемому $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторами, приводит к превращению $\Delta\psi$ в ΔpH . Поскольку в форме ΔpH можно запастись намного больше энергии, чем в $\Delta\psi$ (см. разд. 6.3.1), переход $\Delta\psi \rightarrow \Delta pH$ повышает общее количество «мембранной» энергии в системе. Такой эффект может стабилизировать скорость синтеза АТФ хлоропластами в условиях колебаний освещенности, часто происходящих в природных условиях. Общий план энергетики тилакоида представлен на рис. 29.

Последний существенный момент, который следует отметить при рассмотрении энергетики хлоропластов, состоит в том, что H^+ -АТФ-синтаза может отсутствовать в тех областях, где мембраны двух соседних тилакоидов тесно прилегают друг к другу. Такой эффект возникает при условии, что тилакоиды находятся в ненабухшем состоянии, т. е. имеют дисковидную форму. В этом слу-

чае между тилакоидами остается лишь очень узкая щель. Показано, что в данном состоянии молекулы H^+ -АТФ-синтазы сконцентрированы на самых краях диска, обращенных в сторону хлоропласта, и (главным образом) в мембранах ламелл, далеко выступающих из гран в строму. Ламеллы представляют собой, в сущности, продолжение некоторых из тилакоидов. Ламеллы содержат фотосистему I, в то время как в тилакоидах есть обе фотосистемы. Создается впечатление, что ламеллы специализированы на синтезе АТФ, сопряженном с циклическим переносом электронов вокруг фотосистемы I, и не способны к фотолизу воды и восстановлению НАДФ⁺ (эти два процесса протекают в тилакоидах). Чтобы образовать АТФ, генерируемая тилакоидом $\Delta\mu H$ должна быть передана вдоль мембраны в ламеллу, где локализована большая часть молекул H^+ -АТФ-синтазы.

Если тилакоиды находятся в набухом состоянии, то молекулы H^+ -АТФ-синтазы диффундируют из ламелл в тилакоиды и равномерно распределяются по всей системе внутрехлоропластных мембран. Более детальное обсуждение этой проблемы и соответствующие ссылки будут даны в разд. 6.2.2.

Все эти данные могут быть отнесены и к тилакоидам цианобактерий, представляющих собой эволюционные предшественники хлоропластов. В этом случае необходимо лишь дополнить схему на рис. 29 дыхательной цепью, которая у цианобактерий находится в той же тилакоидной мембране, что и фотосинтетическая редокс-цепь. (У растений дыхательная цепь вынесена в митохондрии.) Взаимодействие дыхательной и фотосинтетической цепей, обслуживаемых на средних своих участках одними и теми же компонентами Q-цикла, будет рассмотрено в разд. 3.4.4.

3.4. Дыхательная цепь

Термин «дыхательная цепь» используют для определения последовательности реакций, ответственных за перенос атомов водорода или электронов от субстратов к молекулярному кислороду.

Различают *два типа дыхательных цепей: сопряженные с трансформацией энергии и не сопряженные с ней*. Биологическое значение дыхания первого типа стало ясным благодаря работам В. А. Энгельгардта, открывшего в начале 30-х годов дыхательное фосфорилирование. Что касается дыхания второго типа, то первые указания на его активную роль были получены почти на 30 лет позже. Концепция, предполагающая, что несопряженное дыхание может быть биологически полезным, была сформулирована автором в 1960 г.

3.4.1. Принцип действия

В клетках эукариот дыхание, сопряженное с трансформацией энергии, локализовано во внутренней мембране митохондрий.

У дышащих бактерий тот же процесс обнаруживается в цитоплазматической мембране, мезосомах или тилакоидах.

НАДН-Оксидазная система, катализирующая окисление НАДН кислородом, представляет собой главный механизм сопряженной дыхательной цепи. Эта система, показанная на рис. 30, включает три ферментных комплекса: НАДН-КоQ-редуктазу (комплекс I), КоQH₂-цитохром c-редуктазу (комплекс bc₁, или комплекс III) и цитохромоксидазу (комплекс IV).

Еще один комплекс: сукцинат-КоQ-редуктаза (синонимы сукцинатдегидрогеназа, или комплекс II) переносит водород от сукцината на КоQ без участия НАД⁺. Эта изоэнергетическая реакция, не связанная с преобразованием энергии, не будет рассматриваться в данном контексте.

Как показано на рис. 30, последовательность реакций дыхательной цепи начинается окислением НАДН. В процессе участвует несколько редокс-центров НАДН-КоQ-редуктазного комплекса: ФМН и, по-видимому, пять FeS-кластеров, обозначаемых FeS_{Ia}, FeS_{Ib}, FeS_{I2}, FeS_{I3} и FeS_{I4}. НАДН-КоQ-редуктаза восстанавливает КоQ. Полученный КоQH₂ окисляется системой Q-цикла, включающей FeS-кластер комплекса III (FeS_{III}) и два гема цитохрома b (высокопотенциальный b_h и низкопотенциальный b_l). Непосредственным акцептором электронов для КоQH₂ служит FeS_{III}. От FeS_{III} электроны поступают на цитохром c₁ и далее на цитохром c. Последний используется как восстановитель конечного фермента дыхательной цепи — цитохромоксидазы, имеющей в своем составе два гема (a и a₃) и два атома Cu. Цитохромоксидаза восстанавливает кислород до воды.

Процесс окисления НАДН кислородом может быть сопряжен с переносом 10 ионов H⁺ из митохондриального матрикса (у бактерий — из цитоплазмы) в межмембранное пространство митохондрии (у бактерий — в периплазму). Каждый из комплексов I, III и IV сам по себе способен транслоцировать ионы H⁺ через мембрану и потому может быть отнесен к ферментам — ΔμH-генераторам.

3.4.2. Источники восстановительных эквивалентов

Восстановительные эквиваленты могут поступать в дыхательную цепь на различных ее уровнях в зависимости от редокс-потенциала окисляемого субстрата. Если этот потенциал оказывается меньше, равен или лишь немногим больше —0,3 В (редокс-потенциал пары НАДН/НАД⁺), то в окислении такого субстрата может участвовать вся дыхательная цепь.

Именно так окисляется большинство субстратов дыхания. Часто НАД⁺ служит непосредственным окислителем субстрата. Примерами могут быть две (из четырех) реакции дегидрогенизации в цикле Кребса (окисление изоцитрата и малата); вторая реакция дегидрогенизации в системе β-окисления жирных кислот (окисле-

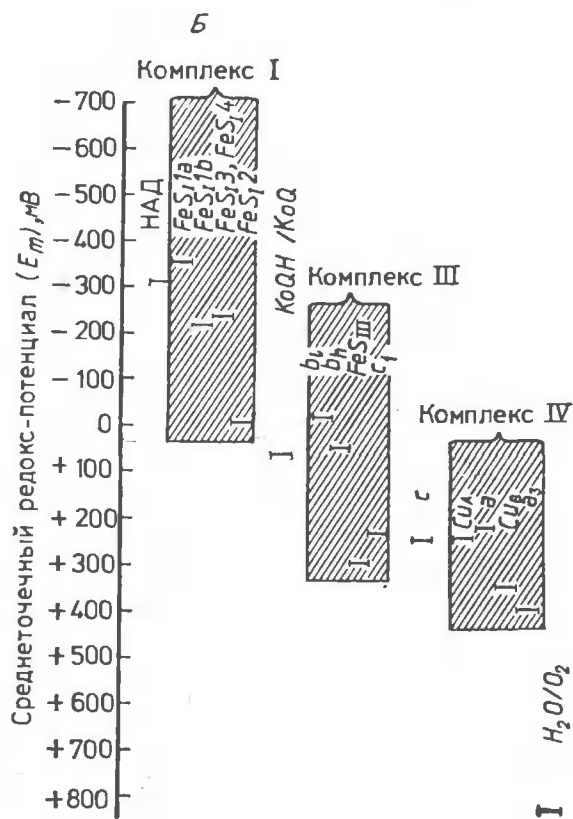
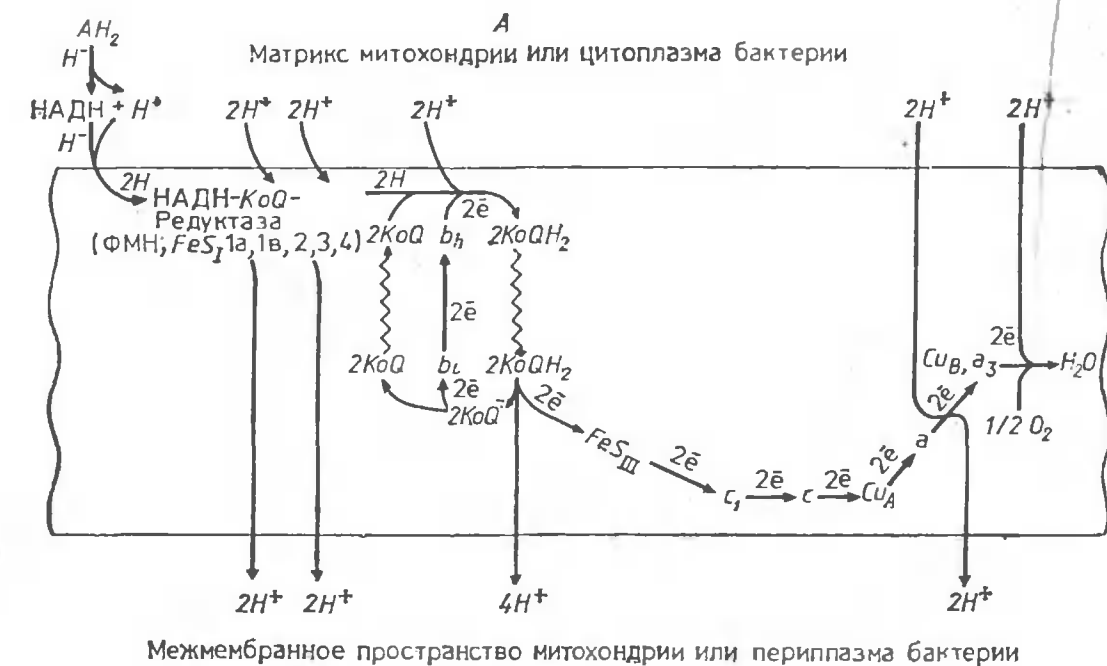


Рис. 30. Митохондриальная дыхательная цепь. **А** и **Б** — соответственно возможная локализация в мембране и редокс-потенциалы компонентов дыхательной цепи:

AN_2 — дыхательный субстрат; FeS_I 1a, 1b, 2, 3, 4 — соответствующие FeS-центры НАДН-КоQ-редуктазы; b_H и b_L — соответственно высоко- и низкопотенциальные гемы цитохрома b; FeS_{III} — FeS-центр комплекса bc_1 ; c_I , c , a , a_3 — цитохромы

ние 3-оксиацил-КоА); гликолитическая оксидоредукция (окисление 3-фосфоглицеринового альдегида), а также окисление лактата, β -оксибутирата и некоторых других субстратов.

В редких случаях НАДФ⁺, а не НАД⁺ служит окислителем субстрата. Образующийся НАДФН может затем восстановить НАД⁺ посредством трансгидрогеназной реакции. Однако этого не происходит в энергизованной мембране, так как фермент трансгидрогеназа является потребителем $\Delta\mu\text{H}$, действующим в направлении НАДН \rightarrow НАДФ⁺ (см. разд. 5.1.3). По этой причине НАДФН обычно не подключается к дыхательной цепи, а используется в реакциях восстановительных биосинтезов.

Если редокс-потенциал субстратов окисления намного отрицательней такового пары НАДН/НАД⁺, то *специальный механизм накопления энергии может быть включен в систему переноса водорода еще до дыхательной цепи*. Известны два важных примера такого рода механизма. Это дегидрогеназы кетокислот: α -кетоглутаровой и пировиноградной. В процессе α -кетоглутаратдегидрогеназной реакции энергия, высвобождающаяся при переносе водорода с α -кетоглутарата (редокс-потенциал $-0,67\text{ В}$) на НАД⁺, используется, чтобы образовать ГТФ из ГДФ и фосфата. Аналогичная реакция в случае пирувата (редокс-потенциал $-0,7\text{ В}$) также сопряжена с восстановлением НАД⁺, но высвобождающаяся энергия используется для ацетилирования КоА посредством ацетильной группы, образующейся из пирувата.

Такого типа реакции относят к разряду процессов *трансформации энергии на уровне субстрата* (субстратное фосфорилирование в случае α -кетоглутарата и ацетилирование в случае пирувата). Гликолитическая оксидоредукция — еще один пример субстратного фосфорилирования.

Во всех этих случаях механизм трансформации энергии *значительно отличается от такового в фотосинтезе и дыхании*. Для его осуществления не требуются мембраны; он может быть продемонстрирован в водном растворе соответствующих субстратов, ферментов и кофакторов. Окислительный процесс приводит к синтезу высокоэнергетических соединений, образованных продуктом окисления субстрата и функциональной группой фермента или кофермента.

Если редокс-потенциал субстрата значительно ниже, чем у НАД, восстановительные эквиваленты переносятся на средний или конечный участок дыхательной цепи. Так окисляются один из субстратов цикла Кребса сукцинат (редокс-потенциал $+0,03\text{ В}$), а также ацил-КоА — субстрат первой оксидоредукции в системе β -окисления жирных кислот. И сукцинат-, и ацил-КоА-дегидрогеназы питают электронами дыхательную цепь на уровне комплекса bc_1 .

В очень редких случаях редокс-потенциал окисляемого субстрата более положителен, чем у КоQ. Тогда восстановительные

эквиваленты входят в цепь на уровне цитохрома c , так что только цитохромоксидазный $\Delta\bar{\mu}H$ -генератор участвует в трансформации энергии. Примером такого рода может служить окисление аскорбиновой кислоты. Ниже приведены окислительно-восстановительные потенциалы некоторых компонентов, имеющих отношение к дыхательной цепи (потенциалы полувосстановления (E_0') измерены при рН 7,0 во всех случаях, кроме цитохрома b_2 и KoQ , где рН=7,4).

Редокс-пара	E_0', B
$OH\cdot + H^+ / H_2O$	1,35
$1/2 O_2 / H_2O$	0,82
Fe^{3+} / Fe^{2+}	0,77
Феррицианид/ферроцианид	0,43
NO_3^- / NO_2^-	0,42
Цитохром c_0 /цитохром c_b	0,25
Метгемоглобин/гемоглобин	0,17
$KoQ / KoQH_2$	0,05
Дегидроаскорбат/аскорбат	0,08
Фумарат/сукцинат	0,03
Метиленовая синь (MC_o / MC_b)	0,01
α -Кетоглутарат + NH_4^+ /глутамат	-0,14
Оксалоацетат/малат	-0,17
Пируват/лактат	-0,19
Глутатион $_o$ /глутатион $_b$	-0,23
Ацетоацетат/ β -оксибутират	-0,27
1,3-Дифосфоглицерат/(Глицеральдегид-3-фосфат + Φ_n)	-0,29
Липоат/дигидролипоат	-0,29
$НАД^+ / (НАДН + H^+)$	-0,32
$НАДФ^+ / (НАДФН + H^+)$	-0,32
(Пируват + CO_2)/малат	-0,33
$H^+ / 1/2 H_2$	-0,42
O_2 / O_2^-	-0,45
α -Кетоглутарат/(сукцинат + CO_2)	-0,67
Пируват/(ацетат + CO_2)	-0,70

3.4.3. НАДН-КоQ-Редуктаза

Белковый состав и редокс-центры. Проблема белкового состава НАДН-КоQ-редуктазы (комплекса I) до сих пор не решена. В комплексе насчитывают до 26 полипептидов, так что его общая масса оказывается порядка 700—900 кДа. Однако комплекс удастся разделить на фрагменты, которые содержат несколько меньше полипептидов, но включают все редокс-группы: ФМН и около 20 атомов негемового железа (железосерные кластеры комплекса I, обозначаемые FeS_I).

Считают, что большинство редокс-центров связано с двумя фрагментами комплекса: флавопротеином (Фп), или НАДН-дегидрогеназой, и железобелком (IP). Первый содержит ФМН и некоторые из FeS -кластеров, в то время как в состав второго входят только FeS -кластеры.

Фрагмент Фп состоит из трех полипептидов в соотношении 1:1:1 (массы 51, 24 и 10 кДа). Он катализирует окисление НАДН некоторыми искусственными акцепторами электронов, но не природным акцептором КоQ. Тяжелая субъединица связывает НАДН. Она содержит ФМН и четыре атома железа. Перенос водорода от НАДН к ФМН специфически тормозится реином (4,4-диоксиантрахинон-2-карбоксилатом).

Средняя субъединица, видимо, содержит FeS-кластер с двумя атомами железа. Еще два FeS-кластера, связанные с большой субъединицей Фп, обозначают FeS_{1a} и FeS_{1b}. Их редокс-потенциалы составляют соответственно —0,37 и —0,22 В.

В мембране Фп недоступен для гидрофильных модификаторов белка. Следовательно, он должен быть прикрыт другими белковыми субъединицами или фосфолипидами.

Первичная структура средней субъединицы не имеет достаточно протяженных гидрофобных последовательностей, чтобы пересекать мембрану.

Фрагмент IP содержит 6 полипептидов (75, 49, 30, 18, 15 и 13 кДа) и 12 атомов Fe. Существуют данные, что все FeS-кластеры IP содержат по 4 атома железа, т. е. всего число этих кластеров равно трем. Считают, что два из них ассоциированы с 75- и 49 кДа-полипептидами, а третий — с эквимольным комплексом субъединиц 30 и 13 кДа. Редокс-потенциалы всех FeS-кластеров в IP похожи (около —0,24 В). Один из кластеров (FeS₁₃) локализован вблизи ФМН.

75 кДа-субъединицу фрагмента IP удастся пометить светоактивируемым производным НАД⁺. Следовательно, она расположена вблизи тяжелой субъединицы фрагмента Фп. Отдельные участки 75 и 49 кДа-субъединиц обращены в водную фазу. Оба полипептида пересекают мембрану.

Как Фп, так и IP можно перевести в раствор хаотропными агентами. На долю Фп и IP приходится 30% от общего белка комплекса I. Остаток не удастся солюбизировать. Он содержит FeS-кластер с редокс-потенциалом около —0,02 В (FeS₁₂), который предположительно играет роль восстановителя КоQ. Полагают, что между FeS₁₂ и КоQ локализован участок торможения комплекса ротеноном, пирицидином, барбитуратами и некоторыми аналогами КоQ.

Согласно последним работам, выполненным на митохондриях человека и нейроспоры, в НАДН-КоQ-редуктазе содержится не менее шести типов полипептидов, которые кодируются митохондриальным геномом и, следовательно, синтезируются в митохондриях. Не менее одиннадцати других полипептидов кодируются в ядре и синтезируются в цитоплазме.

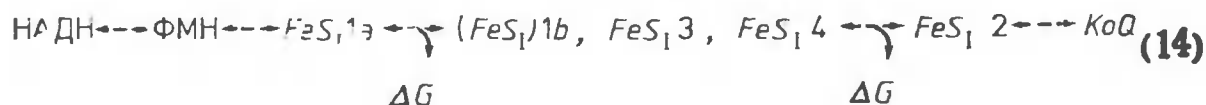
Генерация μ Н. Предположение, что НАДН-КоQ-редуктаза способна генерировать $\Delta\mu$ Н, было высказано П. Митчелом, исходя из наличия синтеза АТФ в этом месте дыхательной цепи. В част-

ности, Дж. Шацем и Э. Ракером было найдено фосфорилирование, сопряженное с окислением НАДН посредством CoQ в субмитохондриальных пузырьках. Группой авторов было установлено, что окисление НАДН фумаратом генерирует $\Delta\phi$ на мембране субмитохондриальных пузырьков.

В НАДН- CoQ -редуктазных протеолипосомах был выявлен транспорт протонов, сопряженный с окислением НАДН. Если протеолипосомы содержали еще и H^+ -АТФ-синтазу, то окисление НАДН сопровождалось синтезом АТФ.

Было описано также образование ΔpH на участке между НАДН и CoQ (стехиометрия H^+/\bar{e} около 2).

Приняв во внимание редокс-потенциалы переносчиков электронов и водорода, входящих в состав НАДН- CoQ -редуктазы, можно было бы расположить эти переносчики в виде такой линейной последовательности:



Первые два этапа этой последовательности реакций, а также последний из них происходят без существенного изменения свободной энергии, так как редокс-потенциалы восстановителей и окислителей близки. Что касается двух других этапов, редокс-потенциал для восстановителя оказывается на 0,15—0,22 В более отрицательным, чем таковой для окислителя. Поэтому именно эти два этапа могут участвовать в трансформации энергии.

Система реакций в уравнении (14) предполагает наличие двух $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов на пути от НАДН к CoQ . Другая возможность состоит в том, что генератор только один, но он организован подобно Q -циклу, так что перенос одного \bar{e} сопряжен с транспортом двух H^+ через мембрану (схема F -цикла).

Сложность строения, присущая митохондриальной НАДН- CoQ -редуктазе, не есть неперемное свойство этого сегмента дыхательной цепи. Так, существует мнение, что НАДН- CoQ -редуктазный $\Delta\bar{\mu}H$ -генератор *E. coli* состоит из единственного полипептида, несущего ФАД вместо ФМН. Фермент устойчив к ротенону. В анаэробных или аэробных условиях, но при нехватке сульфата в среде роста механизм окисления НАДН утрачивает способность генерировать $\Delta\bar{\mu}H$.

В то же время НАДН- CoQ -редуктаза из *Paracoccus denitrificans* чувствительна к ротенону. Она содержит FeS -центры, напоминающие митохондриальные. В состав фермента входит несколько полипептидов, имеющих общие антигенные детерминанты с митохондриальным комплексом I. Существуют данные, что отношение H^+/\bar{e} для фермента из *P. denitrificans* ближе к 2, чем к 1.

Было бы заманчивым предположить, что НАДН-КоQ-редуктазный сегмент цепи может быть организован тремя различными способами: 1) свободное окисление без какой бы то ни было генерации $\Delta\mu\text{H}$ (анаэробные или выращенные при недостатке сульфата клетки *E. coli*); 2) сопряженное окисление с $\text{H}^+/\bar{e}=1$ и линейной последовательностью реакций (аэробные клетки *E. coli* без дефицита сульфата) и 3) сопряженное окисление с $\text{H}^+/\bar{e}=2$, описываемое схемой флавинового цикла (митохондрии и *P. denitrificans*). В рамках такой концепции более сложное устройство НАДН-КоQ-редуктазы митохондрий и *P. denitrificans* необходимо для повышения ее эффективности.

3.4.4. КоQH₂-Цитохром с-редуктаза

НАДН-КоQ-Редуктаза служит восстановителем КоQ, который, в свою очередь, передает электроны на следующий сегмент дыхательной цепи, называемый КоQH₂-цитохром с-редуктазой (комплекс *bc*₁, или комплекс III).

Очищенный комплекс *bc*₁ был реконструирован с фосфолипидами. Полученные протеолипосомы генерировали $\Delta\mu\text{H}$ при переносе электронов от некоторых аналогов убигидрохинона на цитохром с. Если в те же протеолипосомы была включена H^+ -АТФ-синтаза, то наблюдался сопряженный синтез АТФ. Эти факты и целый ряд наблюдений, сделанных при изучении митохондрий и их фрагментов, показывают, что КоQH₂-цитохром с-редуктаза функционирует в качестве $\Delta\mu\text{H}$ -генератора.

Структурные аспекты. Комплекс III содержит четыре редокс-центра: гемы *b*_l и *b*_h, связанные с цитохромом *b*; негемовый железосерный кластер (FeS_{III}), включенный в соответствующий апопротеин; и гем *c*, присоединенный к апопротеину цитохрома *c*₁.

Полипептидный состав комплекса из митохондрий сердца быка приведен в табл. 4. Сравнение со следующим дыхательным комплексом — цитохромоксидазой — показало, что комплексы не содержат ни одной общей субъединицы.

Наряду с переносчиками восстановительных эквивалентов в состав КоQH₂-цитохром с-редуктазы входит, видимо, восемь полипептидов, лишенных простетических групп. Один из них (субъединица VI) связывает КоQ. Она состоит из 110 аминокислотных остатков и содержит большое количество (около 50%) α -спиральных участков.

Существуют данные, что субъединицы VIII и X образуют субкомплекс с цитохромом *c*₁. Одна из них облегчает связывание цитохрома *c*₁ с цитохромом *c*. В этой субъединице 27% всех аминокислотных остатков составляют глутамат и глутамин, причем вблизи N-конца расположен кластер из восьми следующих друг за другом остатков глутамата. Можно предположить, что именно этот отрицательно заряженный участок белка взаимодействует с

цитохромом *c*, который содержит много положительно заряженных аминокислотных остатков.

Таблица 4. Субъединицы комплекса bc_1 из митохондрий сердца быка

Субъ- единица	Молеку- лярная масса, кДа	Название	Функция
I	49,5	Сердцевинный белок I	Неизвестна
II	47,0	Сердцевинный белок II	»
III	44,0	Цитохром <i>b</i>	Редокс
IV	28,0	Цитохром c_1	»
V	21,5	FeS _{III} -белок	»
VI	13,5	Q _{III} -белок	Связывание KoQ
VII	9,5	—	Неизвестна
VIII	9,0	—	Связывание цитохрома c_1 ?
IX	8,0	—	Связывание субъединицы VI?
X	7,0	—	Связывание цитохрома c_1 ?
XI	6,5	—	Связывание FeS _{III} -белка

Самая мелкая субъединица (XI) участвует в связывании FeS_{III}-белка. Что касается других полипептидов, не имеющих редокс-центров, их функции остаются неясными. Известно лишь, что удаление крупных субъединиц I и II, названных *сердцевинными белками*, приводит к потере ферментативной активности, а последующая их добавка возвращает ее.

Рассмотрим более подробно белки, снабженные редокс-группами. Цитохром *b* — белок массой около 45 кДа — единственный полипептид комплекса bc_1 , кодируемый митохондриальной ДНК. Он содержит два гема: b_h и b_l .

Установлено, что плоскости гемов *b* ориентированы перпендикулярно поверхности мембраны. Судя по чередованию гидрофобных и гидрофильных последовательностей в белке, цитохром *b* может девять раз пересекать мембрану. В рамках этой модели наиболее вероятно, что оба гема локализованы между второй и пятой α -спиральными колоннами. Здесь каждый гем связан с белком по крайней мере тремя связями. Две из них образуются имидазольными группами остатков гистидина белка и железом гема, а третья — положительно заряженной группой остатков аргинина или лизина белка и отрицательно заряженной пропионатной группой гема. (Схема расположения гемов *b* приведена на рис. 28, описывающем хлоропластный цитохром b_6 , гомологичный митохондриальному цитохрому *b*.) Все перечисленные аминокислотные остатки инвариантны у шести исследованных цитохромов *b*. По данным спектроскопии цитохромов *b* и модельных соединений, именно остатки гистидина служат аксиальными лигандами гема.

Расстояние между центрами гемов в рассматриваемой модели оценивается в 2 нм, что согласуется с данными биоэнергетических опытов. Однако следует иметь в виду, что цитохром *b* еще

недостаточно исследован, чтобы принять рассматриваемую схему как экспериментально доказанную.

FeS_{III}-Белок (синонимы: фактор Слейтера; фактор, чувствительный к британскому антильюизиту (БАЛ); фактор окисления; белок Риске) содержит один FeS-кластер с двумя атомами железа. Полипептид FeS_{III} массой 21,5 кДа состоит из 199 аминокислот. Он имеет сравнительно небольшую N-концевую гидрофильную часть (29 остатков), гидрофобную часть из 25 остатков (α -спиральная колонна), за которой следует довольно гидрофильный домен (145 аминокислот).

FeS_{III}-кластер образован двумя ионами железа, двумя ионами сульфида (S^{2-}) и четырьмя остатками цистеина.

Цитохром c_1 представляет собой полипептид, состоящий из 241 аминокислоты. Цитохром c_1 содержит один гем типа c , ковалентно связанный с остатками цистеина в положениях 37 и 40. Вместе с некоторыми другими субъединицами комплекса III цитохром c_1 образует место связывания цитохрома c . Последний, как было показано, связывается с комплексом bc_1 тем же участком, который затем взаимодействует с цитохромоксидазой. По-видимому, цитохром c , приняв электрон от цитохрома c_1 , покидает свое место на комплексе bc_1 или по крайней мере «поворачивается к нему спиной», чтобы «стать лицом» к цитохромоксидазе.

Твердо установлено, что место связывания цитохрома c_1 с цитохромом c локализовано на внешней поверхности внутренней митохондриальной мембраны (у бактерий — цитоплазматической мембраны). Белок «заякорен» в мембране единственным гидрофобным сегментом, локализованным вблизи С-конца. Этот сегмент может быть отщеплен протеазой.

Расстояние гема от поверхности глобулы изолированного цитохрома c_1 оценивается в 1,0 нм. То же расстояние для FeS-кластера в FeS_{III}-белке равно 1,9 нм.

Получена определенная информация о расположении в мембране комплекса bc_1 как целого. Так, К. Леонард и др. (1981) использовали электронно-микроскопический подход, ранее разработанный Р. Хендерсоном и П. Ануином применительно к бактериородопсину (см. разд. 3.5.2). Было обнаружено, что комплексы bc_1 образуют димеры, общий вид которых показан на рис. 31.

Каждый мономер длиной 15 нм ориентирован перпендикулярно плоскости мембраны, причем большая его часть (7 нм) выступает из мембраны в матрикс, а меньшая (3 нм) — в межмембранное пространство. Средняя часть (5 нм) погружена в толщу мембраны. Именно в этой области контактируют между собой два мономера, образующие димер.

Существует наблюдение, свидетельствующее о том, что комплекс bc_1 может быть устроен существенно проще. У *P. denitrificans* тот же фермент составлен всего из трех субъединиц: 62 (цитохром c_1), 39 (двугемовый цитохром b) и 20 кДа (FeS-белок). Комплекс катализирует всю последовательность реакций Q-цикла и ге-

нерирует протонный потенциал. *KoQ*-Цитохром *c*-редуктаза этой бактерии чувствительна ко всему набору специфических ингибиторов митохондриального *Q*-цикла.

Функциональная модель. Схема функционирования митохондриальной *KoQ*-цитохром *c*-редуктазы была приведена выше (см. рис. 30). Известен ряд свидетельств, подтверждающих циклический перенос восстановительных эквивалентов, постулированный

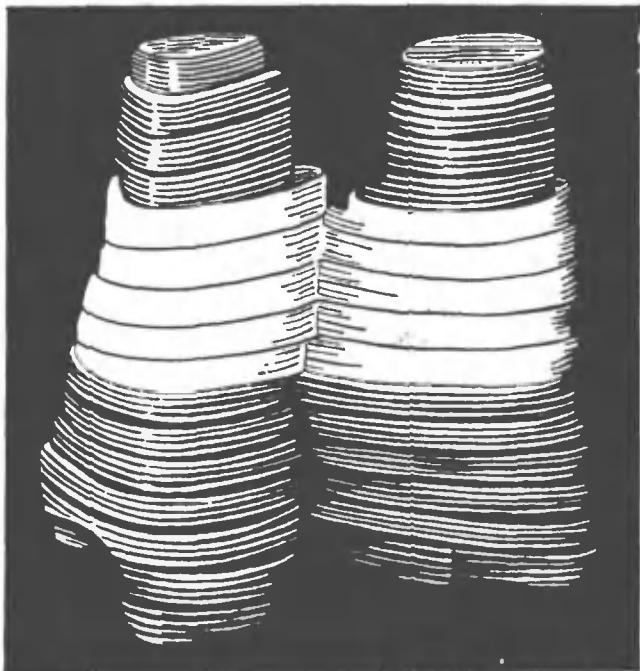


Рис. 31. Пространственная модель димера комплекса bc_1 из митохондрий (по К. Leonard et al., 1981):

темным обозначены участки, выступающие из мембраны в воду (сверху — в межмембранное пространство, снизу — в матрикс), светлым — участки, погруженные в мембрану; толщина срезов 1 нм

на схеме. Среди них — ответы системы на добавление специфических ингибиторов. Как сообщили Д. Дьюэл и М. Торн (1962), необходимы сразу два ингибитора (БАЛ и антимицин А), чтобы блокировать восстановление митохондриального цитохрома *b*. Позднее было показано, что эффект обусловлен существованием двух различных путей переноса электронов к цитохрому *b*. Один из них, чувствительный к антимицину, а также к *N*-оксиду 2-гептил-4-оксихинолина и фуникулозину, обусловлен взаимодействием между *KoQ* и гемом b_h . По данным А. А. Константинова, этот путь локализован вблизи внутренней (т. е. обращенной в матрикс) стороны митохондриальной мембраны.

Другой путь пролегает где-то в середине мембраны. Он ведет к гему b_l и требует участия FeS_{III} . Этот путь тормозится посредством БАЛ, который разрушает FeS_{III} -кластер в присутствии кислорода. Такой же эффект дает экстракция FeS_{III} -белка из мембраны. Кроме БАЛ существует еще ряд ингибиторов, действующих на этот путь. Среди них миксотиазол, муцидин и 5-*n*-ундецил-6-окси-2,7-диоксобензотиазол.

ДЦКД, ингибитор протонного канала в H^+ -АТФ-синтазе и ряде других генераторов и потребителей $\Delta\mu H$, вызывает образование сшивки между FeS_{III} -белком и одной из мелких субъединиц комплекса bc_1 . Такой эффект приводит к торможению переноса электронов. Ингибиторный эффект ионов Zn^{2+} на bc_1 -комплекс, вероятно, направлен на FeS_{III} .

Редокс-потенциалы переносчиков электронов, присутствующих в *KoQ*-цитохром *c*-редуктазе, хорошо согласуются со схемой *Q*-цикла. Для гемов b_l и b_h они равны соответственно $-0,04$ и $+0,04$ В, для FeS_{III} $+0,28$, для цитохромов c_1 и c — соответственно $+0,22$ и $+0,25$ В. Важно, что редокс-потенциал гема b_h заметно положительнее, чем редокс-потенциал гема b_l , так что перенос электронов с b_l на b_h должен сопровождаться высвобождением энергии. Эта энергия расходуется на создание $\Delta\psi$, так как оксидоредукция $b_h \rightarrow b_l$ направлена поперек мембраны. Соответственно, потенциал *KoQ* отрицательнее, чем потенциал FeS_{III} -белка. Энергия, выделяющаяся на этой стадии, также расходуется на создание $\Delta\psi$, но уже за счет переноса протонов.

Перенос электронов от FeS_{III} к цитохрому c_1 и далее к c вдоль мембраны происходит без существенных изменений редокс-потенциала и, следовательно, без выделения энергии. Редокс-потенциалы FeS_{III} и цитохромов типа c при физиологических рН не зависят от кислотности среды, так что эти компоненты служат переносчиками электронов, а не атомов водорода.

Как было показано А. А. Константиновым и его коллегами, а также А. Гофером и М. Гутманом, изменение редокс-потенциала гема b_l соответствует эффекту всего лишь 40% общей $\Delta\psi$ на мембране митохондрий. Этот факт согласуется с положением, что расстояние между центрами гемов в цитохроме b равно 2,0 нм при общей толщине мембраны около 5 нм (см. выше). Следовательно, трансмембранный перенос заряда, катализируемый комплексом bc_1 , складывается из переноса электрона от гема b_l к гему b_h (40% толщины мембраны) и переноса H^+ , освобождающегося при окислении KoQH_2 посредством FeS_{III} , через остальную (60%) часть мембраны (см. рис. 30, А).

На рис. 30, А гем b_h расположен вблизи поверхности мембраны, обращенной в матрикс, а гем b_l — в середине мембраны. Такая локализация гемов b была постулирована П. Митчелом и экспериментально доказана А. А. Константиновым. Оказалось, что водорастворимый непроникающий редокс-медиатор $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ (гексааминорутений) восстанавливает гем b_h при добавлении к вывернутым субмитохондриальным пузырькам с такой же скоростью, как в случае выделенного комплекса bc_1 . Такого восстановления не наблюдали, когда вместо субмитохондриальных пузырьков исследовали митохондрии или протеолипосомы с той же ориентацией комплекса bc_1 , что и в митохондриях. В этих случаях для восстановления гема b_h требовался проникающий медиатор ФМС.

Выяснение положения гема b_h позволило также локализовать и гем b_l . Судя по описанному выше ответу редокс-потенциала b_l на трансмембранную $\Delta\psi$, этот гем должен быть расположен примерно на полпути к противоположной поверхности мембраны.

Одно из требований схемы *Q*-цикла, показанной на рис. 30, А, — это участие стабильной формы аниона семихинона (KoQ^-), кото-

рая образуется на FeS_{III} и затем окисляется гемом b_1 . Эта форма была действительно описана А. А. Константиновым и Э. К. Рууге (1977).

Свойства митохондриальной KoQH_2 -цитохром c -редуктазы во многом сходны с таковыми гомологичных ферментных комплексов в фотосинтетических редокс-цепях хроматофоров пурпурных бактерий и тилакоидов цианобактерий. Показана даже взаимозаменяемость комплексов bc_1 митохондрий и хроматофоров. Комплекс bc_1 из митохондрий млекопитающего был реконструирован в протеолипосомах с комплексом фотосинтетических реакционных центров из хроматофоров пурпурной бактерии *Rps. sphaeroides*. Полученная «химера» катализировала циклический фотоперенос электронов, сопряженный с транслокацией H^+ через мембрану протеолипосомы.

Описана уникальная природная система, где одна и та же PQH_2 -цитохром c -редуктаза участвует в темноте в дыхательной цепи, а на свету — в фотосинтетической. Это мембрана тилакоидов цианобактерий.

При освещении пластохинон, комплекс b_6f , цитохром c и пластоцианин обеспечивают связь фотосистем I и II. В темновой период суток те же компоненты принимают участие в дыхательной цепи между НАД(Ф)Н- KoQ -редуктазой и цитохромоксидазой.

3.4.5. Цитохромоксидаза

Цитохромоксидаза катализирует окисление восстановленного цитохрома c молекулярным кислородом. Эта реакция сопряжена с генерацией $\Delta\mu\text{H}$, что было показано как на природных мембранах, так и на протеолипосомах.

Цитохром c . Восстановитель цитохромоксидазы цитохром c представляет собой очень стабильный гемопротеин, состоящий из 104 аминокислот и гема c . Гем ковалентно связан с апобелком (через SH-группы *Cys-14* и *Cys-17*). Это отличает цитохромы типа c от цитохромов a - и b -типов, где гемы связаны нековалентно. П. М. Вуд полагает, что прочная связь гема с апоцитохромами типа c обусловлена тем, что все цитохромы такого типа расположены на внешней стороне мембраны митохондрии или бактерии. Нековалентно связанный гем мог бы диссоциировать и разбавиться цитозолем (митохондрии) или периплазмой, а затем и внешней средой (бактерии).

Пятый или шестой лиганды железа образованы азотом имидазола *His-18* и серой *Met-80*. Обе эти аминокислоты инвариантны во всех известных цитохромах c , в то время как многие другие варьируют в различных видах организмов. Например, полностью совпадают первичные структуры цитохромов c человека и шимпанзе. При сравнении цитохромов c человека и лошади обнаружены различия по 12 аминокислотным остаткам; различия в цитохромах c человека и нейроспоры затрагивают уже 44 остатка.

Трехмерная структура цитохрома *c*, выясненная посредством рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,2 нм, показана на рис. 32.

Цитохром *c* соединяется с той областью КоQH-цитохром *c*-редуктазы, которая содержит цитохром *c*₁. Во взаимодействии участвует богатая остатками лизина часть цитохрома *c* (*Lys*-13, -72, -86 и возможно, -79, -27). В цитохромоксидазе также есть место связывания цитохрома *c*. Оно локализовано на субъединице II. В связывании участвуют анионы карбоксильных групп *Asp*-158, -112 и *Glu*-198, -144, образующие солевые связи с катионными (аминными) группами перечисленных выше лизинов.

Общепринято, что окислители и восстановители цитохрома *c* атакуют край гема, экспонированный в воду. Предполагают, что цитохром *c* совершает челночные движения между цитохромом *c*₁ и цитохромоксидазой, диффундируя вдоль поверхности мембраны. В опытах с протеолипосомами, содержащими комплекс *bc*₁, было показано, что кардиолипин участвует в связывании цитохрома *c* с мембраной.

Структура цитохромоксидазы. Цитохромоксидаза митохондрий и некоторых бактерий содержит четыре редокс-центра: два гемма *a*-типа (гем *a* и гем *a*₃) и два атома меди (*Cu*_A и *Cu*_B).

Полипептидный состав митохондриального и бактериального ферментов различен. Бактериальная цитохромоксидаза содержит два или чаще три ти-

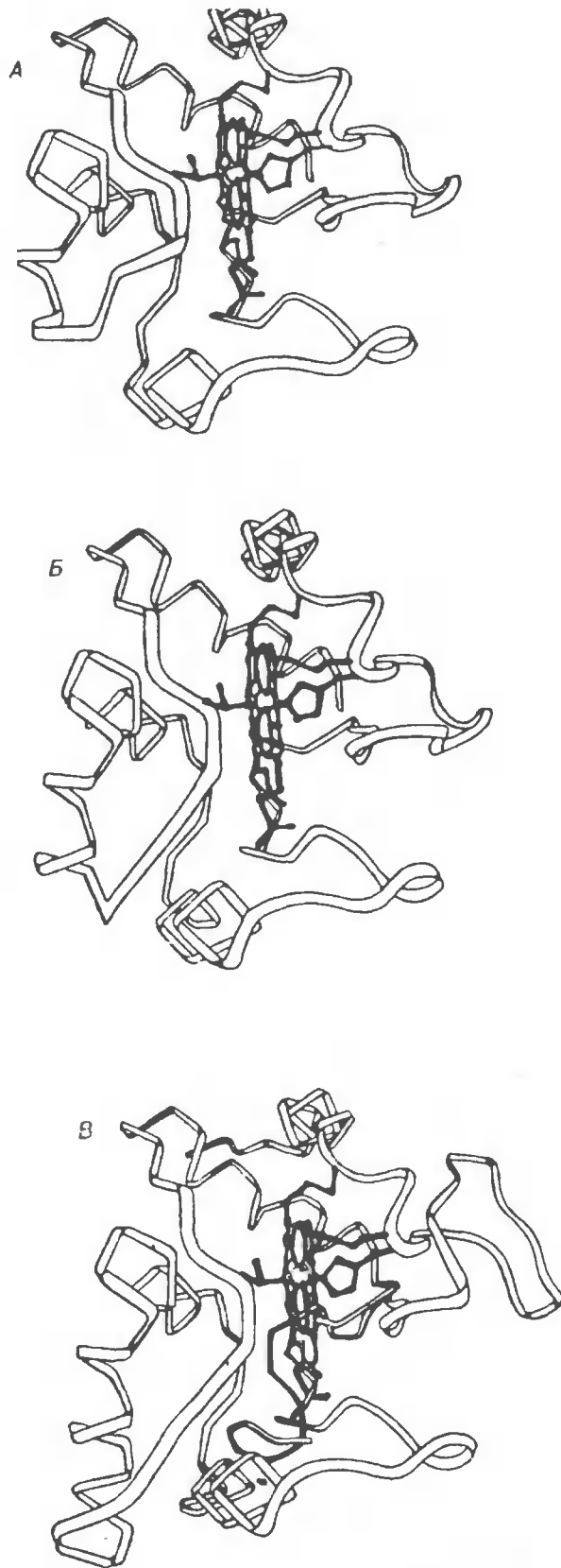


Рис. 32. Пространственные структуры цитохромов *c* из мышцы тунца (А) и *Paracoccus denitrificans* (Б) и цитохрома *c*₂ из *Rhodospirillum rubrum* (В) (по F. R. Salamma, 1977)

па субъединиц. Так, у *Paracoccus denitrificans* обнаружены субъединицы с массами 45 и 28 кДа. У термофильной бактерии *PS3*, по-видимому, идентичной *B. stearothermophilus*, их три (58, 56 и 22 кДа).

Другая термофильная бактерия *Thermus thermophilus* имеет субъединицы с массами 52, 37 и 29 кДа. Субъединицы 58 кДа из *PS3* и 37 кДа из *Th. thermophilus* содержат в дополнение к гемам *a* и *a₃* и двум атомам *Cu* еще и гем типа *c*. Поэтому трехсубъединичные оксидазы термофилов следует рассматривать как комплекс цитохромоксидазы с цитохромом *c*.

Трехсубъединичная цитохромоксидаза *aa₃*-типа (45, 37 и 35 кДа) была обнаружена у дышащей фотосинтезирующей бактерии *Rps. sphaeroides*, а двусубъединичный фермент — у *Nitrobacter*.

Намного обширней набор субъединиц в цитохромоксидазе митохондрий млекопитающих. Она содержит три крупные субъединицы, кодируемых митохондриальной ДНК: I (57 кДа), II (26 кДа) и III (30 кДа), а также по крайней мере еще девять более мелких субъединиц, синтезируемых в цитоплазме: IV (17 кДа), V (12,5 кДа), VIa (10,5 кДа), VIb (9,5 кДа), VIc (8,5 кДа), VII (10 кДа), VIIa (5,5 кДа), VIIb (5 кДа) и VIIc (6 кДа).

Цитохромоксидаза дрожжевых митохондрий имеет меньший набор субъединиц, чем ее аналог, полученный из животных. В ней отсутствуют субъединицы VIb, VIc и VII.

Некоторые прокариотические цитохромоксидазы существуют в виде мономеров, в то время как эукариотические обычно образуют димеры.

По данным электронной микроскопии, митохондриальная цитохромоксидаза частично погружена в мембрану, а частично экспонирована в воду. При этом в межмембранное пространство выступает бо́льшая (5,5 нм) часть молекулы фермента, а в матрикс — меньшая (1,5 нм). Часть, погруженная в мембрану, равна 4,5 нм (рис. 33).

Для всех субъединиц цитохромоксидазы выяснены аминокислотные последовательности. Анализ чередования гидрофобных и гидрофильных сегментов в субъединицах I, II и III показал, что они могли бы содержать соответственно 12, 2 и 7 α -спиральных колонн, пересекающих мембрану.

Общепринятая точка зрения состоит в том, что все редокс-центры цитохромоксидазы локализованы на субъединицах I и II. При этом считают, что *Cu_A* находится на субъединице II, а остальные редокс-центры — на субъединице I.

В субъединице II обнаружен домен, гомологичный *Cu*-связывающему домену других медьсодержащих белков. Кроме того, в субъединице II находятся две гидрофобные последовательности (по 25 аминокислот каждая), которые могли бы пересекать мембрану, образуя гарпуноподобную структуру с N- и C-концами на

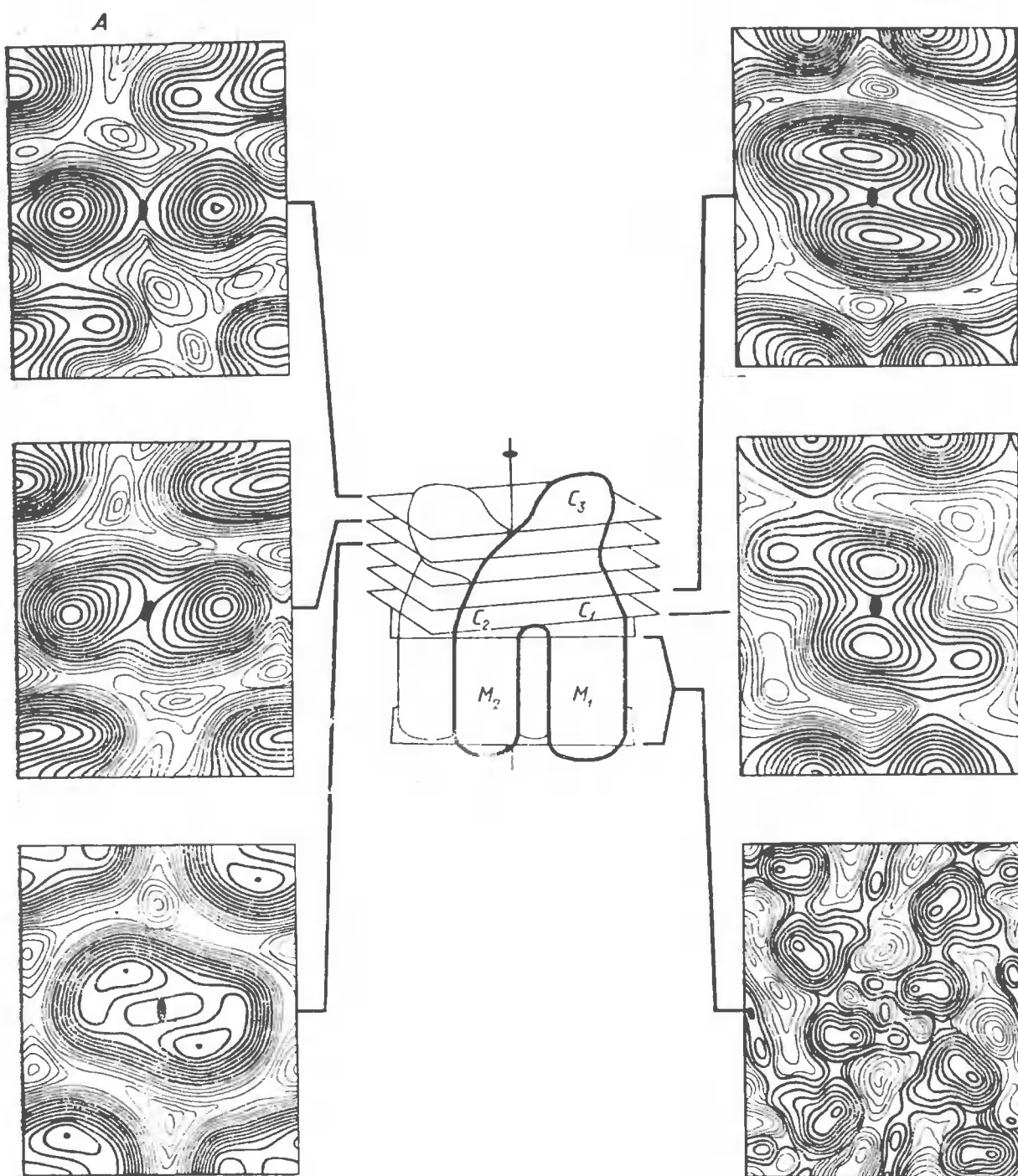
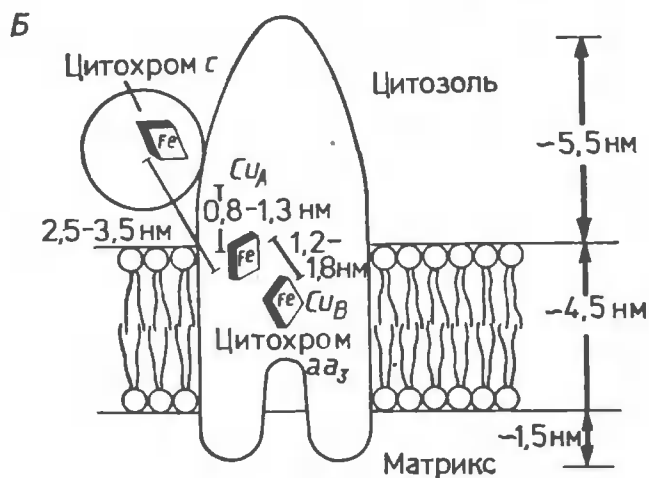


Рис. 33. Размер и форма цитохромоксидазы, выделенной из животного:

А — трехмерная модель димера цитохромоксидазы; приведены срезы, параллельные плоскости мембраны; верхние пять срезов сделаны с интервалом 1 нм (показаны карты электронных плотностей); в левом нижнем углу приведена проекция карты плотностей внутримембранного домена на нижний срез; C_1 , C_2 и C_3 — домены, выступающие в межмембранное пространство; M_1 и M_2 — домены, обращенные в матрикс (по J. Deatherage et al., 1982); **Б** — расположение редокс-центров в мономере цитохромоксидазы (по T. Ohnishi et al., 1985)



одной и той же стороне мембраны. Трансмембранное расположение субъединицы II подтверждается фактом, что протеиназы атакуют этот белок с обеих сторон мембраны.

По-видимому, именно субъединица II взаимодействует с цитохромом *c*, который мог бы связываться с отрицательно заряженными инвариантными остатками дикарбоновых аминокислот, локализованных в гидрофильном домене субъединицы II.

Две субъединицы цитохромоксидазы паракокка оказались родственными субъединицами I и II митохондриального фермента. В частности, были обнаружены иммунологическая перекрестная активность субъединиц II из митохондрий и паракокка и определенное сходство их первичных структур. Недавно М. Сарасте и сотрудники (1986) обнаружили в цитохромоксидазном гене паракокка открытую рамку считывания белка, гомологичного митохондриальной субъединице III. Вероятно, эта субъединица терялась при очистке фермента из бактерии.

Показано, что гемы ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны. При этом гем *a* расположен ближе к внешней поверхности, а гем *a*₃ погружен в мембрану. Расстояние между гемами оценивают в 1,4 нм (см. рис. 32, Б).

Окружение гема *a*₃ во многом напоминает гем-связывающую область гемо- и миоглобинов. Пятый лиганд образован остатком гистидина, в то время как место шестого лиганда может занимать молекула O₂.

Cu_B находится на расстоянии 0,3—0,5 нм от атома Fe гема *a*₃.

Субъединица III, подобно субъединице I, весьма гидрофобна и, подобно субъединицам I и II, кодируется в митохондриях. Субъединицы меньшей молекулярной массы, кодируемые ядерным геномом, в основном гидрофильны.

По данным Н. Куна и Б. Каденбаха, субъединицы I, II и III, кодируемые в митохондриях, были идентичны во всех исследованных тканях крысы. В то же время все субъединицы, кодируемые в ядре, были иммунологически различны хотя бы в каких-либо двух тканях. Для этих субъединиц выявлены также различия между тканью эмбриона и гомологичной тканью взрослого животного (исследовали печень, сердце и скелетные мышцы).

Приняв во внимание эти наблюдения, а также тот факт, что цитохромоксидазы бактерий содержат всего два-три полипептида, гомологичные митохондриальным субъединицам I—III, можно предположить, что *функции легких субъединиц цитохромоксидазы митохондрий связаны с регуляцией этого фермента в клетках эукариот.*

Путь переноса электронов. Существует ряд фактов, указывающих на то, что электрон, отнятый от цитохрома *c*, переносится непосредственно на Cu_A. Этот редокс-центр цитохромоксидазы находится ближе всего к поверхности фермента, обращенной в межмембранное пространство. Cu_A располагается на субъединице II, ответственной, по всей вероятности, за связывание цитохромокси-

дазы с цитохромом *c*. Двигаясь в направлении от поверхности в глубь мембраны, электрон переносится от Cu_A к гему *a* и далее к комплексу гема a_3 и Cu_B — последнему компоненту дыхательной цепи, который восстанавливает O_2 :



Предполагают, что молекула кислорода, связываясь с цитохромоксидазой и восстанавливаясь, образует пероксидный интермедиат, где группа $-\text{O}-\text{O}-$ играет роль лиганда, связывающего атом железа гема a_3 и Cu_B .

Следует подчеркнуть, что расстояния между редокс-центрами в цитохромоксидазе оказываются того же порядка, что и между простетическими группами в комплексе фотосинтетических реакционных центров *Rps. viridis* или между двумя гемами в цитохроме *b*. Это означает, что механизм переноса электронов во всех названных случаях может быть общим.

Механизм генерации $\Delta\bar{\mu}\text{H}$. В первоначальном варианте хемиосмотической гипотезы П. Митчел предположил, что зарядка мембраны посредством $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторов редокс-типа обусловлена трансмембранным перемещением электронов (схема «петель»). Позднее этот принцип был в основном подтвержден применительно к фотосинтетическим реакционным центрам.

На первый взгляд, подобная схема неприменима к цитохромоксидазе, так как показано, что редокс-центры этого фермента располагаются настолько близко друг к другу и к внешней поверхности мембраны, что электрон может быть перенесен на расстояние, не превышающее половины толщины мембраны (см. рис. 32, Б). Однако не исключено, что щель между доменами M_1 и M_2 , видная под электронным микроскопом (см. рис. 32, А), достаточно глубоко проникает в толщу мембраны, чтобы пересечь внутренний липидный монослой. В этом случае край гема a_3 мог бы оказаться в контакте с водной фазой матрикса.

Более существенно, что схема «редокс-петли» оказывается неспособной объяснить важное наблюдение, сделанное М. Викстрёмом (1977): добавление доноров электронов (ферроцианида либо цитохрома *c*) к митохондриям или цитохромоксидазным протеолипосомам вызывает временное закисление инкубационной среды, которое обусловлено работой цитохромоксидазы и снимается разобщителями — *протонофорами*. Как удалось установить в опытах с протеолипосомами, ионы H^+ , выделенные в среду, черпаются из внутреннего пространства этих пузырьков: заметное закисление наблюдали лишь в том случае, если пузырьки содержали рН-буфер. Отношение H^+/\bar{e} оказалось равным единице.

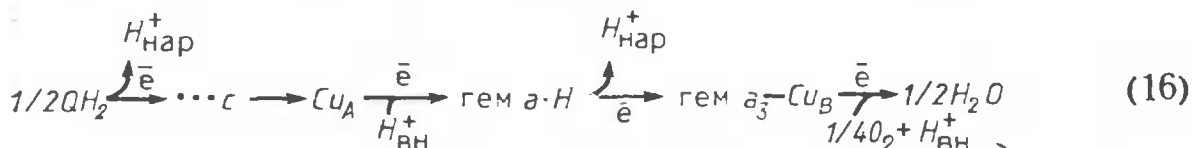
Этот эффект находит свое объяснение в рамках схемы, изображенной в общем виде на рис. 30, А. Как видно из схемы, окисление *одной молекулы цитохрома c* кислородом имеет следствием трансмембранный перенос *двух зарядов* благодаря взаимодейст-

вию следующих процессов: 1) переносу одного электрона на расстояние, равное $1/2$ толщины мембраны (от цитохрома c к a_3); 2) переносу одного протона на такое же расстояние (из матрикса к гему a_3); 3) переносу еще одного протона через всю толщу мембраны (из матрикса в межмембранное пространство).

Описанная система получила название *цитохромоксидазного протонного насоса*. Ее конкретный вариант, изображенный на рис. 30, А, постулирует существование двух отдельных $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов, включенных последовательно на конечном отрезке дыхательной цепи, т. е. между цитохромом c и O_2 . Изменение редокс-потенциала на этом участке равно 0,57 В. Эта величина столь значительна, что высвобождающейся энергии хватит не только на два пункта энергетического сопряжения, но и на обеспечение необратимости последней стадии внутриклеточного дыхания.

Таким образом, общий окислительно-восстановительный процесс, катализируемый цитохромоксидазой, можно разбить на *две группы частных реакций*, одна из которых характеризуется изменением редокс-потенциала от +0,22 до +0,38 В, а другая — от +0,38 до +0,82 В. Обнаружено, что система гемов $a-a_3$ характеризуется двумя среднеточечными редокс-потенциалами, в которые вносят вклад оба гема (+0,22 и +0,38 В). Оба перехода зависят от рН, как если бы восстановление сопровождалось присоединением протона. В то же время редокс-потенциалы Cu_A и Cu_B (0,24 и 0,34 В) не зависят от рН.

На основе этих фактов может быть предложена следующая линейная схема конечного сегмента дыхательной цепи:



Существенным моментом в этой схеме является то, что восстановление гема a приводит к его протонированию ионом H^+ матрикса ($H_{вн}^+$), а окисление — к высвобождению этого иона снаружи митохондрии ($H_{нар}^+$).

Альтернативный механизм устройства цитохромоксидазного $\Delta\bar{\mu}H$ -генератора (О-цикл) был недавно постулирован П. Митчеллом и сотрудниками (1985).

Любая схема устройства цитохромоксидазы предполагает, что в молекуле фермента существуют H^+ -проводящие пути, пересекающие значительную часть гидрофобного барьера мембраны. Первое указание в пользу такой возможности было получено в лаборатории автора А. А. Константиновым и сотрудниками (1978). Установлено, что рН-зависимость редокс-потенциала присуща не только цитохрому a_3 (который передает электроны на O_2 с последующим присоединением ионов H^+ и образованием воды), но также и цитохрому a . Оказалось, что редокс-потенциал цитохрома a

может отвечать на изменение рН по другую сторону мембраны, т. е. в матриксе.

В опытах той же группы была исследована рН-зависимость реакции связывания цианида с гемом a_3 и показано, что $\Delta\psi$, приложенная к мембране, меняет эту зависимость так, как если бы гем a_3 находился в средней части мембраны и был связан с матриксом «протонным колодцем».

Некоторую роль в переносе протонов цитохромоксидазой играет и субъединица III. Возможно, она необходима для димеризации цитохромоксидазных комплексов. Замечено, что соотношение H^+/e^- , равное 2, присуще только димерной форме цитохромоксидазы. Обратимое образование димеров могло бы служить регулятором эффективности цитохромоксидазы.

Отношение H^+/e^- , превышающее 1, было получено на протеолипосомах с цитохромоксидазой из термофильной бактерии *PS3*, *Paracoccus denitrificans* и *Thiobacillus novellus*, в то время как для ферментов из *Rps. sphaeroides* и *Nitrobacter* это отношение было ≤ 1 .

Следует отметить, что энергопреобразующая дыхательная цепь целого ряда бактерий заканчивается оксидазами, отличными от фермента aa_3 -типа. Среди них: цитохром a_1 , содержащие протогем оксидазы, такие, как самоокисляющиеся цитохромы типа b (цитохром o и др.), а также оксидазы с хлориновым гемом, например цитохром d , и модифицированным хлориновым гемом и гемом c (цитохром cd_1).

Цитохром o из *E. coli* состоит из четырех полипептидов (66, 35, 22 и 17 кДа), двух гемов типа b (b_{558} и b_{563}) и двух ионов меди. Он окисляет $KoQH_2$, но не может окислить цитохром c . Этот фермент ответствен за поглощение кислорода клетками *E. coli*, выращенными в нормоксических условиях. При снижении уровня O_2 в среде на смену цитохрому o приходит другой фермент, окисляющий $KoQH_2$: комплекс d , включающий два полипептида, геммы b_{558} , a_1 и d . Оксидазные комплексы типа o и d переносят через мембрану только один заряд на каждый проходящий через них электрон.

3.4.6. Укороченные дыхательные цепи, генерирующие $\Delta\bar{\mu}H$

Для большинства бактерий эффективность дыхательной цепи оказывается ниже, чем в митохондриях. Это обстоятельство может быть следствием по крайней мере трех разных причин: 1) более простого устройства механизма переноса электронов; 2) шунтирования некоторых $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов дыхательной цепи системами свободного окисления и 3) укорочения цепи при использовании доноров электронов, по редокс-потенциалу более положительных, чем НАДН, или акцепторов электронов, более отрицательных, чем O_2 .

Как было показано (см. разд. 3.4.4), НАДН-КоQ-редуктаза *E. coli* выглядит упрощенным вариантом гомологичного фермента митохондрий. Она содержит только два редокс-центра (ФМН и один FeS-кластер) вместо шести в митохондриях. Ротенон, амитал и другие ингибиторы, блокирующие перенос электронов между FeS_2 и КоQ, не влияют на дыхательную цепь *E. coli*.

Это обстоятельство может иметь большой биологический смысл, так как именно восстановление КоQ является наиболее медленным и легко уязвимым звеном дыхательной цепи, которое тормозится широким кругом гидрофобных агентов, сильно различающихся по своей структуре. Можно предположить, что простая, устойчивая к ингибиторам дыхательная цепь *E. coli* дает этой бактерии известные преимущества для выживания в неблагоприятных условиях. Подобный подход пригоден для объяснения функции шунтов свободного окисления, которые также типичны для бактериального дыхания.

Альтернативное толкование состоит в том, что *E. coli* находится на более низкой ступени эволюции по сравнению с митохондриями и потому имеет более низкую эффективность начального сегмента дыхательной цепи. Существуют данные, что отношение H^+/\bar{e} для НАДН-КоQ-редуктазного звена *E. coli* не больше единицы, в то время как в митохондриях оно равно двум.

Такая организация НАДН-КоQ-редуктазы не есть свойство, общее для всех бактерий. У *P. denitrificans* соотношение H^+/\bar{e} для того же сегмента цепи, по-видимому, равно 2.

Восстановление нитрата. Известно много примеров, когда уменьшение числа $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов в редокс-цепи несомненно оказывается следствием адаптации к специфическим условиям в экологической нише, занимаемой данным видом бактерий.

Наиболее типичным примером такой ниши могут служить среды, в которых нет кислорода, но есть какой-либо другой окислитель с положительным редокс-потенциалом. Так, существует довольно много бактерий, восстанавливающих нитрат до нитрита (редокс-потенциал пары $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ равен +0,42 В). Если восстановителем служит НАД(Ф)Н (потенциал —0,32 В), то соответствующая редокс-цепь может использоваться для генерации $\Delta\mu\text{H}$. Действительно, восстановление нитрата у *E. coli* сопровождается образованием протонного потенциала. Отношение H^+/\bar{e} должно быть ниже, если NO_3^- служит окислителем вместо O_2 (напомним, что редокс-потенциал пары $\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$ равен +0,82 В). Измерение коэффициента $\text{ATP}/2\bar{e}$ у *Rhizobium japonicum* показало, что эта величина при окислении сукцината кислородом равна 2, а при окислении нитратом — 1.

Нитратредуктаза *E. coli* может быть получена в растворимом виде как комплекс с массой 720 кДа, составленный из четырех тяжелых и четырех легких субъединиц. Он содержит четыре иона молибдена, валентность которого меняется от 5+ до 4+ при вос-

становлении цитохромом b_{555} , связывающим нитратредуктазу с дыхательной цепью.

Восстановление фумарата. Восстановление фумарата в сукцинат (редокс-потенциал 0,03 В) также может быть использовано в качестве механизма акцептирования электронов с дыхательной цепи в анаэробных условиях.

Для *Wolinella succinogenes* описана следующая редокс-цепь:
 $\text{H}_2 \rightarrow \text{гидрогеназа} \rightarrow \text{MQ} \rightarrow \text{фумаратредуктаза} \rightarrow \text{фумарат} \quad (17)$

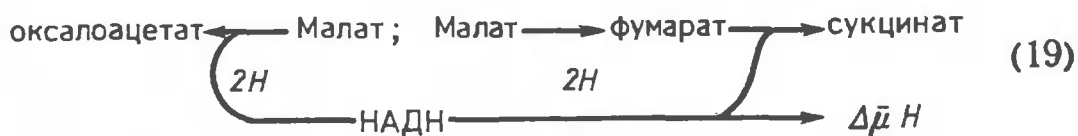
Будучи реконструированными в протеолипосомах с H^+ -АТФ-синтазой, гидрогеназа, фумаратредуктаза и MQ катализировали окисление молекулярного водорода фумаратом, сопряженное с синтезом АТФ.

К восстановителям фумарата, которые наряду с H_2 могут быть использованы в бактериальных системах, относятся также НАДН, формиат и глицерофосфат.

Более сложная катаболическая система была обнаружена у некоторых бактерий, образующих пропионат и ацетат из двух молекул лактата. Одна из стадий процесса состоит в переносе электронов с НАДН на фумарат, сопряженном с генерацией $\Delta\mu\text{H}$:



Существует пример, когда подобный механизм используется в митохондриях животного. Имаго аскариды — гельминта, паразитирующего в анаэробных участках кишечника хозяина, содержат большое количество митохондрий в мышцах. В этих митохондриях активность конечных участков дыхательной цепи низка, хотя ее начальный сегмент очень активен. Ферменты цикла Кребса, ответственные за превращение трикарбоновых кислот, отсутствуют, в то время как ферменты дикарбоновых кислот имеются в большом количестве. Показано, что запасание энергии митохондриями аскариды обусловлено восстановлением фумарата. Как сам фумарат, так и водород, необходимый для его восстановления, образуются за счет дисмутации малата:



Источником малата служит цепь реакций гликолиза, образующая пируват из глюкозы. Малат может быть получен из пирувата

путем карбоксилирования последнего, как это происходит в упомянутых выше бактериях, которые образуют пропионат.

Перенос восстановительных эквивалентов от НАДН к фумарату катализируется НАДН-дегидрогеназой, родохином (аналогом KoQ с более отрицательным потенциалом), особым цитохромом b_{558} , отличным от такового в комплексе bc_1 , и фумарат-редуктазным флавопротеином. Подобный цитохром b участвует в восстановлении фумарата посредством НАДН в митохондриях других животных.

Следует отметить, что личинки аскариды, живущие в аэробных условиях (в крови), располагают митохондриями с обычной дыхательной цепью и полным набором ферментов цикла Кребса.

Метаногенез. У некоторых анаэробных бактерий синтез АТФ сопряжен с образованием метана. Описано несколько типов метаногенеза:



Система метаногенеза включает ряд необычных коферментов и простетических групп (дезафлавин, KoM , тетрапиррол). Образование АТФ тормозится разобщителями и ДЦКД, что указывает на участие $\Delta\mu H$ и H^+ -АТФ-синтазы. Противоположная точка зрения состоит в том, что перенос электронов при метаногенезе сопряжен с синтезом АТФ по принципу субстратного фосфорилирования.

Окисление субстратов с положительным редокс-потенциалом. Примером энергетики такого типа служит бактерия *Thiobacillus ferrooxidans*. В качестве единственного энергетического ресурса она может использовать ион закисного железа (Fe^{2+}), который она окисляет до окисного железа (Fe^{3+}) кислородом воздуха. Редокс-потенциал пары Fe^{2+}/Fe^{3+} равен +0,77 В. Редокс-потенциал пары H_2O/O_2 при нейтральном рН оказывается равным +0,82 В. Таким образом, разность потенциалов между окислителем и восстановителем составляет мизерную величину порядка 0,05 В, что недостаточно для генерации $\Delta\mu H$ (около четверти вольта), необходимой для синтеза АТФ.

Решение этого вопроса было найдено, когда приняли во внимание зависимость редокс-потенциала пары H_2O/O_2 от рН. Так как ионы водорода участвуют в образовании воды из O_2 ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$), этот редокс-потенциал становится более положительным по мере закисления среды, которое сдвигает вправо равновесие реакции восстановления кислорода.

Количественно этот сдвиг равен 0,06 В на единицу рН. Таким образом, например, при рН=3 редокс-потенциал пары H_2O/O_2

чального сегментов цепи представлены в гораздо меньших количествах. Такая гипертрофия цитохромоксидазной системы объясняет исключительно высокую скорость потребления кислорода на 1 мг белка, которая оказалась в семь раз выше, чем у митохондрий сердца быка. Этот факт становится вполне понятным, если учесть, что железобактерии располагают только одним $\Delta\mu\text{H}$ -генератором, поставляющим необходимую энергию для всех функций клетки.

Fe^{2+} — не единственный донор электронов с положительным редокс-потенциалом, утилизируемый бактериями рода *Thiobacillus*. Они способны окислять тиосульфат в сульфат через цитохром *c* и цитохромоксидазу:



Процесс сопряжен с синтезом АТФ, причем разобщители — протонофоры блокируют этот синтез.

Ситуация, аналогичная таковой у *Thiobacillus*, наблюдается также в случае *Nitrobacter*, окисляющего нитрит. Электроны, отобранные у нитрита, который превращается в нитрат (редокс-потенциал +0,42 В), переносятся на цитохромоксидазу, а затем на O_2 . Этот процесс поставляет энергию для синтеза АТФ и переноса электронов от NO_2^- к НАДН.

Окисление NH_3 до NO_2^- (редокс-потенциал +0,44 В) через гидроксилламин используется некоторыми бактериями для восстановления цитохрома типа *c* и организации энергетической системы, подобной тем, что описаны в этом разделе. У *Nitrosomonas europae* в окислении NH_3 , по-видимому, участвует цитохром a_1 .

3.4.7. Пути и эффективность использования $\Delta\mu\text{H}$, образуемой дыхательной цепью. Отношение Р/О

Протонный потенциал, образуемый дыхательным $\Delta\mu\text{H}$ -генератором, может быть использован для обеспечения всех типов работы, производимой биомембранами. У типичных дышащих бактерий протонный потенциал потребляется главным образом H^+ -АТФ-синтазой, $\Delta\mu\text{H}$ -движимыми транспортерами метаболитов и H^+ -мотором.

В митохондриях последняя система отсутствует, а синтез АТФ представляется главным потребителем $\Delta\mu\text{H}$. Это не означает, однако, что альтернативные энергетические потоки количественно незначительны в этих органеллах. Как показывает простой расчет, в условиях, когда синтез внемитохондриального АТФ из внемитохондриальных АДФ и фосфата служит единственной функцией митохондрии, H^+ -АТФ-синтаза потребляет не более $2/3$ от образуемой дыханием $\Delta\mu\text{H}$, в то время как остальное используется АТФ⁴⁻/АДФ³⁻-антипортером и H_2PO_4^- , H^+ -симпортером. Эти соот-

ношения прямо вытекают из предположения, что H^+ -АТФ-синтаза образует один внутримитохондриальный АТФ на два иона H^+ , транспортируемые снаружи митохондрий в матрикс, и что обмен одного внутримитохондриального АТФ на немитохондриальные АДФ и фосфат сопряжен с переносом одного иона H^+ (см. разд. 5.2). Кроме того, транспорт некоторых субстратов дыхания из цитозоля в матрикс требует $\Delta\mu H$. Поэтому H^+ -АТФ-синтаза поглощает меньше $2/3$ энергии, которая поставляется дыханием в виде $\Delta\mu H$ даже в том случае, когда функция митохондрий ограничивается образованием АТФ. Эта величина должна быть в действительности еще ниже, если принять во внимание, что митохондрии выполняют такие функции, альтернативные окислительному фосфорилированию, как транспорт ионов, а в некоторых случаях также и образование теплоты. Эти процессы, как и действие шунтов свободного окисления, могут снижать долю H^+ -АТФ-синтазы в использовании энергии, предоставляемой дыхательной цепью.

Мерой эффективности дыхания как поставщика энергии для синтеза АТФ может служить отношение количества синтезированного АТФ или эстерифицированного фосфата к количеству потребляемого кислорода (АТФ/О или Р/О). Критерий Р/О был предложен в 1939 г. В. Н. Белицером и Е. Т. Цыбаковой.

Для митохондрий, окисляющих НАД-зависимые субстраты, сукцинат или аскорбат, экспериментально измеренные величины Р/О, как правило, оказываются соответственно около 3, 2 и 1. Возникает вопрос, насколько близки эти значения к теоретически максимальным отношениям Р/О, которые должны были бы наблюдаться при условии, что H^+ -АТФ-синтаза и система антипорта АТФ/(АДФ + Φ_H) являются единственными потребителями $\Delta\mu H$. Чтобы найти максимальное значение Р/О, достаточно разделить количество протонов, переносимых из матрикса в межмембранное пространство при восстановлении одного атома кислорода, на 3. Делитель, равный 3, берут исходя из допущения, что синтез одной молекулы внутримитохондриального АТФ сопряжен с возвращением в матрикс двух H^+ , а антипорт АТФ_{вн}/(АДФ + Φ_H)_{нар} — одного H^+ .

Из рис. 30, А ясно, что общее число H^+ , транспортируемых через мембрану на каждый атом кислорода, равно десяти, если окисляется какой-либо НАД-зависимый субстрат (включены все три дыхательных $\Delta\mu H$ -генератора). Для сукцината, окисляющегося, минуя НАДН-КоQ-редуктазный $\Delta\mu H$ -генератор, это число равно шести, а для аскорбата, подключающегося к дыхательной цепи на уровне цитохрома с, оно равно четырем. Что касается максимальной величины Р/О, то она будет составлять $10:3=3,3$ для НАД-зависимых субстратов; $6:3=2,0$ для сукцината и $4:3=1,3$ для аскорбата. Эти величины близки к значениям, полученным экспериментально.

Интересная проблема возникает при рассмотрении дыхательного фосфорилирования в клетках бактерий. Здесь нативная система (интактные бактерии) должна характеризоваться величиной P/O , равной 5 для НАД-зависимых субстратов при условии, что действует дыхательная цепь митохондриального типа. Однако расчет показывает, что при столь высокой эффективности начальный и средний сегменты дыхательной цепи должны работать с энергетическим дефицитом, т. е. выделяющейся энергии не может хватить на поддержание реальных величин $ATP/(ADF + F_n)$, наблюдающихся в клетке. Одним из путей решения этого парадокса может быть предположение о том, что бактериальная H^+ -АТФ-синтаза переносит не два (как это предполагают для митохондрий), а три иона H^+ на каждый синтезированный АТФ.

3.5. Бактериородопсин

3.5.1. Принцип действия

В 1971 г. Д. Остерхельт и В. Стокениус открыли *бактериородопсин* — ретиналь-содержащий белок — в мембранах экстремально галофильной бактерии *Halobacterium halobium*. В дальнейшем было продемонстрировано, что он функционирует как *светозависимый H^+ -насос*.

Бактериородопсин представляет собой одиночный полипептид с массой 26 кДа, что значительно меньше, чем у всех других известных $\Delta\mu H$ -генераторов. Бактериородопсин локализован в специальных областях цитоплазматической мембраны *H. halobium* — так называемых *пурпурных бляшек*, достигающих 0,5 мкм в диаметре. Других белков в бляшках нет, так что бактериородопсин выполняет свои функции самостоятельно. Обычно молекулы бактериородопсина *in vivo* образуют тримеры. Однако и в мономерной форме этот белок эффективен как протонный насос.

Такие процессы, как межмолекулярный перенос окислительно-восстановительных эквивалентов или гидролиз ковалентных макроэргических связей, протекающие в других $\Delta\mu H$ -генераторах, в бактериородопсина не обнаружены.

Согласно современной точке зрения, *механизм действия бактериородопсина* состоит в следующем. Поглощение фотона остатком ретиналя, ковалентно связанным посредством альдиминной связи с ϵ -аминогруппой остатка *Lys-216* в молекуле бактериородопсина, вызывает изомеризацию ретиналя по типу «*полностью транс*→*13-цис*» (рис. 34). Этот эффект сопровождается очень резким «кислым сдвигом» pK иминного азота шиффового основания, который в трансизомере протонирован. В результате шиффового основания теряет сродство к протону и депротонируется. Считают, что высвобождающийся протон выделяется в виде иона H^+ в водную фазу *снаружи* клетки. Затем происходит темновая *цис-транс*-

изомеризация, рК шиффового основания возвращается к исходному значению, т. е. сродство основания к протонам вновь возрастает. В результате шиффово основание протонируется, причем для этой

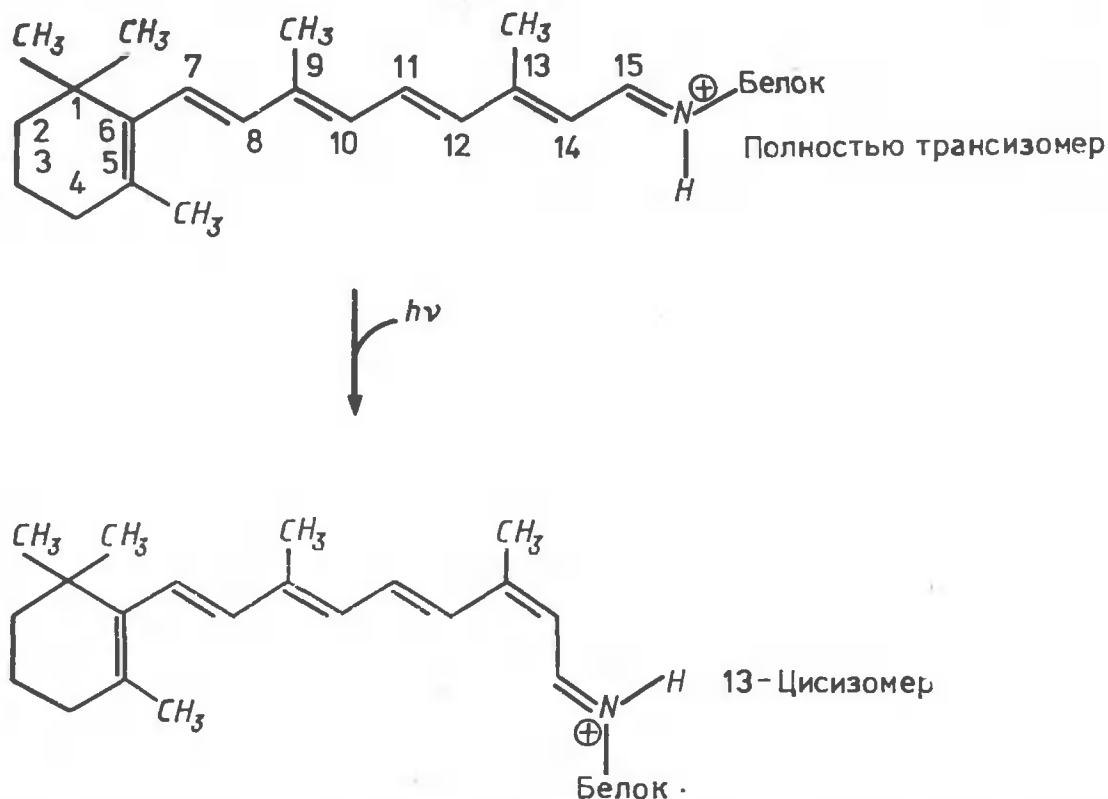


Рис. 34. Светозависимая полностью транс→13-цис-изомеризация остатка ретиналя в бактериородопсине

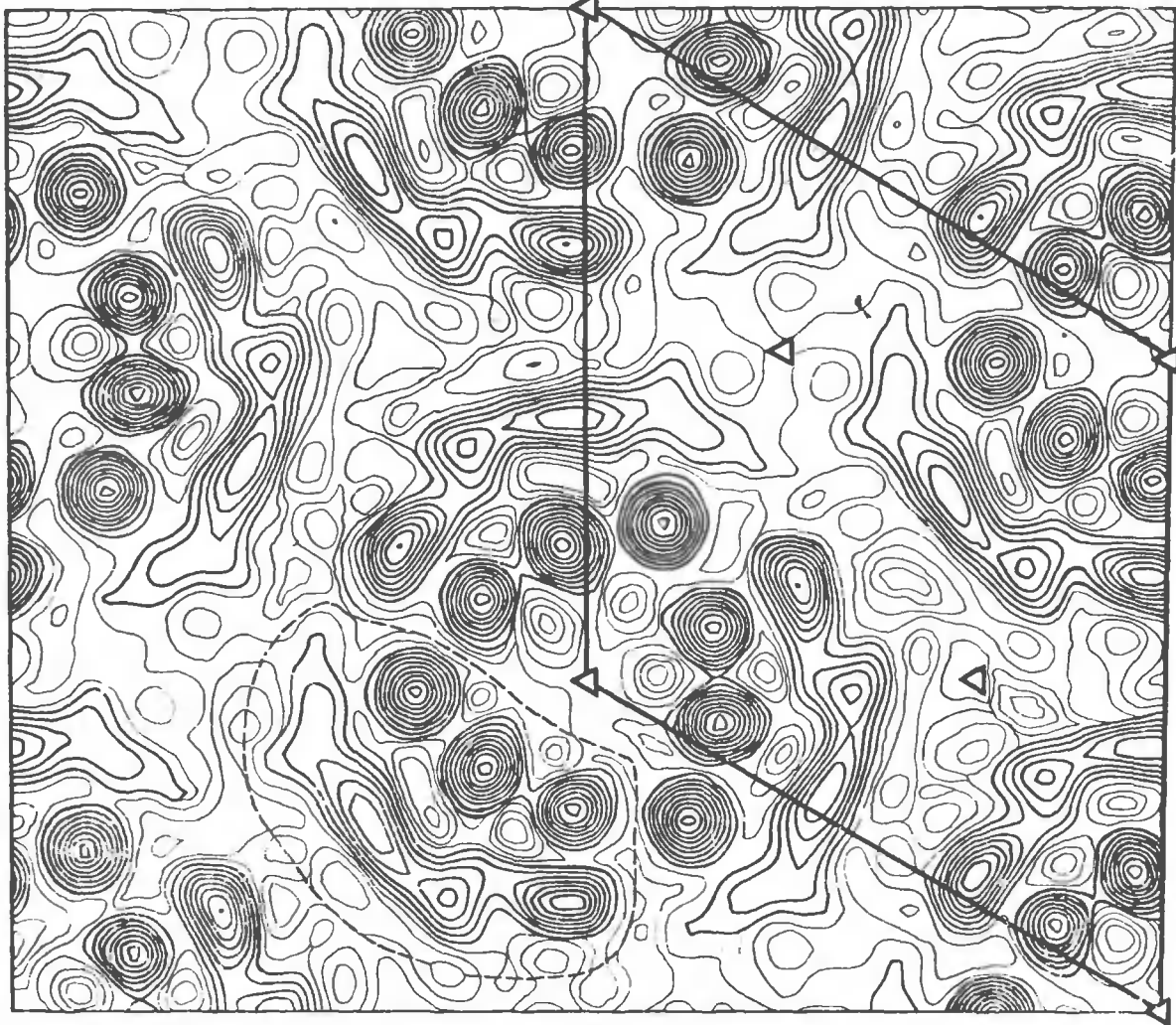
цели используется H^+ , поступающий *изнутри* бактериальной клетки. Таким образом, вызванное светом циклическое превращение бактериородопсина оказывается сопряженным с транспортом иона H^+ через цитоплазматическую мембрану *H. halobium*.

3.5.2. Структура бактериородопсина

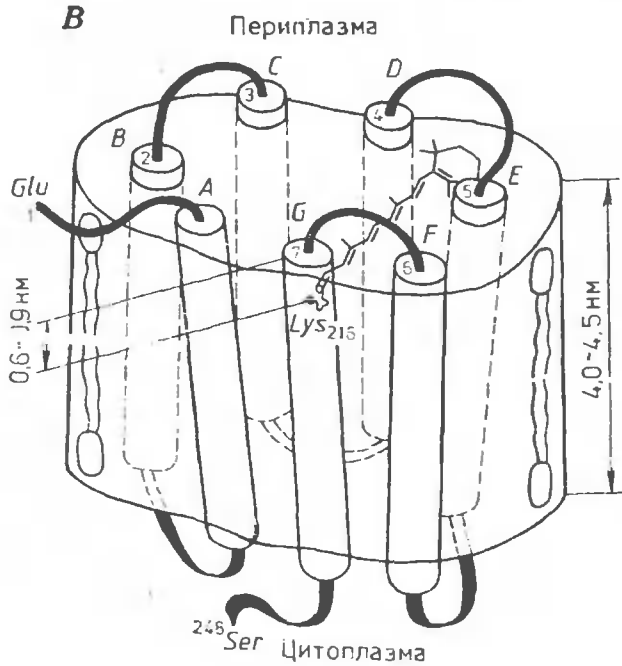
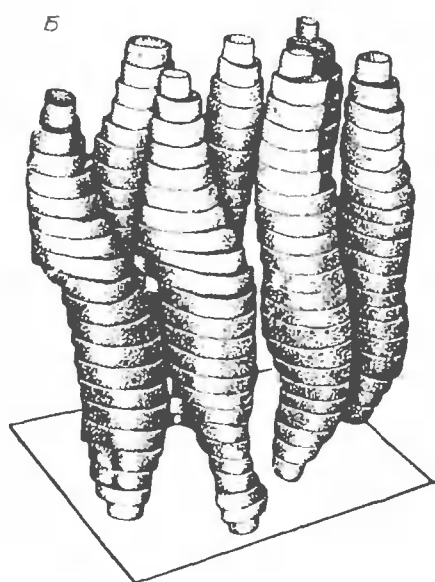
Бактериородопсин оказался хронологически первым $\Delta\mu H$ -генератором, для которого удалось выяснить первичную структуру. Это было сделано Ю. А. Овчинниковым, Н. Г. Абдулаевым и сотрудниками (1978), а позднее Х. Г. Кораной и его коллегами (1979). Оказалось, что белок состоит из 248 аминокислотных остатков, образующих семь гидрофобных последовательностей (по 24—28 аминокислот каждая), чередующихся с более короткими гидрофильными последовательностями. Кроме того, на С-конце молекулы белка находится гидрофильная последовательность, включающая не менее 20 аминокислот.

В 1975 г. Р. Хендерсон и П. Ануин опубликовали пространственную модель бактериородопсина с разрешением порядка 0,7 нм. В этой работе авторы использовали уникальное свойство бактерио-

A



B



родопсина: образовывать *in vivo* двумерные кристаллы в тех областях бактериальной мембраны, где он локализован. Используя электронный микроскоп и метод анализа дифракции электронов, авторы получили изображения бактериородопсина, приведенные на рис. 35, А. Б. Оказалось, что полипептидная цепь бактериородопсина семь раз пересекает мембрану, формируя семь α -спиральных колонн (каждая высотой порядка 3,5 нм), образованных в основном гидрофобными аминокислотами. На рис. 35, Б отсутствуют гидрофильные вставки, связывающие гидрофобные колонны, так как разрешение метода слишком низко, чтобы их увидеть.

Установлено, что N- и C-концы полипептидной цепи бактериородопсина находятся по разные стороны цитоплазматической мембраны: N-конец обращен наружу, а C-конец — внутрь клетки. Это заключение основывается на данных опытов по действию протеолитических ферментов и моноклональных антител в системах двух типов: субклеточных частицах с той же ориентацией мембраны, что у клеток, и протеолипосомах с обратной ориентацией мембраны.

Эти методы были применены также для локализации гидрофильных связей между α -спиральными колоннами. Показано, что колонны А (ближайшая к N-концу) и В (вторая по счету от N-конца) связаны участком полипептидной цепи, содержащим Asp-36 и Phe-42, которые доступны для антител с цитоплазматической стороны мембраны. Следующая связка (между колоннами В и С) обращена в периплазму и включает Leu-66 и Gly-72. Связка С—D экспонирована в цитоплазму. Она состоит из аминокислот, локализованных на участке между Tyr-83 и Met-119. Обработка лактопероксидазой выявила, что Tyr-131 и Tyr-133 находятся на внешней стороне мембраны, участвуя, по-видимому, в связке D—Е. Связки Е—F и F—G оказались, соответственно, на внутренней и внешней сторонах, причем было показано, что в связке Е—F для образования антигенной детерминанты существен Phe-156, а в связке F—G — Glu-194.

Остаток ретиналя в молекуле бактериородопсина связан с Lys-216, локализованным, вероятно, в колонне G.

Методом линейного дихроизма установлено, что *полностью транс-ретиналь в бактериородопсине наклонен под углом 19—28° к плоскости мембраны.*

И. Р. Набиев и сотрудники в группе Ю. А. Овчинникова недавно применили спектроскопию гигантского комбинационного рассеяния для изучения положения ретиналя в мембране пурпурной бляшки. Установлено, что ретиналь залегает на глубине всего

Рис. 35. Пространственная организация бактериородопсина:

А — карта распределения электронной плотности в пурпурной бляшке (проекция на плоскость мембраны); одна из молекул бактериородопсина обведена пунктиром, ячейка двумерного кристалла — сплошной линией;

Б — вид сбоку модели одной молекулы бактериородопсина, реконструированной на основе карт распределения электронной плотности (по R. Henderson et. al., 1977);

В — вероятное расположение семи α -спиральных колонн и остатка ретиналя в молекуле бактериородопсина (по И. Р. Набиеву и др., 1985)

0,6—0,9 нм от внешней поверхности мембраны. Именно такое положение ретиналя было постулировано задолго до этих опытов работами автора и сотрудников на основании измерений быстрой кинетики генерации $\Delta\psi$ бактериородопсином (см. разд. 3.5.6).

Х. Г. Корана и сотрудники предприняли попытку выяснить, с какими аминокислотными остатками контактирует дистальная часть ретиналя (иононовое кольцо). Был синтезирован аналог ретиналя, где иононовое кольцо заменили на фотоаффинную *m*-диазиринофенильную группировку. Бактериородопсин инкубировали с аналогом в темноте, а затем полученный хромопротеин подвергли действию света. Последующий анализ показал, что диазириновая группа преимущественно присоединяется к Ser-193 и Glu-194. Как уже отмечалось выше, по данным опытов с антителами остаток Glu-194 находится вблизи внешней поверхности мембраны, участвуя в образовании связки между колоннами F и G.

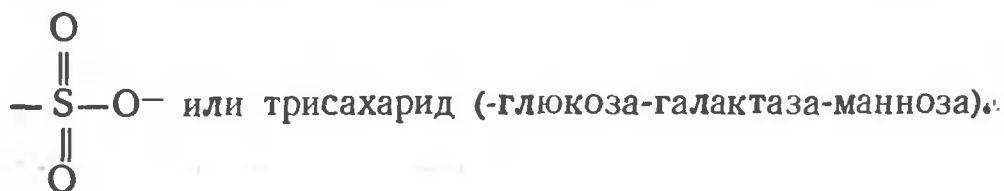
Исследования с применением дифракции нейтронов показали, что ретиналь расположен внутри молекулы бактериородопсина (если смотреть на мембрану сверху) между колоннами C—E, с одной стороны, и колоннами F и G — с другой (рис. 35, B).

3.5.3. Липиды бактериородопсиновых бляшек

В пурпурных бляшках бактериородопсин составляет около 75% вещества мембраны. Остальное — фосфо- и сульфолипиды и каротиноиды.

На один бактериородопсиновый тример в бляшке приходится примерно 30 молекул фосфо(сульфо)липидов, причем три из них располагаются в центре тримера, а остальные — между тримерами. Все липиды относятся к классу терпенов, что характерно для многих бактерий — термофилов (*H. halobium* не только гало-, но и термофил). Возможно, что боковые метильные группы в разветвленных (терпеновых) углеводородах предотвращают слишком плотную упаковку липидов в мембране. В других случаях та же цель достигается присутствием ненасыщенных жирных кислот.

Углеводородные цепи фосфолипидов галобактерий являются остатками жирных спиртов, а не жирных кислот. Следовательно, фосфолипиды этих микроорганизмов представляют собой простые эфиры, а не сложные. Роль жирного спирта играет дигидрофитол ($C_{20}H_{41}OH$) (рис. 36). Среди минорных фосфолипидов, не показанных на рисунке, следует упомянуть аналоги фосфатидилглицерофосфата, в которых конечная фосфатная группа заменена на



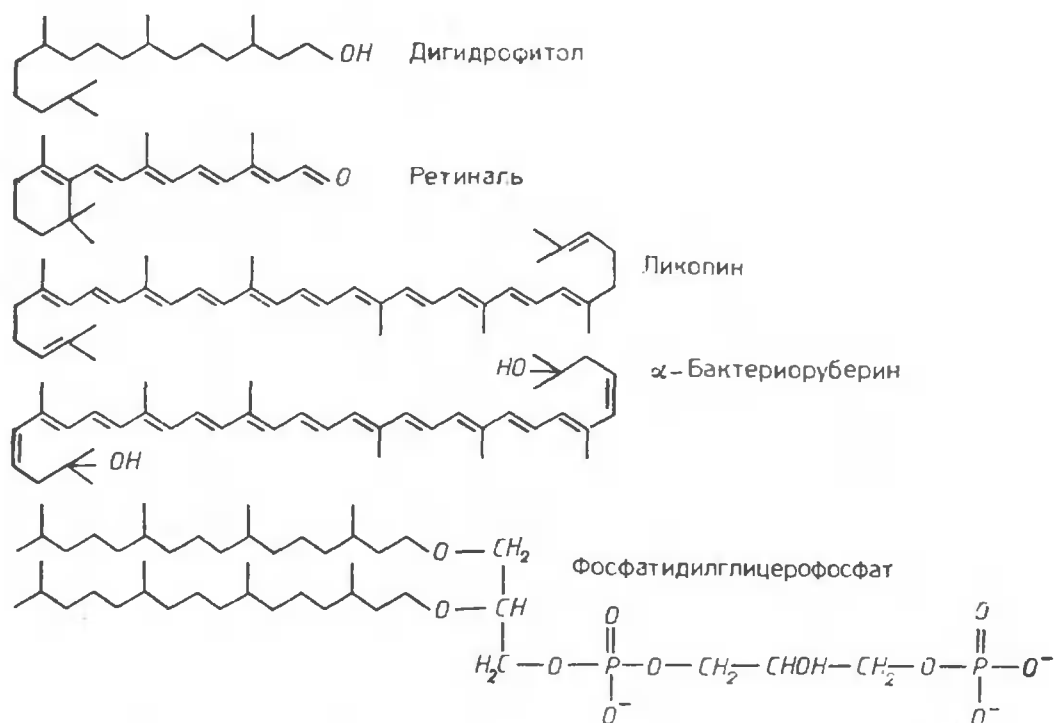


Рис. 36. Липиды мембран галобактерий:

формулы дигидрофитола, ликопина и α -бактериоруберина изображены таким образом, чтобы подчеркнуть их сходство с ретиналем

3.5.4. Фотоцикл бактериородопсина

Поглощение фотона бактериородопсином вызывает ряд превращений, замкнутых в *цикл* (рис. 37). Каждое из них может быть прослежено по характерному спектральному сдвигу. Уже в 1971 г. Д. Остерхельт и В. Стокениус описали ключевой интермедиат бактериородопсинового фотоцикла, поглощающий свет при гораздо более короткой длине волны (412 нм), чем исходная форма бактериородопсина (568 нм). Поскольку этот спектральный сдвиг подобен переходу родопсин \rightarrow метародопсин II (MII) в зрительном родопсине, коротковолновый интермедиат бактериородопсина был назван M_{412} . В последующих работах были выявлены два интермедиата между бактериородопсином и M_{412} в фотоцикле. Они были обозначены буквами алфавита, предшествующими M. Образование M_{412} стали описывать следующей схемой: $bR \rightarrow K \rightarrow L \rightarrow M$, где bR — основное состояние бактериородопсина.

Было высказано предположение, что превращение M_{412} в bR также включает два промежуточных продукта ($M \rightarrow N \rightarrow O \rightarrow bR$). Однако дальнейшие исследования показали, что интермедиат N может быть исключен из основного пути.

Дальнейшее усложнение схемы фотоцикла стало необходимым после описания I и J — весьма короткоживущих предшественников интермедиата K.

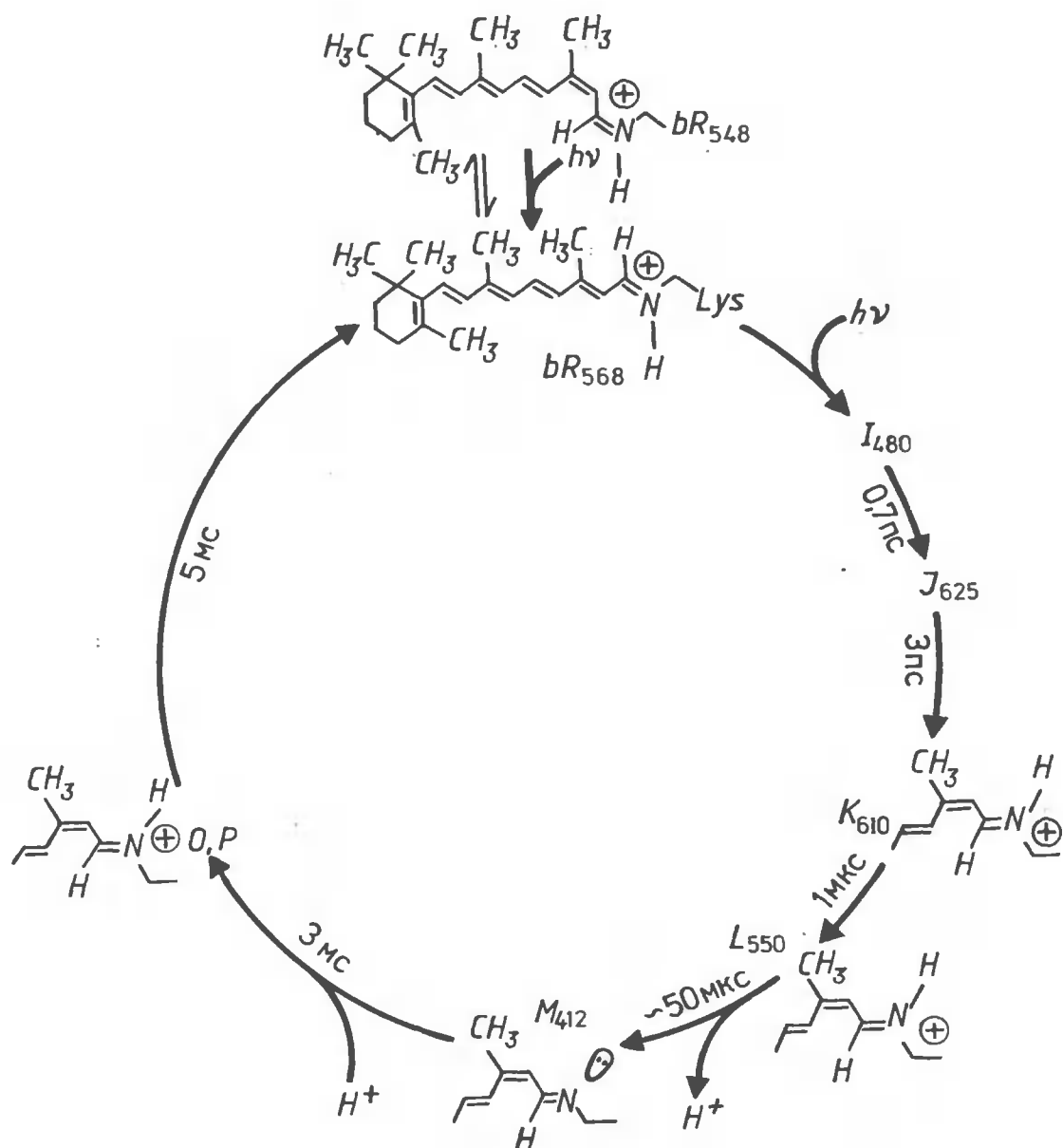


Рис. 37. Фотоцикл бактериородопсина (по S. O. Smith et al., 1985; Л. А. Драчеву и др., 1986):

исходный пигмент, т. е. светоадаптированный бактериородопсин (*bR*₅₆₈), содержит остаток ретиналя в полностью транс-конформации, прикрепленный к *Lys*=216 через протонированное шиффово основание. Поглощение света превращает *bR*₅₆₈ в *I*, который затем вновь регенерирует *bR*₅₆₈. Процесс регенерации *bR*₅₆₈ из *I* включает интермедиаты *J*, *K*, *L*, *M* и *O* или *P*. Транс-цис-изомеризация вокруг *C*₁₃=*C*₁₄ ретиналя в *bR*₅₆₈ приводит к перемещению протонированного шиффового основания из одного места в мембране в другое, что сопровождается запасанием энергии порядка 67 кДж/моль. На последующих тепловых стадиях эта энергия используется для трансмембранного переноса H^+ ($H^+_{вн} \rightarrow H^+_{нар}$). Переход *M*→*O*(*P*) сопровождается переносом H^+ с одной из протолитических групп белка на атом азота шиффового основания. В темноте *bR*₅₆₈ медленно превращается в *bR*₅₄₈, который содержит почти эквимольные количества ретиналя в полностью транс- и 13-цис-формах. Индексы около букв означают максимумы поглощения пигментов.

В последнее время появились указания на то, что M — сборное понятие, объединяющее два интермедиата; возможно, два M участвуют в двух параллельных путях превращения продукта L .

А. Д. Кауленом были получены указания на существование двух форм бактериородопсина с максимумом поглощения в области 560—570 нм, отличающихся молярными коэффициентами экстинкции. Форма бактериородопсина, имеющая меньшую экстинкцию и максимум поглощения, несколько сдвинутый в область коротких длин волн, служит предшественником основной формы бактериородопсина в фотоцикле. Превращение нового интермедиата, названного P , в основную форму bR резко тормозится небольшими количествами тритона X-100.

Хранение бактериородопсина в течение нескольких минут в темноте приводит к так называемой *темновой адаптации*. При этом около 50% молекул бактериородопсина превращается в новый компонент, поглощающий свет при 548 нм и содержащий 13-цисретиналь. Темноадаптированный bR_{548} активен как протонный насос. Освещение вызывает быстрый переход $bR_{548} \rightarrow bR_{568}$ (*световая адаптация*).

3.5.5. Светозависимый транспорт протонов бактериородопсином

Прогресс в понимании функциональной активности бактериородопсина связан прежде всего с разработкой и одновременным применением быстрых спектральных и электрометрических методов, а также с использованием коротких вспышек лазера.

Спектральные измерения в максимумах интермедиатов фотоцикла позволяют следить за образованием и распадом последних. Чувствительные рН-индикаторы дают возможность наблюдать выделение и поглощение ионов H^+ молекулами бактериородопсина, одновременно запущенными вспышкой света. Прямое измерение смещений зарядов в бактериородопсине, сорбированном на коллодиевой пленке, дает информацию о переносе H^+ или каких-либо иных заряженных компонентов внутри молекулы $\Delta\mu H$ -генератора.

Л. А. Драчевым и А. Д. Кауленом были измерены следующие три параметра: 1) образование и распад M_{412} (по изменению поглощения света при 412 нм); 2) изменение рН в среде (по поглощению света рН-индикатором — p -нитрофенолом) и 3) генерация и разрядка $\Delta\psi$, обусловленная смещением зарядов в бактериородопсине (по показаниям вольтметра, соединенного с двумя электродами, погруженными в растворы электролита по обе стороны коллодиевой пленки). Однократное срабатывание бактериородопсина вызывали вспышкой лазера ($t_{1/2}$ вспышки 15 нс). При измерениях сдвигов рН и поглощения при 412 нм использовали суспензию открытых (незамкнутых) пурпурных бляшек. Для

измерения $\Delta\psi$ те же бляшки встраивали с одной стороны в коллодиевый фильтр (см. разд. 2.1.2).

Как показали измерения, кинетика обазования и распада M_{412} совпадает соответственно с выделением и поглощением бляшками H^+ . Поскольку процессы образования M_{412} и выделения H^+ оказались намного быстрее ($t_{1/2}$ около 250 мкс), чем распад M_{412} и поглощение H^+ ($t_{1/2}$ порядка 30 мс), то их можно было легко соотнести с двумя основными электрогенными процессами, наблюдавшимися в системе бляшки — коллодиевая пленка (приведенные выше величины $t_{1/2}$ относятся к $t^\circ=5^\circ\text{C}$). Образование M_{412} и выброс H^+ коррелировали с электрогенной фазой, развивающейся в микросекундной временной шкале. Соответственно, распад M_{412} и поглощение H^+ коррелировали со второй (миллисекундной) электрогенной фазой. Соотношение амплитуд микро- и миллисекундных фаз генерации $\Delta\psi$ оказалось равным 1 : 4.

Измерение $\Delta\psi$ с большим временным разрешением позволило обнаружить еще одну электрогенную стадию ($t_{1/2} < 50$ нс). Ее скорость была недавно измерена, она составила 30 ± 10 пс. Стадия, о которой идет речь, очень мала по амплитуде. Она характеризуется направлением электрического вектора, противоположным таковому для более медленных электрогенных стадий.

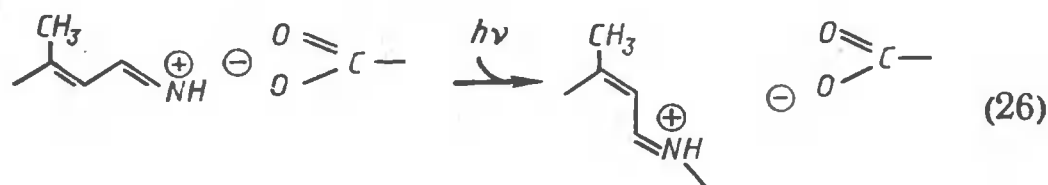
Опыты на субклеточных пузырьках показали, что освещение вызывает быстрое выделение H^+ ; затем следует очень медленное поглощение выделенных ионов. Поглощение резко ускоряется протонфорами, как если бы ионы H^+ черпались из водной фазы внутри пузырька. С другой стороны, протеолипосомы, имеющие обратную ориентацию мембраны, в ответ на свет демонстрируют быстрое поглощение H^+ , после чего происходит медленное выделение этих ионов.

Описанные выше соотношения указывают, что трансмембранный перенос ионов H^+ бактериородопсином должен быть направлен из цитоплазмы в периплазму бактериальной клетки. В полном соответствии с этим выводом оказались результаты опытов на клетках, суббактериальных пузырьках, протеолипосомах и бляшках, сорбированных на коллодиевой пленке. Было найдено, что микро-и миллисекундные электрогенные стадии имеют такое направление, как если бы положительные заряды переносились от цитоплазматической к периплазматической поверхности.

Приняв во внимание перечисленные выше факты, можно описать механизм работы бактериородопсина как процесс, состоящий из четырех основных стадий.

Стадия I. Поглощение фотона остатков полностью трансретиналя вызывает его *изомеризацию* в 13-цисретиналь. Если полиеновая цепь ретиналя прочно фиксирована в молекуле белка, а шиффово основание имеет возможность переместиться, то изомеризация должна вызвать такое перемещение. Видимо, вследствие изомеризации ретиналя шиффово основание перемещается из окружения, благоприятного для его протонирования, в окружение,

благоприятное для депротонирования. Такой эффект может возникать при удалении атома азота шиффового основания от какой-либо отрицательно заряженной группы, например ионизованного карбоксила остатка аспартата, который, как полагают, образует в bR_{568} солевую связь с шиффовым основанием:



Стадия II. Шиффово основание, оказавшись в новом месте, освобождает протон. Последний транспортируется к периплазматической поверхности мембраны по выходному H^+ -проводящему пути, который связывает эту поверхность с областью внутри молекулы белка, где локализовано шиффово основание остатка 13-цисретиналя. Перенос H^+ по выходному пути дает микросекундную стадию фотоэлектрического ответа.

Стадия III. Депротонированный остаток 13-цисретиналя переносится в исходное положение, протонируется некоторой протолитической группой белка и изомеризуется в полностью транс-изомер.

Стадия IV. Протолитическая группа репротонируется ионом H^+ , перенесенным по входному H^+ -пути. Этот путь соединяет цитоплазматическую поверхность мембраны с местом, где находится шиффово основание. Перенос H^+ по входному пути обуславливает появление миллисекундной электрогенной стадии.

Приняв, что величины диэлектрических постоянных в областях выходного и входного путей сходны, можно заключить, что первый примерно вчетверо короче второго, поскольку соотношение амплитуд микро- и миллисекундных электрогенных стадий равно четырем. Следовательно, шиффово основание должно быть локализовано гораздо ближе к внешней поверхности мембраны, чем к внутренней (рис. 38).

Предпринято несколько попыток идентифицировать функциональные группы, участвующие в формировании протон-проводящих путей. С этой целью использовали два подхода: 1) специфическая модификация либо удаление определенных аминокислотных остатков или их замена остатками других аминокислот и 2) измерение состояния функциональных групп аминокислот в интактном белке.

Сведения, полученные с помощью первого подхода, могут быть интерпретированы однозначно, если модификация, удаление или замена остатка аминокислоты не влияют на транспорт H^+ . В таком случае можно с уверенностью считать, что данный аминокислотный остаток не существен для функционирования системы транспорта протонов. Если же измененный бактериородопсин утра-

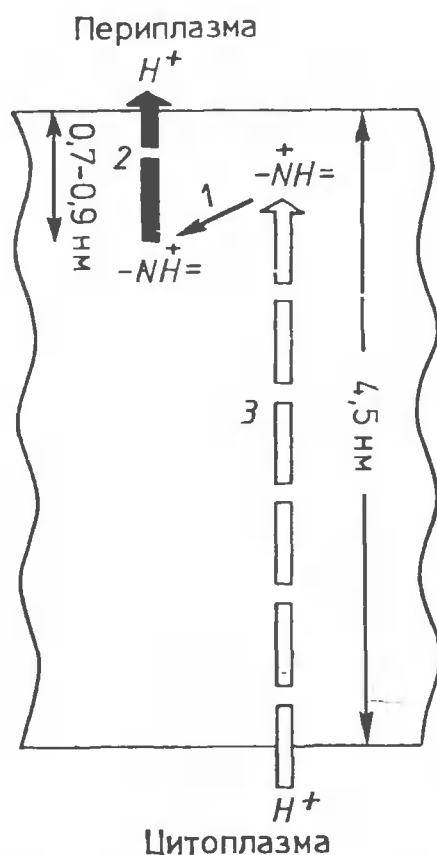


Рис. 38. Бактериородопсин как $\Delta\mu\text{H}$ -генератор:

светозависимая изомеризация ретиналя из полностью транс-формы в 13-цис-форму ведет к перемещению протонированного атома азота шиффова основания от конца входного протон-проводящего пути к началу выходного протон-проводящего пути. Этот процесс происходит в пикосекундной временной шкале (стадия 1). H^+ отщепляется от атома азота шиффова основания и по выходному пути переносится к внешней поверхности мембраны (микросекундная шкала, стадия 2). Затем происходит обратная (13-цис \rightarrow полностью транс-) изомеризация ретиналя и депротонированное шиффово основание возвращается в исходное положение, т. е. к концу входного канала. Там оно протонируется ионом H^+ , перенесенным из цитоплазмы по входному пути (миллисекундная шкала, стадия 3)

как-то влияют на ближайшее окружение шиффова основания. В частности, предполагают, что карбоксильная группа Asp-212 образует солевую связь с протонированным атомом азота шиффова основания (см. уравнение 26).

При рассмотрении возможных вариантов укладки полипептид-

чивает способность перекачивать протоны, то возникает дилемма: либо исследуемый остаток прямо участвует в транспорте H^+ , либо он необходим для поддержания нативной структуры транспортной системы.

Как показали опыты, проведенные нами совместно с Ю. А. Овчинниковым и его коллегами, удаление трех аминокислот с N-конца, 17 аминокислот с C-конца, а также пяти аминокислот (от Met-68 до Gly-72) из гидрофильной связки между α -спиралями B и C не влияет на транспорт протонов и кинетику отдельных электрогенных стадий. Впоследствии это наблюдение было подтверждено Х. Г. Кораной и сотрудниками, которые не только расщепили бактериородопсин на два фрагмента (A—B и C—G), но и препаративно разделили эти фрагменты, а затем реконструировали в протеолипосомах. Полученная система была способна к светозависимому переносу ионов водорода.

При изучении бактериородопсина Х. Г. Корана и сотрудники использовали направленный мутагенез. Сначала был выделен и клонирован ген бактериородопсина. Затем в нем были сделаны замены в единичных кодонах и осуществлен биосинтез модифицированных бактериородопсинов. Выяснили, что замена Lys-216 на остатки аланина или валина предотвращает образование окрашенного продукта из бактериородопсина и ретиналя. Такой же эффект проявили следующие одиночные замены: Asp-212 \rightarrow Asn, Ala-215 \rightarrow Lys, Val-213 \rightarrow Lys и Tyr-185 \rightarrow Phe. Не приходится удивляться, что замена Lys-216, к которому присоединяется ретиналь, делает невозможным образование пигмента. Что касается трех замен вблизи Lys-216, то они, видимо,

ной цепи бактериородопсина не удается избежать ситуации, когда несколько заряженных аминокислотных остатков оказываются в гидрофобной части мембраны. В то же время в комплексе реакционных центров *Rps. viridis* все такие остатки располагаются на поверхностях раздела мембрана/вода (см. разд. 3.1.2). Объяснение такого различия двух $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов может состоять в том, что комплекс реакционных центров переносит через мембрану электрон, а бактериородопсин — протон. Двигаясь поперек мембраны по комплексу реакционных центров, электрон перескакивает с одной простетической группы на другую. В бактериородопсине такого рода эстафетный механизм должен переносить протон. В этом процессе могли бы участвовать заряженные аминокислотные остатки. Действительно, наблюдения, сделанные в лабораториях Б. Хесса и И. Зиберта, свидетельствуют об участии нескольких (предположительно четырех) карбоксильных групп в переносе протонов бактериородопсином.

3.5.6. Другие ретиналь-содержащие белки

Галородопсин. Галородопсин (*hR*) представляет собой ретиналь-содержащий белок, транспортирующий ионы Cl^- из среды в клетку *H. halobium* за счет энергии света. Это мембранный белок с молекулярной массой 27 кДа, т. е. того же порядка, что и у бактериородопсина. По аминокислотным последовательностям два белка различаются примерно на 70%; наибольшее сходство наблюдается в составе α -спиральных колонн, число которых в галородопсине, как и в бактериородопсине, равно семи. Ретиналь присоединяется к галородопсину протонированным шиффовым основаниям.

Фотоцикл галородопсина включает изомеризацию полностью трансретиналя в 13-цисизомер. В процессе фотоцикла шиффово основание постоянно остается протонированным.

Включение галородопсина в протеолипосомы позволяет получить пузырьки, способные к светозависимому транспорту ионов хлора. Будучи сорбированными на плоской бимолекулярной мембране, протеолипосомы генерируют фототок, обусловленный электрогенным транспортом ионов Cl^- .

В мембране галобактерий галородопсин локализован вне пурпурных бляшек. Его насчитывается около 20 тыс. молекул на клетку (примерно в 100 раз меньше, чем бактериородопсина).

Механизм действия галородопсина совершенно неясен. Одна из гипотез предполагает, что Cl^- связывается с положительно заряженным четвертичным азотом протонированного шиффова основания, а изомеризация ретиналя вызывает перемещение этого азота с прикрепленным к нему ионом Cl^- от входного к выходному Cl^- -проводящему пути.

Биологическая функция галородопсина состоит прежде всего в том, чтобы возвращать в клетку ионы Cl^- , электрофоретически

удаляемые из цитоплазмы, которая заряжена отрицательно относительно внешней среды благодаря работе $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов: бактериородопсина и дыхательной цепи. Определенная утечка Cl^- неизбежна, если учесть, что $\Delta\psi$ на мембране галобактерий достигает 200 мВ, а концентрация Cl^- в цитоплазме очень высока (до 4 моль/л).

Галородопсин ответствен за возврат меньшей части теряемых клеткой ионов хлора. Большая их часть возвращается посредством Cl^- , H^+ -симпортера, локализованного в той же мембране. Обе эти системы могут также обеспечивать увеличение количества ионов Cl^- при возрастании объема клетки перед делением.

Сенсорный родопсин и фобородопсин. Галобактерии воспринимают красный свет как аттрактантный сигнал, а синий — как репеллентный. На штамме *H. halobium*, исследованном в лаборатории автора, было показано, что *аттрактантный эффект красного света* достаточно большой интенсивности в основном связан с *протон-транспортной активностью бактериородопсина*. Механизм этого эффекта состоит по всей вероятности в следующем.

На свету бактериородопсин образует $\Delta\mu\text{H}$. Повышение $\Delta\mu\text{H}$ регистрируется клеткой посредством особой $\Delta\mu\text{H}$ -сенсорной системы, названной *протометром*, которая посылает аттрактантный сигнал H^+ -моторам жгутиков.

Таким образом, бактериородопсин, не являясь специализированным фотосенсором, тем не менее участвует в восприятии света как аттрактантного стимула, если интенсивность света достаточно велика, чтобы привести в действие большое количество молекул бактериородопсина. Неудивительно поэтому, что выключение не зависящих от света $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов (дыхания — цианидом, H^+ -АТФазы — ДЦКД) резко увеличивает ответ галобактерий на интенсивный аттрактантный свет. Этот эффект отсутствует у штамма, лишённого бактериородопсина.

Аттрактантное и репеллентное действие низких интенсивностей света обеспечивают другие механизмы. Роль фотосенсоров в этом случае выполняют ретиналь-содержащие пигменты, названные *сенсорным (или медленным) родопсином (sR)* и *фобородопсином (pR)*. Сенсорный родопсин имеет максимум поглощения при 590 нм, который сдвигается к 370 нм под действием света, вызывающего переход полностью трансретиналя в 13-цисретиналь. Освещение sR_{370} вызывает регенерацию формы sR_{590} . В темноте это превращение также происходит, но требует около 1 с, что примерно в 100 раз дольше, чем аналогичный процесс в бактериородопсине и галородопсине. По-видимому, образование долгоживущего продукта необходимо для того, чтобы включить цепь событий, приводящих к усилению аттрактантного сигнала.

Как показали опыты, слабый длинноволновый свет сенсibiliзирует клетки *H. halobium* к репеллентному действию коротковолнового света. Этот эффект был объяснен в рамках схемы, прини-

мающей, что sR_{370} , получающийся из sR_{590} , служит сенсором синего света.

Дальнейшие исследования показали, что галобактерии располагают четвертым ретиналь-содержащим белком, не идентичным bR , hR и sR и участвующим наряду с sR в осуществлении репеллентного эффекта коротковолнового света. Его спектральный максимум располагается при 480 нм. Пигмент, названный фобородопсином (pR), при освещении превращается в интермедиаты с максимумом при 450 и 360 нм.

Последний живет около 0,5 с. Вероятно, он и посылает репеллентный сигнал в систему таксиса. Интересно, что все четыре ретиналь-содержащих белка *H. halobium* используют один и тот же первичный светозависимый механизм: полностью транс→13-цис-изомеризацию ретиналя.

Концентрация и локализация sR и, по-видимому, pR в мембране подобны таковым для hR : это минорные компоненты, находящиеся в тех областях мембраны, где нет бактериородопсина. Одна клетка содержит около 5 тыс. молекул sR и pR .

Как показали расчеты, сенсорный родопсин должен быть связан с какой-то мощной системой усиления сигнала, поскольку для аттрактантного эффекта достаточно 20 квантов света, а для репеллентного — 1—2 кванта.

Родопсин животных. Родопсин животных, или *зрительный родопсин*, открытый за сто лет до бактериального, служит светочувствительным пигментом фоторецепторных клеток глаза. Он ответствен за поглощение световых квантов и включение системы обработки светового сигнала.

Родопсин быка содержит 348 аминокислотных остатков, что на сто остатков больше, чем у бактериородопсина. Аминокислотная последовательность этого белка, расшифрованная Ю. А. Овчинниковым и сотрудниками, резко отличная от таковой бактериородопсина, тем не менее хорошо подходит для формирования структуры с семью α -спиральными колоннами, пронизывающими мембрану. Семь гидрофобных последовательностей той же протяженности, что и в бактериородопсине, связаны гидрофильными последовательностями разной длины. Дополнительные сто аминокислот, упомянутые выше, локализованы в более длинных, чем у бактериородопсина, концевых последовательностях, а также в связках между колоннами. Особенно велика петля между пятой и шестой колоннами.

Кроме «семиколонной» организации мембранной части белка родопсины бактерий и животных имеют целый ряд общих структурных особенностей: 1) N- и C-концы полипептидной цепи находятся по разные стороны мембраны; 2) N-конец блокирован; 3) ретиналь присоединен к белку через ϵ -аминогруппу остатка лизина (у родопсина животных это *Lys-296*), локализованного в ближайшей к C-концу (седьмой) α -спирали (однако в родопсине животных в отличие от бактериального ретиналь расположен, по-

видимому, ближе к цитоплазматической поверхности мембраны); 4) шиффово основание в темноте протонировано и т. д.

Первые этапы фотоцикла в двух родопсинах также подобны. В обоих случаях были описаны следующие последовательные спектральные сдвиги: 1) очень быстрый (пикосекунды) длинноволновый сдвиг; 2) его обращение в микросекундной шкале и 3) более медленный сдвиг в коротковолновую область спектра. Как в бактериальном, так и в животном родопсинах происходит светозависимая изомеризация ретиналя, однако вместо полностью транс→13-цисизомеризации, описанной у галобактерии, в случае зрительного пигмента наблюдается переход из 11-цис в полностью трансформу.

Животный родопсин, подобно бактерио- и галородопсину, оказался способным к генерации $\Delta\psi$ за счет энергии света.

Функциональные различия пигментов животных и бактерий связаны главным образом с судьбой коротковолнового интермедиата (*MII* или *M₄₁₂*).

1. Образование этого интермедиата, в обоих случаях сопровождающееся депротонированием шиффова основания, приводит к выделению H^+ в воду бактериальным (но не животным) родопсином.

2. В случае животного родопсина интермедиат *MII* «живет» несколько минут. Время жизни бактериородопсинового *M₄₁₂* измеряется миллисекундами.

3. *MII* не может спонтанно превращаться в исходную форму родопсина. Он распадается на свободный полностью трансретиналь и опсин, который требует 11-цисретиналя, чтобы регенерировать родопсин.

4. Родопсин, превратившись в *MII*, приобретает способность специфически взаимодействовать с другим белком, названным *трансдуцином*.

Такое взаимодействие приводит к замене ГДФ, связанного с трансдуцином, на ГТФ, что вызывает следующие процессы. Комплекс трансдуцин·ГТФ активирует фосфодиэстеразу, расщепляющую цГМФ.

В результате снижается концентрация цГМФ и закрываются Na^+ -каналы плазматической мембраны, требующие цГМФ в качестве активатора. Закрытие каналов повышает сопротивление этой мембраны, что в свою очередь ведет к повышению $\Delta\psi$. Последняя постоянно генерируется Na^+/K^+ -АТФазой.

При работе этой системы происходит «размножение» светового сигнала: 1) одна молекула долгоживущего интермедиата *MII* способна заменить ГДФ на ГТФ в сотнях молекул трансдуцина; 2) одна молекула активного тройного комплекса фосфодиэстераза·трансдуцин·ГТФ успевает расщепить сотни молекул цГМФ, пока связанный ГТФ не гидролизуется до ГДФ и фосфата, что приведет к распаду комплекса. Приняв во внимание все эти обстоятельства, можно объяснить, каким образом клетке палочки

удаётся отвечать возбуждением на такую минимальную порцию световой энергии, как одиночный фотон.

Однако усиление сигнала становится ненужным и даже вредным, когда световой сигнал содержит не один, а, например, 10^5 фотонов. В этом случае более адекватной была бы система, линейно отвечающая на изменение светового потока. Проблема могла бы быть решена, если допустить, что не способность включать трансдуциновый каскад, а какая-то иная активность родопсина участвует в восприятии света большой интенсивности.

В этой связи следует отметить, что электрический потенциал, генерируемый молекулами родопсина, которые локализованы в плазматической мембране фоторецепторной клетки, оказывается того же направления, что и генерируемый Na^+/K^+ -АТФазой (знак «—» в цитоплазме). Это означает, что электрогенная активность родопсина должна повышать $\Delta\psi$ на плазматической мембране.

Подобный эффект качественно сходен с таковым при закрытии Na^+ -каналов. Поэтому представляется в принципе возможным, что сильное повышение освещенности может быть воспринято фоторецепторной клеткой без участия каких-либо вторичных медиаторов, а просто как результат гиперполяризации плазматической мембраны благодаря генерации $\Delta\psi$ родопсином. При этом следует помнить, что родопсин в отличие от бактериородопсина — *фотоэлектрический генератор однократного действия*, поскольку поглощение кванта приводит к его превращению в опсин и ретиналь. Поэтому возбуждение фоторецепторной клетки за счет электрогенной активности родопсина должно происходить прежде всего в ответ на внезапное и сильное повышение освещенности.

3.6. Первичные $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторы: заключение

В гл. 3 были рассмотрены первичные $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторы, ответственные за извлечение энергии из внешних ресурсов и ее превращение в конвертируемую форму. В табл. 5 перечислены все известные устройства такого рода и приведены классификация живых систем, использующих первичные $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторы.

К типу 1 отнесены системы, получающие энергию посредством светозависимого циклического переноса восстановительных эквивалентов. В состав редокс-цепи входят два $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератора: бактериальный комплекс реакционных центров и CoQ -цитохром c -редуктаза. Генераторы локализованы в мембране хроматофоров и в цитоплазматической мембране бактерий-фотосинтетиков. В тех же мембранах содержится НАДН- CoQ -редуктаза, которая на свету действует как потребитель $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, катализируя обратный перенос электронов к НАДН от субстратов с более положительным редокс-потенциалом. В темноте тот же фермент участвует в генерации $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, сопряженной с переносом электронов в прямом на-

правлении — от НАДН к KoQ и далее к кислороду. Наиболее изученными примерами данного типа энергетики служат пурпурные бактерии *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides* и *Rhodopseudomonas viridis*.

К *типу 2* относятся зеленые бактерии, у которых обнаружена простейшая система нециклического светозависимого переноса электронов. Есть основания предполагать, что механизм генерации $\Delta\mu\text{H}$ у этих бактерий напоминает таковой в фотосистеме II хлоропластов. Остается открытой проблема, каким образом зеленые бактерии образуют $\Delta\mu\text{H}$ в темноте.

Энергетика *типа 3* присуща тилакоидам хлоропластов и цианобактерий. В обоих случаях происходит нециклический перенос восстановительных эквивалентов от H_2O к НАДФ^+ . В редокс-цепи идентифицированы три $\Delta\mu\text{H}$ -генератора: фотосистема I, фотосистема II и PQH_2 -пластоцианин-редуктаза, гомологичная KoQH_2 -цитохром *c*-редуктазе.

Типу 4 соответствуют типичные митохондрии животных, растений и грибов. Здесь представлен полный набор $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов дыхательной цепи, включенной между НАДН и O_2 . Подобная цепь, по-видимому, есть и у некоторых дышащих бактерий, например у *Paracoccus denitrificans*. Однако чаще бактериальные цепи устроены проще, включая либо меньшее число $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов, либо упрощенные аналоги митохондриальных $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов, характеризующиеся сниженной эффективностью. Так, у *E. coli* (тип 5) дыхательная цепь, окисляющая НАДН молекулярным кислородом, характеризуется меньшим соотношением H^+/O , чем цепь митохондрий или *P. denitrificans*.

В дыхательной цепи *E. coli* некоторые $\Delta\mu\text{H}$ -генераторы либо вовсе отсутствуют, либо, появляясь при определенных условиях роста бактерий, транспортируют через мембрану меньше протонов на каждый перенесенный электрон, чем их митохондриальные аналоги.

Сокращение редокс-цепи неизбежно при жизни в природных анаэробных нишах, поскольку конечный этап дыхания — потребление кислорода — здесь невозможен. Примером сокращенных цепей, включающих только один (первый) $\Delta\mu\text{H}$ -генератор, могут быть анаэробные бактерии, восстанавливающие фумарат, и митохондрии имаго аскариды (тип 6).

Энергетика *типа 8* присуща *Thiobacillus ferrooxidans* и некоторым другим бактериям, окисляющим субстраты с положительным редокс-потенциалом. Чтобы образовать $\Delta\mu\text{H}$, здесь используется только цитохромоксидазный генератор, так как субстрат не может восстановить начальные и средние сегменты дыхательной цепи. $\Delta\mu\text{H}$ -Генераторы, локализованные в этих сегментах, действуют как потребители $\Delta\mu\text{H}$, производя обратный перенос восстановительных эквивалентов от донора электронов, например Fe^{2+} , к НАД(Ф)^+ .

Особый случай — энергетика *Halobacterium halobium*, где обнаружен бактериородопсин — светозависимый протонный насос (тип 9). У этих бактерий дыхательной цепью в темноте образуется $\Delta\mu$. Количество $\Delta\mu$ Н-генераторов в цепи *H. halobium* остается неизвестным.

Типом 7 в табл. 5 обозначена энергетическая система, использующая *KoQ*-цитохром *c*-редуктазу в качестве единственного механизма генерации $\Delta\mu$ Н. Автор предполагает, что гипотетический организм (бактерия?), относящийся к типу 7, окисляет субстрат с редокс-потенциалом около нуля (например, сукцинат) каким-либо акцептором электронов с редокс-потенциалом около +0,3 В. Другой возможный представитель энергетической системы типа 7 — это аэроб, использующий только средний участок цепи для генерации $\Delta\mu$ Н, тогда как начальные и конечные сегменты пред-

Таблица 5. Классификация протонной энергетики по типам $\Delta\mu$ Н-генераторов

Типы энергетических	Представители	Типы $\Delta\mu$ Н-генераторов						
		светозависимые				темновые		
		комплекс бактериальных реакционных центров	фотосистема I	фотосистема II	бактериородопсин	НАДН-Q-редуктаза	<i>KoQ</i> H ₂ -цитохром- <i>c</i> -редуктаза	цитохром-оксидаза
1	Пурпурные фотосинтезирующие бактерии	+	—	—	—	+	+	?
2	Зеленые бактерии	—	+	—	—	?	?	?
3	Тикалоиды растительных хлоропластов и цианобактерий	—	+	+	—	—	+ ³	—
4	Митохондрии животных, растений и грибов, <i>Paracoccus denitrificans</i>	—	—	—	—	+	+	+
5	<i>E. coli</i>	—	—	—	—	+ ¹	—	+ ⁴
6	Бактерии, восстанавливающие фумарат; митохондрии аскариды	—	—	—	—	+	—	—
7	?	—	—	—	—	—	+	—
8	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrosomonas europaea</i>	—	—	—	—	+ ²	+ ²	+
9	<i>Halobacterium halobium</i>	—	—	—	+	?	?	?

¹ Действует с 50%-ной эффективностью.

² Действуют как потребители $\Delta\mu$ Н, ответственные за обратный перенос восстановительных эквивалентов.

³ *RQH*₂-Пластоцианин-редуктаза.

⁴ *KoQH*₂-Оксидаза.

ставлены ферментами свободного (несопряженного) переноса электронов.

Из материала этой главы становится ясно, что генерация $\Delta\bar{\mu}H$ является следствием переноса протонов или электронов через гидрофобный барьер мембраны. В большинстве исследованных в этом аспекте $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов трансмембранное разделение зарядов организовано таким образом, что часть расстояния покрывается электроном, а часть — протоном, движущимся в противоположную сторону. Явным исключением из этого правила служит бактериородопсин, где протон пересекает всю толщу мембраны.

В бактериальных реакционных центрах перенос электрона обеспечивает запасание около 95% аккумулируемой энергии, а перенос протона — всего около 5%. Видимо, подобная ситуация характерна также для фотосистем I и II хлоропластов и цианобактерий.

В $KoQH_2$ -цитохром *c*-редуктазе приблизительно 40% пути проходит, по всей вероятности, электрон, перемещающийся с гема b_L на гем b_H . Если это так, то на долю протона остается около 60% толщины мембраны. Подобные соотношения, по-видимому, характерны и для цитохромоксидазного генератора.

Наиболее неопределенной остается проблема механизма генерации $\Delta\bar{\mu}H$ НАДН- KoQ -редуктазой. Кажется вероятным, что по крайней мере часть пути здесь проходит протон. В противном случае пришлось бы постулировать, что часть переносчиков электронов этого звена дыхательной цепи находится на внутренней, а часть — на внешней стороне мембраны митохондрий. В действительности, на наружной поверхности таких центров выявить не удается.

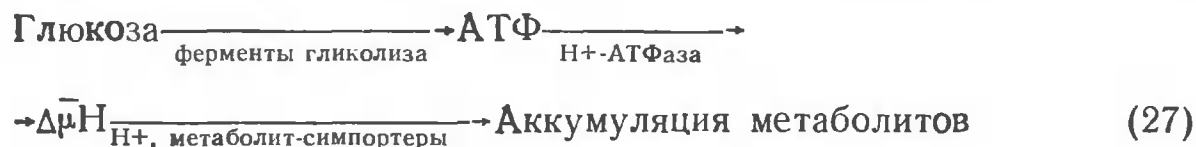
H^+ -АТФазы- вторичные $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы

4

4.1. Определение и классификация

Все $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы, описанные в предыдущей главе, используют энергию света или дыхания, чтобы образовать *протонный потенциал*. АТФ не участвует в этом процессе. В настоящей главе будет рассмотрен другой случай, когда путь от использования энергетических ресурсов к $\Delta\bar{\mu}H$ оказывается более сложным: энергия сначала превращается в АТФ и лишь затем используется для генерации $\Delta\bar{\mu}H$ посредством H^+ -АТФаз. Последние могут быть объединены термином «вторичные $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы».

Как правило, H^+ -АТФазы оказываются необходимыми, когда ни свет, ни энергия дыхания не доступны для мембраны, совершающей некоторую работу, связанную с расходом $\Delta\bar{\mu}H$. Примером такой системы могут быть анаэробные бактерии, получающие энергию *гликолитическим путем*. У таких бактерий АТФ, образованный ферментами гликолиза, может утилизироваться H^+ -АТФазой, находящейся в цитоплазматической мембране. $\Delta\bar{\mu}H$, генерируемая H^+ -АТФазой, используется для совершения *осмотической работы*: аккумуляции метаболитов при участии H^+ , метаболит-симпортеров.



Формально любой фермент, способный генерировать $\Delta\bar{\mu}H$ за счет энергии АТФ, может рассматриваться как H^+ -АТФаза. H^+ -АТФ-синтаза, обычно используемая для образования АТФ за счет энергии $\Delta\bar{\mu}H$, обладает H^+ -АТФазной активностью, т. е. может гидролизовать АТФ и создавать $\Delta\bar{\mu}H$. По этой причине данный фермент часто называют H^+ -АТФазой. Однако, по нашему мнению, более уместно употреблять название « H^+ -АТФаза» только

в тех случаях, когда основной биологической функцией фермента служит *гидролиз, а не синтез АТФ*.

Введя такое ограничение, к H^+ -АТФазам можно будет отнести несколько ферментов, отличающихся по структуре и механизму действия, но имеющих общую функцию.

Описаны H^+ -АТФазы, состоящие из нескольких белковых субъединиц с массами не более 65 кДа. Комплекс может быть легко разделен на два субкомплекса: протон-проводящий фактор F_0 и каталитический фактор F_1 . Гидролиз АТФ ферментами этого типа происходит без образования фосфорилированных интермедиатов. К этому типу АТФаз, определяемых как F_0F_1 -АТФаза, относится H^+ -АТФаза некоторых строго анаэробных бактерий. Следует отметить, что все перечисленные свойства присущи также H^+ -АТФ-синтазе митохондрий, хлоропластов, хроматофоров и цитоплазматических мембран дышащих или фотосинтезирующих бактерий (см. разд. 5.1.1).

Другие H^+ -АТФазы представляют собой очень длинный полипептид (порядка 100 кДа), которому может сопутствовать меньшая субъединица, имеющая скорее регулярные, чем каталитические функции. Реакция начинается с фосфорилирования одного из остатков аспартата большой субъединицы, что вызывает ее конформационный переход, обозначаемый $E_1 \rightarrow E_2$. Этот переход, видимо, сопровождается снижением свободной энергии гидролиза фосфориласпартата. Последующее дефосфорилирование фермента регенерирует исходную форму E_1 . Описанный механизм подобен такому Na^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы (см. разд. 7.1.3 и 7.6). E_1E_2 -АТФазы описаны для внешних клеточных мембран растений и грибов. Такая же структура обнаружена у H^+/K^+ -АТФазы эпителия желудка.

Недавно установлено, что существует *еще один тип H^+ -АТФаз, отличный как от F_0F_1 , так и от E_1E_2* . Его примером может быть H^+ -АТФаза тонопласта — мембраны, ограничивающей вакуоли клеток растений и грибов. Возможно, к тому же типу H^+ -АТФаз следует отнести ферменты, обнаруженные в мембранах секреторных пузырьков, эндосом и лизосом, а также аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и внешней клеточной мемbrane некоторых тканей животных.

Кроме роли H^+ -АТФаз в совершении осмотической работы, следует отметить еще одну их функцию, а именно *регуляцию внутриклеточного рН*.

В мембранах, содержащих H^+ -АТФ-синтазу, генерация $\Delta\mu\bar{H}$ за счет гидролиза АТФ может быть следствием обращения реакции, катализируемой этим ферментом. Такой эффект наблюдается, например, у некоторых бактерий, использующих как энергию дыхания или света, так и энергию гликолиза. Если такие бактерии подвижны, то $\Delta\mu\bar{H}$, образованная за счет гликолитического АТФ, может использоваться наряду с транспортом метаболитов и pH -ре-

гуляцией для совершения механической работы, т. е. вращения жгутика.

Список вторичных $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов приведен в табл. 6. В этой главе будут рассмотрены H^+ -АТФазы. АТФазная активность H^+ -АТФ-синтаз разобрана в следующей главе (см. разд. 5.1.1).

4.2. H^+ -АТФазы облигатно анаэробных бактерий

H^+ -АТФаза бактерий (облигатных анаэробов) представляет собой некоторый вариант ферментов F_0F_1 -типа, действующих в качестве АТФ-синтазы в митохондриях, хлоропластах, дышащих и фотосинтезирующих бактериях.

Наиболее изученным объектом такого рода является *Lactobacillus casei*. В опытах на целых клетках было найдено, что гликолизующая *L. casei* генерирует мембранный потенциал, который снимается протонофорами или ДЦКД (гидрофобным реагентом на протонированные карбоксильные группы). $\Delta\psi$, искусственно созданная за счет выхода из бактерий ионов K^+ в присутствии валиномицина, в течение некоторого времени поддерживает синтез АТФ. Этот синтез также чувствителен к протонофорам и ДЦКД.

На вывернутых суббактериальных частицах *L. casei* было показано, что гидролиз АТФ тормозится ДЦКД.

Электронно-микроскопический анализ очищенного фактора F_1 из *L. casei* показал, что шесть субъединиц образуют правильную двухслойную структуру с тремя субъединицами в каждом слое. Похожая структура была обнаружена при изучении митохондриального фактора F_1 (см. разд. 5.1.1).

Из мембран *L. casei*, лишенных фактора F_1 , был изолирован фактор F_0 и встроен в протеолипосомы. После реконструкции с очищенным фактором F_1 протеолипосомы демонстрировали взаимопревращение АТФ- $\Delta\mu\text{H}$, чувствительное к ДЦКД и разобщителям.

По молекулярной массе, субъединичному составу, трехмерной структуре и чувствительности к ингибиторам АТФаза *L. casei* явно отличается от АТФаз E_1E_2 -типа. В частности, ванадат и гидроксиламин, тормозящие все известные E_1E_2 -АТФазы на стадии фосфорилированного фермента, никак не влияют на АТФазу из *L. casei*.

Указание на то, что H^+ -АТФаза строгих анаэробов напоминает F_0F_1 , но имеет более простой набор субъединиц, было получено Дж. Кларком и сотрудниками, изучавшими *Clostridium pasteurianum*.

Проведенное Ф. М. Харольдом и сотрудниками исследование H^+ -АТФазы факультативного анаэроба *Streptococcus faecalis* выявило субъединичный состав фактора F_1 , обычный для дышащих и фотосинтезирующих бактерий. Возможно, что *S. faecalis*

Таблица 6. Вторичные $\Delta\mu\text{H}$ -генераторы

Фермент	Локализация	Механизм	Функции, поддерживаемые образованной $\Delta\mu\text{H}$
H^+ -АТФаза	Цитоплазматическая мембрана облигатно анаэробных бактерий	F_0F_1	Накопление веществ; регуляция рН в клетке
»	Внешняя мембрана растений и грибов	E_1E_2	То же
»	Тонопласт растений и грибов	Отличный от F_0F_1 и E_1E_2	Накопление веществ в вакуоли; регуляция рН
»	Внешняя мембрана клеток некоторых животных	?	Секреция H^+ ; накопление веществ в клетке
»	Мембраны секреторных пузырьков, эндосом, лизосом, аппарата Гольджи; мембрана эндоплазматического ретикулума	?	Накопление веществ и регуляция рН в пузырьках
H^+ -АТФ-синтаза (обращенная)	Цитоплазматическая мембрана дышащих или фотосинтезирующих бактерий	F_0F_1	Накопление веществ и регуляция рН в клетке, вращение флагелл в отсутствие O_2 и света
»	Внутренняя мембрана митохондрий	»	Транспорт веществ в митохондрии в отсутствие O_2
H^+/K^+ -АТФаза	Внешняя мембрана клеток эпителия желудка	E_1E_2	Секреция H^+

представляет собой пример вторичного анаэроба, т. е. бактерии, первоначально жившей в аэробных условиях, а затем перешедшей в бескислородную нишу.

4.3. H^+ -АТФаза внешней клеточной мембраны растений и грибов

Во внешней клеточной мембране растений и грибов (плазмалемме) находится фермент, откачивающий ионы H^+ из клетки за счет энергии АТФ. Транспорт H^+ носит электрогенный характер. H^+ -АТФаза, о которой идет речь, относится к E_1E_2 -типу. В процессе реакции возникает аспартилфосфатный интермедиат, чувствительный к ванадату и гидроксиламину. Ингибиторами служат также диэтилстильбэстрол и ДЦКД.

Очистка H^+ -АТФазы показала, что это одиночный полипептид с массой несколько больше 100 кДа. Его содержание во внешней мембране достигает 15% от общего количества белка. Первичная структура и упаковка в мембране остаются неизвестными.

Механизм реакции H^+ -АТФазы внешней мембраны, по-видимому, аналогичен таковому других E_1E_2 -АТФаз (см. разд. 7.1.3).

H⁺-АТФазы из мембран грибов и растений были реконструированы в протеолипосомы. В этой системе была показана обратимость гидролиза АТФ, когда $\Delta\psi$, искусственно созданная диффузией K⁺, использовалась для синтеза АТФ.

Используя микроэлектроды, удалось прямо измерить вольт-амперные характеристики H⁺-АТФазы плазмалеммы клеток *Neurospora crassa*. Полученные данные сопоставили с результатами измерения ΔpH и свободной энергией гидролиза АТФ, чтобы рассчитать отношение H⁺/АТФ. Оно оказалось близко к 1, повышаясь до 2 в условиях протонного контроля.

Определенный биологический смысл имеет, видимо, то обстоятельство, что H⁺-АТФаза внешней мембраны характеризуется оптимумом pH между 6 и 7. При pH выше 7,0 активность фермента резко падает. Создается впечатление, что H⁺-АТФаза, откачивая ионы H⁺ из цитоплазмы, используется клеткой, чтобы предотвратить закисление внутриклеточного объема. Вероятно, *регуляция внутреннего pH* есть одна из функций H⁺-АТФазы плазмалеммы. В то же время очевидна и другая функция этого фермента: образующая им $\Delta\mu H$ используется для *концентрирования в клетке различных веществ*, которые транспортируются туда вместе с протонами (см. разд. 5.2).

4.4. H⁺-АТФаза тонопласта

Тонопласт — мембрана, ограничивающая вакуоли в клетках растений и грибов. Известно, что между вакуолью и цитозолем существуют градиенты pH, ионов и метаболитов. Недавно в тонопласте была *идентифицирована особая H⁺-АТФаза*, создающая $\Delta\mu H$ как движущую силу транспорта веществ в сторону большей их концентрации. Центр связывания АТФ этой АТФазой обращен в цитозоль.

Показано, что изолированные вакуоли способны к электрогенному поглощению ионов H⁺, сопряженному с гидролизом АТФ. Транспорт H⁺ и АТФазная активность подавляются уникальным набором ингибиторов, включающим нитрат, N-этилмалеимид, триалкил-олово и высокие концентрации ДЦКД. Олигомицин и ДЦКД (ингибиторы митохондриальной H⁺-АТФ-синтазы) в низких концентрациях не влияют на H⁺-АТФазу тонопласта. Она не тормозится диэтилстильбэстроном, блокирующим H⁺-АТФ-синтазу митохондрий и H⁺-АТФазу внешней клеточной мембраны растений и грибов; не влияет на нее и ванадат. Ферменты митохондрий животных, хлоропластов и плазмалеммы, способные расщеплять АТФ, в отличие от АТФ-азы тонопласта не тормозятся нитратом. В то же время H⁺-АТФ-синтаза растительных митохондрий чувствительна к нитрату. H⁺-АТФаза тонопластов была выделена и встроена в протеолипосомы.

По специфичности в отношении субстрата и двухвалентного катиона-активатора H^+ -АТФаза тонопласта отличается от таковой плазмалеммы и аналогична H^+ -АТФ-синтезе митохондрий. Дополнительная общая черта тонопластной и митохондриальных систем была выявлена Э. Боумэном, идентифицировавшим в H^+ -АТФазе тонопласта сравнительно небольшую белковую субъединицу, ковалентно связывающую ДЦКД.

Однако по некоторым свойствам тонопластная H^+ -АТФаза отличается от митохондриальной. Так, она имеет другой оптимум рН. Фермент состоит из нескольких субъединиц массами от 90 до 9 кДа.

4.5. Немитохондриальные H^+ -АТФазы клеток животных

4.5.1. H^+ -АТФаза хромаффинных гранул

Первым достаточно подробно охарактеризованным ферментом этого класса оказалась H^+ -АТФаза из внутриклеточных пузырьков, накапливающих катехоламины в клетках мозгового слоя надпочечников. Пузырьки, названные *хромаффинными гранулами*, содержат огромные количества адреналина и норадреналина, концентрация которых в гранулах (0,55 моль/л) превосходит таковую в цитозоле в 25 000 раз. Катехоламины — основные по количеству катионы хромаффинных гранул. Противоионом для них является АТФ, концентрация которого внутри пузырьков превышает 0,1 моль/л. Существуют данные о том, что катехоламины и АТФ служат симпатическими котрансммитерами, взаимодействующими с различными рецепторами.

Аккумуляция катехоламинов внутри хромаффинных гранул опосредована антипортером, обменивающим два иона H^+ изнутри гранул на один катион катехоламина снаружи. *Движущей силой процесса оказывается $\Delta\mu H$, генерируемая H^+ -АТФазой*, которая переносит H^+ извне внутрь пузырьков. Эта АТФаза состоит из субъединиц следующих четырех основных типов: 115, 72, 57 и 39 кДа. Тяжелая субъединица содержит, по-видимому, каталитический центр фермента, причем один функциональный комплекс включает не менее четырех таких субъединиц.

Исследование на протеолипосомах показало, что H^+ -АТФаза катализирует электрогенный транспорт H^+ . АТФаза нечувствительна к олигомицину и требует для торможения в 50 раз большие количества ДЦКД, чем H^+ -АТФ-синтаза митохондрий. Объектом атаки ДЦКД оказалась тяжелая субъединица. Отделение ее от мембраны десенсибилизировало АТФазу в отношении ДЦКД. Ванадат, блокирующий E_1E_2 -АТФазы, не влиял на H^+ -АТФазу хромаффинных гранул, хотя она была чрезвычайно чувствительна к N-этилмалеимиду — реагенту на SH-группы.

4.5.2. Другие H^+ -АТФазы

Различные типы животных клеток используют H^+ -АТФазы, чтобы образовать $\Delta\mu H$ и накапливать в особых пузырьках экскрет (гормоны, нейротрансмиттеры и т. д.) перед его выделением из клетки. Такой механизм продемонстрирован, кроме катехоламинов, для серотонина в тромбоцитах, ацетилхолина в синаптических пузырьках, группы гормонов в гипофизе и инсулина в поджелудочной железе.

Кроме того, H^+ -АТФаза описана в лизосомах, эндосомах, окаймленных пузырьках и внешней мембране клеток некоторых тканей животных (почках и мочевом пузыре). Существуют данные о функционировании H^+ -АТФаз в плазматической мембране клеток мозга и асцитных клетках Эрлиха, а также в мембранах аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума.

Перечисленные выше АТФазы обладают некоторыми свойствами, напоминающими H^+ -АТФазу тонопласта. Они устойчивы к олигомицину, ванадату и диэтилстильбэстролю; чувствительны к ДЦКД (как правило, в больших концентрациях, чем H^+ -АТФ-синтаза митохондрий); чувствительны к N -этилмалеимиду. Однако действующие концентрации N -этилмалеимида в случае H^+ -АТФаз животных тканей оказываются гораздо меньшими, чем для фермента тонопласта. Кроме того, тонопластная H^+ -АТФаза полностью тормозится нитратом, в то время как «животные» H^+ -АТФазы устойчивы к действию этого аниона. Необходимы структурные исследования, чтобы ответить на вопрос, являются ли H^+ -АТФазы животных тканей родственными таковой тонопласта.

4.5.3. H^+/K^+ -АТФаза слизистой желудка

Особая АТФаза, образующая $\Delta\mu H$, была обнаружена во внешней мембране клеток слизистой желудка. Фермент осуществляет электронейтральный обмен внутриклеточного H^+ на внешний K^+ , тем самым закисляя среду в желудке. Он был назван H^+/K^+ -АТФазой. H^+/K^+ -АТФаза очищена и реконструирована в протеолипосомы.

Установлено, что H^+/K^+ -АТФаза принадлежит к E_1E_2 -типу; фермент содержит полипептид массой около 100 кДа; гидролитическая реакция протекает с образованием фосфорилированного интермедиата; активность тормозится ванадатом и гидроксиламином. В то же время структуре H^+/K^+ -АТФазы присуща специфическая особенность. Этот фермент, по-видимому, построен из трех подобных, но неидентичных субъединиц с молекулярными массами порядка 100 кДа.

Механизм работы H^+/K^+ -АТФазы состоит в следующем. Комплекс K^+ и фермента в E_1 -конформации связывает АТФ и H^+ на цитоплазматической поверхности плазмалеммы, окружающей клетку слизистой эпителия желудка. При этом K^+ высвобождается в цитоплазму. В тройном комплексе $E_1 \cdot \text{АТФ} \cdot H^+$ фосфорил с АТФ переносится на одну из карбоксильных групп фермента. В результате

образуется интермедиат $E_1 \sim P \cdot H^+$. Затем происходит конформационный переход ($E_1 \rightarrow E_2$), сопровождающийся переброской иона H^+ через гидрофобный барьер мембраны. Полученный комплекс $E_2-P \cdot H^+$ не способен фосфорилировать АДФ. Замена H^+ , связанного с E_2-P , на внеклеточный K^+ приводит к выделению H^+ , который оказывается в просвете желудка. Кроме того, связывание иона K^+ вызывает гидролиз E_2-P . Следующий за этим переход $E_2 \rightarrow E_1$ завершает цикл. Недавно аналогичный фермент был описан в эпителии толстой кишки.

4.6. Соотношение функций H^+ -АТФаз

Как уже отмечалось в разд. 4.1, H^+ -АТФазы обычно выполняют две основные функции: энергизацию мембраны и создание нужного рН в одном из двух отсеков, разделенных мембраной.

У анаэробных бактерий, живущих за счет гликолиза, АТФ гидролизуется H^+ -АТФазой, чтобы образовать $\Delta\bar{\mu}H$ и затем использовать ее при аккумуляции веществ среды внутрь клетки.

В то же время нельзя не учитывать роль H^+ -АТФазы, откачивающей ионы H^+ из клетки, в «борьбе» с закислением цитоплазмы, тенденция к которому всегда существует в бактериях-анаэробах, сбраживающих нейтральные сахара до кислых конечных продуктов. Последняя функция присуща также и H^+ -АТФазе плазмалеммы растений и грибов, которая активируется при падении цитоплазматического рН ниже 7,0. По-видимому, при кислых рН не генерация $\Delta\bar{\mu}H$ для совершения осмотической работы, а *откачка протонов становится ведущей функцией этой H^+ -АТФазы.*

Функцией группы H^+ -АТФаз животных тканей является *закисление среды внутри пузырька*. Именно это происходит в лизосомах, эндосомах и, может быть в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме. В этих случаях $\Delta\psi$, генерируемая H^+ -АТФазой, превращается в ΔpH посредством электрофоретической аккумуляции какого-либо аниона, например Cl^- . В лизосомах закисление внутренней среды создает оптимальный рН для работы литических ферментов. По сути дела, лизосомальные ферменты не активны при нейтральных рН, типичных для цитозоля. В результате компоненты цитозоля не могут быть переварены каким-либо лизосомальным ферментом, даже если он выйдет из лизосомы. Вероятно, кислый рН необходим также для работы эндосом и некоторых других цитоплазматических включений, располагающих H^+ -АТФазами.

Иную роль играют H^+ -АТФазы плазматических мембран некоторых типов клеток в почках и эпителии мочевого пузыря. Они участвуют в *трансклеточном переносе кислотных эквивалентов*. Для выполнения этой функции также необходим переход $\Delta\psi \rightarrow \Delta pH$. В случае H^+/K^+ -АТФазы слизистой желудка, тоже специализированной на функции транспорта кислотных эквивалентов, проблема решается за счет электронейтрального эквивалентного обмена H^+ на K^+ .

По-видимому, эта АТФаза переносит только один ион H^+ на каждую молекулу АТФ, что открывает возможность создания очень больших (согласно термодинамическим расчетам, до 7 единиц рН) градиентов концентрации водородных ионов между цитоплазмой и внеклеточной средой.

В хромаффинных гранулах и некоторых других секреторных пузырьках $\Delta\mu H$ -генерирующая функция H^+ -АТФазы является ведущей, так как аккумуляция секретируемых веществ поддерживается энергией протонного потенциала.

Потребители $\Delta\bar{\mu}H$

5.1. Химическая работа за счет $\Delta\bar{\mu}H$

Описано пять ферментных систем, которые можно рассматривать в качестве потребителей $\Delta\bar{\mu}H$, совершающих химическую работу: H^+ -АТФ-синтаза; H^+ -пирофосфат-синтаза; трансгидрогеназа; обратная НАДН-КоQ-редуктаза; обратная КоQH₂-цитохром *c*-редуктаза.

В первых двух случаях энергия утилизируется для синтеза АТФ или ФФ_н из АДФ и Ф_н, в трех других — для переноса восстановительных эквивалентов против градиента редокс-потенциала. Среди всех этих систем особенно важной представляется H^+ -АТФ-синтаза, ответственная за взаимопревращение основных «конвертируемых валют» живой клетки — мембранной ($\Delta\bar{\mu}H$) и водорастворимой (АТФ). Вот почему на сегодня H^+ -АТФ-синтаза относится к числу наиболее интенсивно изучаемых ферментов.

5.1.1. H^+ -АТФ-Синтаза

H^+ -АТФ-Синтаза — фермент, катализирующий фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом за счет энергии $\Delta\bar{\mu}H$; он обнаружен в митохондриях, хлоропластах, дышащих и фотосинтезирующих бактериях.

В некоторых анаэробных бактериях, таких, как *Streptococcus faecalis*, очень похожий фермент осуществляет обратный процесс ($АТФ \rightarrow АДФ + Ф_n + \Delta\bar{\mu}H$). Эта функция рассматриваемой системы, единственная у *S. faecalis*, играет подчиненную роль у аэробных и фотосинтезирующих клеток или органелл.

Субъединичное строение. H^+ -АТФ-синтазные комплексы, выделенные из разных источников, сходны по своему строению. Каждый из них может быть разделен на два субкомплекса, один из которых отвечает за транспорт протонов (F_0), а другой — за синтез или гидролиз АТФ (F_1).

Для H^+ -АТФ-синтазы *E. coli* известен субъединичный состав, аминокислотная последовательность и структура оперона. В этом

случае фактор F_1 состоит из пяти субъединиц (α — ϵ), а фактор F_0 —из трех (a — c) (табл. 7). Стехиометрия субъединиц следующая— $3\alpha : 3\beta : \gamma : \delta : \epsilon : a : 2b : (6-15)c$. Молекулярные массы F_1 , F_0 и комплекса F_0F_1 оказались для *E. coli* равными соответственно 381, 112—184 и 593—665 кДа. Неопределенности в оценке массы фактора F_0 и комплекса F_0F_1 обусловлены тем обстоятельством, что пока еще нельзя с точностью ответить на вопрос, сколько субъединиц типа c содержится в одной молекуле H^+ -АТФ-синтазы. В литературе обсуждаются величины от 6 до 15.

Комплекс F_0F_1 *E. coli* кодируется одним опероном, который различные авторы называют по-разному: *unc*, *atp* или *rar*. Его размер около 7 килобаз (*kb*). Порядок генов соответствует транскрипции матричных РНК, кодирующих субъединицы I , a , b , c , δ , α , γ , β и ϵ , где символом I обозначен гипотетический белок, который еще не выделен.

Митохондриальная H^+ -АТФ-синтаза построена из субкомплекса F_1 (пять типов субъединиц), субкомплекса F_0 (четыре типа субъединиц) и еще четырех дополнительных субъединиц. При этом, как и у *E. coli*, фактор F_1 содержит субъединицы 3α , 3β , γ , δ и ϵ . Крупные субъединицы (α и β) очень напоминают таковые *E. coli*. Так в β -субъединицах фактора F_1 из митохондрий сердца быка, дрожжей, *E. coli* и хлоропластов содержание консервативных последовательностей составляет около 70%. Подобная ситуация наблюдается и в случае α -субъединицы.

Таблица 7. Субъединичный состав H^+ -АТФ-синтазы *E. coli*

Комплекс	Субъединица	Молекулярная масса, кДа	Количество аминокислотных остатков	Количество субъединиц на один F_0F_1
F_1	α	55,0	513	3
	β	50,0	459	3
	γ	31,5	287	1
	δ	19,5	177	1
	ϵ	15,0	138	1
F_0	a	30,0	271	1
	b	17,0	156	2
	c	8,0	79	6—15

Сравнение минорных субъединиц факторов F_1 из *E. coli* и митохондрий животных показало, что субъединицы γ похожи, а δ и ϵ —отличны. В то же время в митохондриальной δ -субъединице обнаружены последовательности, гомологичные таковым в ϵ -субъединице *E. coli*.

Ю. А. Овчинников и сотрудники выяснили аминокислотную последовательность так называемого белка, обуславливающего чувствительность к олигомицину (*oligomycin sensitivity coferring protein*, или *OSCP*). Этот компонент служит дополнительной, по сравнению с *E. coli*, субъединицей в митохондриальной H^+ -АТФ-синтазе. Ока-

залось, что *OSCP* в основном гомологичен δ -субъединице *E. coli*, но имеет несколько большую молекулярную массу (21 кДа по сравнению с 19,3 кДа δ -субъединицы *E. coli*), содержит гидрофобный участок вблизи N-концевой последовательности и несколько протяженных отрезков, гомологичных не δ -, а b -субъединице *E. coli*.

Гомологом субъединицы *c* *E. coli* в митохондриях служит субъединица 9 (синоним — протеолипид, связывающий ДЦКД).

Последовательности, гомологичные субъединице a *E. coli*, были обнаружены в субъединице 6 (масса 22 кДа).

В H^+ -АТФ-синтазе митохондрий находят пять полипептидов, которые отсутствуют у бактерий. Это: ϵ -субъединица фактора F_1 с массой 5,5 кДа; субъединица *AL6* фактора F_0 ; фактор F_6 (9 кДа); белковый ингибитор фактора F_1 с массой 9,5 кДа и субъединица с массой 18,5 кДа, которая наряду с F_6 и *OSCP* необходима для правильного ссызывания F_1 с F_0 .

У животных и дрожжей все субъединицы фактора F_1 закодированы в ядерном геноме и синтезируются в цитоплазме в виде несколько более крупных предшественников. У растений α -субъединица кодируется в митохондриях, β — в ядре; место синтеза малых субъединиц фактора F_1 остается невыясненным.

Среди компонентов фактора F_0 дрожжей митохондриальным геномом кодируются субъединицы 6 и 9. Все прочие субъединицы имеют соответствующие гены в ядре. В геноме митохондрий животных обнаружены два перекрывающихся гена, имеющих отношение к H^+ -АТФ-синтазе. Они кодируют субъединицы 6 и *AL6*.

Субъединичный состав H^+ -АТФ-синтазы хлоропластов, обозначаемой CF_0CF_1 , в основном подобен таковому бактерий и митохондрий. Вновь фактор F_1 имеет субъединичный состав $3\alpha, 3\beta, \gamma, \delta, \epsilon$. При этом ϵ -субъединица гомологична таковой для бактериального типа. Фактор CF_0 содержит четыре типа субъединиц, обозначаемых I—IV. Субъединицы IV, I и III гомологичны субъединицам a, b и c фактора F_0 *E. coli*. Субъединица II не имеет бактериального аналога.

Субъединицы $\alpha, \beta, \epsilon, I, III$ и IV синтезируются в хлоропластах.

У цианобактерий, тилакоидная мембрана которых содержит как дыхательную, так и фотосинтетическую цепь, фактор F_1 оказался того же типа, что и в хлоропластах.

Трехмерная структура и расположение в мембране. H^+ — АТФ-синтазный комплекс так велик, что выдается в воду на довольно большое расстояние с одной стороны мембраны. Выступающая часть, которая представляет собой фактор F_1 , обращена в цитоплазму бактерий, матрикс митохондрии или строму хлоропласта.

Негативное окрашивание вывернутых субмитохондриальных пузырьков выявляет грибовидные выросты диаметром около 9 нм, располагающиеся по всей поверхности мембраны. Как показал Э. Ракер, выросты исчезают после сильного механического перемешивания суспензий пузырьков, что сопровождается потерей способности пузырьков синтезировать и расщеплять АТФ, а также появлением в растворах сферических частиц диаметром 9 нм и АТФаз-

ной активности. Реконструкция сферических частиц с мембраной пузырьков возвращает последним АТФ-синтазную и АТФазную активности. Из этих наблюдений Э. Ракер заключил, что выступы представляют собой каталитическую часть H^+ -АТФ-синтазы, т. е. фактор F_1 .

После отщепления фактора F_1 в мембране остается часть H^+ -АТФ-синтазы, ответственная за перенос ионов H^+ (фактор F_0). Чтобы реконструировать H^+ -АТФ-синтазу в протеолипосомах, требуются как F_1 , так и F_0 . Результаты компьютерного анализа электронных микрофотографий фактора F_1 суммированы на рис. 39. Найдено шесть белковых масс, представляющих собой, по-видимому, крупные субъединицы (три α и три β), которые упакованы в два слоя по три субъединицы в каждом слое. Фронтальная проекция фактора F_1 имеет диаметр порядка 10 нм. В центральной части митохондриального F_1 иногда удается наблюдать еще одну, седьмую белковую массу, которая могла бы быть комплексом трех мелких субъединиц.

Исследование с использованием малоуглового рассеяния рентгеновских лучей показало, что фактор F_1 можно приблизительно описать как эллипсоид с осями $12 \times 9 \times 7$ нм.

Многое еще не выяснено в вопросе о том, каким образом F_1 прикрепляется к фактору F_0 , погруженному в мембрану. Были получены данные, что по крайней мере β -субъединица фактора F_1 может находиться в прямом контакте с фосфолипидами. Это наблюдение противоречит распространенной точке зрения, что H^+ -АТФ-синтаза всегда выглядит как гриб, шляпка которого соединяется с мембранным сектором посредством довольно длинной ножки. Не исключено, что грибовидная конфигурация фиксируется в результате обработки, предшествующей анализу образца под электронным микроскопом.

Существует весьма косвенная информация о трехмерной структуре фактора F_0 . Ее источником служит, в частности, рассмотрение чередований гидрофобных и гидрофильных участков аминокислотных последовательностей субъединиц, составляющих фактор. Пред-

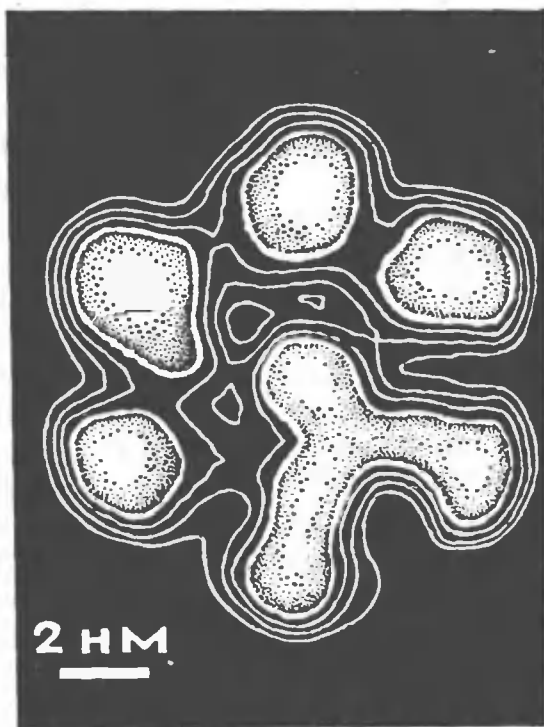


Рис. 39. Структура H^+ -АТФ-синтазы (по Е. J. Воекема et al., 1986):

изолированный фактор F_1 из митохондрий сердца быка (негативный контраст); электронно-микроскопические фотографии 379 проекций пяти основных типов суммированы с использованием системы анализа изображений

полагают, что очень гидрофобные α - и ϵ -субъединицы образуют соответственно шесть и две α -спиральные трансмембранные колонны. Что касается b -субъединицы, то она пересекает мембрану, по-видимому, только один раз.

Гидролиз АТФ изолированным фактором F_1 . Фактор F_1 , будучи отделен от мембранного сектора H^+ -АТФ-синтазы, *сохраняет способность гидролизовать АТФ до АДФ и фосфата*. Реакция протекает с очень большой скоростью и утрачивает чувствительность к олигомицину, диэтилстильбестролу и низким концентрациям ДЦКД, отличаясь в этом отношении от комплекса F_0F_1 .

Гидролиз АТФ растворимым фактором F_1 был исследован в целом ряде лабораторий, однако и сегодня многие существенные моменты механизма этой реакции остаются неясными.

Твердо установлено, что фактор F_1 *может связывать шесть молекул адениннуклеотидов*, т. е. по одному на каждую крупную субъединицу.

Как α -, так и β -субъединицы фактора F_1 содержат весьма консервативные последовательности, подобные тем, что найдены в других АТФ-связывающих ферментах. Три места связывания нуклеотидов гораздо быстрее обменивают связанные нуклеотиды, чем остальные места. Поэтому в факторе F_1 различают *прочно* и *слабо связанные нуклеотиды*. В условиях, когда заполняется только один центр связывания нуклеотидов, гидролиз АТФ идет очень медленно (так называемый *одноцентровый катализ*). Связывание второй АТФ вызывает многократное ускорение реакции, что обусловлено увеличением скорости высвобождения продуктов (АДФ и фосфата) из активного центра.

Как показали А. Д. Виноградов и сотрудники, *гидролиз АТФ изолированным митохондриальным фактором F_1 сильно тормозится одним из продуктов реакции — АДФ*.

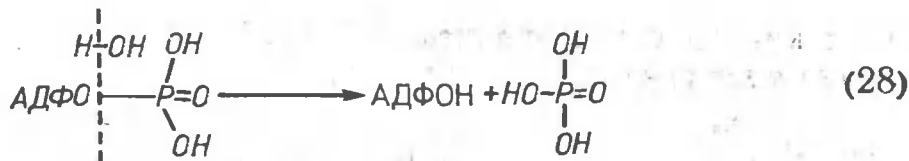
По данным, полученным Я. М. Мильгромом и М. Б. Мураталиевым, это торможение обусловлено АДФ, связанным в некаталитическом центре фактора F_1 .

Установлено, что для удаления АДФ из ингибированного фактора F_1 , находящегося на мембране, требуется $\Delta\mu H$. Это означает, что торможение посредством АДФ может развиваться только в том случае, если $\Delta\mu H$ снижен, т. е. именно тогда, когда есть опасность исчерпания фонда АТФ в клетке за счет обращения H^+ -АТФ-синтазной реакции.

В митохондриях ту же функцию, что и АДФ, может выполнять особый полипептид — *белковый ингибитор*. В хлоропластах он, по-видимому, идентичен ϵ -субъединице.

Подобно АДФ, белковый ингибитор подавляет АТФазную активность изолированного фактора F_1 , а также комплекса F_0F_1 в мембране при условии, когда $\Delta\mu H$ снижен.

Показано, что *гидролиз АТФ в каталитическом центре F_1 происходит путем прямой атаки молекулой воды ангидридной связи АТФ*:



Процесс протекает без образования ковалентных интермедиатов. Об этом свидетельствуют как данные опытов по изотопному обмену, так и тот факт, что гидролиз АТФ фактором F_1 устойчив к ванадату, гидроксиламину и другим реагентам на ацилфосфат.

Синтез связанного АТФ изолированным фактором F_1 . В 1982 г. Р. Фелдмэн и Д. Сигмэн показали, что фактор CF_1 , изолированный из хлоропластов, может синтезировать АТФ из прочно связанного АДФ в ответ на добавление в раствор неорганического фосфата. Синтезированный АТФ оставался связанным с CF_1 и мог быть переведен в раствор только путем денатурации фактора CF_1 . Позднее появились данные о синтезе связанного АТФ из АДФ и фосфата, добавленных к раствору митохондриального фактора F_1 . Процесс резко стимулировался диметилсульфоксидом.

Теоретический расчет, сделанный в лаборатории автора, показывает, что константа равновесия гидролиза АТФ в каталитическом центре фактора F_1 не превышает 100 и по всей вероятности близка к единице. Это означает, что синтез связанного АТФ требует гораздо меньше энергии, чем синтез свободного АТФ в растворе. Вероятно даже, что вся энергия тратится на стадии высвобождения АТФ (или связывания АДФ и фосфата), как это было впервые предположено П. Бойером (1973).

Проведение протонов через фактор F_0 . Удаление фактора F_1 из тилакоидов, хроматофоров, суббактериальных или субмитохондриальных пузырьков приводит к появлению протонной проводимости через фактор F_0 . Протеолипосомы с фактором F_0 также характеризуются высокой проводимостью для протонов. Эффект снимается добавлением специфического блокатора F_0 — ДЦКД. Реконструкция фактора F_0 с фактором F_1 также подавляет утечку протонов.

В опытах с бактериями показано, что мутация по любой из трех субъединиц фактора F_0 приводит к потере его способности проводить протоны. Весьма вероятно, что c -субъединица прямо участвует в переносе H^+ . В c -субъединице фактора F_0 содержится остаток дикарбоновой кислоты, абсолютно необходимый для переноса протонов. Он располагается на расстоянии 1,8 нм от поверхности мембраны, т. е. примерно в середине гидрофобного барьера. В *E. coli* остаток, о котором идет речь, — это Asp-61. Его модификация посредством ДЦКД или замена на Asn или Glu полностью прекращают как транспорт H^+ , так и синтез АТФ за счет $\Delta\mu H$. В c -субъединице из других бактерий, а также в субъединице 9 из митохондрий на месте Asp-61 находится глутамат, также специфически атакующий ДЦКД.

Как отмечает Я. Кагава, F_0 вряд ли представляет собой просто пору, так как зависимость скорости переноса H^+ через F_0 описыва-

ется кривой с насыщением ($K_m = 10^{-7}$ М), что указывает на наличие мест связывания иона H^+ .

Наибольшие значения H^+ -проводимости были получены для фактора F_0 хлоропластов: $6200 H^+/с \cdot CF_0$ при $\Delta\psi = 100$ мВ. Однако даже эта величина, вероятно, слишком низка для H^+ -проводящего механизма типа канала.

Характерной чертой митохондриального фактора F_0 является его чувствительность к олигомицину. Выделены мутанты дрожжей, у которых H^+ -проводимость через F_0 резистентна к этому антибиотику. Ответственными за резистентность оказались два локуса в субъединице b . Оба они консервативны у человека и мыши. В то же время в a -субъединице *E. coli*, гомологичной митохондриальной субъединице b , обнаружен только один из консервативных локусов, что согласуется с наблюдением о слабом эффекте олигомицина на H^+ -АТФ-синтезу *E. coli*. Тем не менее олигомицин препятствует связыванию C^{14} -ДЦКД с c -субъединицей в факторе F_0 *E. coli*. Вентурицидин не только препятствует связыванию ДЦКД, но и тормозит перенос H^+ фактором F_0 *E. coli*.

Среди прочих бактерий, исследованных в этом направлении, только *Rh. rubrum* имеет перенос H^+ , чувствительный к олигомицину. (Отметим, что *Ph. rubrum* — довольно близкий сосед митохондрий на эволюционном «дереве»; см. разд. 7.4, рис. 58.) Чувствительность фактора F_0 *Rh. rubrum* к олигомицину некоторым образом связана с функцией β -субъединицы фактора F_1 . Показано, в частности, что достаточно заменить β -субъединицу в H^+ -АТФ-синтазе *Rh. rubrum* на β -субъединицу из *E. coli*, как олигомицин перестает действовать на эту систему.

Недавно появились сообщения об участии бактериальных a - и b -субъединиц в транспорте H^+ . Установлено, что *Glu-131* в b -субъединице существен для протонной проводимости, создаваемой фактором F_0 . В то же время удаление большей части b -субъединицы, экспонированной в воду, не тормозит перенос ионов H^+ и не препятствует связыванию ДЦКД, хотя последующая реконструкция такого F_0 с фактором F_1 дает F_0F_1 -комплекс, гидролизующий АТФ ДЦКД-нечувствительным способом. Таким образом, b -субъединица участвует в организации правильного контакта факторов F_1 и F_0 .

Для этого контакта необходима также δ -субъединица фактора F_1 , представляющая собой белок, который имеет форму палочки и в основном состоит из α -спиралей. Мутант *E. coli* с измененной δ -субъединицей не способен к генерации $\Delta\bar{\mu}H$ за счет АТФ, а отделение фактора F_1 от мембраны не повышает ее проводимости для протонов. Полагают, что измененная δ -субъединица остается в мембране после отделения F_1 , закрывая вход в H^+ -проводящий путь фактора F_0 .

Взаимопревращение $\Delta\bar{\mu}H \leftrightarrow \text{АТФ}$, катализируемое H^+ -АТФ-синтазой в протеолипосомах. Твердо установлено, что комплекс H^+ -АТФ-синтазы, включенный в мембрану замкнутого пузырька,

представляет собой простейшую систему, способную осуществлять взаимопревращение энергии АТФ и $\Delta\mu\text{H}$. Протеолипосомы, содержащие этот комплекс, генерируют $\Delta\mu\text{H}$ за счет гидролиза АТФ и синтезируют АТФ за счет $\Delta\mu\text{H}$, искусственно созданной на их мембране.

Я. Кагава и Э. Ракер (1971) были первыми, кому удалось реконструировать F_0F_1 -протеолипосомы. Особенно успешными оказались опыты с H^+ -АТФ-синтазой хлоропластов (комплексом CF_0CF_1), когда синтез АТФ поддерживается диффузионным потенциалом ионов K^+ в присутствии валиномицина и искусственно созданной $\Delta\mu\text{H}$. Скорость синтеза АТФ в такой системе была около 200 молекул АТФ на один F_0F_1 в 1 с, что всего вдвое ниже максимальной скорости фотофосфорилирования в хлоропластах.

Показано также, что в протеолипосомах, содержащих F_0F_1 и какой-либо белок- $\Delta\mu\text{H}$ -генератор, АТФ может быть образован независимо от того, выделен ли этот генератор из того же объекта, что и АТФ-синтаза, или он имеет другое происхождение. Первый и наиболее известный опыт, демонстрирующий справедливость этого вывода, был поставлен Э. Ракером и В. Стокениусом. В 1974 г. авторы опубликовали короткое сообщение о фотофосфорилировании в протеолипосомах, составленных из компонентов всех трех царств живой природы: *бактериального* $\Delta\mu\text{H}$ -генератора — бактериородопсина, *«животного»* потребителя $\Delta\mu\text{H}$ — комплекса F_0F_1 из митохондрий сердца быка и *растительных* фосфолипидов — азолектина соевых бобов.

Стехиометрия $\text{H}^+/\text{АТФ}$. Твердо установлено, что для синтеза одной молекулы АТФ необходимо перенести через мембрану более одного протона. Такое заключение базируется на данных по измерению $\Delta\mu\text{H}$ и концентраций АТФ, АДФ и фосфата. Общепринято, что при физиологических концентрациях субстратов и продукта H^+ -АТФ-синтазы образование АТФ «стоит» порядка $44 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ($10,5 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$). Эта величина соответствует $\Delta\mu\text{H}$, равной 455 мВ при условии, что стехиометрия $\text{H}^+/\text{АТФ} = 1$. Указанное значение $\Delta\mu\text{H}$ примерно вдвое больше измеренного экспериментально. Таким образом, если предположить, что рассматриваемое соотношение выражается целым числом, то минимальное $\text{H}^+/\text{АТФ}$ должно быть равно двум.

В митохондриях, фосфорилирующих внешний АДФ внешним фосфатом, $\Delta\mu\text{H}$ потребляется не только H^+ -АТФ-синтазой, но также и $\text{АТФ}^{4-}/\text{АДФ}^{3-}$ -антипортером и H_2PO_4^- , H^+ ,-симпортером. В результате обмен внешних АДФ и фосфата на внутренний АТФ сопровождается импортом в митохондрию одного иона H^+ . Это не означает, однако, что стехиометрия $\text{H}^+/\text{АТФ}$ митохондриального комплекса F_0F_1 может составлять единицу, поскольку митохондрии образуют АТФ не только «на экспорт», но и для обеспечения собственных нужд, т. е. без участия анти- и симпортеров. Кроме

того, хорошо известно, что вывернутые субмитохондриальные пузырьки и F_0F_1 -протеолипосомы способны синтезировать АТФ, причем для этого не требуется никаких транспортеров.

Ряд фактов свидетельствует о том, что стехиометрия $H^+/АТФ$ для митохондриального комплекса F_0F_1 скорее всего равна двум, хотя и величину три нельзя считать исключенной.

У растений фотофосфорилирование АДФ происходит на внешней стороне мембраны тилакоидов. Полученный АТФ используется преимущественно в строме хлоропласта при синтезе глюкозы. В этом процессе портеры не участвуют, а соотношение $H^+/АТФ$ обычно принимается равным трем. Тем не менее обсуждается также и величина, равная двум.

У бактерий мембранные механизмы синтеза АТФ, по-видимому, могут различаться в зависимости от рН среды обитания. Ацидофилы, растущие при рН менее 5, поддерживают $\Delta\bar{\mu}H$ на уровне около 250 мВ, так что $H^+/АТФ$ может быть равно двум. У нейтрофилов (рН от 5 до 8,5) $\Delta\bar{\mu}H$ оказывается в области 150 мВ, так что более вероятно $H^+/АТФ=3$. При этом, однако, следует помнить, что $\Delta\bar{\mu}H$ вряд ли может быть измерена на целых клетках с точностью большей, чем 30%.

У алкалофилов $\Delta\bar{\mu}H$ снижается до очень малых значений, приближаясь к нулю при $pH \geq 11$. В этих условиях цитоплазматическая мембрана уже не может использовать обычные механизмы протонной энергетики и по крайней мере в некоторых случаях происходит замена H^+ -АТФ-синтазы на Na^+ -АТФ-синтазу, утилизирующую $\Delta\bar{\mu}Na$ вместо $\Delta\bar{\mu}H$ (подробнее см. гл. 7).

Возможные механизмы превращения энергии. Основные принципы функционирования H^+ -АТФ-синтазы могут быть сформулированы следующим образом. 1. АДФ и фосфат, связанные с фактором F_1 , могут образовать связанный АТФ без какого-либо притока энергии извне. 2. Энергия требуется для переноса связанного АТФ из активного центра фактора F_1 в воду или переноса АДФ и фосфата из воды в активный центр, т. е. для антипорта $АТФ/(АДФ+фосфат)$ между активным центром и водой. 3. Энергия должна находиться в форме $\Delta\bar{\mu}H$, причем $\Delta\psi$ и ΔpH эквивалентны в качестве энергетического ресурса. Они могут быть образованы естественным путем или созданы искусственно. 4. В переносе протонов через H^+ -АТФ-синтазный комплекс участвует фактор F_0 .

Было высказано предположение, что $\Delta\bar{\mu}H$ -движимый антипорт $АТФ/(АДФ+фосфат)$ происходит через так называемые некаталитические центры связывания нуклеотидов, локализованные на α -субъединице F_1 . По этой схеме АДФ и фосфат сначала поступают из воды на α -субъединицу, а затем транслоцируются на погруженную в мембрану β -субъединицу, несущую каталитический центр.

Другая возможность состоит в том, что нуклеотид-связывающие места на α -субъединицах участвуют в регуляции фактора F_1 . В этом

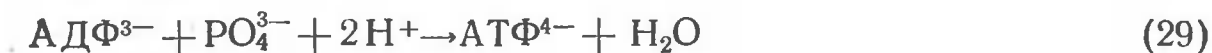
случае β -субъединица осуществляет как катализ, так и транслокацию субстратов и продуктов реакции.

Как уже отмечалось (А. Д. Виноградов и др., 1980), нуклеотиды оказывают мощное регулирующее воздействие на H^+ -АТФ-синтазу. Оказалось, что АДФ тормозит гидролиз АТФ изолированным фактором F_1 двумя совершенно различными способами: *конкурентно и неконкурентно по отношению к АТФ*. В первом случае АДФ взаимодействовал с местом слабого связывания нуклеотидов, во втором — с местом их прочного связывания. Ингибирование в месте прочного связывания усиливалось азидом, эффект которого снимался сульфитом. Азид, а также белковый ингибитор фактора F_1 не влияли на синтез АТФ при дыхании. Авторы заключили, что существуют две изоформы фактора F_1 , одна из которых приспособлена для синтеза, а другая для гидролиза АТФ, и что прочное связывание АДФ фиксирует фермент в его «синтазной» изоформе.

Остается неясным, каким именно образом $\Delta\mu H$ вызывает антипорт АТФ/(АДФ+фосфат) между каталитическим центром и водой. Одно из предположений состоит в том, что различие в числе отрицательных зарядов между полностью ионизованным ATP^{4-} и $(ADP^{3-} + PO_4^{3-})$ может иметь решающее значение.

То, что высвобождение АТФ, связанного фактором F_1 , действительно поддерживается энергией $\Delta\mu H$, показано в опытах, когда изучали торможение АТФазы субмитохондриальных пузырьков негидролизующим аналогом АТФ — 5-аденилилимидодифосфатом (АМРРНР). Короткая преинкубация пузырьков с АМРРНР в среде с сукцинатом в аэробных условиях полностью снимала торможение АТФазной активности, если ее измеряли в присутствии разобщителя, добавленного *после* сукцината. Если же разобщитель был добавлен в среду с субмитохондриальными пузырьками *до* сукцината, торможение сохранялось. Именно такого эффекта можно было ожидать, если $\Delta\mu H$, генерируемая при окислении сукцината, удаляет АМРРНР из каталитического центра.

Как уже отмечалось, роль фактора F_0 состоит в транслокации протонов между внешней (по отношению к митохондрии или бактерии) водной фазой и областью мембраны, где располагается активный центр фактора F_1 . Судьба этих протонов может быть двоякой. Если стехиометрия H^+/ATP равна двум, то они могут поглощаться при АТФ-синтазной реакции:



Если стехиометрия равна трем, дополнительный протон должен транслоцироваться из мембраны в матрикс вместе с АТФ. В этом случае процесс в целом должен описываться антипортом $(ATP^{4-} + H^+)/ (ADP^{3-} + PO_4^{3-})$.

Возможно также, что, во-первых, протоны, транспортируемые через фактор F_0 , не идентичны тем протонам, которые включаются в

молекулу H_2O при синтезе АТФ и, во-вторых, антипорт АТФ/(АДФ+фосфат) между матриксом и каталитическим цент-

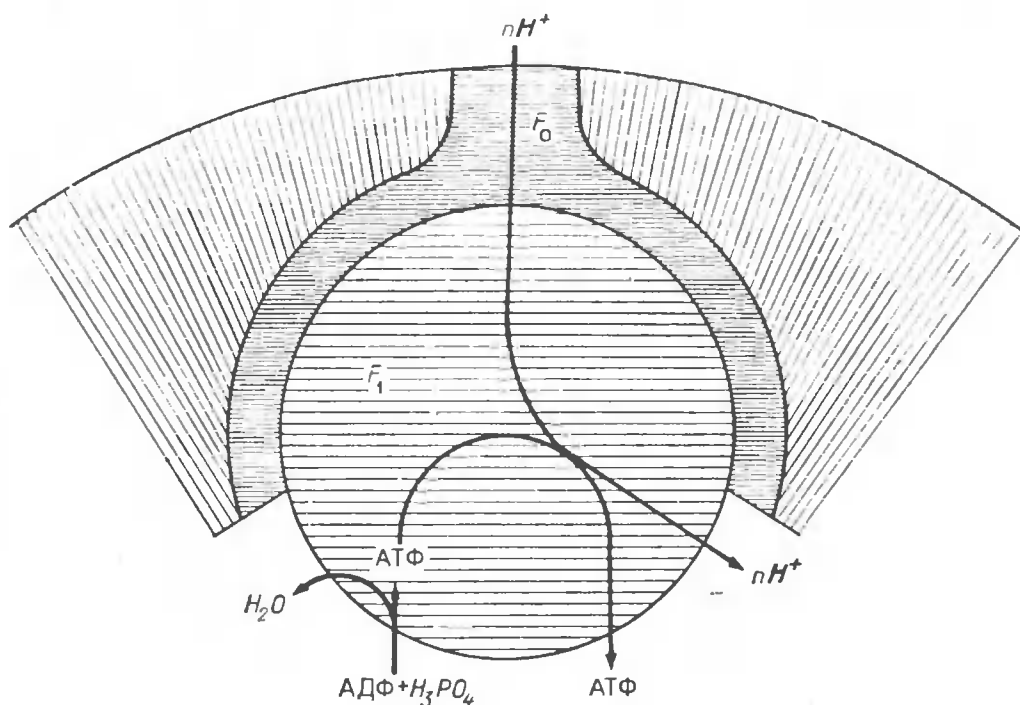


Рис. 40. Возможный механизм действия митохондриальной H^+ -АТФ-синтазы:

АДФ и неорганический фосфат переносятся в каталитический центр фактора F_1 , где происходит изоэнергетический синтез связанного АТФ. Высвобождение АТФ в воду сопряжено с транслокацией n ионов H^+ через F_0 и F_1

ром фактора F_1 происходит вне электроизолирующего слоя мембраны. В этом случае $\Delta\mu\text{H}$ могла бы тратиться на сопряженный с транспортом протонов перевод фактора F_1 в конформацию, облегчающую высвобождение АТФ из каталитического центра. Это соответствует схеме, приведенной на рис. 40.

5.1.2. H^+ -Пирофосфат-синтаза

В 1966 г. М. Балчевски и сотрудники описали образование неорганического пирофосфата хромофорами *Rhodospirillum rubrum* под действием света. Позднее было найдено, что в темноте пирофосфат, подобно АТФ, энергизует мембрану хромофоров. Опыты в группе автора показали, что гидролиз пирофосфата генерирует $\Delta\psi$ на мембране хромофоров, а также протеолипосом, содержащих очищенную пирофосфатазу *Rh. rubrum*. Затем Р. Нирен и М. Балчевски сообщили о синтезе АТФ за счет энергии гидролиза пирофосфата протеолипосомами, содержащими пирофосфатазу и H^+ -АТФ-синтазу из *Rh. rubrum*. Протонофоры блокировали процесс. В хромофорах был показан протонный контроль пирофосфатаз-

ной активности, которая возрастала в восемь раз при рассеянии $\Delta\bar{\mu}H$.

Перечисленные данные представляются достаточными для заключения, что мембранная пирогосфатаза хромофоров *Rh. rubrum* обладает активностью H^+ -насоса, катализируя обратимое взаимопревращение энергии между $\Delta\bar{\mu}H$ и пирогосфатом. Следовательно, данный фермент может быть определен как H^+ -пирогосфат-синтаза.

Механизм действия фермента и его молекулярные свойства остаются неясными. Известен лишь набор ингибиторов, подавляющих пирогосфатазную активность как мембранной, так и растворимой формы фермента. Это фторид, имиодифосфат, N-этилмалеимид и антибиотик Дио-9. Олигомицин не влияет на фермент. ДЦКД снижает активность пирогосфатазы в хромофорах, но не в растворе и не в протеолипосомах. Образование $\Delta\psi$ протеолипосомами чувствительно к ДЦКД.

Казалось бы, функцией H^+ -пирогосфатсинтазы в клетках *Rh. rubrum* должен быть синтез пирогосфата за счет энергии света (или дыхания) либо генерация $\Delta\bar{\mu}H$ за счет гидролиза пирогосфата. Однако в первом случае не ясна дальнейшая судьба образованного пирогосфата, который в клетках обычного типа расщепляется растворимой пирогосфатазой. Последнее необходимо, чтобы удерживать концентрацию пирогосфата на низком уровне и тем самым стимулировать АТФ-зависимые биосинтезы, сопровождающиеся образованием пирогосфата (см. разд. 1.5). Существуют, правда, исключения из правила о том, что пирогосфат немедленно расщепляется растворимой пирогосфатазой. У некоторых бактерий описан целый ряд синтетических процессов, утилизирующих энергию пирогосфата. Быть может, *Rh. rubrum* относится именно к этой категории микроорганизмов. (Возможная роль пирогосфата как энергетического буфера *Rh. rubrum* будет рассмотрена в разд. 6.3.2.) В любом случае H^+ -пирогосфат-синтаза *Rh. rubrum* должна обладать важной биологической функцией. Ее активность в хромофорах очень велика и соизмерима с таковой H^+ -АТФ-синтазы.

Неожиданно высокая концентрация пирогосфата была обнаружена в клетках растений. У растений H^+ -пирогосфатаза найдена в тонопласте и мембранах аппарата Гольджи.

5.1.3. H^+ -Трансгидрогеназа

Обратимый перенос гидрид-иона (H^-) между НАД и НАДФ (уравнение 30) катализируется ферментами, называемыми *трансгидрогеназами*:



Такого рода ферментативная активность впервые была описана в 1952 г. С. Коловиком, Н. Капланом и др. В 1963 г. Л. Даниэльсон и Л. Эрнстер обнаружили, что энергизация субмитохондриальных

пузырьков резко сдвигает равновесие реакции (уравнение 31) вправо, т. е. в сторону образования НАДФН. В результате соотношение $[НАДФН] [НАД^+]/[НАДФ^+] [НАДН]$

оказывается порядка 500. В неэнергизованном состоянии это соотношение близко к единице, что вполне понятно, поскольку редокс-потенциалы пар НАДН/НАД⁺ и НАДФН/НАДФ⁺ различаются всего на 5 мВ.

В 1966 г. П. Митчел постулировал, что *трансгидрогеназа представляет собой дополнительный пункт энергетического сопряжения в дыхательной цепи*. Предполагалась, что окисление НАДФН посредством НАД⁺ (прямая реакция) генерирует $\Delta\bar{\mu}H$ того же направления, что и дыхание, а обратный процесс потребляет $\Delta\bar{\mu}H$, образуемую дыханием.

В рамках этой концепции сдвиг равновесия трансгидрогеназной реакции при энергизации есть прямое следствие энергетических соотношений трансгидрогеназы и других $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов дыхательной цепи. Свободная энергия процесса превращения субстрата *S* в продукт *P* может быть рассчитана как

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln ([S]/[P]), \quad (31)$$

где ΔG_0 есть изменение свободной энергии при $[S] = [P]$. Во всех $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторах, за исключением трансгидрогеназы, ΔG_0 достаточно велико — порядка 30—45 кДж·моль⁻¹. И только в трансгидрогеназной реакции ΔG_0 близко к 0. Поэтому данный фермент не может составить конкуренции дыхательной цепи или АТФазе в качестве генератора $\Delta\bar{\mu}H$, если только произведение $[НАДФН] [НАД^+]$ не окажется на несколько порядков выше, чем $[НАДФ^+] [НАДН]$, что, конечно, вряд ли может произойти в реальных условиях.

Механизм, предложенный П. Митчелом, предполагает, что *перенос H⁻ от НАДФН к НАД⁺ должен образовывать $\Delta\bar{\mu}H$ того же направления, что дыхание, а перенос H⁻ в противоположную сторону — $\bar{\mu}H$ обратного знака*. В обоих случаях добавление продуктов реакции должно снижать величину $\Delta\bar{\mu}H$. Опыты, проведенные Е. А. Либерманом с сотрудниками и группой автора, подтвердили эти предположения. Найдено, что вывернутые субмитохондриальные пузырьки, хроматофоры *Rh. rubrum* и протеолипосомы с очищенной трансгидрогеназой генерируют $\Delta\psi$ («+» внутри пузырька) при окислении НАДФН посредством НАД⁺. Окисление НАДН посредством НАДФ⁺ также образовывало $\Delta\psi$, но внутри был знак «—». Как та, так и другая $\Delta\psi$ исчезали при уравнивании концентраций субстратов и продуктов реакции. Генерируемые $\Delta\psi$ оказались линейной функцией соотношения

$$\ln \frac{[НАДФН] [НАД^+]}{[НАДФ^+] [НАДН]}.$$

Сделано заключение, что трансгидрогеназная система в вывернутых субмитохондриальных пузырьках и хроматофорах катализирует следующий процесс:



Если дыхательные или фотосинтетические генераторы образуют $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, благоприятную для выхода $\text{H}_{\text{вн}}^+$, то реакция сдвигается влево.

Число протонов, переносимых при одном обороте трансгидрогеназы, остается неясным: обсуждаются величины от 0,5 до 2.

Недавно М. Балчевски и соавторы продемонстрировали синтез $\Phi\Phi_{\text{H}}$ из Φ_{H} за счет энергии окисления НАДФН посредством НАД^+ в хроматофорах *Rh. rubrum*.

Электрогенная активность трансгидрогеназы чувствительна к протонофорам и ДЦКД. В дальнейшем эффект ДЦКД был детально изучен Я. Хатефи, Р. Фишером и их коллегами. Оказалось, что для выключения протон-транспортной активности трансгидрогеназы достаточно добавить 0,5 моля ДЦКД на 1 моль фермента, принимая молекулярную массу последнего равной 120 кДа. Такая стехиометрия может объясняться димерной организацией трансгидрогеназы.

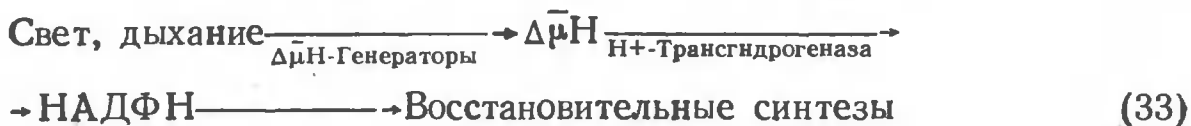
В *E. coli* аналогичный фермент состоит из двух полипептидов, суммарная масса которых чуть меньше таковой мономера митохондриальной трансгидрогеназы. При включении в протеолипосомы фермент из *E. coli* образует $\Delta\bar{\mu}\text{H}$. Процесс блокируется ДЦКД, связывающимся с большей (50 кДа), но не с меньшей (47 кДа) субъединицей.

Существенным моментом трансгидрогеназного механизма является то обстоятельство, что при этой реакции происходит *прямой стереоспецифический перенос H- между положением А никотинамидного кольца НАД и положением В такового НАДФ*. При этом не происходит обмена протонами с водой. Следовательно, протоны, транспортируемые ферментом через мембрану, *не идентичны* тем протонам, которые переносятся от одного никотинамиднуклеотида к другому при трансгидрогеназной реакции.

$\Delta\bar{\mu}\text{H}$ не только смещает равновесие в сторону восстановления НАДФ^+ , но и резко ускоряет этот процесс. Показано, что $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ снижает K_m трансгидрогеназы для НАДФ^+ с 40 до 6,5 мкМ и повышает K_m для НАД^+ с 28 до 43,5 мкМ. Таким образом, $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ благоприятствует восстановлению НАДФ^+ и затрудняет восстановление НАД^+ .

Безусловно, *главная функция H^+ -трансгидрогеназы* состоит в поддержании высокого соотношения $[\text{НАДФН}]/[\text{НАДФ}^+]$, что стимулирует восстановительные синтезы. Последние включают, как правило, один или несколько этапов, на которых происходит окисление НАДФН. Фактически энергия, вырабатываемая дыхательной или фотосинтетической редокс-цепью в виде $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, становится при по-

средни́честве трансгидрогеназы дополнительной движущей силой восстановительных биосинтезов:



Такой эффект имеет место в митохондриях и в подавляющем большинстве бактерий, у которых отсутствует нециклическая фотоцепь.

В хлоропластах и цианобактериях проблема поддержания высокого соотношения $[\text{НАДФН}]/[\text{НАДФ}^+]$ решается восстановлением НАДФ^+ в качестве конечного акцептора электронов редокс-цепи. Неудивительно, что H^+ -трансгидрогеназа в хлоропластах отсутствует.

Другие системы обратного переноса восстановительных эквивалентов. В некоторых случаях трансгидрогеназа оказывается включенной последовательно с системой обратного переноса восстановительных эквивалентов в дыхательной цепи. По-видимому, эта ситуация имеет место в хроматофорах *Rh. rubrum*, окисляющих субстраты с редокс-потенциалом около нуля (серу, S^{2-} и т. д.). На свету $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, образуемая циклической фотоцепью, может использоваться, во-первых, для обращения $\text{НАДН-КоQ-редуктазы}$, т. е. для восстановления НАД^+ серой или сульфидом, и, во-вторых, для окисления образующегося НАДН посредством НАДФ^+ в трансгидрогеназной реакции.

Известны примеры, когда обратный перенос восстановительных эквивалентов оказывается одним из основных потребителей $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ в клетке. Таковы бактерии, использующие субстраты с положительным редокс-потенциалом в качестве единственного источника энергии и восстановительной силы.

Как было отмечено выше (см. раздел 3.4.7), *Thiobacillus ferrooxidans* окисляет Fe^{2+} в Fe^{3+} (редокс-потенциал $+0,77$ В) кислородом и строит все компоненты своей клетки из CO_2 , H_2O и NH_3 . Чтобы сделать это, необходимо обратить вспять не только $\text{НАДН-КоQ-редуктазную}$ реакцию, но и КоQH_2 -цитохром *c*-редуктазную реакцию.

Обратный перенос электронов, по-видимому, не нужен хлоропластам и имеет ограниченное значение для митохондрий.

5.2. Осмотическая работа за счет $\Delta\bar{\mu}\text{H}$

5.2.1. Определение и классификация

Термин «осмотическая работа», в его широком смысле, относится к любому процессу трансмембранного переноса вещества в сторону большей его концентрации. Такой перенос сопровождается появле-

нием осмотического дисбаланса между двумя объемами, разделенными мембраной, поскольку по крайней мере в одном из них меняется концентрация транспортируемого вещества.

Вообще говоря, образование градиентов ионов специфическими ионными насосами, такими, как $\Delta\mu\text{H}$ -генераторы, ион-транспортные АТФазы и т. п., должно быть отнесено к осмотической работе. Однако такого рода эффекты принято исключать из рассмотрения в данном контексте. Вместо этого главное внимание уделяют транспорту метаболитов, движимому посредством $\Delta\mu\text{H}$, $\Delta\mu\text{Na}$, АТФ или фосфоенолпирувата (ФЕП). Ниже будет рассмотрена $\Delta\mu\text{H}$ -зависимая осмотическая работа.

В митохондриях все энергозависимые виды транспорта веществ поддерживаются энергией $\Delta\mu\text{H}$. В плазмалемме и тонопласте растений и грибов большинство процессов такого типа также происходит за счет $\Delta\mu\text{H}$. Однако в плазмалемме животной клетки гораздо более типичны $\Delta\mu\text{Na}$ -зависимые транспортные системы, хотя в некоторых особых случаях движущей силой осмотической работы и служит $\Delta\mu\text{H}$. Для бактерий описаны примеры всех перечисленных выше движущих сил, хотя $\Delta\mu\text{H}$ и АТФ используются наиболее часто. У морских и галофильных микроорганизмов вместо $\Delta\mu\text{H}$ служит с той же целью $\Delta\mu\text{Na}$. У *E. coli* среди 16 систем транспорта аминокислот 8 переносчиков утилизируют АТФ, 5 переносчиков — $\Delta\mu\text{H}$, одна — $\Delta\mu\text{Na}$ и две системы — как $\Delta\mu\text{H}$, так и $\Delta\mu\text{Na}$ (табл. 8). Та же бактерия накапливает глюкозу за счет энергии ФЕП, лактозу — за счет $\Delta\mu\text{H}$.

Таблица 8. Системы аккумуляции аминокислот в клетках *E. coli*

№ системы	Аминокислота	Движущая сила транспорта
1	<i>Ala, Gly</i>	$\Delta\mu\text{H}$
2	<i>Thr, Ser</i>	»
3	<i>Leu, Ile, Val</i>	АТФ
4	<i>Leu, Ile, Val</i>	»
5	<i>Leu, Ile, Val</i>	$\Delta\mu\text{H}$
6	<i>Leu, Ile, Val</i>	»
7	<i>Phe, Tyr, Trp</i>	»
8	<i>Pro</i>	$\Delta\mu\text{Na}$
9	<i>Lys, Arg, Orn</i>	АТФ
10	<i>Arg</i>	»
11	<i>Gln</i>	»
12	<i>Gln</i>	»
13	<i>Gln</i>	$\Delta\mu\text{H}$, $\Delta\mu\text{Na}$
14	<i>Gln</i>	»
15	Цистин	АТФ
16	»	»

$\Delta\bar{\mu}_H$ -зависимая аккумуляция S в отсеке, заряженном отрицательно (например, в матриксе митохондрии или в цитоплазме бактерии), описывается уравнением (34):

$$RT \ln \frac{[S]_{\text{вн}}}{[S]_{\text{нар}}} = -(n + Z)F\Delta\psi - nRT \ln \frac{[H^+]_{\text{вн}}}{[H^+]_{\text{нар}}}, \quad (34)$$

где n — число ионов H^+ , переносимых в симпорте с одной молекулой S , Z — число положительных зарядов на S .

5.2.2. $\Delta\psi$ как движущая сила

Если транспортная система осуществляет аккумуляцию катиона сильного основания внутрь заряженного положительно отсека (или откачивает анион сильной кислоты из этого отсека), *единственной движущей силой процесса может быть $\Delta\psi$ -составляющая протонного потенциала*. Для одновалентного катиона C^+ соотношение его концентрации по ту и другую стороны мембраны описывается уравнением (35):

$$RT \ln \frac{[C^+]_{\text{вн}}}{[C^+]_{\text{нар}}} = -F\Delta\psi. \quad (35)$$

Легко подсчитать, что создание десятикратного градиента C^+ при температуре порядка 25°C требует $\Delta\psi$ около 60 мВ.

Такое простое электрофоретическое поведение системы ионного транспорта показано, например, для переноса ионов K^+ в присутствии антибиотика валиномицина. Подобный механизм ответствен также за перенос Ca^{2+} в митохондрии и бактерии (рис. 41, система 1). Однако в этом случае коэффициент Z равен двум, так что для создания десятикратного градиента оказывается достаточным $\Delta\psi = 30$ мВ.

Как валиномицин, так и митохондриальный унипортер ионов Ca^{2+} решают сравнительно простую задачу. Они «узнают» ион, подлежащий транспорту, и облегчают его диффузию через гидрофобный слой мембраны. Для превращения энергии $\Delta\psi$ в ионный градиент не требуется каких-либо специальных устройств, поскольку весь процесс сводится к движению иона в электрическом поле.

Более сложные механизмы используются, по-видимому, при аккумуляции K^+ клетками *E. coli*. Как было найдено В. Эпстайном и сотрудниками, здесь существуют по крайней мере две системы импорта K^+ : K^+ -транспортирующая система $A(TrkA)$ и K^+ -АТФаза (Kdp -система). $TrkA$ действует при обычных концентрациях K^+ в среде, в то время как K^+ -АТФаза индуцируется резким снижением $[K^+]_{\text{нар}}$. Система $TrkA$ использует энергию $\Delta\bar{\mu}_H$ и аллостерически активируется АТФ. Известны данные о том, что $TrkA$ представляет собой K^+ , H^+ -симпортер. Нет сомнения, что K^+ -АТФаза утилизирует АТФ. Однако и $\Delta\psi$ может участвовать в ее энергообеспечении,

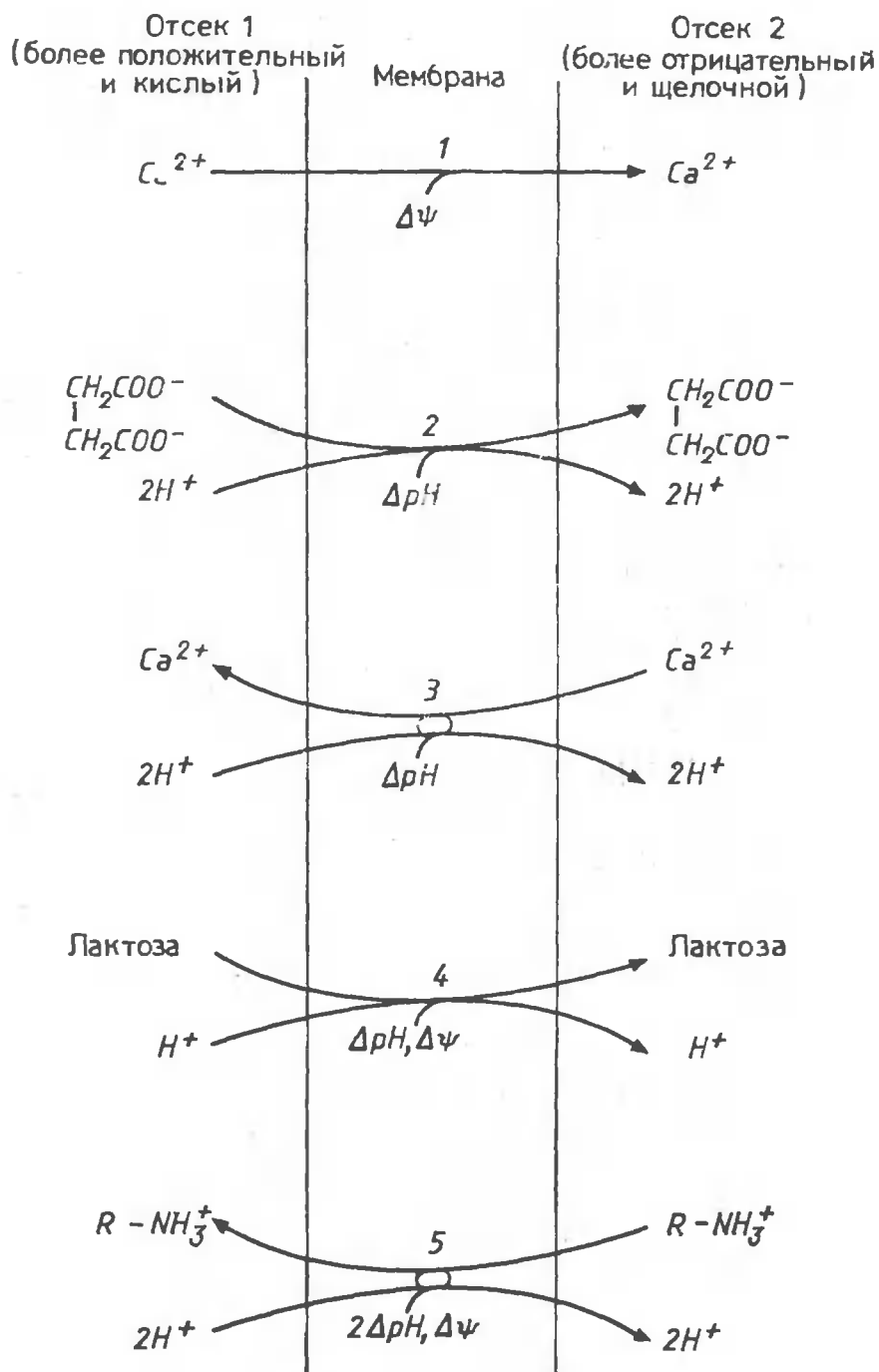


Рис. 41. Примеры $\Delta\mu\text{H}$ -зависимых транспортных систем:

1 — электрофоретический унипорт катиона сильного основания (Ca^{2+}) в отрицательно заряженный отсек; 2 — ΔpH -зависимый симпорт протонов и аниона слабой кислоты (сукцината) в щелочной отсек; 3 — антипорт катиона сильного основания (Ca^{2+}) и протонов по ΔpH ; 4 — симпорт нейтрального соединения (лактозы) и протонов по $\Delta\psi$ и ΔpH , вклады которых равнозначны; 5 — антипорт катиона слабого основания (RNH_3^+) и протонов (вклад ΔpH вдвое превышает таковой $\Delta\psi$)

если этот фермент катализирует унипорт ионов K^+ , поскольку K^+ переносится из положительно заряженного отсека в отсек, заряженный отрицательно. Подобный механизм, вероятно, ответствен за 50 000-кратную аккумуляцию ионов K^+ в клетках *Methanobacterium thermoautotrophicum* при росте на малокалиевой среде.

У *E. coli* существует специальный механизм экспорта K^+ из клетки: на повышение осмолярности среды *E. coli* отвечает поглощением ионов K^+ через *TrkA*-систему. Увеличение $K^+_{\text{вн}}$ препятствует созданию осмотического дисбаланса между цитоплазмой и гипертонической средой. Неудивительно, что снижение осмотического давления среды ведет к выходу ионов K^+ из клетки. Однако этот выход происходит с участием уже иного механизма, отличающегося от *TrkA* по меньшей мере двумя свойствами: он не может использовать Rb^+ вместо K^+ и тормозится блокаторами калиевых каналов плазмалеммы эукариот. Энергетический аспект системы экспорта K^+ остается неясным.

Простой процесс электрофореза может, по-видимому, объяснить движущие силы трансмембранных потоков некоторых анионов. В тилакоидах ион Cl^- движется во внутренний отсек, заряжающийся положительно благодаря работе фотоцепи. В митохондриях выход аниона АТФ также происходит электрофоретически. Однако здесь эта система усложняется тем, что происходит антипорт АТФ $^{4-}_{\text{вн}}$ / АДФ $^{3-}_{\text{нар}}$. (Подробнее см. разд. 5.2.7.)

5.2.3. ΔpH как движущая сила

Электрофоретический транспорт ионов приводит к тому, что катионы и анионы аккумулируются соответственно в отрицательно и положительно заряженных отсеках. Однако очевидно, что разделение

веществ на катионы и анионы вряд ли может быть той целью, ради которой живая клетка тратит энергию на осмотическую работу. Один из путей, помогающих обойти ограничение простого электрофореза, состоит в превращении $\Delta\psi$ -составляющей протонного потенциала в ΔpH . Известно, что $\Delta\psi$ есть первичная форма $\Delta\bar{\mu}H$, поскольку электрическая емкость мембраны меньше, чем pH -буферная емкость разделенных мембраной растворов. Для превращения $\Delta\psi$ в ΔpH необходим электрофоретический поток ионов, разряжающий трансмембранную разность потенциалов.

Если $\Delta\psi = 0$, то уравнение (34) упрощается следующим образом:

$$\frac{[S]_{\text{вн}}}{[S]_{\text{нар}}} = n \frac{[H^+]_{\text{нар}}}{[H^+]_{\text{вн}}} . \quad (36)$$

В простейшем случае слабая кислота или слабое основание аккумулируется соответственно с более щелочном или более кислом отсеке. Для аккумуляции достаточны два условия: мембрана должна быть проницаема для нейтральной формы кислоты (основания) и непроницаема для их заряженной формы. Если выполняются оба

эти требования, то происходят простые события, описываемые уравнениями (37) и (38):



Потребляемые щелочные эквиваленты пополняются $\Delta\mu\text{H}$ -генераторами, откачивающими ионы H^+ , например, из матрикса митохондрий.

Именно таким способом энергизованные митохондрии накапливают ацетат. Поскольку протонированная форма уксусной кислоты (CH_3COOH) представляет собой небольшую нейтральную молекулу, она проходит сквозь мембрану без всяких переносчиков по градиенту pH и аккумулируется в матриксе в форме непроницающего ацетат-иона (CH_3COO^-), нейтрализуя избыток ионов OH^- .

Аналогичный механизм, действующий в противоположном направлении, вызывает выход аммиака:



Если слабое основание или слабая кислота нерастворимы в липиде, требуются соответствующие переносчики, специфичные к незаряженной форме основания (кислоты). Примером такого механизма может быть митохондриальный переносчик сукцината, связывающий сукцинат²⁻ ($-\text{OOCCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$) на наружной поверхности внутренней мембраны и переносящий его с двумя $\text{H}_{\text{нар}}^+$ в матрикс. В целом процесс эквивалентен переносу недиссоциированной формы янтарной кислоты ($\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), концентрация которой в нейтральном растворе очень низка (рис. 41, система 2).

Итак, наличие вторичной формы протонного потенциала (ΔpH) позволяет вовлечь в процессы транспорта слабые кислоты и основания таким образом, что направления их движения оказываются противоположными. Как и в случае электрофореза катионов и анионов, разнонаправленный перенос слабых кислот и оснований не может решить всех задач, стоящих перед транспортными системами клетки или органеллы. Например, бактерия, судя по направленности $\Delta\mu\text{H}$, должна накапливать катионы и слабые кислоты и выбрасывать в среду анионы и слабые основания. Очевидно, что во многих случаях направление движения вещества должно быть иным.

Для катионов сильных оснований проблема может быть решена путем использования катион/ H^+ -антипортеров. Например, в митохондриях и некоторых бактериях *кроме электрофоретической системы аккумуляции ионов Ca^{2+} есть электронейтральный $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ -антипортер*, откачивающий Ca^{2+} из матрикса или бактериальной цитоплазмы с использованием ΔpH (рис. 41, система 3).

Таким образом, митохондрии и бактерии могут не только аккумулировать ионы Ca^{2+} , но и активно выбрасывать эти ионы в среду.

Ясно, что две названные системы должны действовать попеременно, иначе взаимодействие Ca^{2+} -унипортера и $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ -антипортера приведет к рассеянию энергии $\Delta\mu\text{H}$.

Подобным образом анионы сильных кислот могут накапливаться в матриксе за счет ΔpH , если они симпортируются с ионами H^{+} . Так устроен, в частности, механизм накопления фосфата в митохондриях и бактериях. Нейтральная форма фосфорной кислоты (H_3PO_4) практически отсутствует при физиологических значениях pH . Анионы фосфата должны откачиваться из митохондрий (бактерий), двигаясь по $\Delta\psi$. Тем не менее фосфат не только не откачивается, а, напротив, накапливается митохондриями и бактериями под действием $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$, H^{+} -симпортера.

5.2.4. Общая $\Delta\mu\text{H}$ как движущая сила

Иногда движущей силой транспорта оказываются обе составляющие протонного потенциала: $\Delta\psi$ и ΔpH . Это наблюдается, например, при переносе веществ, не обладающих ни зарядом, ни кислотно-основными свойствами. Такие соединения могут переноситься вместе с протоном или обмениваться на протон, используя энергию общей $\Delta\mu\text{H}$. Так, аккумуляция лактозы бактериями осуществляется посредством лактоза, H^{+} -симпортера (см. рис. 41, система 4; подробнее см. разд. 5.2.7). Вакуоли корнеплодов сахарной свеклы накапливают сахарозу при помощи (сахароза/ H^{+})-антипортера. Причиной, по которой в данном случае используется антипортер, а не симпортер, является то обстоятельство, что $\Delta\mu\text{H}$ на мембране вакуоли направлена в другую сторону, чем на бактериальной мембране.

$\Delta\psi$ и ΔpH одинаково эффективны в качестве движущей силы при работе (лактоза, H^{+})-симпортера и (сахароза/ H^{+})-антипортера. В подобных системах повышение стехиометрии H^{+} : вещество увеличивает градиент вещества, возникающий в результате транспортного процесса. В других случаях повышение стехиометрии определяет направление транспорта. Примером тому служит аккумуляция по-

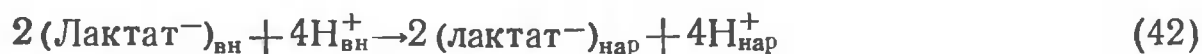
ложительно заряженных катехоламинов (RNH_3^{+}) в хромаффинных гранулах коры надпочечников. Здесь находится H^{+} -АТФаза, накачивающая ионы H^{+} в гранулы, в результате чего их внутренний объем заряжается положительно и закисляется (см. разд. 4.5.1). Аккумуляция RNH_3^{+} обусловлена ($\text{RNH}_3^{+}/2\text{H}^{+}$)-антипортером (рис. 41, система 5). Тем самым перенос одного RNH_3^{+} внутрь гранул сопровождается переносом двух протонов и одного положительного заряда в противоположных направлениях.

Эти данные означают, что энергетически равные по величине $\Delta\psi$ и ΔpH будут вносить разный вклад в обеспечение процесса транспорта: ΔpH окажется вдвое более эффективной, чем $\Delta\psi$ (см. уравнение 34). В то же время в системах типа *TrkA* (см. разд. 5.2.2), ког-

да катион (K^+) симпортируется с H^+ , вклад $\Delta\psi$ должен быть вдвое больше, чем ΔpH , коль скоро транспорт одного иона K^+ связан с переносом *двух* зарядов и *одного* H^+ .

В силу обратимости транспортных процессов *градиент метаболита*, образующегося внутри клетки и выделяющегося в среду $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимой транспортной системой, может, в принципе, использоваться как *источник энергии для генерации $\Delta\bar{\mu}H$* .

Например, в анаэробных *Streptococcus cremoris* и *Streptococcus faecalis* образование лактата в результате гликолиза приводит к возникновению градиента этого продукта между цитоплазмой и средой ($[лактат]_{вн} > [лактат]_{нар}$). Выход лактата из клетки катализируется (лактат, pH^+)-симпортером, где $n=2$ при низких значениях $[лактат]_{нар}$ и $[H^+]_{нар}$. Коэффициент n понижается до 1, когда уровни лактата и H^+ в среде возрастают. Это означает, что совместное действие гликолиза и симпортера защелачивает цитоплазму и заряжает ее отрицательно, если концентрации лактата и H^+ снаружи клетки низки:



Аккумуляция лактата и H^+ в среде таким образом модифицирует этот механизм, что количества лактата и ионов H^+ , выходящих из клетки, уравниваются, и, следовательно, генерация $\Delta\bar{\mu}H$ прекращается. Регуляция такого рода предотвращает накопление в клетке избытка молочной кислоты.

5.2.5. $\Delta\bar{\mu}H$ -Зависимые транспортные каскады

Описано несколько систем, в которых $\Delta\bar{\mu}H$ используется для создания градиента определенного компонента (S_1), а этот градиент затем утилизируется для транспорта другого вещества (S_2).

В бактериях роль S_1 часто выполняют ионы Na^+ . В этом случае энергия $\Delta\bar{\mu}H$ потребляется при откачке ионов Na^+ из клетки посредством электронейтрального Na^+/H^+ -антипортера или электрогенного Na^+/nH^+ -антипортера. Образованная ΔpNa используется для аккумуляции различных метаболитов при помощи (Na^+ , метаболит)-симпортеров. Этот вид осмотической работы оказывается основным у галофильных и многих морских микроорганизмов.

В митохондриях многоступенчатый $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимый каскад описан при исследовании механизмов переноса фосфата и интермедиатов цикла Кребса. Процессом, запускающим каскад, служит образование дыхательной цепью $\Delta\psi$, которая затем превращается в ΔpH посредством электрофоретического обмена $ATP^{4-}_{вн}/ADP^{3-}_{нар}$, а также унипорта Ca^{2+} , K^+ и т. д.

Полученная ΔpH используется для создания Δp (фосфат) при помощи симпорта $H_2PO_4^-$ и H^+ , направленного снаружи внутрь митохондрии. Δp (Фосфат) используется для накопления малата при

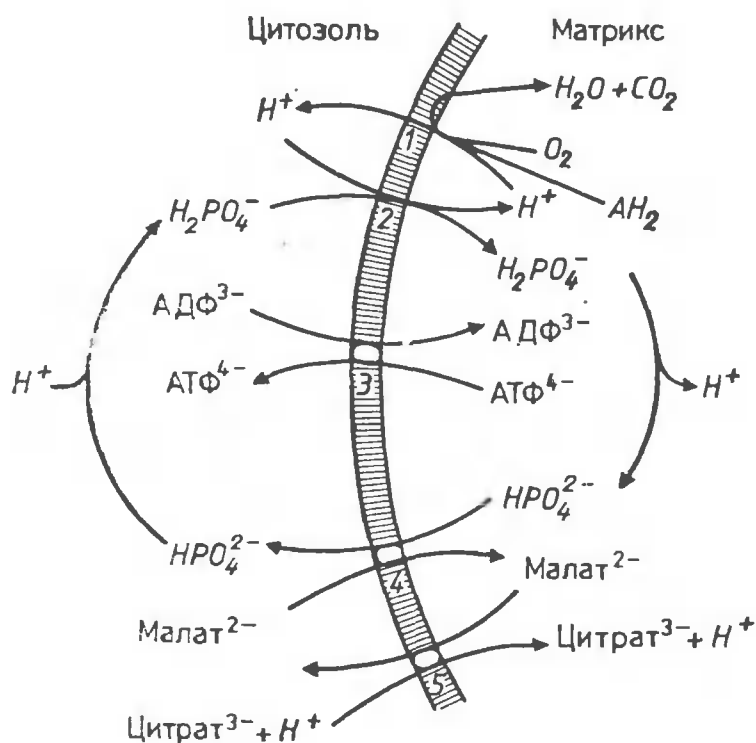


Рис. 42. Транспортный каскад внутренней митохондриальной мембраны (по Р. L. Pedersen, J. P. Wehrle, 1982):

дыхательная цепь (1) откачивает ионы H^+ из матрикса; $(H_2PO_4^-, H^+)$ -симпортер (2) и (ADP^{3-}/ATP^{4-}) -антипортер (3) переносят фосфат и АДФ в матрикс в обмен на АТФ; $(HPO_4^{2-}/\text{малат}^{2-})$ -антипортер (4) катализирует вход малата; $\text{малат}^{2-}/(\text{цитрат}^{3-} + H^+)$ -антипортер (5) вызывает накопление в матриксе цитрата

помощи $HPO_4^{2-}/\text{малат}^{2-}$ -антипортера (тот же переносчик транспортирует некоторые другие дикарбоновые кислоты). Последний этап каскада — импорт митохондриями цитрата. Процесс осуществляется переносчиком, обменивающим малат^{2-} на цитрат^{3-} и H^+ (рис. 42).

Вся эта сложная система открывает возможность создания целой иерархии регулирующих воздействий на метаболизм митохондрий.

5.2.6. Карнитин как пример трансмембранного переносчика химической группировки

В некоторых случаях через мембрану переносится не вся молекула транспортируемого вещества, а только ее часть. Примером этому может быть транспорт остатков жирных кислот (жирных ацилов), опосредованный участием карнитина.

Исследования карнитина имеют длинную историю, поучительную для всех, кто занимается проблемой транспорта метаболитов. Карнитин (рис. 43) был открыт в 1905 г. в России В. Гулевичем и Р. Кримбергом. В то время биохимические журналы пестрели сообщениями о новых веществах биологического происхождения, поэтому описание еще одного органического соединения в мышцах вряд ли было оценено по достоинству.

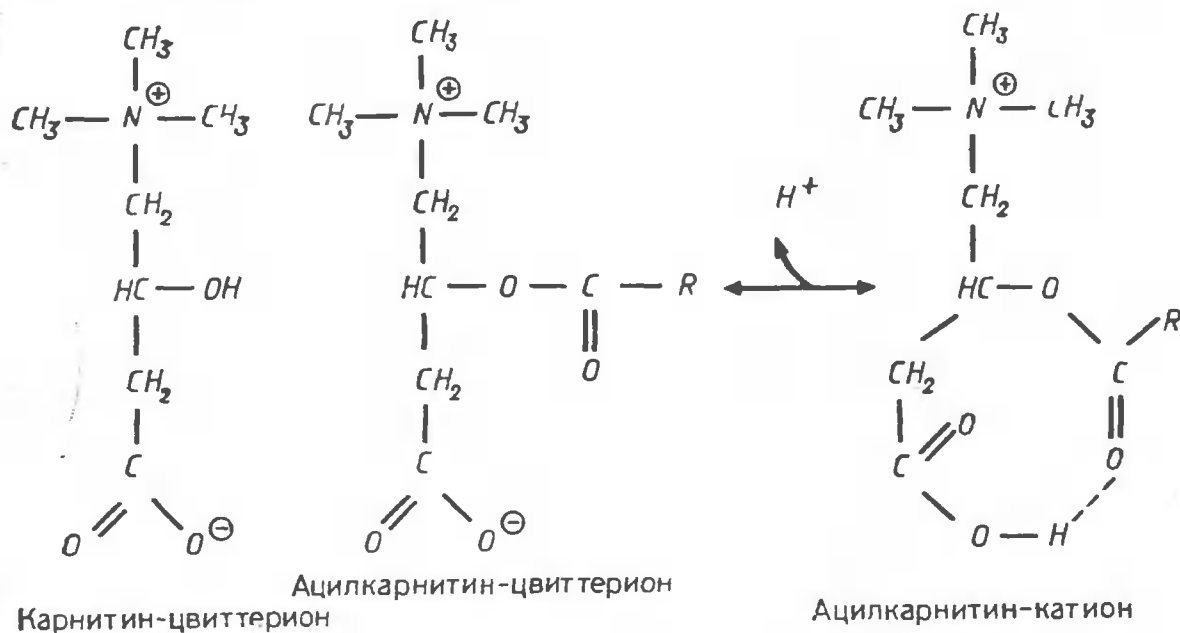


Рис. 43. Карнитин и ацилкарнитины в депротонированной (цвиттерионной) и протонированной (катионной) формах:

R — углеводородный остаток жирной кислоты

В 30-е годы, когда прогресс в понимании биологических функций низкомолекулярных соединений был особенно впечатляющим, структурное подобие карнитина и холина стимулировало ряд исследований, однако никакой метаболической функции карнитина обнаружить не удалось.

В 40-х годах весьма популярными были работы по поиску новых витаминов, и здесь наконец-то был достигнут первый успех в изучении роли карнитина. Оказалось, что он служит одним из ростовых факторов для мучного червя *Tenebrio molitor*. Авторы, обнаружившие этот эффект, назвали карнитин витамином *B_T* (*T* от *Tenebrio*). Позднее было найдено, что в условиях дефицита по карнитину и голодания черви умирают «жирными», будучи неспособными утилизировать свои жировые запасы.

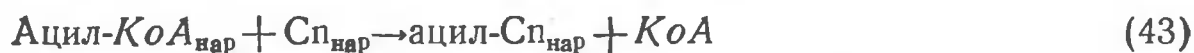
К несчастью для исследователей карнитина, все попытки показать витаминную функцию этого вещества на объектах иных, чем мучной червь, дали отрицательный результат. Работа по витамину *B_T* оказалась не в состоянии стимулировать интерес к функции карнитина просто потому, что человечество, не заинтересованное в про-

цветании мучных червей, было не слишком озабоченно витаминностью их пищи. К середине века, когда подавляющее большинство низкомолекулярных компонентов клетки уже нашло свое место на метаболической карте, функция карнитина все еще оставалась неясной.

В 1955 г., т. е. ровно полвека спустя после открытия карнитина, С. Фридман и Г. Френкель выяснили, что карнитин обратимо ацетилируется посредством *ацетил-КоА*. Ацетил-КоА занимает ключевое место в метаболизме, так что можно было надеяться, что ацетилкарнитин служит интермедиатом переноса ацильных остатков с ацетил-КоА на какой-либо акцептор. Ничего подобного, однако, показано не было. Единственной реакцией утилизации ацетилкарнитина осталось его превращение обратно в карнитин с ацетилированием свободного КоА. То же верно и для ацилкарнитина, второго представителя соединений этого типа, который вместо ацетила содержит ацильный остаток жирной кислоты. Складывалось впечатление, что ацилирование карнитина представляет собой метаболический тупик.

В том же 1955 г. И. Фритц отметил стимулирующее действие карнитина на окисление жирных кислот гомогенатом печени. Подобный эффект представлялся довольно неожиданным для вещества, стоящего в стороне от главных путей метаболизма, так что наблюдение Фритца в течение некоторого времени оставалось необъясненным.

В 60-е годы, когда начались обширные работы по мембранам, эффект Фритца также попал в поле зрения. Обнаружилось, что он как-то связан с митохондриями. Фритц выдвинул гипотезу об участии карнитина в транспорте жирных кислот через митохондриальную мембрану. Эта мысль получила подкрепление, когда выяснились следующие два факта. Во-первых, карнитинацилтрансфераза, катализирующая перенос ацильной группы между КоА и карнитином, локализована на обеих сторонах внутренней мембраны митохондрий. Во-вторых, ацилкарнитин (но не ацил-КоА) способен проникать через митохондриальные мембраны. На основе названных наблюдений была сформулирована схема участия карнитина (Сп) как переносчика жирных ацилов, суммированная уравнениями (43)—(45):



Два вопроса оставались неясными в рамках данной концепции. Какова судьба Сп_{вн}? (Сам по себе он не может выйти из митохондрий, так как внутренняя мембрана, как было показано, не проницаема для карнитина.) Почему именно гидрофильная молекула карнитина была отобрана эволюцией в качестве переносчика жирных ацилов?

Обе проблемы были решены в 70-е годы. Для биоэнергетиков этот период ознаменовался борьбой вокруг хемиосмотической гипотезы Питера Митчела, завершившейся его триумфом. В частности, было найдено, что любой процесс аккумуляции ионов или метаболитов в митохондриях поддерживается энергией $\Delta\mu\text{H}$. Вот почему в 1970 г. автор и сотрудники предположили, что роль карнитина как-то связана с использованием протонного потенциала. Так как жирные кислоты представляют собой гидрофобные анионы, они могли бы откачиваться из митохондрий под действием $\Delta\psi$. Протонированные формы жирных кислот способны входить обратно в митохондрии, двигаясь по $\Delta\mu\text{H}$. Циркуляция жирных кислот в мембране митохондрий должна приводить к рассеянию $\Delta\mu\text{H}$ (разобщению). В то же время ни карнитин, ни ацилкарнитин не могут быть анионами. В депротонированной форме они представляют собой цвиттерионы (суммарный заряд равен нулю), протонированной — катионы. При этом цвиттерионные формы более гидрофильны. Эти данные позволяют предположить, что жирные кислоты, соединяясь с карнитином, утрачивают свою разобщающую активность и приобретают способность накапливаться внутри митохондрий, где происходит их β -окисление. Транспорт в целом может быть описан симпортом жирных ацилов и ионов H^+ в митохондриальный матрикс под действием общей $\Delta\mu\text{H}$:



В соответствии с предсказанием этой схемы, Д. О. Левицкий обнаружил, что плоская искусственная фосфолипидная мембрана проницаема для катиона пальмитоилкарнитина. Как показали дальнейшие опыты, рассеяние $\Delta\mu\text{H}$ в митохондриях разобщителем резко тормозит окисление пальмитоилкарнитина, добавленного после разобщителя. В то же время разобщитель стимулирует окисление, будучи добавленным через 3 мин после пальмитоилкарнитина. По-видимому, количества пальмитоилкарнитина, накопленного энергизованными митохондриями за три минуты инкубации, было достаточно для активного дыхания в течение всего периода полярографического опыта.

Итак, теперь известен ответ на вопрос, почему карнитин был выбран в качестве переносчика жирных ацилов. Зная функцию карнитина, можно лишь поражаться целесообразности устройства этой небольшой молекулы. Все три функциональные группы карнитина необходимы для выполнения им его роли: гидроксильная группа нужна для соединения с жирным ацилом, карбоксильная — для обратимого связывания протона, четвертичный азот — для сообщения молекуле переносчика положительного заряда.

Представленная концепция оставляет без ответа лишь один, последний вопрос, а именно, что происходит с карнитином, освободившимся внутри митохондрии в реакции? Эта проблема была решена в 1976 г. С. Панде и Р. Парвином и независимо Р. Рамсеем и П. Таббосом, обнаружившими стехиометричный карнитин/ацилкарнитин-антипорт между инкубационной смесью и митохондрией.

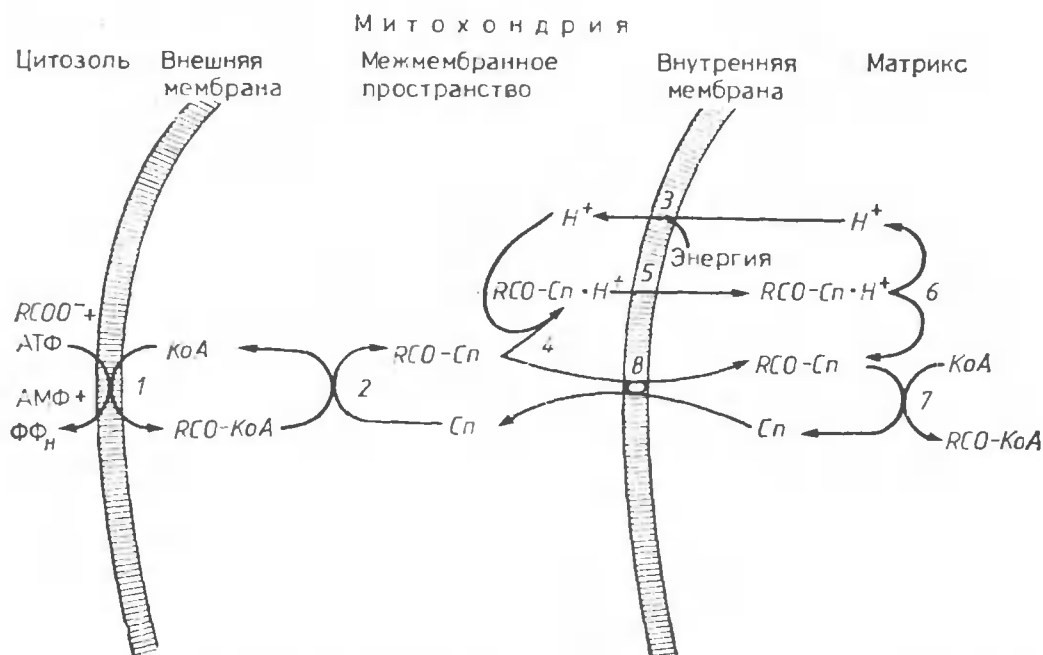


Рис. 44. Карнитин-зависимый транспорт ацилов жирных кислот в матрикс митохондрий:

1 — ацил-КоА-синтаза, 2 — внешняя карнитинацилтрансфераза ($\text{RCO}-\text{Cn}$), 3 — $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторы дыхательной цепи, 4 — протонирование карбоксильной группы ацилкарнитина, 5 — $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -зависимый вход ацилкарнитина, 6 — депротонирование карбоксильной группы ацилкарнитина, 7 — внутренняя ацилкарнитинтрансфераза, 8 — карнитин-ацилкарнитин-антипортер

Общая схема транспорта внемитохондриальных ацилов жирных кислот в матрикс представлена на рис. 44. Процесс начинается во внешней митохондриальной мембране, где локализована ацил-КоА-синтаза, фермент эстерифицирующий КоА свободными жирными кислотами за счет энергии АТФ (реакция 1). В межмембранном пространстве или на внешней поверхности внутренней мембраны ацил-КоА атакуется внешней карнитинацилтрансферазой, в результате чего жирный ацил переносится с КоА на карнитин (реакция 2). Образующийся ацилкарнитин протонируется ионами $\text{H}^+_{\text{нар}}$. Фонд $\text{H}^+_{\text{нар}}$ пополняется дыхательными $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторами, откачивающими протоны из матрикса в межмембранное пространство (реакции 3 и 4). Протонированный ацилкарнитин пересекает внутреннюю мембрану, двигаясь под действием общей $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ (реакция 5), и депротонируется в матриксе (реакция 6). Там ацилкарнитин ацилирует внутримитохондриальный КоА под действием внутренней ацилкарнитинтрансферазы (реакция 7). Высвобождающийся при

этом карнитин обменивается с внешним ацилкарнитином посредством карнитин/ацилкарнитин-антипортера (реакция 8).

Интересной чертой этой системы является то обстоятельство, что уровень карнитина в матриксе регулирует распределение потока ацилкарнитина в митохондрию между $\Delta\mu\text{H}$ -зависимым (т. е. связанным с энергетическими затратами) путем 5 и энергозависимым антипортом 8. Вероятно, $\Delta\mu\text{H}$ -зависимый путь преобладает в тот момент, когда жирные кислоты начинают окисляться, сменяя другие субстраты дыхания. В этих условиях концентрация свободного карнитина в матриксе еще слишком мала, чтобы насытить антипортер, имеющий довольно низкое сродство к карниту (K_m около 1 мМ). На данной стадии затрата $\Delta\mu\text{H}$ оправдана, поскольку это форсирует накопление жирных кислот в митохондриях и тем самым способствует переводу митохондрий на окисление жирных кислот. Массированное поступление ацилкарнитина в матрикс с последующей утилизацией жирных ацилов в системе β -окисления приводит к накоплению карнитина в матриксе митохондрий в количествах, достаточных для активации антипортера. Теперь система может ограничить затраты $\Delta\mu\text{H}$ на транспорт жирных ацилов, так как работа антипортера сама по себе не требует протонного потенциала.

Приведенную выше логику нельзя применить к ацетилкарниту, который слишком гидрофилен для проникающего катиона. В группе автора было постулировано, что *главная функция ацетилкарнитина состоит в забуферивании уровня ацетил-КоА подобно тому, как креатинфосфат забуферивает уровень АТФ.*

5.2.7. Некоторые примеры $\Delta\mu\text{H}$ -зависимых белков-переносчиков

Образование концентрационных градиентов того или иного вещества за счет энергии $\Delta\mu\text{H}$ в принципе может происходить и без специального энергопреобразующего устройства. Как уже упоминалось выше, ацетат должен накапливаться в митохондриях, а аммиак — откачиваться во внемитохондриальное пространство под действием $\Delta p\text{H}$ без всяких переносчиков просто потому, что мембрана проницаема для CH_3COOH и NH_3 . В такой ситуации включение переносчика может лишь ускорить процесс транспорта. Однако переносчик оказывается совершенно необходим, если транспортируемое вещество или химическая группировка сами по себе не могут двигаться через мембрану в нужном направлении. *Живая клетка всегда стремится избежать спонтанных событий*, предпочитая иметь дело с процессами, катализируемыми белками. В этом случае может быть получена высокая специфичность в отношении субстрата и регулируемая в широких пределах скорость реакции. Данный принцип применим и к $\Delta\mu\text{H}$ -зависимой осмотической работе.

Огромное большинство транспортных механизмов обслуживается специальными переносчиками. В некоторых случаях переносчик может быть устроен достаточно просто, как, например, карнитин. Грамицидин, образующий канал, проницаемый для K^+ , Na^+ и H^+ , калиевый унипортер валиномицин, K^+/H^+ -антипортер — нигерицин, Na^+/H^+ -антипортер — моненсин также выглядят сравнительно простыми веществами рядом с белковыми молекулами. Однако следует помнить, что и карнитин, и антибиотики-ионофоры выполняют, в общем-то, примитивные функции.

В случае карнитина — это включение процесса транспорта, который затем, набрав необходимый темп, переходит на другие «рельсы», где уже требуется белок-переносчик (карнитин/ацилкарнитин-антипортер). Что касается антибиотиков, то их роль, по всей видимости, сводится к повреждению мембраны клеток конкурирующих видов. Если функция переносчика более сложна, то это всегда — белок.

Белки-переносчики — это трансмембранные полипептиды, которым при их работе иногда «ассистируют» периферические или водорастворимые белки. В этой связи уместно вспомнить хорошо изученную систему транспорта аминокислот в *E. coli* (см. разд. 5.2.1, табл. 8). Показано, что транспортные белки 1, 2, 5, 7, 8 и 14 действуют без водорастворимых белков-помощников. Другие системы, перечисленные в той же таблице, используют растворимые белки. В случаях 3, 4 и 6 такие белки играют роль буферов, стабилизирующих уровень аминокислот в периплазме. Они обратимо связывают аминокислоты, которые поступают из внешней среды, и высвобождают аминокислоты, когда концентрация последних в периплазме падает из-за активности белков-переносчиков, локализованных в цитоплазматической мембране. Благодаря этим эффектам скорость импорта аминокислот в цитоплазму стабилизируется.

Иная ситуация описана для систем 9 и 10. Здесь белки-помощники необходимы для транспорта как такового. Связав аминокислоту в периплазме, белок-помощник образует комплекс с одним из интегральных белков цитоплазматической мембраны, который играет роль «апопереносчика». Белок-помощник в системах 9 и 10 обуславливает специфическое сродство «холопереносчика» к транспортируемому веществу. Ниже будут рассмотрены две $\Delta\mu H$ -зависимые транспортные системы, исследованные достаточно детально.

(Лактоза, H^+)-симпортер из *E. coli*. (Лактоза, H^+)-симпортер из *E. coli* — наиболее изученный переносчик бактериального происхождения. Он был открыт в 1955 г. Ж. Коэном и Г. Рикенбергом. Спустя восемь лет П. Митчел предположил, что лактоза симпортируется с протоном под действием $\Delta\mu H$. В 1970 г. И. Уэст показал, что поглощение лактозы клетками *E. coli* сопровождается поглощением ионов H^+ . В то же время было выяснено, что продуктом гена *lac y* является какой-то мембранный белок. В 1978 г. Р. Титер и сотрудники клонировали ген *lac y*, что позволило выяснить amino-

кислотную последовательность симпортера, амплифицировать ген и синтезировать белок *in vitro*. В 1980 г. симпортер, растворенный октилглюкозидом, был встроен в протеолипосомы.

В опытах с интактными бактериями, вывернутыми суббактериальными пузырьками и протеолипосомами было продемонстрировано, что диффузия лактата в сторону его низкой концентрации приводит к появлению $\Delta\mu\text{H}$. При этом положительно заряжался и закислялся тот отсек, где концентрация лактозы была ниже. Образующаяся $\Delta\mu\text{H}$ тормозила перенос лактозы. Разобщители-протонофоры снимали торможение.

В то же время транспорт лактозы в сторону большей концентрации за счет энергии $\Delta\mu\text{H}$, образуемой дыханием, тормозился разобщителями. Первоначально этот эффект был показан на интактных клетках *E. coli*, а затем на протеолипосомах, содержащих симпортер и цитохром *o* из *E. coli*.

Описан мутант, сохраняющий способность только к пассивному транспорту лактозы в сторону меньшей ее концентрации. Перенос лактозы через мембрану мутанта не был сопряжен с транспортом протонов.

(Лактоза, H^+)-симпортер — очень гидрофобный белок массой 46,5 кДа, состоящий из 417 аминокислотных остатков. В мембране он существует, по-видимому, в мономерной форме. В аминокислотной последовательности удастся выявить 12—14 гидрофобных сегментов протяженностью в среднем по 24 аминокислотных остатков каждый. Предполагают, что все они образуют трансмембранные α -спиральные колонны. Если это действительно так, то колонны составляют 70% белка. Число колонн должно быть четным, так как оба конца полипептидной цепи находятся на одной и той же (цитоплазматической) стороне мембраны *E. coli*.

Место связывания лактозы локализовано в области 5—6-й колонн, считая от С-конца белковой молекулы. В этой области находится Cys-148, алкилирование которого инактивирует симпортер. Лактоза защищает цистеин от алкилирования, что указывает на его участие в связывании субстрата.

Рис. 45 иллюстрирует вероятный механизм работы (лактоза, H^+)-симпортера.

Митохондриальный АТФ/АДФ-антипортер. Среди митохондриальных транспортных систем наиболее изученным считается АТФ/АДФ-антипортер (синонимы: адениннуклеотидтранслоказа, переносчик адениннуклеотидов). Это гидрофобный мембранный белок (масса 32 кДа) известной аминокислотной последовательности. В протеолипосомах молекулы антипортера формируют частицы массой порядка 60 кДа, как если бы они объединились в димеры.

Судя по распределению гидрофобных и гидрофильных последовательностей в полипептидной цепи, антипортер в принципе мог бы образовать по крайней мере три α -спиральных колонны, пересекающих мембрану. Однако истинное число колонн остается неясным,

так как не решена проблема пространственной структуры антипортера.

Антипортер осуществляет обмен одной молекулы АДФ на одну молекулу АТФ между вне- и внутри митохондриальными пространствами.

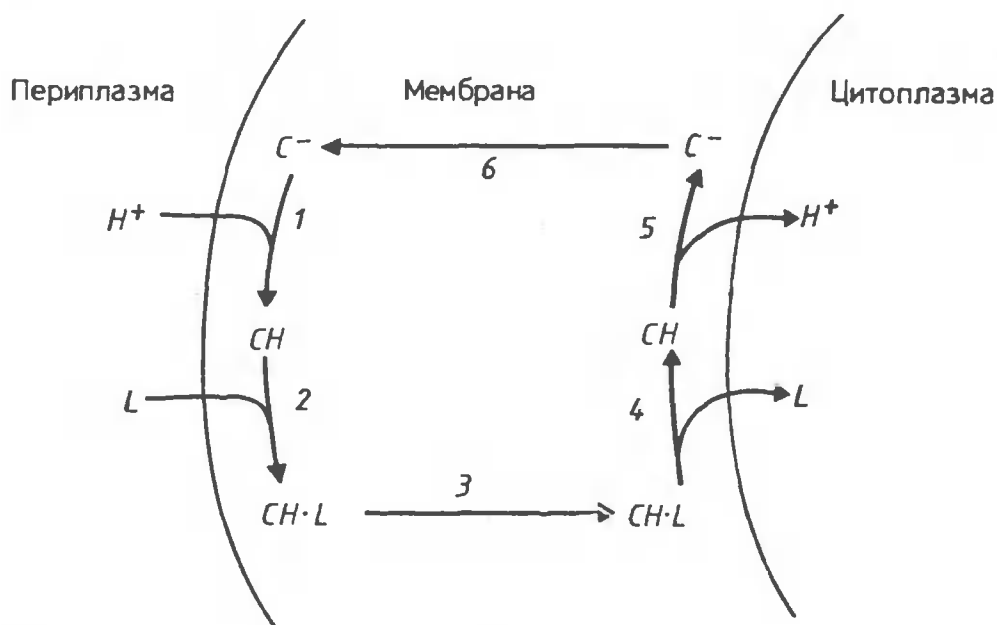


Рис. 45. Механизм действия (лактоза, H^+)-симпортера (по Н. R. Кабаск, 1983):

1—6 — последовательность стадий процесса; СН и C^- — протонированная и депротонированная формы симпортера, L — лактоза

Как было показано М. Клингенбергом и Г. Роттенбергом, катализируемое антипортером перераспределение АТФ и АДФ линейно зависит от $\Delta\psi$, образуемой дыханием. Валиномицин, разряжая $\Delta\psi$, уравнивает соотношение адениннуклеотидов снаружи и внутри митохондрий и меняет кинетику антипорта, в то время как нигерицин, снимающий ΔpH , не влияет на указанные параметры. Все эти факты свидетельствуют об электрогенном характере обмена АТФ/АДФ. Так как АТФ при нейтральном рН несет на один отрицательный заряд больше, чем АДФ и направление $\Delta\psi$ в митохондриях благоприятствует выбросу анионов, авторы заключили, что $АТФ_{вн}^{4-}$ обмениваются на $АДФ_{нар}^{3-}$. Этот вывод был подтвержден в опытах с протеолипосомами.

Число оборота антипортера довольно мало (около 25 в 1 с). В то же время количество молекул антипортера в мембране очень велико: оно составляет от 5 до 12% от общего белка внутренней мембраны.

Специфическими ингибиторами антипортера служат глюкозиды атрактилат и карбоксиатрактилат, а также бонгкрековая кислота.

Антипортер необходим для откачки из митохондрий в цитоплазму того АТФ, который образуется при окислительном фосфорили-

ровании. Электрофоретический характер антипорта нуклеотидов через мембрану энергизованных митохондрий облегчает выход АТФ из митохондрий и вход в них АДФ. Кроме того, повышается цена энергии гидролиза АТФ в цитозоле из-за роста отношения АТФ/АДФ в этом отсеке клетки. Последнее сдвигает все АТФ-зависимые процессы в сторону использования АТФ. Тем самым оказывается возможным совершить дополнительную работу.

Если окислительное фосфорилирование выключено, например, анаэробнозом, тот же самый механизм антипорта предотвращает истощение гликолитического АТФ H^+ -АТФ-синтазой, действующей в обратном (АТФазном) направлении. Чтобы войти в митохондрию, внешний АТФ должен двигаться против поля, создаваемого H^+ -АТФазной реакцией.

Интересно сравнить субстратную специфичность АТФ/АДФ-антипортера и H^+ -АТФ-синтазы. Первый взаимодействует только с адениннуклеотидами, вторая также и с гуаниннуклеотидами. Поэтому ГТФ, образованный внутри митохондрий при окислительном фосфорилировании ГДФ, не может, в отличие от АТФ, быть немедленно откачен антипортером в цитозоль. Сначала требуется передать фосфорил с ГТФ на АДФ посредством нуклеозиддифосфаткиназы и лишь затем полученный АТФ подлежит обмену на цитоплазматический АДФ.

Это относится и к субстратному фосфорилированию при окислительном декарбоксилировании α -кетоглутарата, при котором образуется ГТФ. Ингибирование нуклеозиддифосфаткиназы матрикса предотвращает использование ГТФ_{мн} внемитохондриальными потребителями энергии.

Указание в пользу присутствия АТФ/АДФ-антипортера в мембране оболочки хлоропласта было недавно получено Дж. Уолдегиргисом и сотрудниками. Он оказался чувствительным к бонгкрековой кислоте, но устойчив к карбоксиатрактилату.

Особая система переноса адениннуклеотидов обнаружена в цитоплазматической мембране бактерии *Rickettsia prowazekii*, внутриклеточного паразита эукариотов, который вызывает эпидемический тиф. Бактерия располагает H^+ -АТФазой и с помощью этого фермента поддерживает $\Delta\bar{\mu}H$ на своей мембране. АТФ, образуемый клеткой хозяина, служит энергетическим ресурсом для *R. prowazekii*. Поэтому антипорт АТФ/АДФ, если он обеспечивает поток АТФ в бактерию и поток АДФ в другую сторону, должен быть организован иначе, чем в митохондриях, чтобы обеспечить противоположную направленность процесса транспорта нуклеотидов.

Импорт АТФ был обнаружен также у *Bdellovibrio bacteriovorus*. Эта мелкая бактерия — рекордсмен по скорости движения среди прокариот. Плывая с большой скоростью, *B. bacteriovorus* убивает другие микроорганизмы, сталкиваясь с ними и пробивая их клеточную стенку. Оказавшись внутри клетки, *B. bacteriovorus* поглощает АТФ своей жертвы.

5.2.8. Роль $\Delta\mu\text{H}$ в транспорте макромолекул

Одна из наиболее интригующих проблем мембранологии и биоэнергетики состоит в том, каким образом биологические макромолекулы, а именно белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды переносятся через гидрофобный барьер сопрягающих мембран, не проницаемый для такой небольшой частицы, как ион H^+ .

Твердо установлено, что *процессы транспорта макромолекул происходят без нарушения целостности мембраны*, поскольку найдено, что они обеспечиваются энергией $\Delta\mu\text{H}$ или одной из ее составляющих. Скорость транспорта некоторых макромолекул очень высока. Как ясно из предыдущих разделов, вопрос о механизме транспорта низкомолекулярных соединений все еще ожидает своего решения. Однако в ряде случаев переносчики уже идентифицированы, выделены и встроены в протеолипосомы. Для некоторых из них выяснена аминокислотная последовательность. Применительно к транспорту макромолекул переносчики еще не идентифицированы.

Если обсуждать транспорт белков через мембраны, то здесь наиболее изучены две модели: импорт в митохондрии (хлоропласты) белков, синтезируемых в цитозоле, и экспорт из бактериальной цитоплазмы белков, предназначенных для периплазмы и внешней мембраны.

С проблемой транспорта белков тесно связан вопрос о механизме встраивания в мембрану вновь синтезированных трансмембранных белков. Чтобы расположиться нужным образом в мембране, определенные домены этих белков должны пересечь гидрофобный барьер.

Транспорт митохондриальных белков. Биогенез митохондрий. Как правило, белки, синтезируемые в цитозоле и затем импортируемые в митохондрии, образуются в виде более крупных предшественников, содержащих добавочную аминокислотную последовательность с N-конца полипептидной цепи. Такая последовательность, называемая *лидером*, может иметь массу от 0,5 до 10 кДа. Длина лидера не коррелирует с типом «адреса», по которому направляется белок в митохондрии: в матрикс, внутреннюю или внешнюю мембрану, в межмембранное пространство. Кроме того, различные субъединицы одного и того же ферментного комплекса могут иметь лидерные последовательности разной длины.

В ряде случаев выяснена аминокислотная последовательность лидера. Так, лидер субъединицы 9 (протеолипида) фактора F_0 из митохондрий нейроспоры содержит 66 аминокислот. Он гораздо основнее и более гидрофилен, чем сам протеолипид. Лидер цитохром *c*-пероксидазы дрожжевых митохондрий также более основен, но в отличие от лидера протеолипида содержит гидрофобную последовательность из 23 аминокислотных остатков (10 из них — остатки аланина), которая могла бы образовать трансмембранную α -спиральную колонну. Лидер орнитинтранскарбамилазы, как и в двух

предыдущих случаях, более основен. Однако предшественник аспаратаминотрансферазы более кислый, чем зрелый белок (о возможной причине этого обстоятельства см. ниже).

В некоторых случаях, когда лидер отсутствует, показано, что белок-предшественник имеет иную конформацию, чем зрелый белок. Это продемонстрировано, в частности, для АТФ/АДФ-антипортера и одного из белков внешней митохондриальной мембраны — порина (рис. 46, случаи 1 и 3). Показано, что информация, необходимая для направления синтезируемых молекул АТФ/АДФ-антипортера во внутреннюю мембрану митохондрий, заключена где-то в пределах первых 115 аминокислотных остатков этого белка.

Цитохром *c*, также не имеющий лидерной последовательности, проходит в межмембранное пространство митохондрии в виде апофермента и получает гем только по прибытии на «место своего назначения» (рис. 46, случай 2). Образование холоцитохрома *c* сопровождается сильным конформационным изменением, делающим невозможным возвращение этого белка в цитозоль.

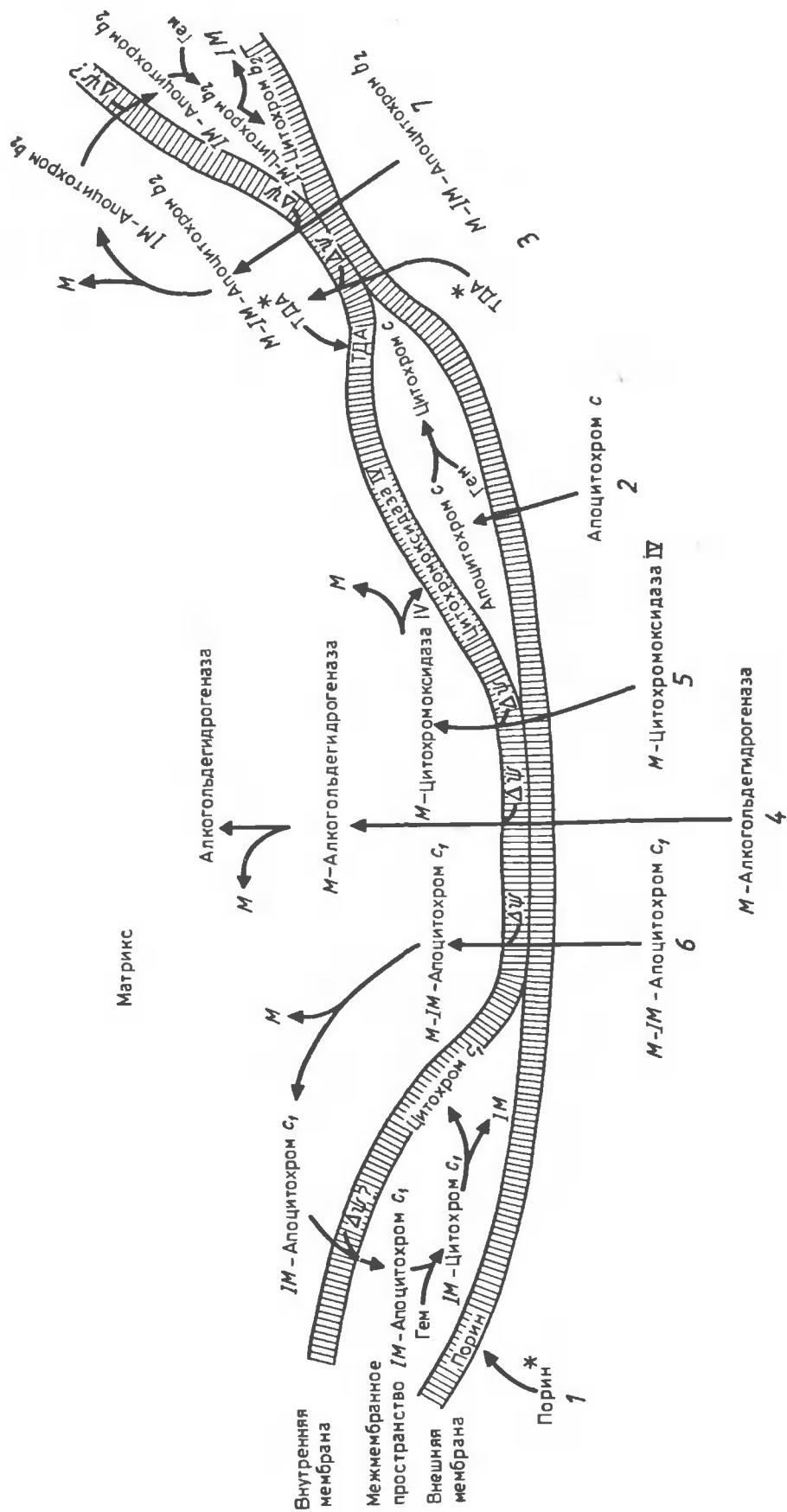
Во многих случаях показано, что митохондриальные белки синтезируются на свободных полисомах. Тем самым транспорт этих белков, имеющий, как правило, энергозависимый характер, должен обеспечиваться необходимой энергией на каких-то посттрансляционных этапах.

Достигнув места назначения, белок-предшественник становится объектом действия *лидер-пептидазы*, специфического протеолитического фермента, требующего ионов металла для своей активности. Лишившись лидера, предшественник превращается в *зрелый белок*. Измерено время жизни предшественников; оно оказалось сравнительно коротким (1 мин или даже меньше).

Для некоторых митохондриальных белков показаны специальные рецепторы, локализованные во внешней мембране митохондрий. Пузырьки, полученные из внешней митохондриальной мембраны, специфически связывают белки-предшественники, причем этот процесс не требует энергии.

Транспорт *апоцитохрома c*, по всей вероятности, служит примером простейшего случая, когда внутримембранный белок сначала связывается с рецептором, а затем переносится через внешнюю мембрану в межмембранное пространство не зависящим от энергии способом.

Гораздо сложнее ситуация для другого межмембранного белка: *лактатдегидрогеназы дрожжевых митохондрий* (синоним — цитохром b_2). Предшественник этого водорастворимого фермента массой 68 кДа в виде апобелка сначала связывается с рецептором, затем достигает митохондриального матрикса энергозависимым образом и теряет там часть своей лидерной последовательности, так что образуется белок массой 65 кДа. Последний, образовавшись, вторично пересекает внутреннюю мембрану (но уже в противоположном направлении), чтобы попасть из матрикса в межмембранное



пространство. Здесь 65 кДа-белок связывает гем, атакуется межмембранной лидер-пептидазой и укорачивается еще раз, превращаясь в зрелый холофермент массой 58 кДа (рис. 46, случай 7).

Аналогичная цепь событий наблюдается при транспорте цитохрома c_1 , белка внутренней мембраны, большая часть которого расположена на внешней поверхности этой мембраны. Предшественник цитохрома c_1 массой 35 кДа сначала переносится через две мембраны в матрикс, укорачивается лидер-пептидазой матрикса с образованием 34 кДа-белка и транспортируется через внутреннюю мембрану из матрикса в межмембранное пространство. Здесь он связывает гем и расщепляется местной лидер-пептидазой, давая зрелый холофермент массой 31 кДа. Твердо установлено, что энергия требуется по меньшей мере для входа 35 кДа-предшественника в матрикс.

Процессинг цитохрома c_1 показан на рис. 46, случай 6. Такой сложный механизм становится понятным, если предположить, что энергозависимый импорт белков в митохондрии происходит через те места внутренней мембраны, где она сливается с внешней мембраной. В подобном случае любой белок, транспортирующийся в митохондрии энергозависимым образом, прежде всего попадает в матрикс. Поэтому предшественнику приходится дважды пересекать внутреннюю мембрану, чтобы достичь межмембранного пространства.

Г. Шацу и его коллегам удалось получить удлиненное производное немитохондриального белка — дигидрофолатредуктазы, к которой была присоединена лидерная последовательность цитохрома

Рис. 46. Транспорт в митохондрии белков, синтезированных в цитозоле (показаны семь основных случаев, различающихся по механизму транспорта):

1 — порин синтезируется без какой-либо лидерной последовательности и прямо встраивается во внешнюю мембрану митохондрии. Встраивание требует специального белка-рецептора, локализованного во внешней мембране, и сопровождается конформационным переходом (порин* → порин). Процесс не нуждается в энергизации мембраны;

2 — апоцитохром c соединяется с особым рецептором, локализованным во внешней мембране и переносится в межмембранное пространство. Энергизации мембраны не требуется. В межмембранном пространстве апоцитохром c связывает гем с образованием холоцитохрома c , который уже не узнается рецептором и не может пройти через мембрану;

3 — АТФ/АДФ-антипортер в конформации (ТДА*), отличной от той, которая характерна для него в мембране, переносится в матрикс энергозависимым способом. По неизвестной причине в матриксе происходит изменение конформации ТДА* → ТДА. Образованный ТДА встраивается во внутреннюю мембрану. В этом и во всех последующих случаях транспортируемый белок узнается рецептором во внешней мембране и транспорт происходит без промежуточного высвобождения белка в межмембранное пространство (по-видимому, белок переносится через места слияния внешней и внутренней мембран);

4 — предшественник алкогольдегидрогеназы содержит лидерную последовательность M , которая служит адресом матрикса. M -Алкогольдегидрогеназа пересекает две мембраны энергозависимым способом. В матриксе M отщепляется лидер-пептидазой и образуется зрелая алкогольдегидрогеназа;

5 — предшественник субъединицы IV, цитохромоксидазы (M -цитохромоксидаза IV), синтезирующийся в цитозоле, транспортируется и процессируется, как и в случае 4, но продукт встраивается во внутреннюю мембрану;

6 — предшественник апоцитохрома c_1 содержит сразу два адреса: матрикса (M) и межмембранного пространства (IM). Предшественник вначале транслоцируется и процессируется, как и в случае 4, но после отщепления M переходит из матрикса в межмембранное пространство. Транспорт требует энергии. В межмембранном пространстве IM -апоцитохром c_1 связывает гем и расщепляется межмембранной лидер-пептидазой на цитохром c_1 и IM . Полученный цитохром c_1 сорбируется на внешней поверхности внутренней мембраны;

7 — процесс протекает, как и в случае 6, но зрелый белок не встраивается в мембрану

c₁. Установлено, что этот белок, будучи добавленным к суспензии дрожжевых митохондрий, процессируется в два этапа с образованием исходной дигидрофолатредуктазы, которая оказывается в межмембранном пространстве. Затем аналогичный опыт был поставлен с химерным белком. Этот белок содержал дигидрофолатредуктазу и конечную часть лидера цитохрома c₁, лишенную пептида из 19 аминокислотных остатков, который, по-видимому, располагается трансмембранно и необходим для переноса белка из матрикса в межмембранное пространство. В этом случае дигидрофолатредуктаза направлялась в матрикс и уже не покидала его.

В той же лаборатории были получены производные дигидрофолатредуктазы, содержащие лидер субъединицы IV цитохромоксидазы (фермент внутренней мембраны) или алкогольдегидрогеназы (фермент матрикса) (рис. 46, случаи 5 и 4). В соответствии с предсказанием рассматриваемой схемы дигидрофолатредуктаза в обоих случаях направлялась в матрикс.

Существует очень мало данных о встраивании во внутреннюю мембрану тех белков, которые синтезируются в матриксе. К белкам этого типа относится небольшое количество очень гидрофобных полипептидов, принадлежащих следующим комплексам: НАДН-КоQ-редуктазе (несколько полипептидов неизвестной функции), КоQH₂-цитохром c-редуктазе (цитохром b), цитохромоксидазе (субъединицы I—III) и H⁺-АТФ-синтазе (субъединица 9, или протеолипид). Все они образуются сразу в зрелой форме. Вопрос о том, нужна ли энергия для их встраивания в мембрану, остается открытым.

Особый случай представляет собой субъединица 9 H⁺-АТФ-синтазы из митохондрий *Neurospora crassa*. Показано, что данный белок синтезируется в цитозоле, а не в матриксе.

Изучение энергообеспечения импорта белков в митохондрии показало, что энергия необходима лишь на стадии транслокации лидера. Остальная (т. е. большая) часть белка-предшественника проходит через мембрану без затраты энергии. Протеолитическое расщепление предшественника также не зависит от энергии.

Интересен вопрос, в какой форме должна быть энергия, чтобы транслоцировать лидер. Наличие АТФ недостаточно, поскольку в отсутствие $\Delta\mu\text{H}$ импорт белков невозможен, даже если уровень АТФ высок как внутри, так и снаружи митохондрий. Вероятнее всего, в большинстве случаев электрический компонент протонного потенциала ($\Delta\psi$) вызывает электрофорез положительно заряженной лидерной последовательности в направлении отрицательно заряженного матрикса (см. ниже).

Важный вывод из этих рассуждений состоит в том, что митохондрия не может образоваться самосборкой из составляющих ее компонентов. Она происходит только от другой митохондрии подобно тому, как клетка происходит от клетки. Необходимым условием для биогенеза митохондрий служит наличие $\Delta\psi$ на ее внутрен-

ней мембране. Поскольку ни один из ферментов, образующих $\Delta\psi$, не может быть синтезирован самой митохондрией, вся популяция этих органелл в клетке обречена на гибель, когда митохондрии потеряют свой последний $\Delta\psi$ -образующий фермент, даже если в цитозоле будет избыток всех белков-предшественников.

Вот почему дрожжи, растущие в анаэробных условиях, сохраняют замкнутые мембранные пузырьки («промитохондрии»), которые не содержат дыхательной цепи, но способны в генерации $\Delta\psi$ посредством обращения H^+ -АТФ-синтазы, по-видимому, присутствующей там, хотя и в очень малом количестве.

Транспорт бактериальных белков. Белки бактерий, локализованные в периплазме или внешней мембране, должны пересечь внутреннюю мембрану, чтобы прибыть по назначению. Кроме того, известно, что бактерии экскретируют некоторые ферменты во внешнюю среду. Все эти процессы напоминают импорт белков митохондриями. В обоих случаях транспортируемый полипептид содержит дополнительную лидерную последовательность, транспорт которой требует энергии.

Необходимость энергизации мембраны специально исследовали применительно к периплазматическим белкам, связывающим лейцин, изолейцин и валин, мальтозу, β -лактамазу и несколько белков внешней мембраны.

По некоторым данным, $\Delta\mu H$ необходим не только для экспорта определенных белков из цитоплазмы, но и для удержания цитоплазматических белков внутри бактериальной клетки. Показано, что в оболочке устойчивого к протонофору мутанта *E. coli*, который выращен в присутствии протонофора, обнаруживается какой-то новый белок массой 42 кДа. Белок, найденный как в цитоплазматической, так и во внешней мембране клетки, оказался рибосомальным фактором элонгации $T_u(EF-T_u)$.

Роль $\Delta\mu H$ в транспорте белков и их укладке в мембране. В некоторых случаях найдено, что $\Delta\mu H$ или $\Delta\psi$ необходимы для правильного встраивания белка в мембрану. Вероятно, простейшим примером такого рода явления может быть $\Delta\psi$ -зависимое образование каналов в плоской фосфолипидной мембране при добавлении пептидного антибиотика аламетицина. В этом случае $\Delta\psi$ необходима для электрофоретического перемещения заряженных групп аламетицина в мембране.

Асиалоггликопротеиновый рецептор из печени и мелиттин, активное начало пчелиного яда, встраиваются в плоскую мембрану, только если на нее подано напряжение более 20 мВ. Мелиттин — короткий полипептид (26 аминокислотных остатков), так что нетрудно представить механизм $\Delta\psi$ -зависимого встраивания в мембрану, включающий трансмембранный электрофорез определенных участков этой молекулы.

Существует правило, что положительно заряженный домен мембранного белка локализуется на внутренней стороне, а отрицатель-

но заряженный — на противоположной (внешней) стороне цитоплазматической мембраны. Этот принцип применим также к процессу транспорта белков-предшественников через внутреннюю мембрану митохондрий в направлении отрицательно заряженного матрикса. Лидерная последовательность митохондриальных белков отличается высокой основностью, так как содержит несколько положительно заряженных аминокислот.

По данным Н. Пфаннера и В. Нойперта, импорт митохондриальных белков может поддерживаться искусственно созданной $\Delta\psi$, но не ΔpH . Для образования $\Delta\psi$ к митохондриям, нагруженным ионами K^+ и инкубируемым в бескальциевой среде, добавляли валиномицин. Диффузионный потенциал K^+ и поддерживаемый этим потенциалом импорт белков лишь частично снижались при добавлении разобщителя-протонофора.

Суммируя все эти наблюдения, можно заключить, что в белковом транспорте положительно заряженный лидер подобно карнитину участвует в переносе жирных ацилов. Оба они, лидер и карнитин, напоминают по своей функции электровоз, использующий электрическую тягу, чтобы везти железнодорожный состав, который много больше его по размеру и сам по себе неподвижен.

В митохондриях исключение из правила составляет аспартат-аминотрансфераза, которая импортируется под действием ΔpH , а не $\Delta\psi$. Предшественник этого белка — более кислый, чем сам белок. Может быть, в данном случае кислые аминокислоты, содержащиеся в лидерной последовательности, протонируются при связывании с внешней поверхностью мембраны и депротонируются после того, как лидер пересекает мембрану и появляется на внутренней ее стороне.

В ряде случаев для транспорта макромолекул необходимыми оказываются не только ΔpH , но также и АТФ. Именно так обстоит дело при транслокации липополисахаридов из цитоплазмы во внешнюю мембрану *E. coli*. Транспорт фосфатидилэтаноламина по тому же маршруту также является энергозависимым, однако остается неясным природа энергетического ресурса.

Недавно группами Н. Нойперта и Г. Шаца (1987) была продемонстрирована необходимость не только $\Delta\psi$, но и АТФ для транспорта митохондриальных белков. По-видимому, АТФ требуется для разворачивания глобулы белка, подлежащего транспорту. Импорт белков в хлоропласты нуждается в АТФ, а не в ΔpH . При этом АТФ расщепляется на внешней стороне мембраны оболочки хлоропласта.

Транспорт бактериальной ДНК. Нет сомнений, что должен существовать особый молекулярный механизм, транспортирующий ДНК через мембрану бактериальной клетки. Этот процесс может быть исключительно быстрым. Так, скорость переноса ДНК при инфицировании бактерии фагом T4 достигает $3 \cdot 10^3$ нуклеотидных остатков в 1 с, т. е. один нуклеотид за 330 мкс. Это сравнимо со

скоростью переноса электрона по дыхательной цепи. Перенос ДНК при конъюгации и генетической трансформации происходит несколько медленней: соответственно 600 и 55 нуклеотидных остатков в 1 с, что больше, чем скорость переноса нуклеотидов АТФ/АДФ-антипортером (25 нуклеотидов/с). Транспорт ДНК часто сопровождается переносом особых «пилотных» белков. Это означает, что мембрану пересекают большие молекулярные массы. В некоторых случаях ДНК переносится в виде двойной спирали.

Роль $\Delta\mu\text{H}$ и АТФ в транспорте ДНК была изучена Л. Л. Гринюсом и его сотрудниками. Найдено, в частности, что истощение фонда внутриклеточного АТФ при инкубации с арсенатом не тормозит ни генетической трансформации, ни способности бактерий инфицироваться фагом T4. С другой стороны, конъюгация тормозилась арсенатом. При этом оказалось, что $\Delta\mu\text{H}$ необходима во всех трех случаях транспорта ДНК. В частности, это было показано для трансформации *B. subtilis*, инфицирования *E. coli* фагом T4 и конъюгации.

Позднее эти наблюдения были подтверждены в других лабораториях. Так, Б. Бремер и сотрудники нашли, что вызывающий трансформацию перенос ДНК в клетки *B. subtilis* или *Haemophilus influenzae* зависит от $\Delta\mu\text{H}$, причем эффективны $\Delta\psi$ и $\Delta\mu\text{H}$. Б. Лабедан и сотрудники подтвердили, что $\Delta\mu\text{H}$ необходим для инфицирования фагом T4, но, по их мнению, действующим компонентом служит $\Delta\psi$, а $\Delta\mu\text{H}$ не эффективен. Группе Б. Лабедана не удалось показать необходимость $\Delta\mu\text{H}$ для инфицирования фагом T5. Транспорт ДНК фага λ в *E. coli* также оказался энергонезависимым процессом.

Складывается впечатление, что бактерии располагают различными механизмами переноса фаговой ДНК через мембрану.

В процессах, когда $\Delta\mu\text{H}$ необходима, она может служить либо движущей силой транспорта, либо его регулятором, определяющим, например, правильную ориентацию транспортируемой ДНК или ДНК-белкового комплекса.

Почти нет данных об энергетике трансмембранного переноса нуклеиновых кислот в эукариотической клетке. Многообещающим представляется изучение переноса ДНК и РНК через внешнюю мембрану эукариот. Другая интересная проблема — экспорт информационной РНК из ядра в цитоплазму.

5.3. Механическая работа за счет $\Delta\mu\text{H}$: движение бактерий

В течение длительного времени молекулярный механизм механической работы живых организмов ассоциировали исключительно с АТФазами актомиозинового типа. Было доказано, что актомиозин-подобные АТФазы ответственны не только за мышечное сокра-

щение, но и за подвижность сперматозоидов, некоторых растений, грибов и простейших, а также за движение определенных внутриклеточных структур. В частности, АТФ-зависимый механизм приводит в движение флагеллы, или жгутики, эукариотических клеток.

Когда стало ясно, что движение бактерий обусловлено вращением флагелл, простейшая трактовка механизма этого эффекта, казалось, состояла в предположении об АТФ-зависимом характере и этого типа механической работы. Однако все попытки обнаружить АТФазную активность прокариотических флагелл были тщетными. Кроме того, выяснилось, что структуры про- и эукариотических флагелл совершенно различны. Принципиально другим оказался и механизм движения бактерий, использующий вместо АТФ $\Delta\mu\text{H}$ (в ряде случаев $\Delta\mu\text{Na}$ — см. разд. 7.2.2).

5.3.1. Структура флагеллярного мотора бактерий

Типичная *флагелла бактерии состоит из филамента и базального тела*, закрепленного в клеточной стенке. Филамент представляет собой жесткую левую спираль в несколько микрометров длиной (иногда до 20 мкм) и 12—20 нм в диаметре. Он построен из структурного белка флагеллина, молекулярная масса которого у разных видов колеблется от 25 до 60 кДа. Никакой ферментативной активности у флагеллина обнаружить не удалось. Молекулы флагеллина в филаменте упакованы таким образом, что получается полая трубка.

Филамент обычно крепится к базальному телу особой изогнутой структурой, называемой *крюком*. Это трубка несколько большего диаметра, чем филамент. *Базальное тело состоит из стержня, сочлененного с крюком, и четырех (иногда трех или двух) дисков*, как бы насаженных на стержень. Диаметр стержня от 8 до 12 нм, дисков — 18—33 нм (рис. 47).

Диски обозначаются буквами *L, P, S* и *M*, причем последний из них локализован в цитоплазматической мембране бактерии. В дисках *Salmonella typhimurium* обнаружены следующие белки: 27 кДа (*L*), 38 (*P*) и 65 кДа (*M*). Белковый состав *S*-диска неизвестен. Кроме этих белков базальное тело содержит также белки с массой 60 кДа (сочленение филамента и крюка), 42 (крюк), 32 и 30 (стержень), 16 и 14 кДа (локализация неизвестна) и, возможно, некоторые другие.

Иногда в бактериальной стенке видны кольца гораздо большего диаметра, чем диски базального тела. Их нет в препаратах очищенных базальных тел. Можно предположить, что эти большие кольца являются компонентами «статора», в то время как базальное тело есть «роторная часть» флагеллярного мотора.

Показано, что филамент совершает не биение, а истинное вращательное движение вдоль своей длинной оси. Из-за того, что фи-

ламент обычно представляет собой левую спираль, флагелла, расположенная сзади, толкает клетку при вращении против часовой стрелки. Вращение по часовой стрелке тянет клетку в противополо-

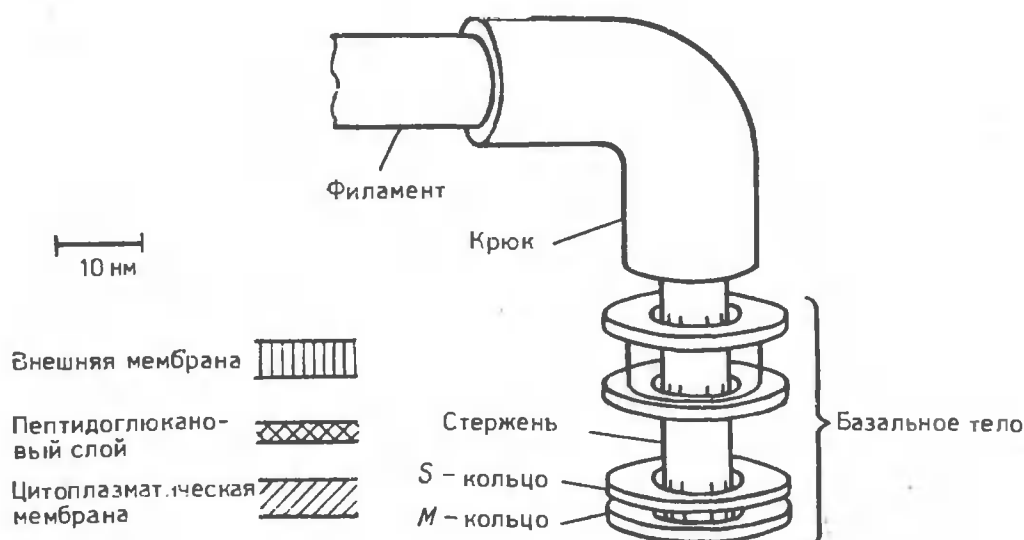


Рис. 47. Структура базального тела бактериальных флагелл (на примере *E. coli*) (по J. Adler, 1975)

ложную сторону, и она движется флагеллой вперед. Известны бактерии, имеющие много флагелл, как, например, *E. coli*. Вращение флагелл *E. coli* против часовой стрелки приводит к тому, что все они как бы сплетаются в жгут, вращение которого обуславливает поступательное движение клетки. При вращении по часовой стрелке жгут расплетается, флагеллы вращаются независимо одна от другой, и клетка останавливается.

5.3.2. $\Delta\mu\text{H}$ вращает ротор флагеллярного мотора

Еще в 1956 г. П. Митчел отметил принципиальную возможность того, что ионный градиент может вызвать движение бактерий. Было высказано предположение, что бактериальная флагелла играет роль гигантского ионного канала. Впоследствии эта конкретная схема была оставлена на основании расчета, показавшего ее неэффективность. Тем не менее общая идея локомоции, поддерживаемой энергией ионного градиента, получила экспериментальное подтверждение.

В 1974 г. Дж. Адлер и его коллеги наблюдали движение мутанта *E. coli*, лишенного способности к окислительному фосфорилированию. Мутант был подвижен в условиях активного дыхания, хотя оно не могло быть сопряжено с синтезом АТФ, уровень которого поддерживался гликолизом. Более того, сильное уменьшение кон-

центрации АТФ в клетке не снижало скорости движения мутанта. Клетки обездвиживались при добавлении разобщителя.

В 1975 г. работами автора и его сотрудников было подтверждено наблюдение Дж. Адлера, хотя исследования производили на бактерии *Rhodospirillum rubrum*, весьма отдаленной от *E. coli* по своему систематическому положению. Как оказалось, и в этом случае скорость движения не коррелирует с уровнем АТФ. В то же время наблюдали хорошую корреляцию с величиной мембранного потенциала, образуемого фотосинтетической редокс-цепью. На основе этих данных было сделано заключение, что движение *Rh. rubrum* поддерживается энергией $\Delta\bar{\mu}H$, а не АТФ. В дальнейшем в группе автора и двух других лабораториях было показано, что бактерии, неподвижные в условиях, когда генерация $\Delta\bar{\mu}H$ естественным путем была невозможна, на несколько минут вновь приобретают подвижность, если на их мембране искусственно создается $\Delta\psi$ или ΔpH .

У *B. subtilis* подвижность появлялась при $\Delta\bar{\mu}H$ около 30 мВ; скорость движения возрастала при повышении $\Delta\bar{\mu}H$ до 60 мВ. Дальнейший рост $\Delta\bar{\mu}H$ не влиял на скорость. У *E. coli* также был обнаружен порог, ниже которого бактерии оставались неподвижными. Однако возрастание скорости движения наблюдалось вплоть до величин $\Delta\bar{\mu}H$ порядка 200 мВ.

Максимальные скорости движения различаются у разных видов. Наибольшая величина: $140 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$ получена для *Bdellovibrio bacteriovorus*.

Другие бактерии обычно движутся со скоростью 20—30 $\text{мкм} \cdot \text{с}^{-1}$. Скорость вращения флагеллы обычно колеблется в пределах 5—50 оборотов/с, достигая 150 оборотов/с у *E. coli* в условиях, когда базальное тело вращается практически без нагрузки.

Важная особенность флагеллярного мотора — его способность вращать флагеллу как по часовой стрелке, так и против нее при неизменной направленности $\Delta\bar{\mu}H$. Переключение с одного направления вращения на другое контролируется системой таксиса. Добавление репеллента вызывает смену направления вращения: флагелла, вращавшаяся против часовой стрелки, начинает вращаться по часовой стрелке.

Одним из параметров, измеряемых системой таксиса, служит $\Delta\bar{\mu}H$. Таким образом, $\Delta\bar{\mu}H$ оказывается не только движущей силой, но и регулятором направления вращения ротора. Этот факт сильно осложняет изучение механизма работы флагеллярного мотора. Преодолеть затруднение удалось двумя различными путями.

В работах Г. Берга и сотрудников был исследован подвижный мутант стрептококка, дефектный по системе таксиса. Оказалось, что изменение направления $\Delta\bar{\mu}H$, искусственно создаваемой на мембране мутанта, приводит к изменению направления вращения флагеллы. Этот эффект служит сильным доводом в пользу кон-

цепции, рассматривающей $\Delta\bar{\mu}H$ в качестве той формы энергии, которая непосредственно потребляется флагеллярным мотором. Крайне маловероятно, чтобы обратная $\Delta\bar{\mu}H$ вызывала вращение в противоположную сторону, если между $\Delta\bar{\mu}H$ и мотором есть какой-либо интермедиат типа высокоэнергетического соединения.

Другой подход был применен М. Эйзенбахом и Дж. Адлером. Авторы получили «тени» клеток *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, сохраняющие оболочку и флагеллы, но лишенные цитоплазмы. «Тени» прикрепляли к стеклу, покрытому антителами к флагеллину. В результате приклеенная к стеклу флагелла вместе со своим ротором оказывалась прочно закрепленной. В этих условиях включение мотора приводило к вращению статора, а с ним и «тени» бактериальной клетки, висящей на флагелле. Используя такую систему, лишенную цитоплазматической системы таксиса, авторы нашли, что как дыхание, так и искусственно созданная $\Delta\bar{\mu}H$ естественного направления поддерживают вращение против часовой стрелки. К сожалению, искусственно созданная $\Delta\bar{\mu}H$ обратного знака вращения не вызывала, что, по мнению авторов, было следствием необратимого повреждения мотора.

В группе Г. Берга были исследованы интактные клетки стрептококка, приклеенные флагеллами к стеклу. Искусственную $\Delta\psi$ создали переносом K^+ по концентрационному градиенту в присутствии валиномицина, а искусственную ΔpH — подкислением или подщелачиванием инкубационной среды. Важнейший результат, полученный авторами, состоит в том, что *вращательный момент флагеллярного мотора практически не зависит от температуры в исследованном интервале от 38 до 4°C*.

По всей вероятности, работа мотора происходит без каких-либо конформационных изменений образующих его белков или других событий, сопутствующих ферментативному катализу, который всегда сильно тормозится при таком значительном снижении температуры. Кроме того, можно заключить, что ротор прямо не контактирует с липидной фазой. Известно, что температурный сдвиг такого масштаба, как в опытах Г. Берга, тормозит даже столь простой процесс, как проведение протонов через липидную мембрану низкомолекулярными разобщителями-протонофорами. Другой факт, отличающий мотор от ферментов-переносчиков ионов H^+ , — отсутствие изотопного эффекта при замене H_2O на D_2O .

5.3.3. Возможный механизм H^+ -мотора

В 1978 г. автор и сотрудники предложили механизм устройства протонного мотора бактерий, изображенный на рис. 48. Согласно этой схеме роль ротора играет последний диск (M), поскольку это единственный компонент базального тела, локализованный там, где есть $\Delta\bar{\mu}H$, т. е. в цитоплазматической мембране.

М-диск представляет собой идеальный цилиндр диаметром от 10 до 30 нм и высотой порядка 5 нм; по некоторым данным, он составлен из 16 белковых субъединиц.

Предполагают, что в той же мембране закреплены определенные компоненты статора. В статоре находится два протонных «колодца», каждый из которых пересекает часть толщины мембраны. На дне входного «колодца» расположена протон-акцепторная группа X , принадлежащая ротору, т. е. *М-дису* (это может быть, напри-

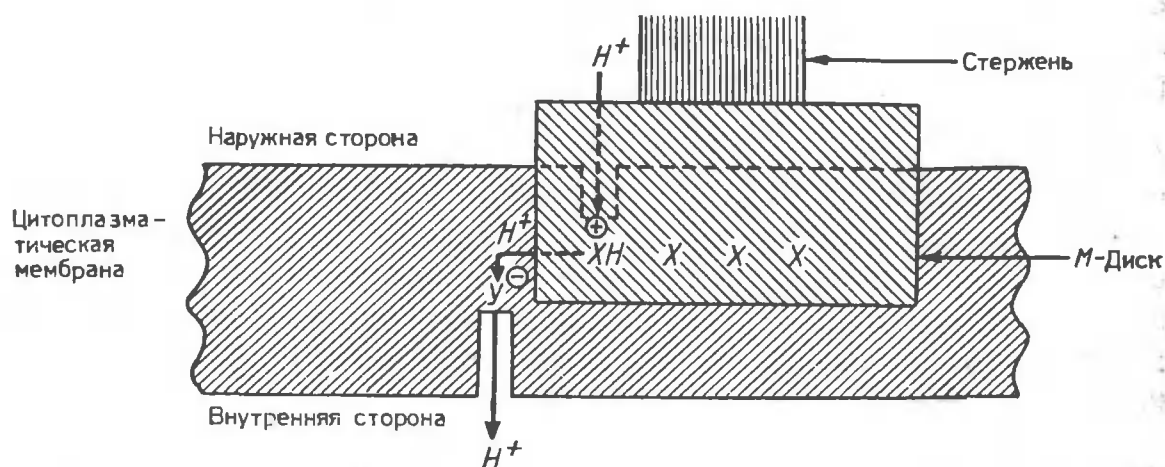


Рис. 48. Возможное устройство протонного мотора бактерий (объяснения см. в тексте)

мер, NH_2 -группа остатка лизина белка, образующего *М-диск*). Появление положительного заряда на X при его протонировании вызывает кулоновское притяжение этой группы к другой протон-акцепторной группе Y^- (например, ионизированной карбоксильной группе дикарбоновой аминокислоты, принадлежащей белку статора). Притяжение приводит к вращению *М-диска* и сближению XH^+ и Y^- . Перенос протона от XH^+ к Y^- и далее в цитоплазму по выходному «колодцу» завершает цикл. Теперь другой ион H^+ из периплазмы может протонировать следующую группу X , занявшую место на дне входного «колодца».

Схема предполагает, что на периферии *М-диска* расположена длинная цепь групп X , так что один оборот *М-диска* сопровождается переносом большого числа протонов из периплазмы в цитоплазму. По расчету Г. Берга, один оборот ротора требует переноса около 200 ионов H^+ через мембрану в цитоплазму по градиенту $\Delta\mu_H = 200$ мВ. В рамках схемы, показанной на рис. 48, это означает, что число групп X на *М-диске* должно быть порядка 200. Поскольку радиус *М-диска* обычно составляет около 10 нм, расстояние между двумя соседними группами X оказывается порядка 0,3 нм. Количество групп X будет меньшим, если в статоре содержится не одна, а несколько пар входных и выходных «колодцев».

Как уже отмечалось выше, во флагеллярном моторе предусмот-

рено переключение направления вращения ротора при неизменном знаке $\Delta\mu\text{H}$. Чтобы объяснить это свойство мотора, надо дополнить схему на рис. 48 устройством, меняющим положение протонных «колодцев» относительно ротора таким образом, что в одном положении перенос протонов вращает ротор по часовой стрелке, а в другом — против.

Движение протонов по «колодцам» является, видимо, чисто физическим процессом, судя по тому факту, что работа мотора не зависит от температуры. Это может быть диффузия ионов H^+ или H_3O^+ по обводненной поре, или их миграция вдоль цепочки молекул связанной воды, либо эстафета по закрепленным в белке протон-акцепторным группам, не требующая конформационных изменений белковой молекулы.

5.3.4. $\Delta\mu\text{H}$ -Зависимая подвижность прокариот, не содержащих флагелл, и внутриклеточных органелл

Эксперименты, проведенные в лаборатории, руководимой автором, показали, что *скользящее движение трихомов многоклеточных цианобактерий Phormidium uncinatum по поверхности подложки поддерживается энергией $\Delta\mu\text{H}$, а не АТФ*. Такое заключение было сделано на основании ингибиторного анализа скольжения, когда энергия поставлялась фотоцепью, дыханием или гликолизом. В тех же опытах было продемонстрировано движение трихомов при создании искусственных $\Delta\psi$ или $\Delta p\text{H}$ в присутствии ДЦКД, блокировавшего образование АТФ за счет $\Delta\mu\text{H}$.

Ph. uncinatum не содержит флагелл. Предполагают, что их движение некоторым образом связано с фибриллами, локализованными под внешней мембраной трихома. Если это действительно так, то фибриллы должны быть соединены с несущей $\Delta\mu\text{H}$ цитоплазматической мембраной клеток, образующих трихом.

В литературе можно найти указание, что *скользящее движение бактерии Flexibacter также поддерживается $\Delta\mu\text{H}$* .

В то же время *скользящее движение тканевых паразитов животных (микоплазм) и растений (спироплазм)*, вероятно, не зависит от $\Delta\mu\text{H}$. У этих бактерий отсутствуют не только флагеллы, но и клеточная стенка, так что они отделены от среды одной только цитоплазматической мембраной. Движение паразитов оказалось устойчивым к протонофору (1 мМ динитрофенолу). Скольжение *Spiroplasma* полностью подавлялось ингибиторами гликолиза и ДЦКД. Вопрос о движущей силе процесса скольжения остается открытым. Им мог бы быть либо АТФ, либо $\Delta\mu\text{Na}$, либо какой-нибудь другой ионный градиент.

Интересное наблюдение было опубликовано недавно Дж. Уотер-бери и сотрудниками, которые изучали движение мелких однокле-

точных цианобактерий рода *Synechococcus*, обнаруженных в Атлантическом океане. Эти бактерии плывут сквозь объем жидкости со скоростью порядка $25 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$. По данным световой микроскопии, движение клетки *Synechococcus* напоминает таковое флагеллярных бактерий. Однако электронная микроскопия не обнаружила у них флагелл.

Подобный механизм, видимо, лежит в основе *вращательного движения хлоропластов харовых водорослей*. Вращение хлоропластов было открыто в 1838 г. французом Донне, который изучал капли протоплазмы, выдавленной из клетки водоросли *Chara*. Это явление впоследствии было забыто и переоткрыто несколько раз. Недавно Е. Х. Моценок в группе автора повторила эксперимент Донне, чтобы выяснить источник энергии для вращения хлоропластов. В опытах использовали нителлу из оз. Байкал. Оказалось, что хлоропласты могут часами вращаться в капле протоплазмы. Скорость вращения колебалась в пределах один оборот за 2—3 с. Иногда направление вращения менялось на противоположное. Период времени, в течение которого направление вращения оставалось неизменным, в отдельных случаях достигал 1 ч. Вращение хлоропластов удалось наблюдать также и в интактных клетках водоросли. В некоторых случаях один или несколько хлоропластов отрывались от неподвижного мультислоя хлоропластов, расположенного под цитоплазматической мембраной водоросли. Уносимые током цитозоля, они медленно вращались с той же скоростью, что и в выделенных каплях протоплазмы.

Был проведен ингибиторный анализ вращения хлоропластов. Для сравнения смотрели действие тех же ингибиторов на *циклоз* — движение протоплазмы, поддерживаемое энергией АТФ. Полученные данные показали, что вращение хлоропластов на свету устойчиво, а в темноте чувствительно к ДЦКД. Включение света немедленно запускало вращение хлоропластов, остановленное в темноте посредством ДЦКД. Вращение тормозилось аммонием, рассеивающим ΔpH — главную составляющую $\Delta \mu H$ в хлоропластах. Если концентрация соли аммония была не слишком велика, торможение удавалось преодолеть, повысив интенсивность света. Ингибиторами вращения оказались также разобщители-протонофоры. Цитохалазин В, блокирующий АТФ-зависимые движения в клетке, не влиял на вращения хлоропластов, но полностью останавливал циклоз. Все эти соотношения могли быть предсказаны, если принять, что *вращение хлоропластов поддерживается $\Delta \mu H$* . Как и в описанных выше опытах с *Synechococcus*, электронная микроскопия не позволила выявить каких-либо образований типа флагелл, прикрепленных к оболочке хлоропласта.

Принимая во внимание вероятное происхождение хлоропластов от цианобактерий, можно предположить, что вращение хлоропластов поддерживается тем же неизвестным пока механизмом, который лежит в основе движения *Synechococcus*. Поскольку хлоро-

пласты и *Synechococcus* лишены наружных флагелл, приходится думать о каком-либо другом механизме движения. Им могло бы быть волнообразное колебание внешней мембраны клетки или оргanelлы. Волны, «пробегающие» по поверхности хлоропласта, могли бы приводить в движение цитозоль в узких щелях между хлоропластами в мультислое, ускоряя транспорт синтезируемого в хлоропластах сахара. Именно в этом и состоит, быть может, функция рассматриваемого механизма. Циклоз также призван выполнять эту функцию, но его роль ограничивается свободным пространством цитоплазмы, находящимся между мультислоем хлоропластов и тонопластом.

5.3.5. Подвижные симбионты эукариот и прокариот

Обзор $\Delta\mu\text{H}$ -зависимой подвижности был бы неполным без упоминания редких, но весьма впечатляющих случаев, когда неподвижная эукариотическая клетка использует подвижные бактерии-симбионты для целей локомоции. Так движется, в частности, *Mixotricha paradoxa*, крупное простейшее из класса флагеллат, обнаруженное в кишечнике термита. Как показано Л. Р. Кливлендом, движение этого простейшего обеспечивается координированным волнообразным движением мембран многих тысяч спирохет, покрывающих большую часть тела миксотрихи. Интересно, что миксотриха имеет четыре собственных флагеллы, которые, однако, она использует не для движения, а для какой-то иной, пока неизвестной цели, может быть, в качестве водителя ритма, синхронизирующего работу спирохет. Такая синхронизация могла бы, например, производиться прикосновением флагеллы к спирохете, вызывающим (через систему восприятия тактильных сигналов) реверсию ее протонных моторов. (Образно говоря, миксотриха погоняет своих спирохет флагеллой как бичом — красивое, но пока бездоказательное предположение.)

Еще один пример подобного рода был описан С. Л. Таммом, изучавшим другой вид простейшего — девесковиниду, также относящуюся к флагеллатам и обитающую в кишечнике термитов. Как и миксотриха, девесковинида использует для движения не собственные флагеллы, а бактерии-симбионты. На поверхности простейшего в специальных выемках, образуемых мембраной хозяина, располагаются тысячи палочковидных перитрихиальных бактерий. Все флагеллы этих бактерий локализованы на той части бактериальной клетки, которая обращена во внешнюю среду. Вращение флагелл хозяина удается выключить амфотерицином В или нистатином, для действия которых необходим холестерин, имеющийся у этого простейшего, но отсутствующий у бактерий. Жгутики бактерий продолжают вращаться в присутствии этих антибиотиков, что обеспечивает подвижность простейшего несмотря на неподвижность его собственных флагелл. В то же время разобщители-протонофоры, шунтирующие мембрану бактерий, парализуют девесковиниду.

Как миксотриха, так и девесковинида совершают активное скользящее движение по поверхности подложки. Скорость скольжения достигает $150 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$, что намного превосходит скорость скольжения прокариот, например цианобактерий (порядка $10 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$). Складывается впечатление, что локомоторная система этих простейших — весьма эффективный способ движения.

Размер клетки миксотрихи составляет порядка 0,1 мм, девесковиниды — 0,5 мм. Есть подвижные цианобактерии, трихомы которых достигают длины около 1 мм.

Не описано случаев, чтобы $\Delta\mu\text{H}$ использовалась для движения организмов большей длины. Более крупные живые объекты, чтобы двигаться, всегда применяют АТФазные системы актомиозинового типа.

Трудно себе представить устройство, в котором бактериальная флагелла длиной не более 20 мкм нашла бы себе применение, чтобы перемещать в пространстве организм, построенный из множества крупных эукариотических клеток. Однако, изучая актомиозиновый механизм, конечно, важнейший для животных и человека, необходимо иметь в виду, что миниатюрные формы жизни выбрали совсем другой способ обеспечения подвижности. С этой целью они используют вращающийся диск, так что первое изобретение колеса не следует приписывать человеку. Диск — элемент более сложной конструкции, базального тела, служащего молекулярным прототипом нашего электромотора, опять-таки оказывается изобретенного задолго до нас. Ось мотора соединена с жестким филаментом, играющим роль винта моторной лодки.

Такой или несколько видоизмененный механизм применяется не только, чтобы плыть, но и чтобы скользить по поверхности, как движутся трихомы цианобактерий и некоторые простейшие. Последние даже вступали с этой целью в эктосимбиоз с бактериями, пытаясь как бы «построить океанский лайнер из моторных лодок». Неудивительно, что такая попытка оказалась эволюционным тупиком.

5.4. $\Delta\mu\text{H}$ как источник энергии для образования теплоты

5.4.1. Три способа превращения метаболической энергии в теплоту

В живой клетке теплота может выделяться тремя основными способами: 1) при гидролизе АТФ; 2) при рассеянии $\Delta\mu\text{H}$ и 3) при окислении субстратов системами, не образующими ни АТФ, ни $\Delta\mu\text{H}$. В механизмах первого типа участвует *дыхание, сопряженное с фосфорилированием*, в то время как во втором и третьем случаях — *дыхание, соответственно, разобщенное или первично не сопряженное с запасанием энергии*. Чтобы отличить последние два меха-

низма от систем первого типа, где путь от субстрата дыхания к выделению теплоты весьма сложен и требует образования и утилизации АТФ, удобно использовать понятие *свободное окисление*, объединяющее как разобщенные, так и первично не сопряженные дыхательные системы.

Изучение регулярной теплопродукции у теплокровных животных показало, что все три упомянутые выше механизма могут активизироваться в ответ на понижение окружающей температуры. Тот факт, что дыхательные системы как-то вовлечены в терморегуляцию, был выяснен в ранних физиологических исследованиях, показавших сильное увеличение поглощения кислорода млекопитающими и птицами, помещенными в холодные условия. Обычно такое усиление дыхания (достигающее 2,5 раз) происходит без пропорционального увеличения основных функций организма. Создалось впечатление, что на холоде физиологические функции осуществляются менее эффективно: чтобы совершить одну и ту же работу, в холодных условиях необходимо потребить больше пищи и кислорода, а значит, выделить больше теплоты. Возможно и другое объяснение данного эффекта: при охлаждении эффективность функций, как таковых, остается неизменной, а усилившиеся дыхание и теплопродукция обусловлены активацией каких-то специализированных механизмов образования теплоты. Второе объяснение выглядит более рациональным, поскольку оно соответствует задаче, решаемой терморегуляторной системой организма — сделать физиологические функции независимыми от температуры окружающей среды.

5.4.2. Терморегуляторная активация свободного дыхания у животных

Скелетные мышцы. Работы по изучению действия кратковременного охлаждения животного на митохондрии были начаты в 1960 г. автором совместно с С. П. Масловым в лаборатории С. Е. Северина. Опыты проводили на голубях, которых предварительно остригали, чтобы исключить физическую терморегуляцию. Клетку с животным помещали в холодильник на -20°C и включали вентилятор. Голубь, впервые помещенный в эти жесткие условия, выдерживал 15—20 мин, после чего наступало резкое снижение температуры тела. Однако при повторном охлаждении, которому подвергали голубя на следующий день, животное лишь несколько снижало температуру своего тела, после чего она стабилизировалась, и голубь мог выдерживать охлаждение часами.

Изучение митохондрий, выделенных из грудной мышцы голубя, охлаждавшегося впервые, показало снижение коэффициента Р/О в 1,6 раза по сравнению с неохлаждавшимися животными. Второе охлаждение вызывало снижение Р/О в шесть раз, т. е. наступало почти полное разобщение дыхания и фосфорилирования.

Дальнейшее исследование этого эффекта показало, что степень разобщения достигает максимума уже через 15 мин после помеще-

ния животного на холод. Разобшение в мышечных митохондриях могло быть продемонстрировано не только у птиц, но и у млекопитающих.

Было показано также, что концентрация высокоэнергетических соединений возрастает при первом охлаждении и падает при втором. Этот факт свидетельствовал по меньшей мере о том, что мышцы некоторым образом вовлечены в исследуемый терморегуляторный ответ. Измерение дыхания *in vivo* выявило его стимуляцию как при первом, так и при повторном охлаждении животного. В первом случае стимуляция сменялась прогрессирующим торможением дыхания, в то время как во втором случае торможения не наступало. Именно таких соотношений можно было ожидать, если животное, охлаждаясь впервые, не успевало в должной степени разобщить дыхание и фосфорилирование, и избыточное потребление кислорода приводило к избыточному синтезу АТФ и торможению дыхательной цепи по механизму протонного контроля. При втором действии холода происходило сильное разобщение, предотвращавшее накопление АТФ и исчерпание АДФ, так что состояние дыхательного контроля не наступало. Но если эта логика верна, то введение животному искусственного разобщителя-протонофора при первом охлаждении могло бы спасти организм от скоропостижной холодовой смерти. Опыты, поставленные С. П. Масловым, подтвердили это предсказание. Инъекция 2,4-динитрофенола, являющегося токсичным для животных, тем не менее значительно увеличивала продолжительность жизни на холоде мышей, впервые подвергнутых охлаждению.

В других опытах было показано, что дыхание интактной мышцы диафрагмы крысы активируется при повторном охлаждении животных. Одновременно снижается степень стимуляции дыхания ткани динитрофенолом. Эффект, подобный охлаждению, мог быть вызван инъекцией животному норадреналина.

Дальнейшее исследование показало, что концентрация жирных кислот значительно возрастает в мышцах животных, подвергнутых повторному воздействию холода. Было получено несколько независимых свидетельств роли свободных жирных кислот в качестве медиаторов терморегуляторного разобщения в мышцах.

1. Связывание жирных кислот при промывании митохондрий раствором предварительно обезжиренного сывороточного альбумина повышало Р/О в митохондриях из мышц охлажденных животных.

2. Фракция жирных кислот, выделенная из мышц охлажденных животных и добавленная к митохондриям контрольных животных, вызывала разобщение.

3. Пальмитиновая кислота в концентрации всего $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л заметно стимулирует дыхание мышечных митохондрий в состоянии дыхательного контроля, причем этот эффект подавляется $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л карбоксиатрактиллатом, специфическим ингибитором АТФ/АДФ-антипортера. АДФ, добавленный как с олигомицином,

так и без него, также уменьшал стимуляцию дыхания малыми дозами пальмитата.

Возможный механизм разобщения жирными кислотами, опосредованного участием АТФ/АДФ-антипортера, состоит в следующем.

Предполагают, что антипортер построен из «статора», несущего «ворота» для нуклеотидов, которые блокируются карбоксиатрактилатором, и «ротора», ответственного за обмен АТФ⁴⁻ на АДФ³⁻. Анионы жирных кислот (А⁻) достигают, минуя «ворота», нуклеотид-связывающих центров, например NH₃⁺-групп остатков лизина антипортера. Затем А⁻ переносятся через мембрану ротором, вращающимся под действием Δψ.

Облегчение трансмембранного перемещения анионов А⁻ может иметь принципиальное значение для разобщенного действия жирных кислот, поскольку их анионные формы задерживаются на поверхности раздела мембрана/вода, ориентируясь карбоксильной группой в сторону воды, а жирным «хвостом» — в сторону липида. Именно поэтому мембраны плохо проницаемы для анионов жирных кислот и хорошо проницаемы для их нейтральных (протонированных) форм (АН). Если АТФ/АДФ-антипортер может переносить А⁻, это обстоятельство должно повысить эффективность жирных кислот как разобщителей.

В хорошем соответствии с этой логикой находятся наблюдения Л. М. Цофиной и Т. В. Выгодиной, показавших, что пальмитат не способен ни повышать протонную проводимость плоских фосфолипидных мембран, ни тормозить генерацию Δψ в цитохромоксидазных протеолипосомах.

В тех же условиях грамицидин и ХКФ снимали дыхательный контроль и тормозили образование Δψ как в митохондриях, так и в протеолипосомах, причем этот эффект оказался устойчивым к карбоксиатрактилатору.

Опыты, проведенные в лаборатории автора, показали, что разобщающее действие больших концентраций пальмитата уже не удается снять карбоксиатрактилатором. Можно думать, что какие-то другие переносчики анионов вступают в реакцию при повышении концентрации жирной кислоты.

Разобщение жирными кислотами было впервые описано Б. Прессмэном и Г. Ларди еще в 1956 г. Значительно позднее выяснилось, что жирная кислота и жирный ацил-КоА тормозят АТФ/АДФ-антипорт. Бонгкрековая кислота, мощный ингибитор АТФ/АДФ-антипортера, представляет собой ненасыщенную жирную кислоту с тремя карбоксильными группами. Две из них расположены на расстоянии 0,55 нм, равном таковому между ионизованными атомами кислорода соседних фосфорильных остатков в АДФ и АТФ. В карбоксиатрактилаторе также есть две соседние карбоксильные группы, расстояние между которыми составляет 0,55 нм.

То обстоятельство, что жирные кислоты не только повышают H^+ , но и конкурируют с адениннуклеотидами за АТФ/АДФ-антипортер, должно страховать клетку от истощения фонда немитохондриального АТФ в условиях разобщения, когда H^+ -АТФ-синтаза начинает действовать в обратном (гидролитическом) направлении. Истощение АТФ, помимо всего прочего, могло бы блокировать окисление жирных кислот, служащих не только регулятором сопряжения, но и основным субстратом дыхания на холоде. Активация жирных кислот путем их соединения с КоА за счет энергии АТФ происходит во внешней мембране митохондрий.

Следует отметить, что термогенин — белок, специализированный на трансмембранном проведении протонов в митохондриях бурого жира, во многом подобен по аминокислотной последовательности и доменному строению АТФ/АДФ-антипортеру. Перенос H^+ термогенином также активируется жирными кислотами и тормозится пуриновыми нуклеотидами (см. ниже). Поэтому можно полагать, что как в мышцах, так и в буром жире жирные кислоты служат медиаторами терморегуляторного разобщения в митохондриях, однако в первом случае мишенью жирных кислот оказывается АТФ/АДФ-антипортер, а во втором — специальный белок, представляющий собой, видимо, особую модификацию антипортера.

Другая весьма важная характеристика разобщения жирными кислотами состоит в том, что здесь не требуется специального механизма для прекращения разобщающего эффекта. Разобщение исчезает само по себе, как только скорость поступления жирных кислот в митохондрии станет меньше скорости их окисления. Именно такие соотношения возникают при повышении окружающей температуры, когда отключаются холодовые рецепторы кожи, а с ними прекращается действие регуляторного каскада, обеспечивающего образование жирных кислот из триглицеридов (см. ниже). С прекращением подачи жирных кислот в митохондрию их запас быстро исчерпывается мощной системой β -окисления. В итоге уровень жирных кислот падает и разобщение, вызванное жирными кислотами, исчезает.

Явления, описанные выше, характерны для ответа мышц на повторное охлаждение. Однако в мышцах существует и другой термогенный механизм, включающийся уже при первом воздействии холода. Это *мышечная дрожь*, поддерживаемая, как любое сокращение мышцы, гидролизом цитоплазматического АТФ. Регенерация последнего происходит за счет транспорта АТФ из митохондрий АТФ/АДФ-антипортером. В митохондриях АТФ образуется H^+ -АТФ-синтазой, которая потребляет $\Delta\mu H$, генерируемую дыхательной цепью. Вероятно, такой путь — слишком длинный и медленный, чтобы резко увеличить продукцию теплоты в условиях внезапного понижения температуры среды. Кроме того, он связан с сильной активацией мышечного сокращения, т. е. специфической функции данной ткани (потребление кислорода организмом при

резком охлаждении приближается к таковому при тяжелой мышечной работе). Таким образом, главный принцип терморегуляции: сделать функции независимыми от температуры — в данном случае остается нереализованным применительно к самой «массовой» ткани организма — мышечной. Вот почему мышечная дрожь уменьшается по мере адаптации к холоду.

Все данные, касающиеся терморегуляторного разобщения в мышках, были получены в лабораторных опытах на голубях, мышах и крысах. Позднее этот феномен был воспроизведен Г. Гравом и А. Бликсом на северных морских котиках в природных условиях.

Бурый жир. Многие черты терморегуляторного разобщения жирными кислотами, впервые описанного в митохондриях скелетных мышц, были затем прослежены применительно к *митохондриям бурого жира*, особой ткани млекопитающих, специализированной на выработке добавочной теплоты при снижении окружающей температуры.

Бурый жир составляет не более 1—2% массы тела. Тем не менее стимуляция этой ткани симпатической нервной системой при охлаждении животных, предварительно адаптированных к холоду, повышает теплопродукцию бурого жира в такой степени, что она может достигать одной трети всей дополнительно образованной в организме теплоты. В этих условиях бурый жир способен выделять до 400 Вт теплоты на 1 кг массы, что на несколько порядков больше обычной термогенной способности тканей млекопитающих (человек в состоянии покоя образует около 1 Вт теплоты на 1 кг массы).

В организме бурый жир сосредоточен в верхней части спины, ближе к шее. Он окружает кровеносные сосуды, питающие кровью мозг. Вот почему теплопродукция в буром жире может иметь огромное значение для выживания организма на холоде.

Первые научные публикации о буром жире датируются XVII веком, но лишь недавно была понята его функция. В 1959 г. Б. Йоханссон написал первый подробный обзор о метаболизме бурого жира. Основываясь на скудной фактической информации тех лет и некоторых предварительных данных, он выдвинул гипотезу, что бурый жир может некоторым образом участвовать в терморегуляции.

Благодаря последующим работам Р. Э. Смита и ряда других исследователей стало ясно, что основной физиологической функцией бурого жира является образование дополнительной теплоты в условиях, когда возрастает теплоотдача организма.

Своим цветом бурый жир обязан митохондриям, содержащимся в огромных количествах в клетках этой ткани. Митохондрии бурого жира оказались хорошо оснащенными именно для образования теплоты. Содержание дыхательных ферментов в них намного превышает таковое H^+ -АТФ-синтазы. Но, пожалуй, важнее всего то, что в их внутренней мембране содержится описанный выше особый

белок-протонофор термогенин. Термогенин составляет до 15% общего белка митохондрий бурого жира.

Молекулярная масса термогенина равна 33,2 кДа. Недавно удалось выяснить аминокислотную последовательность термогенина из хомяка. Как уже отмечалось, последовательность термогенина напоминает таковую АТФ/АДФ-антипортера. Как и в случае АТФ/АДФ-антипортера мышечных митохондрий, микромолярные концентрации жирных кислот активируют протонофорную функцию термогенина, что и приводит к разобщению.

Привлекательная возможность состоит в том, что термогенин представляет собой монофункциональный вариант АТФ/АДФ-антипортера, утратившего основную (нуклеотид-транспортную) функцию и специализированного на дополнительной функции: разобщении жирными кислотами.

Эксперименты, проведенные на животных *in vivo*, ткани бурого жира *in situ*, адипоцитах и митохондриях *in vitro*, позволили выявить следующую цепь событий, включенных в термогенный ответ этой ткани на понижение температуры среды.

1. Холодовые рецепторы кожи активируются и посылают сигнал в мозг, а именно в терморегуляторный центр гипоталамуса.

2. Из гипоталамуса сигнал поступает в бурую жировую ткань через симпатические нейроны. Из нервных окончаний в пространство между адипоцитами выделяется норадреналин.

3. Норадреналин связывается с β -адренорецепторами, локализованными на внешней стороне плазматической мембраны клеток бурого жира (это и все дальнейшие события проиллюстрированы на рис. 49).

4. β -Адренорецепторы, связав норадреналин, активируют аденилатциклазу. Синергистом норадреналина служит глюкагон, а антагонистом — инсулин. Каждый гормон действует через свой рецептор.

5. Аденилатциклаза образует цАМФ из АТФ.

6. цАМФ включает протеинкиназный каскад, приводящий к активации липазы.

7. Липаза расщепляет триглицериды, содержащиеся в жировых каплях, до жирных кислот и глицерина.

8. Образованные таким путем жирные кислоты выполняют две функции: они служат субстратами дыхания и одновременно вторичными (внутриклеточными) медиаторами гормонального сигнала. Как субстраты жирные кислоты претерпевают обычный цикл катаболических превращений. Они активируются во внешней мембране митохондрии, давая ацил-КоА. Полученные жирные ацилы транспортируются в митохондриальный матрикс посредством карнитиновой системы, где расщепляются, давая CO_2 и восстановительные эквиваленты, под действием ферментов β -окисления.

9. Восстановительные эквиваленты, поставляемые в дыхательную цепь при β -окислении жирных кислот и окислении ацетильных групп в цикле Кребса, переносятся к O_2 , что сопряжено с образо-

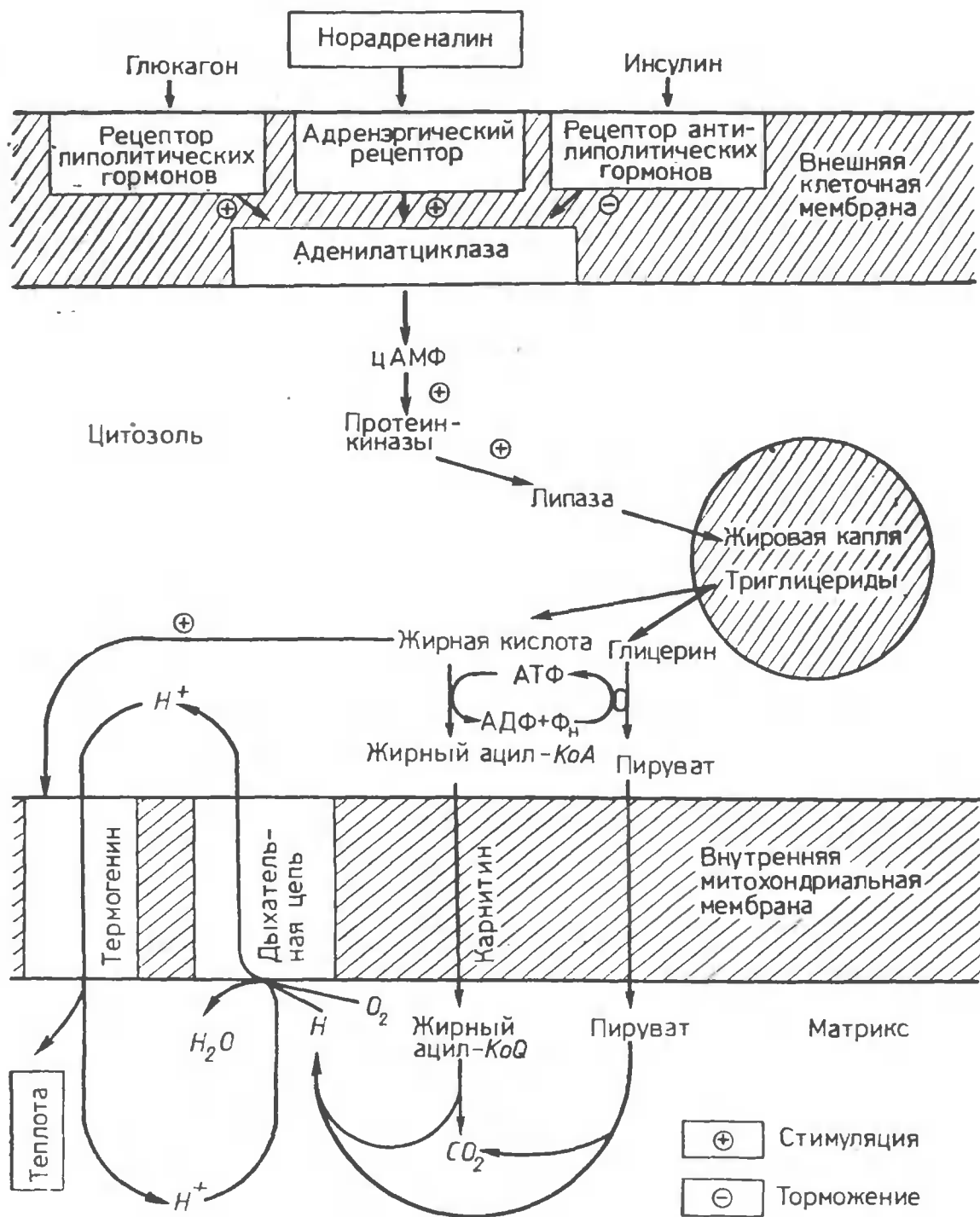


Рис. 49. Индуцированный холодом термогенез в митохондриях бурого жира

ванием протонного потенциала дыхательными $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторами. В результате ионы водорода откачиваются из матрикса в межмембранное пространство.

10. Ионы H^+ возвращаются в матрикс системой термогенин — жирные кислоты. Этот завершающий этап сопровождается выделением теплоты.

Интересно, что не только охлаждение, но и по крайней мере еще два состояния организма, связанные с повышением поглощения кислорода и выделения тепла, сопровождаются разобщением в бурой жировой ткани. Одно из таких состояний — *пробуждение животного от зимней спячки*. Показано, что бурый жир не атрофируется у зимоспящих животных, адаптированных к термонеutralным условиям. Холодовая акклиматизация повышает количество термогенина в митохондриях бурого жира зимоспящих животных, но не в такой степени, как, например, у крыс или кроликов. Пробуждение хомяков от спячки сопровождается разобщением, которое, по-видимому, особенно важно для разогрева крови, притекающей к мозгу. Из-за локализации бурого жира в области сосудов, идущих к голове, теплопродукция в этой ткани прежде всего вызывает повышение температуры мозга, который переходит в активное состояние сразу же вслед за разогревом бурого жира.

Другая модель — *термогенез, обусловленный избыточным потреблением пищи*. Н. Ротуел и М. Сток поставили следующий опыт. Взрослым крысам скармливали «ресторанную диету», т. е. разнообразную и вкусную пищу. Потребление животными этой пищи оказалось на 80% бóльшим, чем в контрольной группе, получавшей обычный корм. При этом масса животных за три недели увеличилась только на 27%. Измерение газообмена показало, что хорошо питавшиеся крысы потребляли на 25% больше кислорода, чем в контроле. Эта надбавка исчезала после введения животным пропанола — антагониста норадреналина. Масса бурого жира за те же три недели опыта возросла более чем втрое; в митохондриях увеличилось количество термогенина. (Оказалось также, что мутация, вызывающая ожирение, сопровождается снижением уровня термогенина у мышей.)

Согласно данным Д. Никольса, митохондрии периферической ткани бурого жира людей в юношеском возрасте по степени разобщения находятся в промежуточном положении между митохондриями той же ткани тепло- и холодадаптированных морских свинок. Как и у животных, митохондрии бурого жира людей чувствительны к низким концентрациям жирных кислот.

Печень. Митохондрии печени отличаются от митохондрий «быстрых» скелетных мышц и бурого жира, в частности тем, что *в их внешней мембране существует очень активный путь свободного окисления: НАДН — цитохром b_5* . Процесс катализируется флавиновой НАДН-цитохром b_5 -редуктазой (синонимы: флавопротеин-5; f_p5).

Этот путь был открыт А. Л. Ленинджером в 1951 г. В течение длительного времени он оставался загадкой митохондриологии, так как, несмотря на высокую скорость переноса электронов от НАДН к цитохрому b_5 , дальнейшая судьба восстановительных эквивалентов оставалась неясной. В использованных условиях опыта восстановленный цитохром b_5 переносил электроны на добавленный цитохром c , но не на эндогенный цитохром c митохондрий. В ре-

зультате считали, что митохондрии не способны окислять внешний НАДН со сколько-нибудь заметной скоростью.

Ситуация менялась, если животное перед опытом на митохондриях подвергали воздействию холода. Как показали Е. Н. Мохова и сотрудники, 15-минутное *выдерживание на холоде крыс*, предварительно подвергнутых серии холодовых стрессов, *приводит к высвобождению в межмембранное пространство части фонда цитохрома с*, сорбированного на внешней поверхности внутренней мембраны печеночных митохондрий. Этот эффект сопровождается активацией внешнего пути окисления НАДН.

Проблема, ожидающая своего решения, — механизм восстановления НАДН, который окисляется внешним путем. Субстратами, расщепление которых может привести к восстановлению цитоплазматического НАДН, могут быть: 1) глюкоза и гликоген, восстанавливающие НАД⁺ в реакции гликолитической оксидоредукции; 2) глицерин, высвобождающийся при гидролизе триглицеридов и окисляющийся глицериндегидрогеназой с последующим подключением к цепи реакций гликолиза; 3) некоторые аминокислоты и их метаболиты, расщепляющиеся с участием НАД-связанных дегидрогеназ в цитозоле, и т. д. Кроме того, фонд внутримитохондриальных восстановительных эквивалентов может быть в принципе использован для восстановления НАД⁺ в цитозоле, если соотношение [НАДН]/[НАД⁺] вне митохондрии оказывается ниже, чем внутри, и если $\Delta\mu\text{H}$ низка. В таких условиях возможно обращение малат-глутамат-аспартатного челночного механизма, обычно используемого для окисления цитоплазматического НАДН митохондриальным НАД⁺.

5.4.3. Терморегуляторная активация свободного окисления у растений

Согласно широко распространенной догме терморегуляция представляет собой функцию, присущую только высшим млекопитающим и птицам. Однако природа, не столь догматичная, как ее исследователи, иногда преподносит им свои сюрпризы. Проблема лишь в том, что люди зачастую склонны игнорировать подобные подарки.

В 1778 г. Ж.-Б. Ламарк обратил внимание на то, что температура в основании распустившегося цветка лилии рода *Arum* заметно выше, чем в других частях того же растения. В 1851 г. Гарз, работая с тем же объектом, показал хорошее соответствие между потреблением кислорода и продукцией теплоты в цветах. Биохимические исследования начались в 1932 г., когда Окунуки описал цианид- и СО-устойчивое дыхание в пыльце *Lilium auratum*. Систематическое изучение биоэнергетических аспектов этого феномена было предпринято только в 70-е годы нашего столетия.

Выяснили, что термогенез выражен особенно явно в цветках ароидных лилий и некоторых других цветковых растений.

Гиперпродукция тепла и вспышка дыхательной активности длятся в течение примерно 12 ч, что необходимо для испарения пахучих веществ (обычно аминов или индолов), привлекающих насекомых-опылителей. Терморегуляторный механизм, основывающийся на активации дыхания, делает процесс не зависимым от температуры окружающей среды. При этом разница температур, например между цветком восточной капусты и воздухом, достигает 35°C (+20° в цветке при —15°C в воздухе).

Снижение окружающей температуры приводит к сильной активации дыхания (традиционно считали, что такой эффект — прерогатива теплокровных животных). Например, снижение температуры среды с +15 до +5°C ускоряет в 3,5 раза скорость дыхания цветков восточной капусты. Максимальная скорость дыхания достигает 40 мл·г⁻¹·ч⁻¹, что служит исключением в мире растений и близко к наивысшим скоростям дыхания животных тканей.

Митохондрии перед цветением растения имеют обычное дыхание, чувствительное к цианиду и сопряженное с фосфорилированием (коэффициент Р/О для окисления малата составляет порядка 2,7). В день цветения дыхание разобщается и утрачивает чувствительность к цианиду.

Как и у животных, роль разобщителей у растений, по-видимому, играют жирные кислоты. Они же становятся основными субстратами в условиях вспышки дыхания.

Интересный вопрос состоит в том, используют ли растения терморегуляторную активацию свободного окисления для целей иных, чем испарение аттрактантов? В данной связи следует отметить результаты работ В. К. Войникова и сотрудников, показавших снижение протонного контроля и усиление антимицин- и цианид-устойчивого дыхания митохондрий, которые были выделены из проростков озимых хлебных злаков, охлаждавшихся в течение 1 ч при температуре воздуха —4°C. При этом содержание свободных жирных кислот в митохондриях возрастало в 2—3 раза. Интересно, что проростки в течение получаса удерживали температуру на 7—10°C большую, чем температура воздуха. У яровых злаков подобных эффектов не наблюдали.

Регуляция, транспорт и стабилизация протонного потенциала

6.1. Регуляция $\Delta\mu_{\text{H}^+}$

Ферменты, образующие и потребляющие $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, могут контролироваться, подобно другим энзиматическим системам, всем набором регулирующих воздействий, которым располагают клетка и организм. Ряд примеров такого рода регуляции был описан в предыдущих разделах этой книги. В данной главе будут обсуждаться особые механизмы, специально изобретенные живой природой, чтобы регулировать $\Delta\mu_{\text{H}^+}$.

Некоторые из них уже рассмотрены в предыдущей главе применительно к функции свободного окисления в терморегуляции. В следующем разделе будет показано, что процессы свободного окисления, часто в комбинации с сопряженным окислением, имеют гораздо более широкое значение, чем образование теплоты.

6.1.1. Альтернативные функции дыхания

Когда в 1932 г. Окунуки описал цианид- и СО-устойчивое дыхание пыльцы одного из лилейных, это произошло почти одновременно с открытием В. А. Энгельгардтом (1930) *фосфорилирующего дыхания* в эритроцитах птиц. Поэтому неудивительно, что Окунуки не уточнил, сопряжен ли с фосфорилированием открытый им новый путь окисления.

Огромный успех направления исследований, начало которым положил В. А. Энгельгардт, привело, как это часто бывает, к появлению догмы, переоценивавшей роль фосфорилирующего окисления. Стало принято считать биологически полезным только то дыхание, которое сопряжено с образованием АТФ. Если кто-либо обнаруживал дыхание, не связанное с фосфорилированием, то это наблюдение списывали на счет артефакта *in vitro* или патологии *in vivo*.

В 1958 г. этой догме была противопоставлена противоположная точка зрения, что клеточное дыхание *in vivo* в норме происходит не только сопряженно с запасанием энергии, но и без такого сопряжения (этот второй тип дыхания был назван свободным). Было высказано предположение, что *свободное дыхание участвует в терморегуляторном образовании теплоты, в образовании или разрушении метаболитов, детоксикации ксенобиотиков и даже (косвенно) в запасении энергии.*

Чтобы подтвердить эту гипотезу, исследовали образование теплоты в организме теплокровных, подвергнутых воздействию холода. Как уже отмечалось выше, свободное окисление действительно активируется в мышцах и печени. Впоследствии подобный эффект был описан другими исследователями в буром жире и цветах некоторых растений.

Что касается неэнергетических функций свободного окисления, то их наиболее наглядным примером могут служить системы, обеспечивающие разрушение конечных продуктов метаболизма и токсичных веществ-ксенобиотиков.

В 1962 г. автор и сотрудники обнаружили, что коэффициент Р/О при окислении лактата кислородом в мышцах оказывается значительно ниже, чем при использовании других субстратов дыхания, окисляющихся через НАД⁺.

Позднее было показано, что окисление лактата в митохондриях дрожжей идет в обход начальных и средних участков фосфорилирующей дыхательной цепи. В обходном пути свободного окисления участвует цитохром *b*₂, заключенный в межмембранном пространстве, а также цитохромоксидаза. НАД не нужен для окисления лактата дрожжевыми митохондриями. По данным А. Ф. Броди и сотрудников, клетки *Mycobacterium phlei* окисляют лактат быстрее, чем другие субстраты, но без фосфорилирования.

Впечатляющий прогресс был достигнут при изучении систем свободного окисления, ответственных за *детоксикацию ксенобиотиков*. В мембране эндоплазматического ретикулума клеток печени были обнаружены особые дыхательные цепи, включающие *цитохром Р-450* в качестве конечной оксидазы и *НАДФН-цитохром Р-450-редуктазу* или *НАДН-цитохром *b*₅-редуктазу* и цитохром *b*₅. Эти цепи участвуют в окислении множества ксенобиотиков. Образующие их ферменты находятся в клетке в большом количестве. Например, концентрация цитохрома Р-450 в определенных условиях может превышать таковую любого другого цитохрома в печени.

Свободное дыхание, катализируемое цитохромом Р-450, участвует не только в деструктивных, но также и в некоторых конструктивных процессах, которые обычно локализованы в эндоплазматическом ретикулуме. Однако, пожалуй, наиболее демонстративный пример — это митохондрии коры надпочечника. Показано, что начальный и конечный этапы образования стероидных гормонов (кортизона и альдостерона) осуществляются двумя видами

цитохрома *P*-450, находящимися во внутренней мембране этих митохондрий. Там же существует особая редокс-цепь, восстанавливающая цитохром *P*-450. Она окисляет внутримитохондриальный НАДФН посредством НАДФН-аденодоксин-редуктазы — флавопротеина, содержащего ФАД. Последний восстанавливает аденодоксин — негемовый железопротеин, служащий донором электронов для цитохрома *P*-450. Все эти окислительные реакции не сопряжены с генерацией $\Delta\mu\text{H}$, которая образуется обычной фосфорилирующей дыхательной цепью, локализованной в той же самой мембране.

Интересный пример мощной активации свободного дыхания описан в *лейкоцитах*, атакующих бактериальную клетку. В этом случае особые внутриклеточные пузырьки сливаются с внешней клеточной мембраной лейкоцита. Такой эффект имеет следствием вспышку свободного дыхания, в котором участвует цепь окисления НАДН и НАДФН, включающая флавопротеины и самоокисляющийся цитохром типа *b*. Цитохром *b* катализирует одноэлектронное восстановление O_2 до супероксидного радикала, который реагирует с Cl^- под действием миелопероксидазы с образованием радикальной формы хлора. Последняя, будучи чрезвычайно токсичной, убивает бактерии. Описанная цепь реакций прерывается аскорбатом, восстанавливающим супероксидный радикал.

Нетрудно объяснить, почему перечисленные выше процессы поглощения кислорода не сопряжены с генерацией $\Delta\mu\text{H}$. Энергетическое сопряжение неизбежно усложнило бы выполнение деструктивных или конструктивных функций всеми этими ферментными системами, которые имеют жизненно важное значение для организма.

Итак, мы рассмотрели *четыре главные функции окислительных процессов*: 1) запасение энергии в утилизируемой форме ($\Delta\mu\text{H}$), 2) рассеяние энергии в виде теплоты, 3) образование полезных соединений и 4) расщепление вредных веществ. Можно было бы думать, что первая из перечисленных функций непосредственно обеспечивается сопряженным, а три другие — свободным дыханием. Однако такой взгляд слишком упрощает реальную ситуацию.

Сопряженное дыхание участвует в некоторых случаях в осуществлении функций (2)—(4). Так, мышечная дрожь при первом охлаждении животного в качестве механизма срочной теплопродукции требует образования $\Delta\mu\text{H}$, а затем и АТФ, используемого актомиозином в качестве субстрата.

Ясно также, что большинство конструктивных процессов нуждается в энергии АТФ, образуемого сопряженным дыханием. Что касается деструктивных реакций, то они, как правило, обходятся без АТФ, хотя и здесь есть ряд важных исключений. Достаточно вспомнить цикл синтеза мочевины из аммиака, использующий энергию АТФ.

На первый взгляд, свободное дыхание, по определению, не может участвовать в запасании энергии. Парадоксально, что существуют случаи, когда это не так.

Известно, что *начальный участок сопряженной дыхательной цепи — самый медленный и наиболее уязвимый*. Широкий круг гидрофобных ксенобиотиков блокирует дыхание именно в этом пункте цепи. Шунтировав заторможенное место цепи свободным окислением, можно вновь активировать дыхательный синтез АТФ, хотя, конечно, со сниженным КПД. Такой эффект особенно актуален для митохондрий в печени — органе, специализированном на аккумуляции гидрофобных ксенобиотиков с целью их последующего разрушения при помощи цитохрома Р-450.

Шунтирование заторможенной НАДН-КоQ-редуктазы может достигаться десорбцией цитохрома с в межмембранное пространство или добавлением витамина К₃ (менадиона) либо викасола, которые активируют дикумарол-чувствительную ДТ-диафору. Не ясно, однако, стимулируется ли эта система, описанная *in vitro*, гидрофобными ксенобиотиками при интоксикации *in vivo*. В то же время показано, что искусственное ведение менадиона оказывает выраженный благоприятный терапевтический эффект при наследственном нарушении среднего участка дыхательной цепи (подробнее см. разд. 8.2.1).

6.1.2. Регуляция потоков восстановительных эквивалентов между цитозолем и митохондриями

Если два пути окисления: свободный и энергетически сопряженный — сосуществуют в одной и той же клетке, возникает проблема, как предотвратить утилизацию всех восстановительных эквивалентов по тому из них, который термодинамически более выгоден. Без сомнения, пространственное разграничение (компарментализация) метаболических процессов играет ведущую роль в решении этой проблемы. Так, например, дегидрогеназы основных субстратов локализованы в матриксе, так что восстановительные эквиваленты, питающие дыхательную цепь, образуются непосредственно внутри митохондрий и потому сами по себе недоступны для внешних систем свободного окисления. Кроме того, во внутренней митохондриальной мембране содержится несколько $\Delta\mu\text{H}^+$ -зависимых переносчиков, ответственных за аккумуляцию в матриксе тех субстратов, чьи дегидрогеназы имеются не только в митохондриях, но и в цитозоле. Если же дегидрогеназа данного субстрата локализована исключительно в цитозоле, то используются особые челночные механизмы, переносящие восстановительные эквиваленты из цитозоля в матрикс.

На рис. 50 показан *малат-аспартат-глутаматный челнок*. Действие этой системы приводит к окислению немитохондриального НАДН посредством НАД⁺-матрикса. В процессе участвуют два фермента, локализованные по обе стороны внутренней мембраны

митохондрий, а именно малатдегидрогеназа и аспарат: глутаматаминотрансфераза. Кроме того, необходимы два переносчика: антипортер дикарбоновых кислот и глутамат/аспарат-антипортер. Последний использует энергию $\Delta\mu\text{H}$, так как он катализирует обмен аспарат²⁻/(глутамат²⁻ + H^+). В результате перенос гидрид-иона от $\text{НАДН}_{\text{нар}}$ к $\text{НАД}^+_{\text{мт}}$ оказывается сопряженным с перемещением одного иона H^+ из цитозоля в матрикс под действием $\Delta\mu\text{H}$.

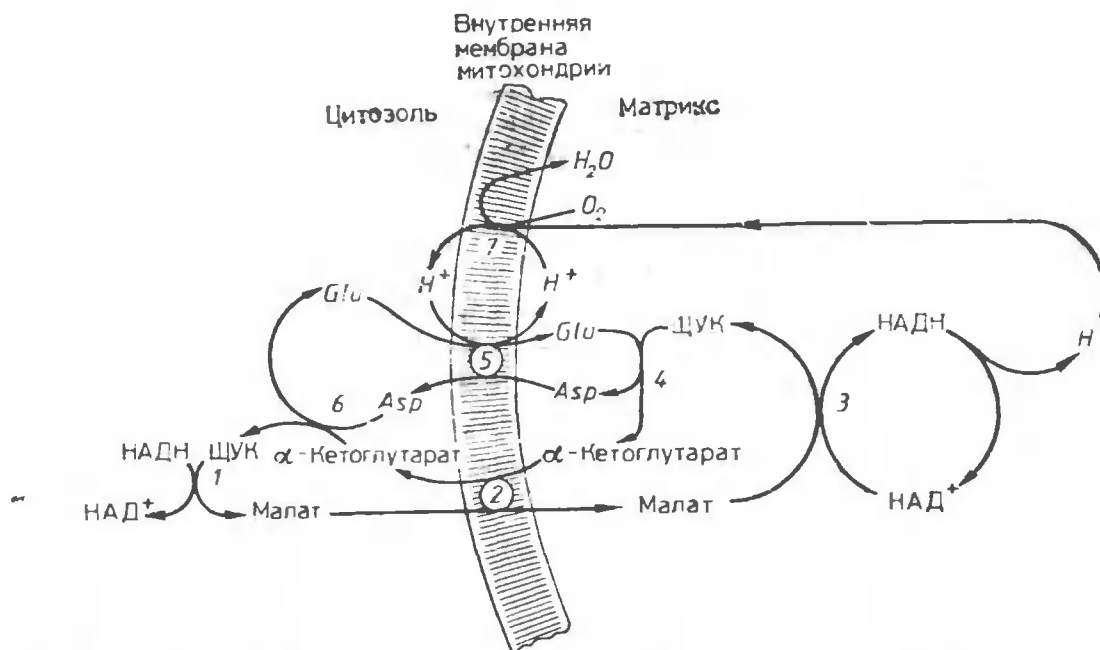


Рис. 50. Челночная система для окисления цитозольного НАД митохондриальной дыхательной цепью (по D. Nicholls, 1982):

$\text{НАДН}_{\text{нар}}$ восстанавливает оксалоацетат посредством обращения реакции, катализируемой цитозольной малатдегидрогеназой (1). Образованный таким путем малат переносится в матрикс в обмен на α -кетоглутарат при участии антипортера дикарбоксилатов (2). В матриксе малат восстанавливает НАД^+ митохондриальной малатдегидрогеназой (3). Полученный оксалоацетат переаминируется с глутаматом, давая аспарат и α -кетоглутарат (4). Внутренний аспарат обменивается на внешние глутамат и H^+ при помощи аспарат²⁻-ке (глутамат²⁻ + H^+)-антипортера с использованием энергии $\Delta\mu\text{H}$ (5). Внешний аспарат переаминируется с внешним α -кетоглутаратом, регенерируя внешний оксалоацетат (6). $\Delta\mu\text{H}$, потребляемая в реакции (5), возобновляется дыхательной цепью (7).

Другой челночный механизм использует две глицерофосфатдегидрогеназы: цитозольную, зависящую от НАД, и митохондриальную, восстанавливающую КоQ без участия НАД. Челночные системы тканеспецифичны. Например, малатный челнок очень активен в печени, но отсутствует в сердце, где митохондрии лишены дикарбоксилатного антипортера. Глицерофосфатный челнок резко активизируется тиреоидными гормонами.

Другим примером пространственного разделения окислительного обмена могут быть пероксисомы. Эти органеллы окружены мембраной, напоминающей по проницаемости внешнюю митохондриальную мембрану. Она не проницаема для белков, но легко пропускает низкомолекулярные вещества. Поглощение кислорода

пероксисомами обусловлено действием уратоксидазы, оксидазы D-аминокислот и оксидазы α -оксикислот. Оксидазы пероксисом не конкурируют с ферментами сопряженного дыхания митохондрий, поскольку субстраты этих оксидаз окисляются без участия НАД(Ф) и дыхательной цепи. Токсический продукт реакции — пероксид водорода — немедленно разлагается внутри пероксисом каталазой, самым массовым белком этих органелл.

6.1.3. Взаимопревращение $\Delta\psi$ и ΔpH

Без сомнения, *взаимопревращения $\Delta\psi$ и ΔpH могут иметь регуляторное значение.* Такого типа эффект должен влиять на соотношение $\Delta\psi$ - и ΔpH -зависимых транспортных систем, количество энергии, запасенной мембраной, и значение pH по крайней мере с одной стороны мембраны.

Чтобы превратить $\Delta\psi$ в ΔpH , достаточно электрофоретически перенести через мембрану любой ион, кроме H^+ . В митохондриях есть только один крупномасштабный процесс такого рода: $ATP^{4-}_{вн}/ADP^{3-}_{нар}$ -антипорт, питающий H^+ -АТФ-синтазу одним из ее субстратов. Однако в условиях, когда митохондрии синтезируют АТФ, этот антипорт всегда сопровождается ΔpH -зависимым стехиометрическим симпортом $H_2PO_4^-$ и H^+ , который поставляет в митохондрию фосфат — второй субстрат реакции образования АТФ. В результате, как правило, митохондрия поддерживает $\Delta\mu H$ в основном в форме $\Delta\psi$. Тем не менее иногда $\Delta\psi$ снижается, а ΔpH возрастает. Такой эффект наблюдал, в частности, Р. Кауппинен, измерявший $\Delta\psi$ и ΔpH в митохондриях перфузированного сердца *in situ*.

Л. Б. Чен и сотрудники окрашивали метилродамином митохондрии клеток в культуре ткани. Как отмечалось в разд. 2.1.3, катион метилродамина электрофоретически накапливается в митохондриях и потому прокрашивает только те из них, которые имеют $\Delta\psi$, но не ΔpH . Был описан случай, когда из двух соседних клеток, не отличающихся по морфологии, только в одной митохондрии накапливали метилродамин. Добавление нигерицина, превращающего ΔpH в $\Delta\psi$ путем обмена H^+ на K^+ , вызывало окрашивание митохондрий также и во второй клетке.

Существует ряд данных, что митохондрии располагают собственным K^+/H^+ -антипортером, который обычно находится в лентной форме.

Одним из факторов, вызывающих переход $\Delta\psi$ в ΔpH , может быть унипорт Ca^{2+} в митохондрии. Однако этот процесс, как правило, имеет ограниченное значение из-за очень низкого (10^{-7} — 10^{-6} моль/л) уровня Ca^{2+} в цитозоле. Что касается K^+ , концентрация которого в цитозоле составляет около 0,1 моль/л, его массовый унипорт в митохондрии должен быть запрещен, так как распределение K^+ по $\Delta\psi$ привело бы к накоплению КОН в матриксе.

Импорт K^+ служит, по-видимому, главным механизмом превращения $\Delta\psi$ в ΔpH у бактерий, существующих при гораздо более низкой концентрации K^+ снаружи, чем митохондрии.

В хлоропластах ΔpH находится в основном в форме ΔpH из-за высокой проницаемости мембраны тилакоидов для Cl^- , K^+ и Mg^{2+} .

6.1.4. Отношение системы контроля ΔpH к основным регуляторным механизмам эукариот

В организмах эукариот надклеточные регуляторы, например гормоны, передают свои команды при помощи внутриклеточных медиаторов, называемых *вторичными посредниками*. Среди них наиболее часто используются Ca^{2+} , циклические нуклеотиды и продукты расщепления фосфатидилинозитдифосфата: трифосфоинозит и диацилглицерин. В последнее время биохимики все большее внимание уделяют такому регулятору с множественным действием, как иону H^+ .

Иногда в качестве вторичных посредников действуют метаболиты, регулирующие пути своего собственного превращения в клетке.

Подобная ситуация была описана при рассмотрении терморегуляторного разобщения (см. разд. 5.4.2). Жирные кислоты выступают не только как субстраты окисления, но и как разобщители этого окисления и ингибиторы АТФ/АДФ-антипортера. Недавно был описан еще один регуляторный эффект жирных кислот. Оказалось, что они вызывают *десорбцию гексокиназы*, связанной с внешней мембраной митохондрий. Это может облегчить жирным кислотам конкуренцию с глюкозой за АТФ в реакциях образования ацил-КоА и глюкозо-6-фосфата. Оба эти процесса могут происходить на поверхности внешней митохондриальной мембраны. Жирные кислоты, сорбируясь на мембране, повышают отрицательный заряд, что приводит к разрушению комплекса гексокиназы с ее рецептором. Роль последнего выполняет порин.

Что касается «классических» вторичных посредников, то применительно к митохондриям особенно тщательно изучены ионы Ca^{2+} . Накапливаясь в митохондриях, они превращают $\Delta\psi$ в ΔpH . Кроме того, они активируют фосфолипазу A_2 . Последняя образует жирные кислоты, вызывающие все те эффекты, о которых шла речь выше. Другой продукт действия фосфолипазы — лизофосфолипиды — также влияет на некоторые параметры митохондрий.

ψ АМФ может, по-видимому, влиять на функции митохондрий не только через жирные кислоты, но и более прямо. На внешней стороне внутренней мембраны митохондрий дрожжей находится белок массой 45 кДа с очень высоким сродством к ψ АМФ ($K_d = 10^{-9}$ М). Можно предположить, что этот белок служит специфическим рецептором, ответственным за описанное ранее действие ψ АМФ, добавленного к клеткам дрожжей — стимуляцию син-

теза митохондриями субъединиц I—III цитохромоксидазы и ускорение дыхания.

Нет сомнений, что ион H^+ также может быть использован в качестве вторичного посредника. Совершенно очевидно, что рН-регуляция очень важна при работе H^+ -АТФазы внешней мембраны клеток растений и грибов. Как было показано в разд. 4.3, этот фермент начинает активно откачивать ионы H^+ из цитоплазмы во внешнюю среду, если возрастает внутриклеточная концентрация H^+ . Действие растительных гормонов ауксинов по всей вероятности связано с закислением цитоплазмы, вызывающим активацию H^+ -АТФазы и, как следствие, повышение $\Delta\psi$ на внешней мембране клетки.

6.1.5. Контроль $\Delta\mu H$ у бактерий

Как уже отмечалось, многие бактерии располагают параллельными электрон-транспортными путями, одни из которых сопряжены с накоплением энергии, а другие — нет. Кроме того, свободное и сопряженное окисления могут быть последовательно включены в одну и ту же дыхательную цепь. Проблему «полезного разобщения» никогда не исследовали применительно к бактериям.

Интересный пример механизма, поддерживающего высокую $\Delta\mu H$ по принципу саморегуляции, был выявлен в опытах с подвижными бактериями. Показано, что искусственно вызванные изменения $\Delta\mu H$ воспринимаются бактерией как сигнал, регулирующий ее движение. Так, добавка разобщителя или исчерпание кислорода служат репеллентным сигналом, вызывающим изменение направления движения бактерии. Соответственно добавление O_2 оказывается аттрактантным стимулом, благоприятным для линейного движения. Отмечено, что влияние кислорода на поведение бактерий (аэротаксис) проявляется лишь в тех случаях, когда концентрация O_2 в среде влияет на $\Delta\mu H$.

Простейшее объяснение этих данных состоит в том, что бактерия располагает устройством, которое измеряет $\Delta\mu H$ и посылает соответствующий сигнал флагеллярному мотору, регулируя таким способом направление вращения жгутика: направление изменяется на противоположное, если $\Delta\mu H$ снижается, и сохраняется неизменным, если она растет. В результате клетка движется туда, где она может поддерживать более высокую $\Delta\mu H$. Гипотетический механизм подобного типа, названный автором *протомером*, позволяет интегрировать множество благоприятных и неблагоприятных воздействий, отражающихся на энергетическом состоянии мембран.

Описан механизм, согласующий работу двух фотосистем в хлоропластах и тем самым оптимизирующий продукцию $\Delta\mu H$ и НАДФН. Если фотосистема II работает слишком быстро, это при-

водит к восстановлению редокс-переносчика (предположительно PQ), включенного между двумя фотосистемами. Такой эффект некоторым способом активирует протеинкиназу, фосфорилирующую белок, который несет на себе хлорофилл антенны. Названный белок в его нефосфорилированном состоянии локализуется в основном в тилакоидах, упакованных в граны. Фосфорилирование увеличивает отрицательный заряд белков антенны, которые диффундируют из тилакоидов в мембраны стромы, где, как правило, локализована фотосистема I. В итоге фотосистема I получает больше хлорофилла антенны, а следовательно, и больше фотонов, чем фотосистема II. Активация фотосистемы I вызывает окисление PQH_2 , а значит, и торможение протеинкиназы. Непрерывно действующая протеинфосфатаза дефосфорилирует белок антенны и прекращает его дальнейшую утечку из тилакоидов в ламеллы стромы.

6.2. Транспорт энергии вдоль мембран в форме $\Delta\bar{\mu}H$

6.2.1. Общие положения

Обычно мембраны рассматривают как структуры, отделяющие цитоплазму от окружающей среды или один отсек клетки от другого. Без сомнения, такое свойство присуще любой биологической мембране. Однако также ясно, что разделительная функция всегда имеет следствием и определенные интегративные эффекты. Например, цитоплазматическая мембрана не только отграничивает цитоплазму от внеклеточной среды, но и объединяет разнообразные внутриклеточные компоненты в единую систему.

Как должно быть ясно из всего предыдущего изложения, $\Delta\bar{\mu}H$, подобно АТФ, служит конвертируемой энергетической «валютой» многих бактерий, растений, грибов, митохондрий и хлоропластов. В гл. 7 будет показано, что роль мембранной формы энергии в цитоплазматической мембране ряда бактерий и во внешней мембране животной клетки играет $\Delta\bar{\mu}Na$.

Обязательное свойство любой «валюты» — ее транспортабельность. Как $\Delta\bar{\mu}H$, так и $\Delta\bar{\mu}Na$ отвечают этому требованию. В частности, представляется вполне очевидным, что и $\Delta\psi$ -, и ΔpH -составляющие протонного потенциала, возникнув на той или иной мембранной структуре, немедленно распространяются по мембране во все стороны. Так как среды по обе стороны мембраны представляют собой водные растворы электролитов, электропроводность их очень высока. В то же время электропроводность самой мембраны очень низка. Это означает, что $\Delta\psi$, образованная данным $\Delta\bar{\mu}H$ -генератором, не может избежать быстрой иррадиации по всей поверхности мембраны. То же относится и к ΔpH в

связи с высокой скоростью диффузии H^+ в воде и большой концентрации рН-буферов, еще более увеличивающих эту скорость. Эти факты означают, что $\Delta\mu H$, образованная $\Delta\mu H$ -генератором в определенной области мембраны, может передаваться вдоль мембраны и превращаться в работу в другой области той же мембраны. Основываясь на приведенных выше соображениях, автор выдвинул (1969) концепцию, согласно которой сопрягающие мембраны могут играть роль электрического кабеля, действующего в пределах клетки или даже на надклеточном уровне. Ниже будут рассмотрены эта и ряд других интегрирующих функций биологических мембран.

6.2.2. Перенос $\Delta\mu H$, образуемой светозависимыми $\Delta\mu H$ -генераторами, вдоль мембран галобактерий и хлоропластов

Как было показано в разд. 3.5, перенос $\Delta\mu H$ вдоль мембраны должен быть обязательным этапом утилизации световой энергии бактериями *H. halobium*. У этих микроорганизмов более 50% площади цитоплазматической мембраны может быть занято пурпурными бляшками диаметром до 0,5 мкм. $\Delta\mu H$, образуемая бактериородопсином, должна использоваться потребителями $\Delta\mu H$ в областях мембраны, иных, чем пурпурные бляшки, поскольку других белков, кроме бактериородопсина, в бляшках нет.

По меньшей мере два процесса транспорта энергии вдоль мембран существует в хлоропластах и цианобактериях. Хорошо известно, что фотоны в основном поглощаются хлорофиллом антенны. Затем энергия электронного возбуждения мигрирует в плоскости мембраны между молекулами хлорофилла антенны, пока не достигнет хлорофилла реакционного центра.

Перенос энергии вдоль мембраны хлоропласта, но уже в форме $\Delta\mu H$, должен иметь место, когда $\Delta\mu H$, поставляемая фотосистемой II (которая локализована в тилакоидах), используется для синтеза АТФ H^+ -АТФ-синтазой, сосредоточенной в ламеллах стро-мы хлоропласта.

6.2.3. Трансклеточный перенос энергии в трихомах цианобактерий

В галобактериях и хлоропластах передача энергии осуществляется на расстояния не более 1 мкм. В то же время транспорт $\Delta\mu H$ может быть эффективным на расстояние порядка 1 мм, как это показал расчет потерь, сопровождающих такую передачу энергии (потери рассчитывали по уравнению электрического кабеля).

Первый пример передачи $\Delta\bar{\mu}H$ на столь большое расстояние был описан в группе автора при изучении трихомов нитчатых цианобактерий *Phormidium uncinatum*.

Трихом цианобактерий представляет длинную цепочку соединенных друг с другом клеток. Число клеток может достигать тысячи, а длина трихома — нескольких миллиметров. Существуют данные, что клетки, объединенные в трихом, могут быть связаны друг с другом *микроплазматесмами* — тончайшими трубочками, пересекающими межклеточное пространство. Если микроплазматесмы имеют высокую электропроводность, то $\Delta\psi$, образованная, например, вблизи одного конца трихома, может передаваться вдоль трихома вплоть до его противоположного конца и там совершать полезную работу. Найдено, что *освещение около 5% трихома сфокусированным пучком света вызывает генерацию $\Delta\psi$, распространяющуюся по всей длине трихома*. Амплитуда и кинетика распространения $\Delta\psi$ соответствовали таковым, рассчитанным на основании предположения о кабельных свойствах трихома.

Вывод о кабельных свойствах трихомов цианобактерий можно экстраполировать на ткани растений, в которых клетки соединены между собой плазматесмами, хорошо проницаемыми для ионов, в том числе для H^+ . Возможное значение трансклеточной передачи $\Delta\bar{\mu}H$ для растительных организмов — интересный предмет будущих исследований.

6.2.4. Структура и свойства нитчатых митохондрий и митохондриального ретикулума

Догма о мелких митохондриях. В переводе с греческого *митохондрия* означает *нить-зерно*. Это название было предложено цитологами, использовавшими световой микроскоп. Первые исследователи митохондрий всегда подчеркивали, что данные органеллы существуют в двух основных формах: нитчатой и сферической или эллипсоидной.

С введением электронной микроскопии и техники тонких срезов подобное мнение изменилось таким образом, что нитчатые митохондрии стали рассматривать как весьма редкое исключение, в то время как сферическая форма была принята канонической. Подобное изменение взгляда на митохондрии оказалось следствием того обстоятельства, что микроскопист, рассматривающий одиночную электронную микрофотографию, по существу имеет дело с двумерным изображением клетки. На одиночном срезе и клубок ниток можно ошибочно принять за россыпь мелких зерен. Истинная картина возникает только при реконструкции структуры по многим серийным резам, прошедшим строго параллельно друг другу.

Догма о размере и форме митохондрий приобрела особую популярность среди молодого поколения биохимиков, никогда не видевших толком митохондрии в световой микроскоп. Чтобы наблю-

дать митохондрии этим старым способом, нужна известная сноровка, поскольку митохондрии находятся на грани разрешающей способности световой микроскопии. Проще было поверить на слово электронным микроскопам, развившим новый физический метод с несравнимо большим разрешением.

Ясно, что передача $\Delta\bar{\mu}H$, ограниченная отдельной мелкой митохондрией сферической формы, не может служить механизмом транспорта энергии в масштабах клетки. Но если все же старые морфологии были правы, помещая «митос» на первое место в названии этих органелл, и митохондрии обычно (или хотя бы иногда) имеют вид длинных нитей, то их функция в качестве внутриклеточного протонного кабеля представляется вполне реальной.

Гигантские митохондрии и Reticulum mitochondriale. Три методических подхода поколебали догму о мелких митохондриях: 1) реконструкция трехмерной структуры клетки по сериям тонких срезов; 2) высоковольтная электронная микроскопия, позволившая увеличить толщину исследуемого препарата, и 3) окрашивание митохондрий флуоресцирующими проникающими катионами, что сделало возможным возврат к прижизненному изучению клетки под световым микроскопом.

Метод серийных срезов был применен прежде всего в работах на одноклеточных эукариотах. Уже самые первые исследования этих объектов выявили очень крупный размер и сложное строение митохондрий. Например, М. Бертон и Дж. Мур, работая с *Polytomella agilis*, обнаружили в клетке этого простейшего из группы жгутиковых всего одну (!) митохондрию, выглядевшую как перфорированная сфера, располагающаяся сразу под внешней клеточной мембраной. Цитоплазма и ядро лежали внутри этой сферы «как в авоське» (рис. 51).

Одиночная гигантская митохондрия была описана в клетках некоторых дрожжей, хлореллы и других одноклеточных водорослей. Несколько очень крупных сетчатых митохондрий, иногда объединяющихся в одну, было обнаружено у хламидомонад, эвглены, трипаносом и некоторых грибов. Нитевидные митохондрии длиной около 10 мкм найдены в экзокринных клетках поджелудочной железы. Сперматозоиды содержат цепь длинных митохондрий, состыкованных конец в конец. В печени выявлены два типа митохондрий: мелкие сферические и крупные разветвленные. Подобная картина наблюдается в клетках асцитного рака и у водоросли *Polytoma papillarum*. В последнем случае было проанализировано 228 параллельных срезов через клетку водоросли. Оказалось, что клетка содержит 246 отдельных мелких сферических митохондрий, две крупные и разветвленные и еще одну очень большую, образующую полый перфорированный шар.

Одним из наиболее интересных объектов для изучения возможных механизмов передачи энергии являются клетки мышечной

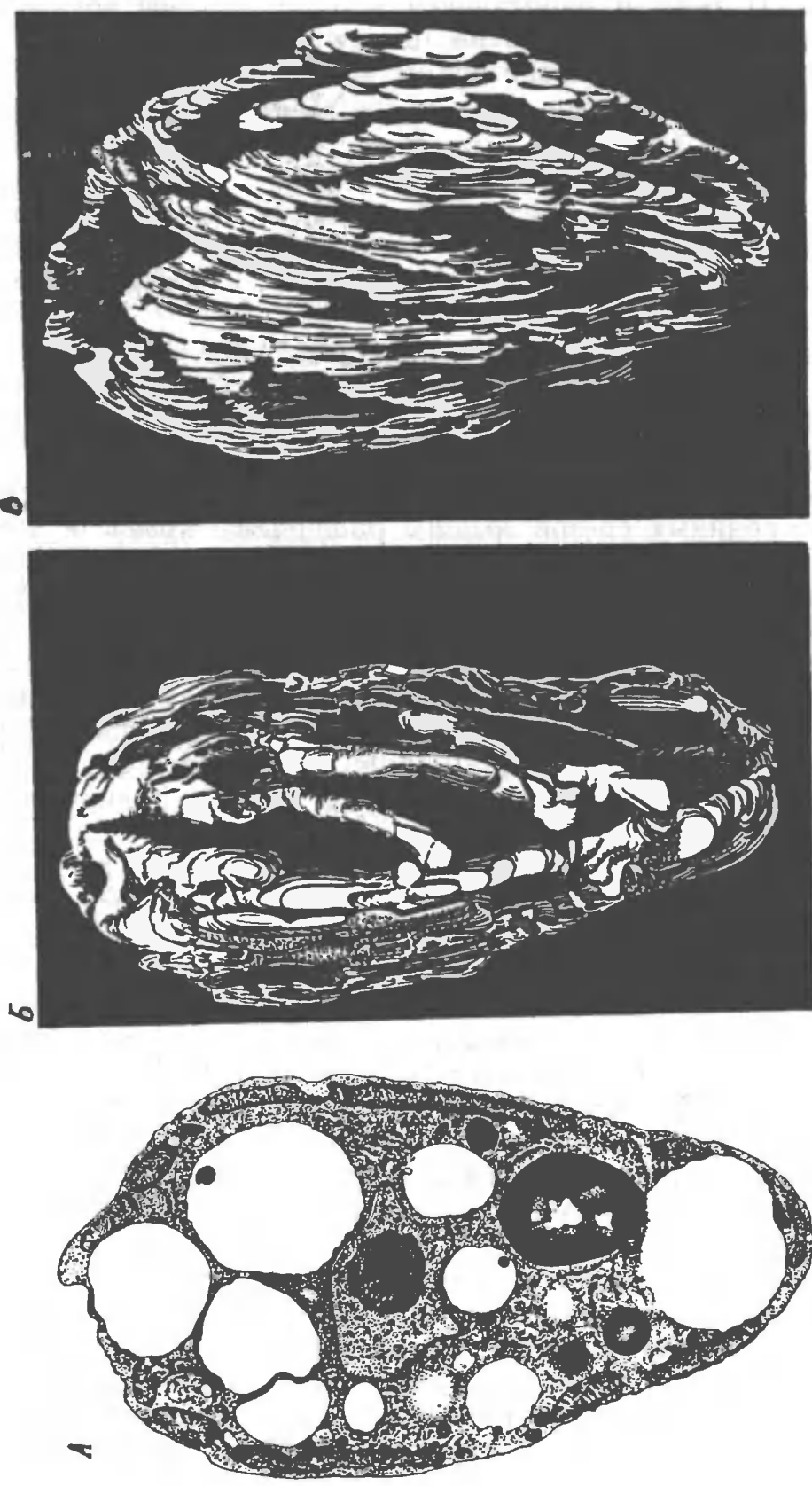


Рис. 51. Единая митохондриальная система в клетке жгутикового *Polytomella agilis* (по М. Burtop, J. Mooge, 1974):

А — срез через клетку (микрофотография может быть ошибочно интерпретирована как свидетельство того, что в клетке находится много мелких митохондрий); Б и В — вид спереди и сбоку модели единой митохондриальной системы *P. agilis*, реконструированной по серийным срезам

ткани. Многоядерные клетки мышц (мышечные волокна) достигают огромных размеров. Их энергетические потребности чрезвычайно высоки. В тяжело работающей мышце должны возникать градиенты кислорода и субстратов между периферией и сердцевиной клетки, что ограничивает объем выполняемой работы. Передача $\Delta\bar{\mu}H$ от краев мышечной клетки к ее центру могла бы решить проблему. Но для этого мышечные митохондрии должны быть очень велики по размеру.

В летательных мышцах насекомых обнаружены митохондрии, имеющие вид пластин, которые тянутся от края к центру клетки. Их длина около 10 мкм, т. е. того же порядка, что и радиус мышечного волокна.

Первые указания на то, что в мышцах высших животных митохондрии могут достигать значительных размеров, были получены в 60-е годы Г. Д. Бубенцером и сотрудниками при исследовании одиночных срезов.

Л. Е. Бакеева и Ю. С. Ченцов предприняли систематическое исследование серийных срезов *мышцы диафрагмы крысы* и установили, что *митохондрии* в этой ткани имеют вид сети, пронизывающей мышечное волокно в изотропной области: вблизи Z-дисков. Сети связаны между собой колоннами, расположенными параллельно миофибриллам. Кроме того, имеются ветви, связывающие сети с митохондриальными кластерами по краям мышечного волокна. Вся эта система, названная автором и сотрудниками *митохондриальным ретикулумом* (*Reticulum mitochondriale*), характерна для диафрагмы взрослых животных. Ее нет в диафрагме крысиных эмбрионов и новорожденных крысят.

Иногда составляющие ретикулум митохондриальные филаменты образуют, соприкасаясь, особые контактные зоны. Эта структура, открытая Л. Е. Бакеевой и сотрудниками при исследовании *мышцы диафрагмы*, затем была детально изучена в той же группе на примере сердечной мышцы, где *митохондриальные контакты* особенно многочисленны. Оказалось, что митохондрии в этой ткани также образуют трехмерную систему, но вместо сети из тонких ветвящихся трубчатых митохондриальных тяжей, описанных в мышце диафрагмы и скелетных мышцах, в сердце содержится множество толстых эллиптической формы митохондрий с малым количеством отростков; все они связаны друг с другом контактами.

Зона контакта представляет собой диск диаметром от 0,1 до 1 мкм. В этой зоне как мембраны, так и межмембранное пространство характеризуются повышенной электронной плотностью. Две внешние мембраны контактирующих митохондрий максимально сближены друг с другом подобно тому, как это происходит при плотных контактах внешних клеточных мембран. Каждая митохондрия связана с соседними несколькими такими контактами (контакты отсутствуют в сердце трехдневного крысенка).

Еще более сложная контактная структура обнаружена в зоне нексуса (межклеточного щелевого контакта). Иногда можно видеть, что митохондрии, локализованные в двух соседних миокардиоцитах, плотно прилегают к внешней клеточной мембране в области щелевого контакта. В результате образуется шестимембранный контакт, составленный из двух клеточных и четырех митохондриальных мембран.

Нитчатые митохондрии. Если изучаемый объект имеет не столь высокую электронную плотность, как мышечное волокно, истинные форма и размер митохондрий могут быть несложно выявлены посредством высоковольтной электронной микроскопии. Такого рода исследования обнаружили длинные нитевидные митохондрии в клетках самых различных типов.

Однако указанный метод имеет два существенных ограничения. Во-первых, он не позволяет наблюдать митохондриальные контакты. Поэтому не удастся ответить на вопрос, что является объектом наблюдения — одна протяженная митохондрия или множество органелл, состыкованных друг с другом. Во-вторых, подобно любой другой методике, использующей электронный микроскоп, при высоковольтной микроскопии исследователь имеет дело с фиксированным материалом, что не позволяет прямо следить за функционированием митохондрий. Чтобы преодолеть последнее затруднение, было решено временно вернуться к световому микроскопу. Этим методом в принципе можно увидеть митохондрии в живой клетке, но тонкие митохондриальные филаменты и сети часто ускользают от наблюдения из-за низкого разрешения микроскопии в проходящем свете. Такого рода ограничение снимается, если работать не с поглощением, а с эмиссией света. Когда эмиссия достаточно интенсивна, источник света можно увидеть в темноте, даже если его не удастся наблюдать как тело, задерживающее свет.

Исследования, проведенные Л. Б. Ченом и сотрудниками в США и Д. Б. Зоровым в лаборатории автора, показали, что *производные флуоресцирующего проникающего катиона родамина специфически накапливаются в митохондриях*. Также было установлено, что митохондрии в живой клетке достаточно часто представляют собой филаменты длиной в десятки микрометров. Иногда митохондриальные филаменты имеют такую большую протяженность, что могут связывать периферию и центр клетки или даже пересекать клетку от края до края. В ряде типов клеток был выявлен митохондриальный ретикулум. Довольно типичный вариант состоит в том, что в клетке сосуществуют *две популяции митохондрий — длинные нитчатые и мелкие овальные*.

Применение прижизненной флуориметрии митохондрий подтвердило отрывочные наблюдения, которые были сделаны ранее традиционными методами, свидетельствовавшими, что обратимый переход нить — зерно есть универсальное свойство этих органелл. Демонстративный пример такого рода был описан и Л. Фойссне-

ром, который показал превращение митохондрий нителлы в филаменты длиной до 30 мкм при торможении фотосинтеза диуроном или снижением интенсивности света, а также при блокировании дыхательной цепи в среднем или конечном сегментах. В то же время торможение НАДН-КоQ-редуктазы ротеноном или снятие $\Delta\mu\text{H}$ динитрофенолом не влияли на размер митохондрий. Удлинение митохондрий предотвращалось при торможении синтеза белка. Примечательно, что только некоторые митохондрии (не более 20% от их общего числа) превращались в нити, как если бы они несли какую-то дополнительную функцию, отличную от той, которая может быть выполнена мелкими митохондриями.

Случай другого рода был описан К. Танакой и сотрудниками, заметившими, что при вхождении клеток дрожжей *Candida albicans* в стадию почкования отдельные митохондрии объединяются в одну гигантскую, которая фрагментируется при митозе. Затем (перед цитокинезом) вновь образуется гигантская митохондрия, впоследствии разделяющаяся на две части.

Образование митохондриальных филаментов в клетках дрожжей *Endomyces magnusii*, выращиваемых в гипоксических условиях, было отмечено М. Н. Мейселем и сотрудниками еще в 1964 г.

Митохондрия как внутриклеточный протонный кабель. Результаты, изложенные в предыдущем разделе, свидетельствуют о том, что многие клетки эукариот располагают очень длинными митохондриями, иногда объединяющимися в сеть. Протяженные митохондрии часто сосуществуют с популяцией мелких митохондрий, традиционно считающихся типичным примером митохондриальных структур.

Если нитчатая митохондрия представляет собой континуум как внешней, так и внутренней мембраны, то $\Delta\mu\text{H}$ распространяется по всей ее длине. Если же эта нить составлена из многих мелких митохондрий или митопластов, состыкованных конец в конец, то возможны два варианта: 1) митохондриальный филамент подобен трихому цианобактерий, у которых все его составляющие (клетки) соединены друг с другом микроплазматесмами, имеющими высокую электропроводность (см. разд. 6.2.3); 2) между двумя соседними митохондриями нет электрического контакта.

В предыдущем разделе уже был описан межмитохондриальный контакт — особая структура, локализованная на стыках двух митохондрий. Проблема состоит в том, чтобы установить — проводящий ли это контакт, подобно микроплазматесмам цианобактерий либо щелевым контактам внешних мембран животных клеток, или же, напротив, его сопротивление так же высоко, как и в других участках внутренней мембраны митохондрий. С точки зрения предполагаемых кабельных свойств длинных митохондрий, первый случай идентичен митохондриальному континууму. Во втором случае приходится предполагать, что обмен энергией между соседними митохондриями обеспечивается не диффузией протонов, а диффу-

зией АТФ, перемещающегося через область контактов или где-то рядом с ним.

Очевидное предсказание гипотезы, рассматривающей нитевидную митохондрию в качестве кабеля, состоит в том, что локальное повреждение такой митохондрии в любой точке должно вызывать дезэнергизацию по всей ее длине. Это предсказание недавно получило свое прямое подтверждение: в группе автора В. А. Драчевым был сконструирован специальный прибор, состоящий из лазера и флуоресцентного микроскопа. Используя это устройство, Д. Б. Зоров облучил одиночный митохондриальный филамент в клетке культуры фибробластов человека, прокрашенной этилродамином. Облучение производили сфокусированным пучком лазера, так что диаметр светового пятна был соизмерим с поперечником филамента. Облучение приводит к исчезновению свечения родамина по всей длине (40 мкм) филамента; существенно, что при этом другие митохондриальные филаменты сохраняли свою флуоресценцию. Следовательно, наблюдаемый эффект нельзя объяснить неспецифическим повреждением всей клетки лазером. Фазово-контрастная и электронная микроскопия не выявила заметных повреждений в структуре облученной лазером и прекратившей светиться митохондрии.

Аналогичное исследование было проведено на миокардиоцитах. Облучение одиночной митохондрии вызывало тушение кластера, состоящего из многих митохондрий. Электронное микрофотографирование обнаружило, что погашение митохондрии связано с облученной межмитохондриальными контактами. Что касается митохондрий, сохранивших флуоресценцию, то здесь контактов с облученной органеллой найти не удалось.

Простейшее объяснение всех этих данных состоит в следующем. В миокардиоците содержится несколько независимых митохондриальных кластеров, образованных многими митохондриями (*гроздь митохондрий*, или *Streptio mitochondriale*). Митохондрии, формирующие гроздь, соединены друг с другом митохондриальными контактами. Эти контакты характеризуются высокой электропроводностью, напоминая в данном отношении микроплазматесмы цианобактерий.

Гигантские митохондрии как пути транспорта веществ. Не только H^+ , но и другие ионы, метаболиты и т. п. могли бы транспортироваться по нитчатым митохондриям. Например, любое вещество, концентрирующееся в матриксе, будет переноситься по митохондриальному филаменту, как по трубопроводу. В частности, ионы Ca^{2+} , попавшие из межклеточного пространства в приграничный слой цитозоля, будут аккумулироваться посредством $\Delta\psi$ -зависимого Ca^{2+} -унипортера в окончаниях митохондриальных филаментов и диффундировать по матриксу к противоположным концам этих филаментов, расположенным в центральных участках клетки. Если предположить, что в этих последних активирован

$\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ -антипортер, то нитевидные митохондрии одним своим концом могли бы поглощать ионы Ca^{2+} на периферии клетки, а другим — выделять их в глубинных ее частях.

Подобную логику можно применить к любому другому компоненту, способному обратимо аккумулироваться в митохондриальном матриксе.

Другой вариант предположений — это мембрана как транспортная артерия клетки, используемая для переноса жирорастворимых веществ. На первый взгляд, транспорт веществ по мембранам должен происходить медленнее, чем по водной фазе клетки. Бытует мнение, что вязкость мембраны гораздо выше, чем вязкость цитоплазмы, а следовательно, для любого вещества, растворимого и в воде, и в липиде, водный путь предпочтительнее.

Однако цитозоль и митохондриальный матрикс — это не водные растворы низкомолекулярных веществ, а, скорее, коллоидные растворы, к тому же пересеченные нерастворимыми структурами — мембранами и компонентами цитоскелета. Как показал опыт, в котором измеряли движение низкомолекулярного спин-меченого соединения с коэффициентом распределения в системе липид/вода, близким к 1, в клетках самых различных типов это соединение предпочтительно движется не по воде, а по липиду. Такое предпочтение должно быть еще более выражено, если коэффициент распределения вещества — в пользу липида, как это имеет место, например, для *жирных кислот* и их эфиров с карнитином или *КоА*. В частности, мембранный путь был постулирован для *ацил-КоА* М. Сампером и Дж. Тройбле. *Ацилкарнитин*, по-видимому, приспособлен для выполнения этой функции даже лучше, чем *ацил-КоА*, так как по массе он значительно меньше.

Интересная проблема — *транспорт молекулярного кислорода по мембранам*. Можно указать по крайней мере четыре обстоятельства, благоприятствующие транспорту O_2 по внутренней мембране митохондрий.

1. Растворимость O_2 в липиде примерно в пять раз выше, чем в воде.

2. Цитохромоксидаза — главный фермент, поглощающий кислород, локализована во внутренней мембране. Она имеет очень высокое сродство к кислороду (K_m цитохромоксидазы гораздо ниже концентрации O_2 в воде), что может способствовать образованию локальных областей низкой концентрации O_2 во внутренней митохондриальной мембране.

3. Скорость диффузии O_2 в углеводородах в 10—100 раз выше, чем это следует из данных по макровязкости; ее величина оказывается того же порядка, что и величина скорости диффузии O_2 в воде. Она резко замедляется холестерином, которого, как известно, нет во внутренней мембране митохондрий.

4. В таких тканях, как мышечная, внутренняя митохондриальная мембрана составляет большую часть мембранного материала клетки.

Однако даже в сердечной мышце, где митохондрий особенно много, митохондриальные мембраны по объему занимают малую часть клетки. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы решить, какой путь транспорта кислорода является главным: по мембранам или через цитозоль.

Интересная проблема — *перенос электронов вдоль мембран*. Этот процесс локализован, по-видимому, в эндоплазматическом ретикулуме и внешней митохондриальной мембране, где он обеспечивается *НАДН-цитохром b_5 -редуктазой* (флавопротеином Фп₅) и *цитохромом b_5* . Названная система найдена в печени, почках, мозге и некоторых других тканях. Как Фп₅, так и цитохром b_5 состоят из двух неравных частей: большей гидрофильной, содержащей флавин или гем, и меньшей гидрофобной, требующейся для заякоривания белка в мембране. Подобно челноку, Фп₅ и цитохром b_5 могут перемещаться по поверхности мембраны, встречая сравнительно небольшое сопротивление.

Поскольку редокс-потенциал Фп₅ близок к редокс-потенциалу восстановителя (НАДН), этот флавопротеин, двигаясь вдоль мембран, может выравнивать градиенты редокс-потенциалов в области —0,3 В в различных частях клетки. Цитохром b_5 способен выполнять ту же функцию, но на уровне редокс-потенциалов, близких к нулю.

Еще одна функция цитохрома b_5 была обнаружена автором совместно с А. И. Арчаковым. Установлено, что пузырьки эндоплазматического ретикулума или митохондрии печени способны восстанавливать цитохром b_5 протеолипосом, не содержащих других белков, кроме этого цитохрома. В качестве восстановителя использовали НАДН. Поскольку эффект не снижался многократными промываниями эндоплазматического ретикулума, был сделан вывод, что Фп₅ или цитохром b_5 , или они оба могут катализировать *межмембранный перенос электронов* без помощи каких-либо водорастворимых посредников.

Дальнейшие опыты показали, что данное свойство присуще только цитохрому b_5 . Пузырьки эндоплазматического ретикулума обрабатывали проназой при 4°C, что приводило к разрушению цитохрома b_5 . При этом активность Фп₅ сохранялась на вполне измеримом уровне. Такие пузырьки полностью утрачивали способность к межмембранному переносу электронов.

Интересное наблюдение было сделано С. Грингат и М. Роузманом, исследовавшими количество цитохрома b_5 в протеолипосомах, диаметр которых варьировал в 1,5 раза (от 21 до 35 нм). Выяснилось, что содержание цитохрома b_5 была по крайней мере в 20 раз больше в пузырьках меньшего диаметра. Это означает, что цитохром b_5 может накапливаться в изогнутых участках мембраны, например в концах митохондриальных филаментов.

На рис. 52 представлен возможный механизм переноса электронов через щель между двумя соседними митохондриальными филаментами. Предполагают, что молекулы цитохрома b_5 диф-

фундируют в плоскости мембраны вдоль филаментов посредством броуновского движения, сканируя мембрану в поисках окислителя. В области, где два соседних мембранных тяжа находятся на расстоянии не более удвоенного диаметра гидрофильной головки

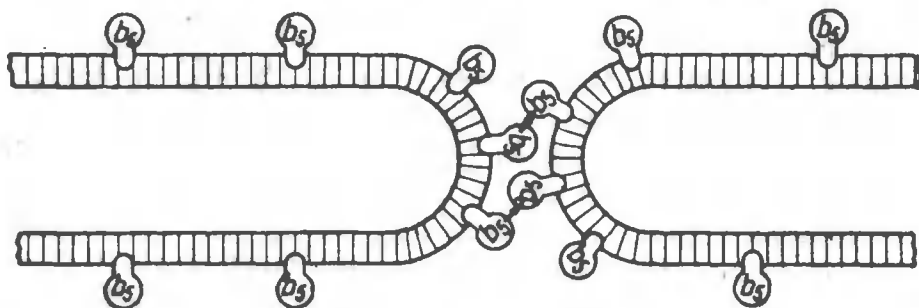


Рис. 52. Перенос электронов с конца одного мембранного тяжа на начало другого тяжа посредством цитохрома b_5 :

стрелками показан межмембранный электронный транспорт

цитохрома b_5 , цитохром более восстановленного филамента передает электрон цитохрому более окисленного филамента. Эта реакция облегчается вследствие концентрирования цитохромов b_5 в изогнутых окончаниях филаментов, что может быть частным случаем сформулированного автором более общего принципа о «таксисе» мембранных ферментов к их субстратам.

6.3. $\Delta\bar{\mu}$ Н-Буферы

6.3.1. Градиенты Na^+ и K^+ как $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -буфер у бактерий

Если протонный потенциал действительно играет роль конвертируемой «валюты», то количество энергетических эквивалентов, накопленных в виде $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, должно быть достаточно велико, чтобы стабилизировать, забуферивать колебания скоростей $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -образующих и $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -потребляющих процессов.

Зная электрическую емкость и площадь мембраны, например бактериальной клетки, можно рассчитать, сколько ионов водорода будет откачено из цитоплазмы бактерии при образовании $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ порядка 250 мВ (верхний предел $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, поддерживаемой в энергизованных условиях). Если принять емкость за $1 \text{ мкф} \cdot \text{см}^{-2}$, то получается количество H^+ , равное всего $1 \text{ мкмоль} \cdot \text{г белка}^{-1}$, что соизмеримо с содержанием мембранных ферментов. Чтобы запасти энергию $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ в «субстратных» количествах, необходимо разрядить мембрану потоком любых ионов, за исключением H^+ . При этом снижение $\Delta\psi$ будет сопровождаться переносом новых порций ионов H^+ до тех пор, пока ΔpH не возрастет до величины, эквивалентной 250 мВ. рН-Буферная емкость цитоплазмы примерно на два порядка превышает электрическую емкость цитоплазматиче-

ской мембраны, так что порция энергии, накопленной в ΔpH , оказывается гораздо большей, чем в $\Delta\psi$.

Дальнейшее увеличение количества «мембранной» энергии может быть достигнуто, если образованная таким способом ΔpH затем используется, например, катион/ H^+ -антипортером, заменяющим ΔpH на Δp (катион). Включение такого антипортера, обменивающего, например, внутренний Na^+ на внешний H^+ , по существу равносильно увеличению концентрации рН-буфера, как это впервые было отмечено П. Митчелом еще в 1968 г. При этом Митчел игнорировал роль другого одновалентного катиона — K^+ . По его мнению, накопление K^+ под действием $\Delta\psi$ есть нежелательный, хотя и неизбежный, побочный эффект.

В 1978 г. автор этой книги предположил, что *вход* K^+ используется бактериальной клеткой с целью *превращения* $\Delta\psi$ в ΔpH и ΔpK . Образующая ΔpK забуферивает $\Delta\psi$. Что касается ΔpH , то она утилизируется Na^+/H^+ -антипортером для образования ΔpNa . В результате ΔpNa оказывается буфером ΔpH . Согласно этой концепции, *бактерия аккумулирует K^+ и выбрасывает Na^+ в условиях избытка энергетических ресурсов*. Энергетический дефицит меняет направление ионных потоков: снижается $\Delta\psi$, и K^+ начинает выходить из клетки, двигаясь по градиенту своей концентрации; соответственно снижение ΔpH приводит к входу Na^+ (рис. 53).

Гипотеза $\Delta\mu H$ -буфера позволила объяснить ряд наблюдений, относящихся к энергетике бактерий. В частности, было известно, что K^+ может электрофоретически накапливаться в бактериальных клетках. Что же касается Na^+/H^+ -антипорта, то он был описан в 1974 г. И. Уэстом и П. Митчелом у *E. coli*. Впоследствии его наличие было продемонстрировано у многих видов бактерий.

Взаимодействие $\Delta\psi$ -зависимого импорта K^+ и ΔpH -зависимого экспорта Na^+ в принципе удовлетворяет требованиям, предъявляемым к $\Delta\mu H$ -буферу. Na^+ — наиболее массовый катион. Его концентрация в морской воде около 0,5 М. Поэтому клетка, откачи-

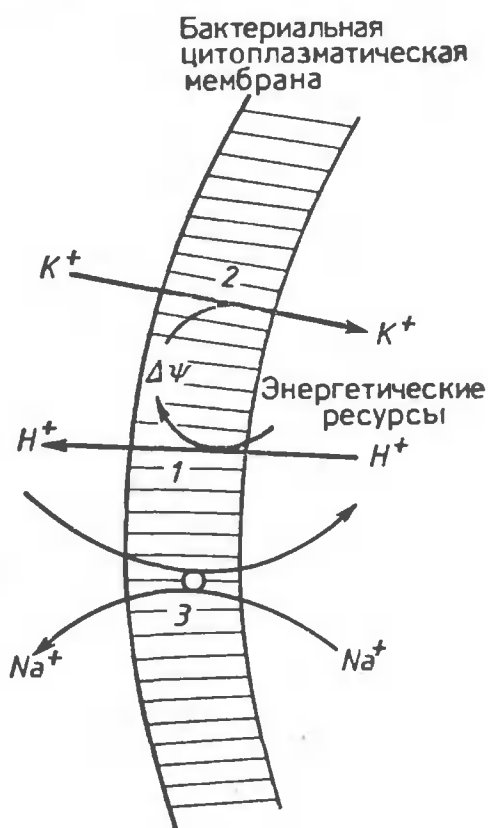


Рис. 53. $\Delta\mu H$ -Зависимое образование градиентов ионов Na^+ и K^+ на цитоплазматической мембране бактерий:

H^+ откачивается из клетки $\Delta\mu H$ -генераторами (1). Образованная при этом $\Delta\psi$ вызывает электрофоретический вход ионов K^+ (2), который разряжает $\Delta\psi$, превращая ее в ΔpH . Na^+/H^+ -антипортер откачивает Na^+ из клетки за счет ΔpH (3). Снижение $\Delta\psi$ и ΔpH обращает ионные потоки, которые поддерживают некоторое время $\Delta\psi$ и ΔpH в отсутствие внешних энергетических ресурсов

вая Na^+ из цитоплазмы, может легко создать большой градиент ионов Na^+ . Концентрация $[\text{K}^+]_{\text{нар}}$ обычно гораздо ниже, чем $[\text{Na}^+]_{\text{нар}}$, так что большая величина ΔpK может быть получена за счет аккумуляции K^+ внутри клетки. В то же время $[\text{K}^+]_{\text{нар}}$ не столь мала, чтобы затруднить поиск этого катиона во внешней среде. Ведь K^+ — второй по массовости катион в морской воде.

Замена внутриклеточного Na^+ на K^+ и наоборот вряд ли должна сильно сказаться на метаболизме и структуре клетки, поскольку свойства этих ионов во многом подобны, тем более что ни K^+ , ни Na^+ прямо не участвуют в биохимических реакциях. Опыты по проверке гипотезы о $\Delta \mu\text{H}$ -буфере показали, что бактерии действительно образуют Na^+/K^+ -градиенты при избытке энергии и используют их для совершения полезной работы при нехватке энергетических ресурсов. Наиболее существенны следующие наблюдения.

1. Предобразованные градиенты ионов Na^+ и K^+ могут поддерживать такую $\Delta \mu\text{H}$ -зависимую функцию, как движение галофильной *Halobacterium halobium*, морского *Vibrio harveyi*, а также *E. coli*, после истощения энергетических ресурсов. У пресноводной *Phormidium uncinatum* был эффективен градиент K^+ , но не Na^+ .

2. Градиенты Na^+ и K^+ стабилизируют уровень $\Delta \psi$ и АТФ в условиях энергетического дефицита.

3. Емкость Na^+/K^+ -буфера прямо пропорциональна концентрации соли в среде обитания бактерий, снижаясь в ряду *H. halobium* > *V. harveyi* > *E. coli* > *Ph. uncinatum*. Градиенты Na^+ и K^+ у *H. halobium*, предынкубированной на свету, все еще поддерживают движение спустя более чем 8 ч после прекращения освещения и истощения O_2 . Это означает, что галобактерия в течение дня способна вложить в Na^+/K^+ -градиент столь значительную порцию энергии, что ее практически хватает на всю ночь.

Взаимодействие K^+ -унипорта и Na^+/H^+ -антипорта — простейший, но не единственно возможный механизм стабилизации $\Delta \mu\text{H}$ градиентами одновалентных катионов. У некоторых бактерий, по крайней мере в щелочной среде, имеет место электрогенный (Na^+/nH^+)-антипорт. Кроме того, накопление K^+ может катализироваться K^+ , H^+ -симпортером. В подобных случаях $\Delta p\text{Na}$ стабилизирует не только $\Delta p\text{H}$, но и (в меньшей степени) $\Delta \psi$. Соответственно ΔpK стабилизирует и $\Delta \psi$, и $\Delta p\text{H}$, причем эффект более выражен в отношении $\Delta \psi$.

Вероятно, стабилизация $\Delta \mu\text{H}$ необходима прежде всего в мембранах, располагающих сразу многими путями образования и использования $\Delta \mu\text{H}$. Такова, например, цитоплазматическая мембрана дышащих или фотосинтезирующих бактерий, где имеются дыхательные (фотосинтетические) $\Delta \mu\text{H}$ -генераторы, H^+ -АТФ-синтаза, $\Delta \mu\text{H}$ -зависимые переносчики и H^+ -моторы.

В то же время у анаэробных неподвижных бактерий, живущих гликолизом, проблема стабилизации $\Delta\bar{\mu}H$ может и не стоять. В их цитоплазматической мембране содержится только один тип $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов (H^+ -АТФаза, использующая гликолитический АТФ) и один тип потребителей $\Delta\bar{\mu}H$ (H^+ , метаболит-симпортеры). В этой группе микроорганизмов можно найти представителей, у которых содержание Na^+ внутри клетки оказывается выше, чем снаружи. Та же логика справедлива применительно к внутриклеточным пузырькам и органеллам, специализированным на $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимом синтезе АТФ (хроматофоры бактерий-фотосинтетиков, митохондрии и хлоропласты). Они используют упрощенные варианты механизма стабилизации $\Delta\bar{\mu}H$.

6.3.2. Другие системы стабилизации $\Delta\bar{\mu}H$

Обычно биологическая мембрана делит некий объем на две неравные части. Поэтому активный транспорт ионов H^+ через мембрану изменяет рН главным образом (или даже исключительно) в меньшем отсеке. Если в этом отсеке нет ферментов, то механизм стабилизации $\Delta\bar{\mu}H$ может быть упрощен таким образом, что его натриевый компонент попросту отсутствует. Наиболее демонстративный пример — *тилакоиды хлоропластов*.

Здесь ионы H^+ , транспортируемые через мембрану, высвобождаются во внутритилакоидное пространство, представляющее собой очень узкую щель, размеры поперечника которой имеют тот же порядок, что и толщина мембраны. В этой щели практически нет ферментов, поэтому нет риска, что закисление внутритилакоидного пространства инактивирует какой-либо ферментативный процесс. Как было показано выше (см. разд. 3.3.5), стабилизация $\Delta\bar{\mu}H$ происходит за счет перехода $\Delta\psi \rightarrow \Delta pH$, сопровождающего перенос K^+ , Mg^{2+} и Cl^- через мембрану тилакоидов. Поскольку внутритилакоидное пространство очень мало по сравнению с объемом стромы хлоропласта, ΔpH образуется почти исключительно за счет закисления среды внутри тилакоида, рН которой может быть на три единицы ниже, чем в строме.

Некоторая стабилизация $\Delta\bar{\mu}H$ необходима хлоропласту из-за колебаний интенсивности света, всегда происходящих в естественных условиях. Вероятно, по этой причине хлоропласт превращает $\Delta\psi$ в ΔpH . Та же проблема существует и в бактериальных хроматофорах; у *Rhodospirillum rubrum* она может быть решена посредством *H^+ -пирофосфат-синтазы*. Этот весьма активный фермент использует $\Delta\bar{\mu}H$, чтобы образовать пирофосфат из фосфата. Путей утилизации пирофосфата, соизмеримых по скорости с H^+ -пирофосфат-синтазой, для этой бактерии описано не было. Автор и сотрудники предположили, что главный путь превращения пирофосфата у *Rh. rubrum* — его гидролиз с образованием $\Delta\bar{\mu}H$ при обращении

H^+ -пирофосфат-синтазной реакции. Синтез АТФ есть основная функция хроматофоров. Существенно, что пирофосфат стабилизирует $\Delta\mu H$ на уровне, достаточном для синтеза АТФ, поскольку энергии гидролиза пирофосфата и АТФ близки.

Вероятно, внешняя мембрана клеток высших растений стабилизирует $\Delta\mu H$ тем же путем, что и тилакоиды. Протоны, откачиваемые из клетки H^+ -АТФ-синтазой, оказываются в узком межклеточном пространстве, где рН может быть на две единицы ниже, чем в цитоплазме.

У пресноводных цианобактерий ΔpNa «правильного» направления не может быть образована из-за низкой $[Na^+]_{нар}$. Здесь емкость $\Delta\mu H$ -буфера невелика, поскольку используется только одна его составляющая — ΔpK .

Для митохондрий проблема $\Delta\mu H$ -буфера состоит не так остро, как для бактерий и хлоропластов, поскольку уровень дыхательных субстратов колеблется, как правило, в меньшей степени, чем уровень света. Неудивительно поэтому, что $\Delta\mu H$ в митохондриях представлена главным образом в виде $\Delta\psi$. Среди возможных претендентов на роль $\Delta\mu H$ -буфера здесь можно назвать унипорт K^+ , а в тканях с сильно меняющейся активностью типа мышечной — объединение митохондрий в митохондриальный ретикулум.

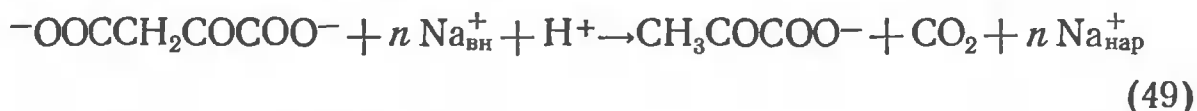
Натриевый мир

Прогресс биоэнергетических исследований последних лет стимулировал интерес к ионам Na^+ . Оказалась поколебленной догма о H^+ как единственном сопрягающем ионе. Выяснили, что роль Na^+ не ограничивается его функцией в системе $\Delta\mu\text{H}$ -буферов. У некоторых форм жизни ион Na^+ прямо вовлечен в превращения энергии, заменяя ион H^+ . Значительное таксономическое разнообразие видов, использующих Na^+ , а не H^+ в качестве первичного сопрягающего иона, указывает на всеобщее распространение вновь открытого типа мембранной энергетики. Возникает впечатление, что наряду с миром живых существ, чья энергетика базируется на циркуляции протонов, существует достаточно обширная область, которую можно было бы назвать «натриевым миром».

7.1. Генераторы $\Delta\mu\text{Na}$

7.1.1. Декарбоксилазы, транспортирующие Na^+

В 1980 г. П. Димрот сообщил об открытии *первичного $\Delta\mu\text{Na}$ -генератора*, откачивающего Na^+ из цитоплазмы бактериальной клетки без участия $\Delta\mu\text{H}$. Было показано, что *Klebsiella aerogenes*, растущая в анаэробных условиях, декарбоксилирует оксалоацетат в пируват и CO_2 только в присутствии Na^+ и *декарбоксилирование сопряжено с переносом Na^+ из клетки во внешнюю среду против концентрационного градиента*:



где n , вероятнее всего, равно двум.

Указанный процесс показан как в интактных клетках, так и в вывернутых субклеточных пузырьках. Реакция, катализируемая биотинным ферментом, локализованным в цитоплазматической

мембране, протекала в два этапа: 1) перенос карбоксила с оксалоацетата на биотиновую простетическую группу и 2) высвобождение CO_2 из карбоксилированного биотина с регенерацией исходной формы фермента. Для второго этапа требовался Na^+ . При транспорте Na^+ внутренний объем вывернутых субклеточных пузырьков заряжался положительно, что свидетельствовало об электрогенном характере этого транспорта. $\Delta\psi$ и $\Delta p\text{Na}$ были равны 65 и 50 мВ, т. е. общая $\Delta\mu\text{Na}$ составляла 115 мВ.

Оксалоацетаткарбоксилаза *K. aerogenes* состоит из α -, β - и γ -субъединиц с молекулярными массами соответственно 65, 34 и 12 кДа. α -Субъединица — периферический белок, в то время как β - и γ -субъединицы — интегральные мембранные белки, переходящие в раствор только в присутствии детергента. Биотин связан с α -субъединицей.

Дальнейшие исследования показали, что *K. aerogenes* — не единственный микроорганизм, располагающий Na^+ -транспортирующей декарбоксилазой. Na^+ -Транспортирующая оксалоацетатдекарбоксилаза обнаружена также у *Klebsiella pneumoniae* и *Salmonella typhimurium*.

У микроорганизмов *Acidaminococcus fermentans*, *Peptococcus aerogenes*, *Clostridium symbiosum* и *Fusobacterium nucleatum* глутаконил-КоА (интермедиат сбраживания глутамата до ацетата и бутирата) декарбоксилируется в кротонил-КоА сопряженно с транспортом Na^+ .

У строго анаэробной бактерии *Veilonella alcalensis*, превращающей лактат в ацетат и пропионат, и у *Propionigenium modestum*, утилизирующей сукцинат с образованием пропионата, декарбоксилирование метилмалонил-КоА в пропионил-КоА также поддерживает транспорт Na^+ . Перед декарбоксилированием сукцинат превращается в метилмалонил-СоА, декарбоксилирование которого собственно и сопряжено с транспортом Na^+ .

Субклеточные пузырьки *V. alcalensis* переносят два иона Na^+ на каждую молекулу декарбоксилированного субстрата. Декарбоксилаза была очищена и встроена в протеолипосомы. Декарбоксилирование создавало тридцатикратный градиент Na^+ между внутренним объемом протеолипосом и средой. Протонофоры ускоряли вход ионов Na^+ в протеолипосомы, по-видимому, снимая $\Delta\psi$, которая образовывалась при унипорте Na^+ .

7.1.2. Na^+ -Транспортирующая дыхательная цепь

В 1977 г. Т. Унемото и сотрудники описали активацию НАДН-оксидазы морской щелочеустойчивой *Vibrio alginolyticus* и умеренно галофильной *Vibrio costicola* ионами Na^+ . Другие катионы были неэффективны. В тех же условиях НАДН-оксидаза *E. coli* не требовала Na^+ для достижения максимальной активности. Дальнейшие исследования той же группы ученых выявили, что

Na⁺-зависимая стадия локализована между НАДН-дегидрогеназой и менахином или убихиноном, в то время как цитохромный сегмент цепи активен и без Na⁺.

В 1982 г. Х. Токуда и Т. Унемото продемонстрировали сопряженный с дыханием экспорт Na⁺ из клеток *V. alginolyticus*. Затем авторам удалось выделить Na⁺-транспортирующую НАДН-мена(уби)хионредуктазу и встроить ее в протеолипосомы. Окисление НАДН протеолипосомами сопровождалось накоплением в них ионов Na⁺. Исключение Na⁺ из состава среды инкубации в 15 раз тормозило скорость окисления НАДН.

Na⁺-транспортирующая НАДН-хионредуктаза имеет рН-оптимум между 8,5 и 9,0. Она специфически тормозится ионами Ag²⁺, а также очень низкими концентрациями N-окиси 2-гептил-4-оксихинолина (HQNO).

По данным Т. Унемото, Na⁺-транспортирующая НАДН-хионредуктаза состоит из двух мономеров, каждый из которых имеет три субъединицы: α (52 кДа), β (46 кДа) и γ (32 кДа). Соответствующие гены находятся, по-видимому, в большей из двух плазмид, обнаруженных у *V. alginolyticus*. α-Субъединица содержит ФМН, а β-субъединица — ФАД. В отсутствие КоQ НАДН восстанавливает ФАД, но не ФМН. Очищенная α-субъединица не обладает какой-либо ферментативной активностью, но при реконструкции с очищенными β- и γ-субъединицами дает комплекс, восстанавливающий КоQ до КоQH₂ посредством НАДН.

Предполагают, что β-субъединица катализирует перенос восстановительных эквивалентов с НАДН на ФАД и далее на КоQ с образованием КоQ⁻ (НАДН-дегидрогеназная часть комплекса), а α- и γ-субъединицы ответственны за дисмутацию двух КоQ⁻ с образованием КоQH₂ и КоQ. Именно эта последняя реакция зависит от Na⁺.

Транспорт Na⁺ НАДН-хионредуктазой носит электрогенный характер, что установлено в опытах как на целых клетках, так и на вывернутых субклеточных пузырьках *V. alginolyticus*.

Показано, что рост *V. alginolyticus* при щелочных рН гораздо более устойчив к действию протонофора ХКФ, чем рост *E. coli*. При рН 8,5 вибрионы поддерживали градиенты Na⁺, K⁺ и H⁺ несмотря на присутствие ХКФ.

Т. Унемото и сотрудники установили, что Na⁺ необходим для максимальной активности НАДН-оксидазы *Vibrio costicola*. В то же время Ф. Хамаиде и сотрудники, изучая энергетику этого вибриона, пришли к выводу, что она базируется при дыхании на откачке ионов H⁺, а не Na⁺. Возможно, что Na⁺- и H⁺-транспортирующие дыхательные цепи сосуществуют в мембране этих вибрионов, преобладая при росте соответственно в щелочной или нейтральной среде.

Свидетельство в пользу такой возможности было недавно получено в лаборатории Т. Унемото. Оказалось, что вывернутые субклеточные пузырьки *V. costicola* окисляют НАДН с образованием

$\Delta\mu_{\text{Na}}$. В тех же условиях окисление лактата давало $\Delta\mu_{\text{H}}$. Во втором (но не в первом) случае перенос Na^+ был сопряжен с дыханием лишь косвенно, при участии Na^+/H^+ -антипортера. По данным И. А. Смирновой и В. А. Костырко, окисление НАДН субклеточными пузырьками *V. alginolyticus* образует Na^+ -потенциал, а окисление сукцината — H^+ -потенциал.

Недавно получены данные о существовании « Na^+ -дыхания» у *Vibrio parahaemolyticus*.

Другой пример Na^+ -транспортирующего дыхания был описан не так давно Я. Ави-Дором и сотрудниками (1984). Работая с галотолерантной бактерией *Ba₁*, авторы показали, что добавка Na^+ при pH 8,5 стимулирует поглощение кислорода, генерацию $\Delta\psi$ и вход протонов в клетку. Разобщитель-протонофор вызывал дальнейшее увеличение входа H^+ , сопровождающегося снижением $\Delta\psi$. Эти наблюдения можно было объяснить, предположив, что дыхательная цепь откачивает Na^+ из цитоплазмы, тем самым генерируя $\Delta\psi$. Существенно, что данная система действовала только в щелочных условиях, будучи неактивной при pH 6,5.

Na^+ -Зависимое дыхание *Ba₁* очень чувствительно к HQNO. Есть ряд указаний, что место взаимодействия ионов Na^+ с НАДН-хинонредуктазой *Ba₁* и *V. alginolyticus* локализовано на стадии восстановления семихинона в гидрохинон. Высказано предложение, что в процессе своего транспорта ион Na^+ соединяется с анион-радикалом $Q^{\cdot-}$, и образующийся электронейтральный комплекс $\text{Na}^+\cdot Q^{\cdot-}$ переносится через гидрофобный слой мембраны.

В литературе можно найти целый ряд описаний стимулирующего действия Na^+ на дыхание морских щелоче- или солеустойчивых бактерий. Однако требуются дальнейшие опыты, чтобы выяснить, нужен ли Na^+ как аллостерический активатор или как транспортируемый ион. В этой связи представляется весьма заманчивым продолжить одну из первых работ, описывавших Na^+ -стимулируемое дыхание. Речь идет о публикации Т. Кодамы и С. Танигуси (1976), показавших, что у негалофильного *Pseudomonas stutzeri* ион Na^+ необходим для: 1) роста в любых условиях, 2) максимальной скорости дыхания, 3) импорта K^+ , глутамата, лейцина и фосфата и 4) подвижности. К сожалению, у авторов не было мысли о возможной роли Na^+ как сопрягающего иона, и транспорт Na^+ в этих экспериментах остался неисследованным.

7.1.3. Na^+ -Транспортирующие АТФазы

Бактериальные Na^+ -АТФазы. В 1982 г. Д. Хифнер и Ф. Харольд представили убедительные свидетельства существования Na^+ -транспортирующей АТФазы у *Streptococcus faecalis*. Было показано, что добавка Na^+ к вывернутым субклеточным пузырькам из *S. faecalis* стимулирует их АТФазную активность. Радиоактив-

ный Na^+ накапливался в пузырьках сопряженно с гидролизом АТФ.

Недавно Н. Киношита и сотрудники получили интересные результаты, указывающие на энергизацию мембраны *S. faecalis* посредством Na^+ -АТФазы в условиях, когда невозможна H^+ -энергетика. В серии опытов был найден мутант, дефицитный по H^+ -АТФазе. Его общая АТФазная активность составляла всего 30% от контроля. При этом вклад Na^+ -АТФазы резко возрос: активность этого фермента была в 40 раз больше у мутанта, чем у исходного штамма. Подобно Na^+ -дыхательной цепи *V. alginolyticus* и Ba_1 , Na^+ -АТФаза *S. faecalis* была наиболее активна в щелочной среде (рН 8,0—9,0).

Количество Na^+ -АТФазы могло быть повышено и у дикого штамма *S. faecalis*, если бактерии растили в присутствии ионов Na^+ и разобщителя-протонофора. В этих условиях Na^+ -АТФаза достигала 75% от уровня, наблюдаемого у мутанта. Исключение Na^+ из состава среды роста предотвращало индукцию Na^+ -АТФазы.

По-видимому, биологическая функция Na^+ -АТФазы *S. faecalis* состоит в энергизации мембраны этой гликолизирующей бактерии в условиях, когда невозможно использовать обычную цепь реакций, приводящих к накоплению метаболитов, и другие типы мембранной работы:



В отсутствие $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ реализуется альтернативный механизм:



где второй и третий этапы катализируются соответственно Na^+ -АТФазой и Na^+ -зависимыми транспортерами.

Na^+/K^+ -АТФаза и Na^+ -АТФаза животных. *Na^+/K^+ -АТФазе*, описанной в 1957 г. Й. Скоу, посвящено большое количество исследований. Фермент локализован во внешней мембране животной клетки. Он ответствен за генерацию $\Delta\psi$, $\Delta p\text{Na}$ и $\Delta p\text{K}$ на этой мембране. Такой эффект достигается путем обмена $2\text{K}^+_{\text{нар}}$ на $3\text{Na}^+_{\text{вл}}$, сопряженного с гидролизом одной молекулы АТФ. Na^+/K^+ -АТФаза имеет массу порядка 550 кДа и состоит из четырех субъединиц двух типов (2α и 2β). Массы субъединиц равны соответственно 95 и 45 кДа. По данным Ю. А. Овчинникова и сотрудников, полученным посредством электронного микроскопирования двухмерных кристаллов фермента (разрешение 2 нм), вертикальный размер $\alpha\beta$ -протомера составляет около 10 нм, что больше толщины липидного бислоя. α -Субъединица выдается из мембраны по обе ее стороны, тогда как β -субъединица экспонирована на внешней стороне мембраны. N-Концевой участок β -субъединицы гликозилизирован. Масса углеводной части равна 7 кДа. По данным, полученным в опытах с химической модификацией и антите-

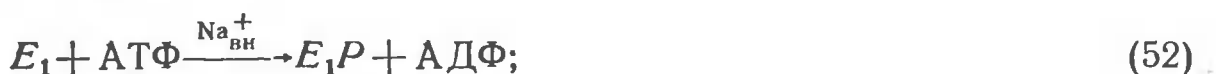
лами, почти две трети α -субъединицы находится вне мембраны, причем цитоплазматический домен втрое больше того, который выступает снаружи клетки. α -Субъединица сужается в своей центральной части, погруженной в мембрану.

Na^+/K^+ -АТФаза может быть встроена в протеолипосомы, способные к АТФ-зависимому антипорту Na^+ и K^+ . Как показал метод травления замороженных образцов, протеолипосомы содержат частицы размером 9—12 нм, что примерно соответствует размеру $\alpha_2\beta_2$ -комплекса.

Аминокислотная последовательность Na^+/K^+ -АТФазы недавно установлена. Анализ профилей гидрофобности свидетельствует о наличии семи α -спиральных колонн в α -субъединице и четырех колонн в β -субъединице.

N-Концевой домен α -субъединицы обращен в цитоплазму. Карбоксильная группа одной из дикарбоновых аминокислот, локализованных в этом домене, фосфорилируется посредством АТФ при образовании фосфофермента в процессе АТФазной реакции.

Механизм Na^+/K^+ -АТФазы описывается в рамках общей схемы E_1E_2 -АТФаз:



Согласно схеме ионы Na^+ (по всей вероятности $\text{Na}^+_{\text{вн}}$) необходимы для фосфорилирования фермента. Фосфофермент претерпевает конформационное изменение ($E_1 \rightarrow E_2$) и распадается на E_2 и фосфат в присутствии ионов калия ($\text{K}^+_{\text{нар}}$). Затем E_2 релаксирует в E_1 . Состояние E_2P фиксируется оуабаином. Наблюдается положительная кооперативность в связывании 3Na^+ и 2K^+ .

Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Tl^+ , Li^+ , Na^+ , могут, хотя и в разной степени, заменять ион K^+ . Что касается иона Na^+ , то его роль более специфична. Среди перечисленных катионов только Li^+ может быть использован вместо Na^+ , причем скорость гидролиза АТФ снижена, а сродство фермента к Li^+ гораздо меньше, чем к Na^+ . Интересно, что Na^+ можно заменить ионом водорода, причем H^+ имеет по крайней мере на два порядка *большее сродство* к Na^+/K^+ -АТФазе, чем Na^+ . Тот факт, что фермент в физиологических условиях переносит Na^+ , а не K^+ , обусловлен гораздо большей концентрацией Na^+ , чем H^+ в цитоплазме. Однако в более кислых средах (рН 5,7) удается наблюдать H^+/K^+ -антипорт и АТФазную активность без Na^+ .

Другая Na^+ -транспортирующая АТФаза была описана Ф. Провербио, Дж. Дель Кастилло и их коллегами в эпителии тонкого

кишечника и проксимальных почечных канальцах. Она отличается от Na^+/K^+ -АТФазы прежде всего тем, что K^+ не нужен для активности, а оубаин не влияет на фермент.

7.2. Утилизация $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, образуемой первичными $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторами

7.2.1. Осмотическая работа

(Na^+ , метаболит)-симпортеры. У алкалотолерантной *V. alginolyticus*, располагающей Na^+ -НАДН-хинонредуктазой, обнаружены (Na^+ , метаболит)-симпортеры, ответственные за аккумуляцию 19 аминокислот и сахарозы.

Показано также, что накопление K^+ в клетках *V. alginolyticus* при щелочных рН поддерживается энергией $\Delta\psi$, генерируемой Na^+ -НАДН-хинонредуктазой.

Na^+ -Зависимое накопление метаболитов в алкалофильных бактериях было описано в ряде сообщений. Однако остается неясным, как эти алкалофилы образуют $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$.

Нейтрофильные бактерии, живущие при низких или умеренных концентрациях NaCl , обычно используют H^+ , а не Na^+ в качестве симпортируемого иона (см. разд. 5.2.7). Однако известны и исключения из этого правила. Так, пролин транспортируется вместе с Na^+ в клетки *Mycobacterium phlei*, *Salmonella typhimurium* и *E. coli*.

Интересный «дуалистический» механизм импорта метаболита описан у *E. coli*. Оказалось, что эта бактерия использует альтернативно H^+ или Na^+ в качестве сопрягающего катиона при аккумуляции мелибиозы. Поглощение цитрата бактериями *Klebsiella pneumoniae* осуществляется переносчиком, обеспечивающим импорт цитрата³⁻, 2Na^+ и 2H^+ . Это означает, что движущей силой процесса должны быть $\Delta\psi$, pNa и ΔpH .

А. Броди и сотрудникам удалось выделить (Na^+ , пролин)-симпортер из *M. phlei*, который оказался белком массой в 20 кДа. Очищенный симпортер был реконструирован с фосфолипидами. Полученные протеолипосомы транспортировали пролин за счет $\Delta\psi$, образованной диффузией ионов K^+ . Аккумуляция пролина тормозилась протонофорами, снижавшими $\Delta\psi$, а также сульфгидрильными реагентами.

Описана также частичная очистка и реконструкция (Na^+ , аспартат)-симпортера из галофильной *Halobacterium halobium*. Вообще морские и галофильные микроорганизмы, подобно алкалофильным, обычно используют Na^+ , а не H^+ как симпортируемый ион. Это верно также и для внешней мембраны клеток высших животных, омываемой раствором с высокой концентрацией NaCl . Данное обстоятельство — еще одно свидетельство справедливости мнения о том, что кровь — «частичка океана в теле человека». Ге-

нераторами $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ на плазмалемме животных клеток служит Na^+/K^+ -АТФаза (в некоторых случаях также и Na^+ -АТФаза). Образованная $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ утилизируется различными переносчиками, транспортирующими в клетку аминокислоты, сахара, жирные кислоты и другие соединения. Ряд (Na^+ , метаболит)-симпортеров выделен и встроен в протеолипосомы.

Некоторые животные клетки содержат H^+ -АТФазу во внешней мембране (см. разд. 4.5.2). В этих клетках также найдены (H^+ , метаболит)-симпортеры.

Ионы Na^+ и регуляция внутриклеточного рН. Бактерии весьма успешно решают проблему гомеостаза внутриклеточного рН. Как было показано в группе Р. М. Макнаба, у *E. Coli* этот гомеостаз наблюдается при $\text{pH}_{\text{нар}}$ 5,5—9,0. В указанном интервале $\text{pH}_{\text{нар}}$ величина $\text{pH}_{\text{вн}}$ описывается уравнением

$$\text{pH}_{\text{вн}} = 7,5 - 0,1 (\text{pH}_{\text{нар}} - 7,6), \quad (56)$$

так что значения $\text{pH}_{\text{вн}}$ при $\text{pH}_{\text{нар}}$ 5,5 и 9,0 равны соответственно 7,4 и 7,8.

При понижении $\text{pH}_{\text{нар}}$ закисление цитоплазмы может быть предотвращено посредством *импорта* K^+ , разменивающего образующую $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератором $\Delta\psi$ на ΔpH нужного направления (цитоплазма щелочнее внешней среды) (рис. 54, А).

При нейтральном $\text{pH}_{\text{нар}}$ единственная задача — вернуть в цитоплазму ионы H^+ , теряемые клеткой из-за работы $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторов. Проблема может быть решена посредством электронейтрального Na^+/H^+ -антипорта (рис. 54, Б).

Электронейтральный Na^+/H^+ -антипорт эффективен в поддержании рН-гомеостаза только при условии, что $\text{pH}_{\text{нар}} \leq \leq \text{pH}_{\text{вн}}$. Механизмы закисления цитоплазмы оказываются иными, если $\text{pH}_{\text{нар}}$ выше, чем $\text{pH}_{\text{вн}}$. Бактерия сталкивается с этой проблемой, когда среда роста становится щелочной. Теперь электронейтральный Na^+/H^+ -антипортер уже не может обеспечивать вход H^+ в клетку, так как градиенты рН и рNa неблагоприятны для такого процесса. Один из способов предотвратить защелачивание цитоплазмы при высоком $\text{pH}_{\text{нар}}$ — это сделать Na^+/H^+ -антипортер электрогенным (например, обмен одного иона Na^+ на два иона H^+). Если при этом $\Delta\psi$, образуемая $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератором, достаточно высока, чтобы перекрыть неблагоприятное действие ΔpH и ΔpNa , то взаимодействие $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератора и $\text{Na}^+/2\text{H}^+$ -антипортера будет поддерживать $\text{pH}_{\text{вн}} < \text{pH}_{\text{нар}}$ (рис. 54, В).

Альтернативная возможность показана на рис. 54, Д. Здесь первичный $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -генератор заряжает мембрану, а H^+ -унипортер облегчает электрофорез ионов H^+ под действием образованной $\Delta\psi$.

Ионы Na^+ участвуют также в рН-гомеостазе животных и растительных клеток. Для животных твердо установлено, что именно

Na^+/H^+ -антипортёр ответствен прежде всего за постоянство внутриклеточного рН. У растений Na^+/H^+ -антипорт происходит как во внешней мембране клетки, так и в тонопласте.

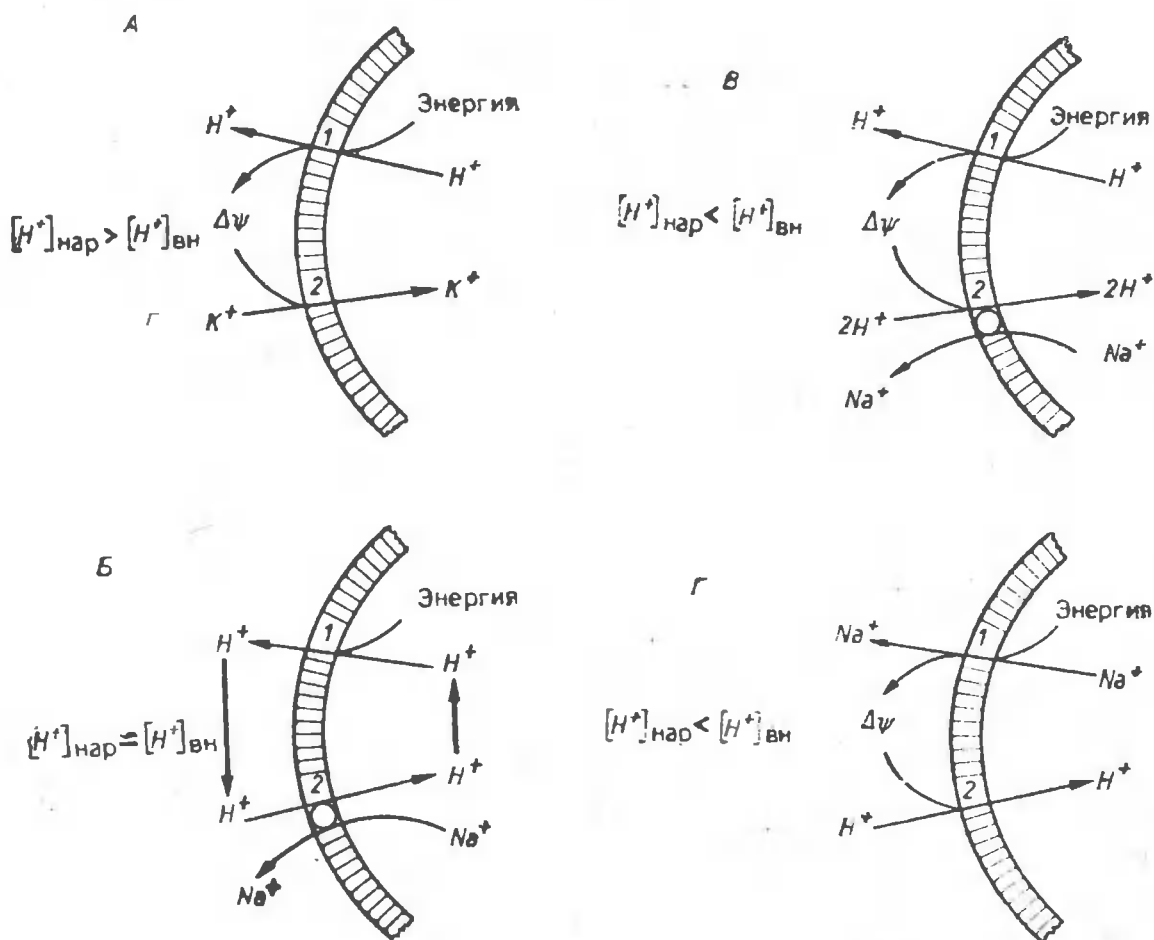


Рис. 54. Возможные механизмы стабилизации рН в цитоплазме бактерий:

А: $\text{pH}_{\text{нар}} < \text{pH}_{\text{вн}}$; $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератор выбрасывает ионы H^+ из клетки и образует $\Delta\psi$ (реакция 1). Эта $\Delta\psi$ разряжается потоком K^+ в клетку (реакция 2), так что образуется ΔpH нужного знака (цитоплазма защелачивается);

Б: $\text{pH}_{\text{нар}} \approx \text{pH}_{\text{вн}}$; потеря клеткой ионов H^+ из-за работы $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторов (реакция 1) компенсируется входом H^+ нар в обмен на Na^+ вн (реакция 2);

В, Г: $\text{pH}_{\text{нар}} > \text{pH}_{\text{вн}}$; **В** — H^+ -помпа откачивает H^+ из цитоплазмы, генерируя $\Delta\psi$ (реакция 1). Эта $\Delta\psi$ используется $\text{Na}^+/2\text{H}^+$ -антипортером, обменивающим один Na^+ вн на два H^+ вар (реакция 2); **Г** — первичная Na^+ -помпа заряжает мембрану, откачивая Na^+ во внешнюю среду (реакция 1). Унипорт H^+ в клетку разряжает $\Delta\psi$ и подкисляет цитоплазму (реакция 2)

7.2.2. Механическая работа

Существует по крайней мере один пример, когда механическая работа совершается за счет $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, образуемой первичным Na^+ -насосом. Как было показано П. А. Дибровым, движение *V. alginolyticus*: 1) наблюдается только в присутствии Na^+ ; 2) может поддерживаться искусственно созданной ΔpNa (но не ΔpH), причем

моненсин снимает этот эффект; 3) происходит, хотя и со сниженной скоростью, в присутствии высокой концентрации протонофора. В 100 раз меньшая концентрация протонофора полностью подавляет движение, если добавить моненсин. В отсутствие ХКФ моненсин лишь слегка снижает скорость движения, поддерживаемого дыханием. Было сделано заключение, что *флагеллярный мотор V. alginolyticus* использует энергию $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, а не $\Delta\bar{\mu}\text{H}$.

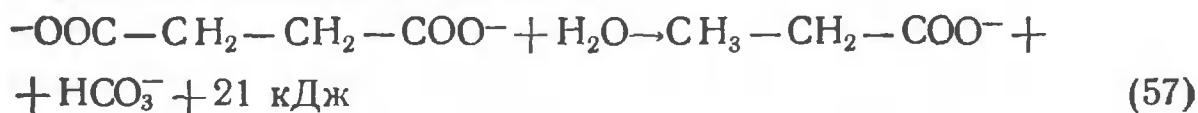
Na^+ -Зависимое движение показано также у алкалофильных бактерий: *Bacillus* sp. YN-1 и *Bac. firmus*. На *Bac. sp. YN-1*, изученной более детально, показано, что Na^+ необходим для движения, которое лишь частично тормозится протонофором. Продемонстрировано также, что $\Delta p\text{Na}$ и $\Delta\psi$, генерируемые энзиматически, эквивалентны друг другу в качестве источников энергии для движения. Ф. Дж. Феррис и сотрудники описали структуру базального тела флагеллы *V. cholerae*; выявлено полное сходство с таковой *V. alginolyticus*.

Известно, что *V. cholerae* образует токсин, вызывающий выброс соли из тканей в кишечник. Возможно, эта соль необходима *V. cholerae* для Na^+ -энергетики этого вибриона.

7.2.3. Химическая работа

Еще в 1966 г. И. Глин и П. Гаррахан доказали принципиальную возможность того, что $\Delta p\text{Na}$ (вместе с $\Delta p\text{K}$) способна повернуть вспять реакцию гидролиза АТФ, катализируемую ион-транспортной АТФазой. Авторы описали синтез АТФ эритроцитами в условиях, когда $[\text{Na}^+]_{\text{вн}} > [\text{Na}^+]_{\text{нар}}$ и $[\text{K}^+]_{\text{вн}} < [\text{K}^+]_{\text{нар}}$. Однако такая реакция вряд ли происходит *in vivo* из-за противоположной направленности ионных градиентов.

$\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -зависимый синтез АТФ у анаэробных бактерий. Некоторые указания на превращение энергии $\Delta\bar{\mu}\text{Na} \rightarrow \text{АТФ}$ в естественных условиях были получены П. Димротом и его коллегами, изучавшими *Propionigenum modestum*, строго анаэробную бактерию, описанную в 1982 г. Б. Шинком и Н. Пфенигом. Единственным источником полезной энергии для *P. modestum* служит декарбоксилирование сукцината в пропионат:



Энергетический выход этой реакции примерно вдвое ниже, чем цена энергии синтеза АТФ из АДФ и фосфата при физиологических условиях. (Это послужило поводом для Б. Шинка и Н. Пфенига дать видовое название вновь открытому микробу *modestum*, т. е. умеренный в смысле энергетических потребностей.) Ясно, что механизмы субстратного фосфорилирования не могут быть использованы *P. modestum*, так как все они предполагают образование одной молекулы АТФ на одну молекулу утилизированного субстрата. Решением проблемы могла бы быть генерация $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ или $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ при де-

карбоксилировании сукцината, если предположить, что на каждый декарбоксилированный сукцинат из клетки откачивается $n\text{H}^+$ или $n\text{Na}^+$, а синтез одной молекулы АТФ сопряжен с переносом $2n\text{H}^+$ ($2n\text{Na}^+$) назад в клетку.

По данным П. Димрота и сотрудников, декарбоксилирование метилмалонил-КоА (интермедиата превращения сукцината в пропионат) сопряжено с откачкой ионов Na^+ из цитоплазмы *P. modestum* (см. разд. 7.1.1). Полагают, что образованная $\Delta\mu\text{Na}$ используется для синтеза АТФ путем обращения Na^+ -АТФазы, которая была обнаружена в больших количествах в мембране *P. modestum* (рис. 55). Эта АТФаза похожа по субъединичному составу на фактор F_1 , чувствительна к ДЦКД будучи связана с мембраной и утрачивает эту чувствительность, как и способность активироваться ионами Na^+ , после отделения от мембраны. В отсутствие Na^+ фермент транспортирует H^+ .

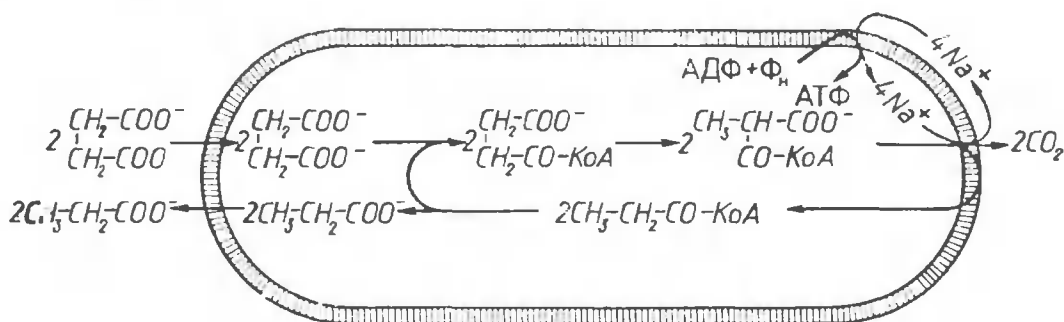


Рис. 55. Предполагаемый механизм энергообеспечения анаэробной бактерии *Propionigenium modestum* (по P. Dimroth, W. Hilpert, 1984):

сукцинат входит в клетку, где превращается в сукцинил-КоА посредством переацилирования с пропионил-КоА. Из сукцинил-КоА образуется метилмалонил-КоА. Последний декарбоксилируется до пропионил-КоА и CO_2 , что сопряжено с выбросом из клетки ионов Na^+ . Эти ионы Na^+ возвращаются в цитоплазму через Na^+ -АТФ-синтазу, образующую АТФ из АДФ и фосфата. Стехиометрия Na^+ : субстрат для декарбоксилазы меньше, чем для H^+ -АТФ-синтазы

Найдено, что декарбоксилирование метилмалонил-КоА субклеточными пузырьками *P. modestum* может поддерживать синтез АТФ. Моненсин тормозил процесс. К сожалению, степень сопряжения декарбоксилирования и фосфорилирования в пузырьках оказалась очень низкой: скорость синтеза АТФ была в 10^4 раз медленнее скорости декарбоксилирования. Кроме того, АТФазная активность была в 10^3 раз большей, чем АТФ-синтазная. Поэтому наблюдение П. Димрота и соавторов можно рассматривать лишь как качественное указание в пользу $\Delta\mu\text{Na}$ -зависимого фосфорилирования, а не как окончательное доказательство этого процесса. $\Delta\mu\text{H}$ -Независимый синтез АТФ, поддерживаемый искусственно созданной $\Delta\mu\text{Na}$, был продемонстрирован в опытах с другим типом анаэробных микробов — с метанообразующими бактериями. В 1983 г. П. Шенхайт и Г. Перски сообщили, что вызванный валиномицином выход K^+ из клеток *Methanobacterium thermoautotrophicum* приводит к возраста-

нию уровня внутриклеточного АТФ. Эффект значительно стимулировался ионами Na^+ . По мнению авторов, одно из возможных объяснений наблюдавшегося явления состоит в том, что $\Delta\psi$, генерируемая на выходе ионов K^+ , используется для обращения гипотетической Na^+ -АТФазы. Однако П. Шенхайту и Г. Перски не удалось обнаружить стимулирующего действия ионов Na^+ на АТФазную активность мембранной фракции исследованной бактерии.

В 1985—1986 гг. наблюдение П. Шенхайта и Г. Перски было подтверждено Дж. Ланкастером и сотрудниками, работавшими с другой метаногенной бактерией — *Methanococcus voltae*. Было показано, что синтез АТФ может быть вызван диффузионным потенциалом ионов K^+ с валиномицином или ионов H^+ в присутствии разобщителя-протонофора. В последнем случае к бактериям, инкубированным с разобщителем при кислом рН, добавляли КОН. Выход H^+ из клетки, катализируемый разобщителем, должен был создавать $\Delta\psi$ (внутри клетки знак «—»). Постулировано, что наблюдавшийся в ответ на защелачивание синтез АТФ происходил за счет этой $\Delta\psi$. В соответствии с данной интерпретацией показано, что Na^+ был необходим для синтеза АТФ в присутствии разобщителя, а K^+ и валиномицин, разряжающие диффузионный потенциал ионов H^+ , прекращают этот синтез. Дальнейшие опыты выявили, что добавление NaCl к бактериям в безнатриевой среде также вызывает синтез, причем этот эффект снимается моненсином и диэтилстильбэстролом.

Приведенные данные о синтезе АТФ, требующем присутствия разобщителя-протонофора, служат прямым доказательством того, что определенные виды бактерий имеют в своем распоряжении мембранный механизм синтеза АТФ, альтернативный протонному фосфорилированию. К сожалению, остается неясным, использует ли *M. voltae* этот механизм для образования АТФ и в физиологических условиях, а не только в модельных. Сами авторы данной работы склонны рассматривать свое наблюдение лишь как свидетельство того, что *M. voltae* имеет Na^+ -АТФазу, функция которой сводится к откачке Na^+ из цитоплазмы этой морской солеустойчивой бактерии. Однако остается открытым вопрос, не участвуют ли ионы натрия в единственном процессе запасаения энергии у метаногенных бактерий, а именно в фосфорилировании, сопряженном с образованием метана.

«Натриевое» дыхательное фосфорилирование у *Vibrio alginolyticus*. Недавно автору и сотрудникам удалось продемонстрировать «натриевое» дыхательное фосфорилирование в клетках *V. alginolyticus*. Оказалось, что добавление лактата к клеткам *V. alginolyticus*, отмытым от эндогенных субстратов, приводит к резкой стимуляции поглощения кислорода и многократному возрастанию уровня АТФ, которое достигает такового в неотмытых клетках. Этот синтез АТФ стимулируется ионами Na^+ и подавляется HQNO , ингибитором Na^+ -транспортирующей дыхательной цепи. Обратная $\Delta\mu\text{Na}$ ($[\text{Na}^+]_{\text{вн}} > [\text{Na}^+]_{\text{нар}}$) полностью подавляет дыхательный синтез АТФ без снижения скорости дыхания или величины $\Delta\psi$.

В дальнейших опытах удалось продемонстрировать синтез АТФ, поддерживаемый энергией искусственно созданной $\Delta\mu_{\text{Na}}$ «правильного направления» ($[\text{Na}^+]_{\text{вн}} < [\text{Na}^+]_{\text{нар}}$). С этой целью 0,25 М NaCl добавляли к клеткам *V. alginolyticus*, инкубированным в безнатриевой среде. Было обнаружено, что NaCl вызывает быстрое повышение [АТФ]. Через 1—2 мин после добавления NaCl уровень АТФ вновь снижался до уровня, близкого к наблюдаемому до этого добавле-

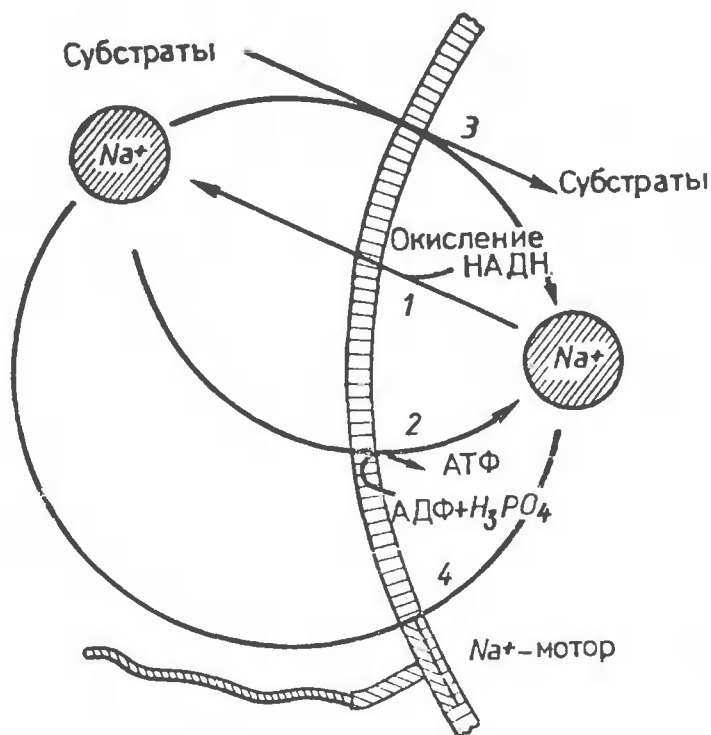


Рис. 56. Натриевый цикл в клетке *Vibrio alginolyticus*:

$\Delta\mu_{\text{Na}}$ генерируется Na^+ -транспортирующей НАДН-хинонредуктазой (1) и используется для химической работы (синтеза АТФ Na^+ -АТФ-синтазой (2)), осмотической работы (симпорта Na^+ и метаболитов (3)) и механической работы (вращения флагеллы Na^+ -мотором (4))

ния. Последующее добавление лактата вызывало устойчивое повышение концентрации АТФ. Анализ эффектов NaCl и лактата выявил следующее.

1. Действие NaCl (но не лактата) снимается моненсином.
2. Эффект лактата (но не NaCl) блокируется посредством HQNNO .
3. Протонофор ХКФ не снимает эффектов NaCl и лактата.
4. Моненсин и ХКФ, добавленные совместно, почти полностью ингибируют действие как NaCl, так и лактата.
5. Снижение концентрации добавленного NaCl с 0,25 М до 0,5 М резко снижает получаемый уровень АТФ, не влияя на фосфорилирование, поддерживаемое окислением лактата.

6. Ни K^+ , ни Li^+ не заменяют Na^+ .

7. Синтез АТФ на добавление $NaCl$ или лактата тормозится ДЦКД. (ДЦКД служит ингибитором Na^+ -АТФазы *P. modestum*, H^+ -АТФазы (синтазы) и Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула. Так же действует диэтилстильбэстрол, подавляющий активность H^+ -АТФаз синтаз и некоторых ион-транспортных АТФаз животных и бактерий, в частности Na^+ -АТФазы *M. voltae*.)

Перечисленные выше наблюдения доказывают, что фосфорилирование, вызванное $NaCl$ и лактатом, катализируется Na^+ -АТФ-синтазой, чувствительной к ДЦКД и диэтилстильбэстролу. В данном контексте уместно отметить два факта, упомянутые выше: Na^+/K^+ -АТФаза животных, очень специфичная к Na^+ , тем не менее хорошо связывает и переносит через мембрану ионы H^+ , а Na^+ -АТФаза *P. modestum* напоминает по структуре H^+ -АТФ-синтазу и в отсутствие Na^+ переносит H^+ .

Эти факты в сочетании с данными ингибиторного анализа могут свидетельствовать об определенной общности механизмов протонных и натриевых АТФаз (АТФ-синтаз).

Итак, в клетках *V. alginolyticus* натриевый потенциал, образованный дыханием, может использоваться для синтеза АТФ. Этот факт завершает систему экспериментального доказательства концепции Na^+ -цикла, предполагающего, что Na^+ может использоваться вместо H^+ в качестве иона, сопрягающего экзергонические процессы с совершением всех трех основных типов работы: химической, осмотической и механической (рис. 56). *V. alginolyticus* оказался первым представителем живых существ, располагающих полным Na^+ -циклом.

7.3. Как часто используется Na^+ -цикл живыми клетками?

Рис. 57 иллюстрирует тот факт, что $\Delta\bar{\mu}H$ обычного направления может эффективно использоваться только при кислых или нейтральных значениях pH внешней среды.

В этих условиях откачка протонов из цитоплазмы поддерживает $\Delta\psi$ и ΔpH «правильного» знака, т. е. благоприятного для входа H^+ обратно в клетку.

При щелочных pH тот же процесс генерирует «правильную» $\Delta\psi$ на фоне обратной ΔpH . Концентрация ионов H^+ в клетке алкалофилов должна поддерживаться на более высоком уровне, чем снаружи, чтобы избежать щелочной инактивации внутриклеточных ферментов.

В результате ион H^+ , откаченный из цитоплазмы, не может произвести полезной работы, так как, возвращаясь назад в клетку, он движется по $\Delta\psi$, но против ΔpH . Замена сопрягающего иона (K^+ на Na^+) может решить проблему, как это оказалось в случае *V. alginolyticus*. Другие алкалотолерантные и алкалофильные бактерии так-

же, по-видимому, могут энергизовать цитоплазматическую мембрану без участия протонного потенциала.

Мутант *Streptococcus faecalis*, лишенный H^+ -АТФазы, а также дикий штамм того же микроба, выращенный в присутствии протонофора, могут служить примерами, когда развитие натриевой энер-

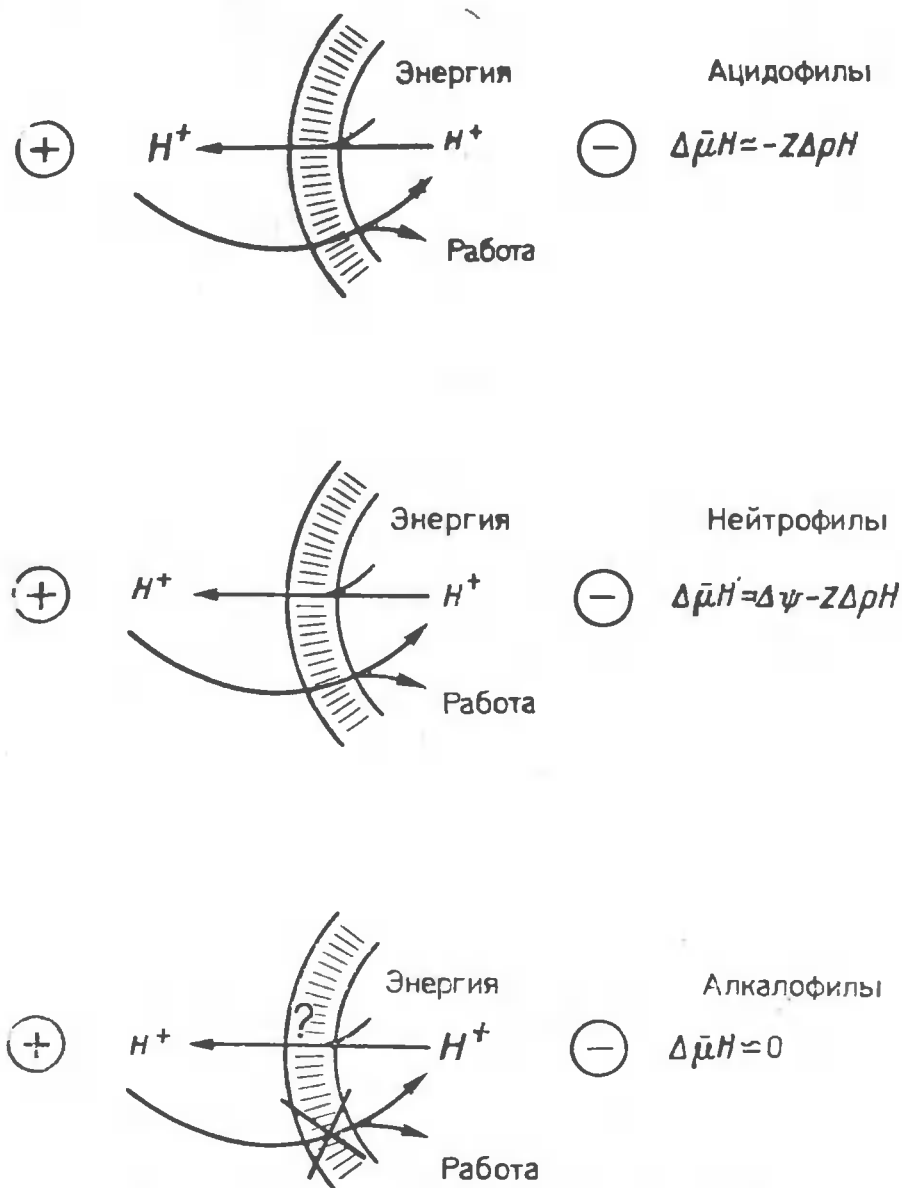


Рис. 57. Роль $\Delta\bar{\mu}H$ при различных рН среды обитания бактерий:

$\Delta\bar{\mu}H$ может эффективно использоваться ацидо- и нейтрофилами, но не алкалофилами, где электрический градиент и градиент H^+ направлены в противоположные стороны

гетики не связано с жизнью в щелочной среде (см. разд. 7.1.3). Это же имеет место у некоторых анаэробов, а также у *Salmonella typhimurium*, использующих Na^+ -транспортирующие декарбоксилазы. Например, *P. modestum* растет при рН 6,5—8,4 с оптимумом между 7,1 и 7,7.

Интересно, что отдельные компоненты Na^+ -цикла можно найти у такого нейтрофила, как *E. coli*, которая накапливает определенные метаболиты в симпорте с Na^+ . Этот способ совершения осмотической работы является основным для многих морских и галофильных бактерий, а также для внешней мембраны животных клеток (см. разд. 7.2.1). Здесь также очевидно, что использование натриевой энергетики обусловлено причинами иными, чем приспособление к щелочным условиям среды.

7.4. Возможные эволюционные отношения между протонным и натриевым миром

Можно предположить, что эволюционно первичным сопрягающим ионом был H^+ . Нетрудно представить, как примитивная живая клетка могла бы «изобрести» $\Delta\mu\text{H}$ -генератор, устроенный по типу редокс-петли Митчела. Механизм редокс-петли предполагает, что некий акцептор *атомов водорода*, например хинон Q , восстанавливается донором *электронов*, например цитохромом Fe^{2+} . Если такой процесс протекает вблизи одной из поверхностей мембраны (допустим, левой), ионы водорода должны поглощаться из воды, омывающей эту поверхность:



Образованный QH_2 диффундирует в сторону своей меньшей концентрации к противоположной стороне мембраны и там окисляется акцептором *электронов*, например другим цитохромом Fe^{3+} . В результате *ионы водорода* высвобождаются в воду справа от мембраны:



Эти две реакции и диффузия QH_2 образуют «полупетлю», переносящую атомы водорода. Другая «полупетля» представляет собой перенос электронов через мембрану, направленный справа налево.

Тот факт, что редокс-петля образует разность электрохимических потенциалов ионов *водорода*, есть прямое и неизбежное следствие химизма окислительной реакции, поставляющей энергию. Схема редокс-петли была прямо доказана для фотосинтетических редокс-центров пурпурных бактерий (см. разд. 3.1.2). Есть ряд свидетельств, что она верна также для фотосистем I и II хлоропластов и цианобактерий (см. разд. 3.3.1). Редокс-циклы, включенные, видимо, в механизмы генерации $\Delta\mu\text{H}$ дыхательной цепью, можно рассматривать как усложненный вариант редокс-петли.

В то же время существуют $\Delta\mu\text{H}$ -генераторы, использующие энергию без участия системы H/e -антипорта. Таковы, в частности, трансгидрогеназа (см. разд. 5.1.3) и бактериородопсин (см. разд. 3.5.1). В этих случаях поставляющий энергию процесс сопряжен с генерацией $\Delta\mu\text{H}$ не прямо, как в редокс-петле, а каким-то иным, более

изошренным способом. Системы такого типа уже не предполагают с неизбежностью участие H^+ в качестве сопрягающего иона. Поэтому неудивительно, что непрямые механизмы сопряжения используются для транспорта других ионов. Так, бактериородопсин переносит H^+ , а близкий к нему по пространственной и первичной структуре галлородопсин транспортирует Cl^- (см. разд. 3.5.7).

Генераторы натриевого потенциала с очевидностью попадают в разряд непрямых преобразователей энергии и потому могут рассматриваться как эволюционно более поздние изобретения природы.

В тех случаях, когда поглощение и выделение ионов H^+ уже не есть следствие химизма процесса, замена H^+ на Na^+ имеет известные преимущества.

1. Как уже обсуждалось, это сообщает клетке устойчивость к средам с низкой $[H^+]$.

2. Проводимость липидной мембраны для H^+ по крайней мере в 10^6 раз выше, чем для Na^+ . Эта величина окажется еще большей, если липидный бислой содержит включения белков, располагающих протон-акцепторными группами, которые могут облегчить эстафетный механизм H^+ -проводимости. В то же время $[H^+]$ в среде обычно в $\sim 10^6$ раз ниже, чем $[Na^+]$. Соотношение этих двух параметров может приводить к тому, что клетка легче удерживает градиент Na^+ , чем H^+ . По-видимому, названное соотношение становится неблагоприятным для Na^+ -энергетики только у экстремальных галофилов, живущих в насыщенном растворе $NaCl$. Возможно, именно по этой причине они используют H^+ , а не Na^+ в качестве первичного сопрягающего иона, несмотря на высокую $[Na^+]_{нар}$.

3. Последний и, может быть, самый важный момент состоит в том, что *внутриклеточные ферменты гораздо чувствительней к изменению концентрации H^+ , чем Na^+ , особенно если снижение $[Na^+]_{вн}$ компенсируется повышением $[K^+]_{вн}$* . Поэтому клетка, откачивающая из цитоплазмы Na^+ , выглядит биологически более совершенной, чем та, которая откачивает H^+ . В такой клетке $pH_{вн}$ становится не зависим от скорости мембранных процессов преобразования энергии и в свою очередь эти процессы перестают контролироваться цитоплазматическим pH .

Следуя подобной логике, можно понять, почему такая эволюционно молодая мембрана наиболее прогрессивного царства живых существ, как плазмалемма животной клетки, использует Na^+ в качестве сопрягающего иона.

Как уже отмечалось, слишком высокая $[Na]_{нар}$ может оказаться неблагоприятной для натриевой энергетики. Однако $[Na^+]_{нар}$ не должна быть и слишком низкой, иначе не удастся создать Na^+ -градиент нужного направления, т. е. $[Na^+]_{вн} < [Na^+]_{нар}$. Это требование выполняется как для клеток животных и для микроорганизмов, за исключением пресноводных (*V. alginolyticus* и *P. modestum*, служащие наиболее яркими примерами натриевой энергетики, найдены в море).

Чтобы выявить таксономические связи между живыми существами, использующими H^+ или Na^+ в качестве сопрягающих ионов, К. М. Чумаков в лаборатории автора построил дендрограмму, основанную на анализе нуклеотидных последовательностей рибосомальных 5SРНК. Эти РНК очень консервативны и распространены среди всех современных форм жизни. Они невелики по длине, что облегчает определение их первичной структуры.

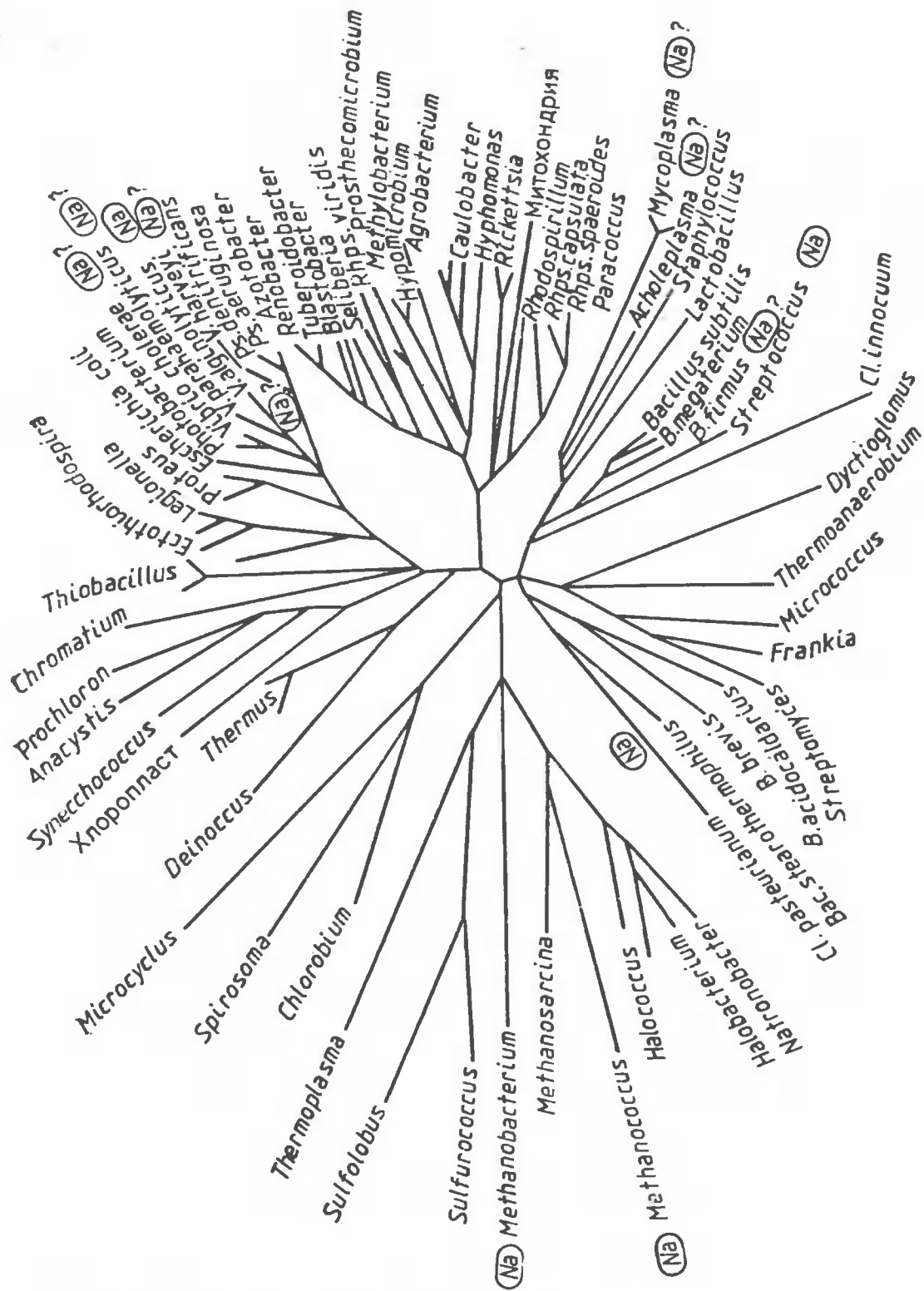
Дендрограмма представлена на рис. 58, длина отрезков на ней пропорциональна числу мутаций. Мутациям в разных положениях нуклеотидной последовательности придан различный «вес», который тем больше, чем реже встречается данная мутация. Это сделано для того, чтобы учесть объем «эволюционной работы» для каждой мутации. Дендрограмма не дает представления о направлении эволюционного процесса; она только отвечает на вопрос, насколько близки между собой рассматриваемые микробы по анализируемому параметру. Поэтому нельзя указать, где находится корень родословного дерева бактериального царства. Такой способ свободен от бездоказательного допущения о том, что скорость эволюционного процесса всегда была постоянной.

Распределение на дендрограмме родов, использующих $\Delta\mu Na$ (обозначены значком \textcircled{Na}) указывает, что Na^+ -цикл был «открыт» бактериями достаточно давно. Б. Розен даже предположил, что натриевая энергетика появилась до протонной, которая пришла на смену Na^+ -циклу, когда бактерии поднялись из моря в реки, т. е. перешли из соленой воды в пресную, характеризующуюся низкой $[Na^+]$. Эту гипотезу трудно исключить, как и многие другие построения эволюционистов. Однако соображения, изложенные в начале настоящего раздела, делают, как нам кажется, более вероятной альтернативную точку зрения: *первичным сопрягающим ионом был H^+* . Если принять, что сначала возникла протонная энергетика, можно представить *возможный путь становления натриевого цикла*. Первым этапом могло быть использование градиентов Na^+ и K^+ как $\Delta\mu H$ -буферов (см. разд. 6.3.1).

Следующей стадией эволюции стало, по-видимому, прямое использование $\Delta\mu Na$, образованной совместным действием $\Delta\mu H$ -генератора и Na^+/H^+ -антипортера, для совершения осмотической работы (Na^+ , метаболит)-симпортерами. Создание Na^+ -цикла завершилось с появлением первичных $\Delta\mu Na$ -генераторов, не требующих $\Delta\mu H$ для образования натриевого потенциала.

Большинство этих событий произошло, вероятно, на достаточно ранних этапах эволюции жизни, так что теперь отдельные компоненты Na^+ -цикла обнаруживаются в самых различных таксонах: *Vibrio*, *Propionigenum*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Streptococcus*, метанобразующих бактериях, цианобактериях (а также по всей вероятности *Pseudomonas*) и, наконец, животных клетках. Возможно, даже «классическая» *E. coli* имеет представителей натриевого мира

Рис. 58. Дендрограмма, иллюстрирующая родственные отношения в царстве бактерий, которая построена на основании нуклеотидных последовательностей рибосомной 5SРНК. Значком (Na) отмечены бактерии, использующие $\Delta\mu\text{Na}$ - генераторы вместо $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов или совместно с $\Delta\mu\text{H}$ -генераторами (по К. М. Чумакову, 1987)



среди своих далеких предков, иначе трудно понять, почему эта бактерия накапливает некоторые метаболиты за счет $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$.

7.5. Общая схема соотношений протонного и натриевого циклов

Превращения энергии в мембранах, сопряженные посредством образования и использования ионных потенциалов, суммированы на рис. 59. Предполагают, что роль сопрягающих ионов выполняет H^+ (черные стрелки) или Na^+ (белые стрелки).

Простые протонные схемы (рис. 59, А, Б) описывают трансформацию энергии в мембранах, специализированных на выполнении одного типа $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -зависимой работы, а именно *химической* или *осмотической*. Схема А (рис. 59) реализуется в мембранах бактериальных хромофоров и тилакоидах хлоропластов. В обоих случаях энергия света используется для образования протонного потенциала $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторами фотосинтетической редокс-цепи. Образованная $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ потребляется H^+ -АТФ-синтазой.

Другой пример монофункциональной протонной мембраны приведен на рис. 59, Б. Здесь $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, создаваемая $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератором, используется для концентрирования определенных соединений (осмотическая работа). У прокариот примером подобной системы могут быть анаэробные бактерии, образующие АТФ посредством субстратного фосфорилирования (например, при гликолизе). У эукариот та же схема применима к внешней клеточной мембране и тонопласту растений и грибов, а также мембранам лизосом и секреторных гранул некоторых животных клеток (например, хромаффинных гранул). В этих случаях роль $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генератора играет H^+ -АТФаза, а роль потребителей $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ — (H^+ , метаболит)-симпортеры.

Гораздо более сложная схема описывает энергетику цитоплазматической мембраны многих аэробных и фотосинтезирующих бактерий (рис. 59, В). Здесь химическая работа (синтез АТФ), осмотическая работа (накопление веществ) и механическая работа (вращение ротора H^+ -мотора) осуществляется за счет $\Delta\bar{\mu}\text{H}$, которая образуется дыхательными или фотосинтетическими $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторами. Кроме того, $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ используется Na^+/H^+ -антипортером для получения $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$, играющей роль $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -буфера. $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ может использоваться также для совершения осмотической работы (Na^+ , метаболит)-симпортерами. Последний процесс является, по существу, одной из составных частей натриевого цикла.

Фактором, благоприятным для совершения работы, которая сопряжена со входом в клетку ионов Na^+ , является превышение концентрации Na^+ снаружи над таковой внутри цитоплазмы. Это требование не выполняется для пресноводных микроорганизмов. Здесь реализуется упрощенный вариант схемы (рис. 52, В), где ионы Na^+

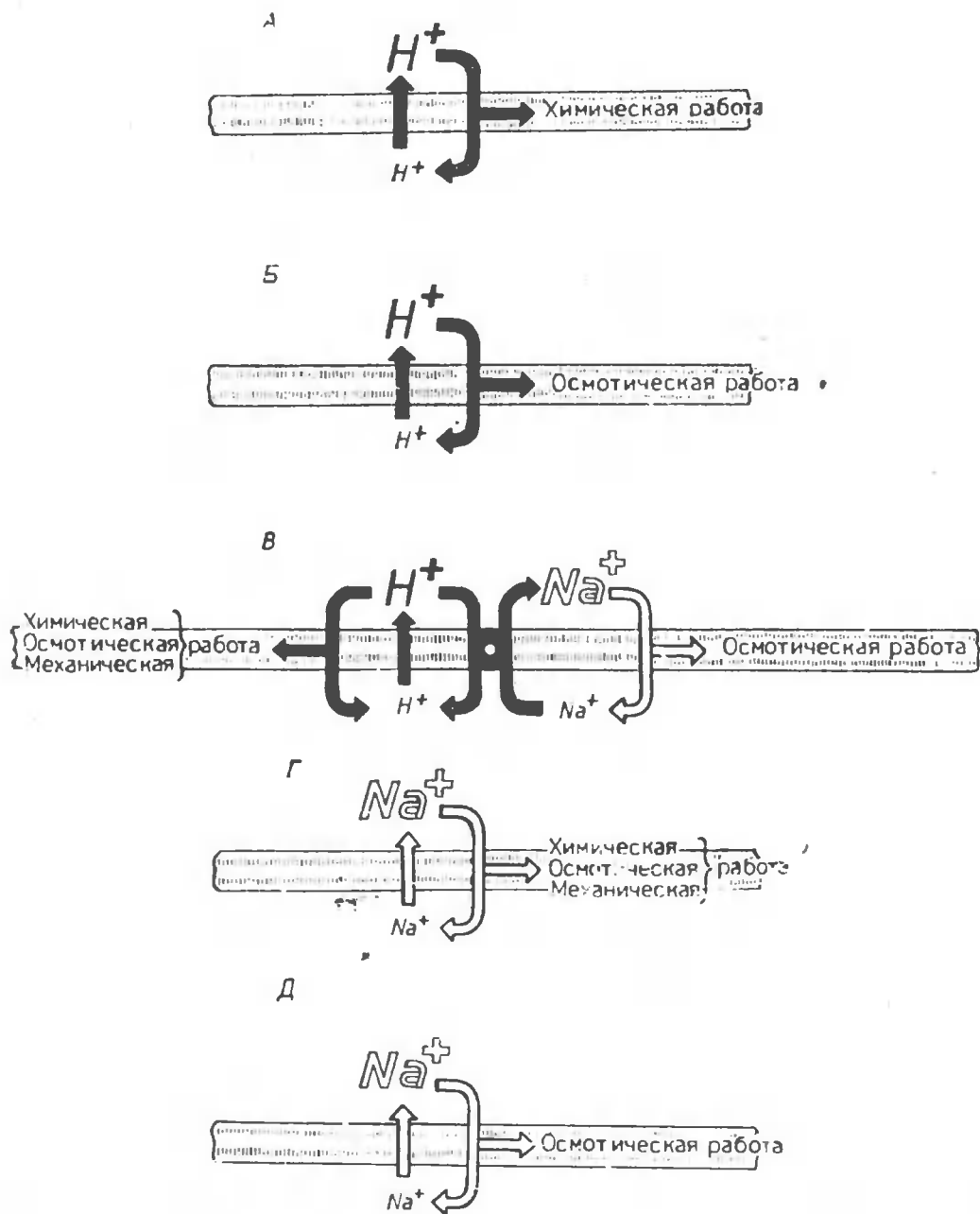


Рис. 59. Пять типов (А—Д) мембранных систем превращения энергии $\Delta\bar{\mu}H$ или $\Delta\bar{\mu}Na$:

черными стрелками обозначена протонная энергетика, светлыми — натриевая; *химическая работа*: синтез АТФ и пирогосфата и обратный перенос восстановительных эквивалентов; *осмотическая работа*: перенос веществ против их концентрационных градиентов; *механическая работа*: движение посредством H^+ -(Na^+)-моторов

не фигурируют. Подобная логика применима и к митохондриям, поскольку внешней средой для них служит цитозоль, содержащий, как правило, мало ионов Na^+ . Действительно, ни Na^+/H^+ -антипорт, ни $(Na^+, \text{метаболит})$ -симпорт не характерны для митохондрий.

Натриевый цикл показан на рис. 59, Г. В своем полном выражении схема Na^+ -цикла требует, чтобы все три типа мембранной работы поддерживались натриевым потенциалом, образуемым первичным $\Delta\bar{\mu}Na$ -генератором. *Vibrio alginolyticus*, растущий при щелоч-

ном рН, оказался первым примером, где был экспериментально доказан полный Na^+ -цикл.

Упрощенный вариант натриевого цикла приведен на рис. 59, Д. Фактически он аналогичен схеме Б с единственной разницей, что функции H^+ выполняет Na^+ . Здесь АТФ также используется в качестве источника энергии, но мембрана энергизируется АТФазой, транспортирующей Na^+ , а не H^+ -АТФазой. Плазматическая мембрана животной клетки служит наиболее разработанной системой такого типа: $\Delta\mu_{\text{Na}}$ генерируется Na^+/K^+ -АТФазой (или Na^+ -АТФазой) и потребляется главным образом (Na^+ , метаболит)-симпортерами. Фактически именно внешняя клеточная мембрана животных оказалась хронологически первой в ряду систем, где был описан Na^+ -цикл.

Долгое время считали, что подобный принцип есть одно из эволюционных достижений животной клетки. Однако теперь уже ясно, что натриевая энергетика впервые была «открыта» прокариотами и лишь затем, по всей вероятности, унаследована от них животными, причем в упрощенном варианте.

Можно полагать, что схема Д (рис. 59) присуща также анаэробным бактериям, утилизирующим «гликолитический» АТФ в условиях, когда протонный цикл не работает. Таков, вероятно, *Streptococcus faecalis*, лишенный H^+ -АТФазы или растущий в присутствии разобщителя.

На сегодня примеры натриевой энергетики далеко не столь многочисленны, как случаи, когда используется протонный цикл. Однако здесь необходимо иметь в виду, что описание роли Na^+ как сопрягающего иона, способного выполнять, по существу, все биоэнергетические функции протона, произошло совсем недавно. Огромное таксономическое разнообразие организмов, использующих натриевый цикл или его фрагменты (от вибрионов, анаэробных бактерий, кокков до цианобактерий и, наконец, животных), указывает на всеобщий характер распространения этого нового типа мембранной биоэнергетики.

Будущим исследованиям предстоит выяснить действительные масштабы натриевого мира. Но уже и сейчас ясно, что это достаточно обширная область биосферы.

В поисках представителей натриевого мира следует учитывать то обстоятельство, что H^+ - и Na^+ -циклы могут сосуществовать в одном и том же объекте, причем переключение с H^+ на Na^+ и наоборот может регулироваться условиями внешней среды. Выше уже была упомянута индукция Na^+ -АТФазы у *S. faecalis*. У микроорганизма *V. alginolyticus* натриевая энергетика, по-видимому, сменяется протонной при увеличении $[\text{H}^+]_{\text{нар}}$.

7.6. Превращение энергии в биомембранах без участия H^+ и Na^+

Рассматривая соотношение протонного и натриевого миров, уместно задать вопрос, нет ли также и еще одного (третьего) мира, где ни H^+ , ни Na^+ не участвуют в энергетическом сопряжении. На сегодня ответ на этот вопрос однозначен и отрицателен.

Сказанное не означает, что среди всего многообразия процессов превращения энергии в мембранах нельзя найти таких, которые обходятся без H^+ и Na^+ . Однако все это — исключительные случаи, не складывающиеся в единую энергетическую систему, подобную протонной или натриевой энергетике.

Например, биоэнергетические функции ионов K^+ . Как уже отмечалось в разд. 6.3.1, у бактерий ΔpK может возникать за счет $\Delta\psi$ -составляющей протонного (или натриевого) потенциала, образуемого $\Delta\mu H$ - ($\Delta\mu Na$ -) генераторами. Если *E. coli* растет в среде с очень низким содержанием K^+ , то индуцируется K^+ -АТФаза E_1E_2 -типа (система *Kdp*), аккумулирующая в клетке ионы K^+ за счет энергии АТФ. Функции образуемой ΔpK ограничены стабилизацией $\Delta\psi$, внутреннего рН и осмотического давления.

В животных тканях K^+ -градиент, как правило, образуется Na^+/K^+ -АТФазой. Роль иона K^+ в этом случае сводится к функции противоиона для иона Na^+ , который откачивается из клетки с целью образования $\Delta\mu Na$ — конвертируемой «валюты» внешней мембраны животной клетки.

В разд. 4.5.3 была рассмотрена K^+/H^+ -АТФаза эпителия слизистой желудка высших животных. Здесь K^+ служит противоионом для H^+ , откачиваемого из клетки для подкисления желудочного сока.

В эпителии некоторых насекомых электрогенная K^+ -АТФаза катализирует транспорт массовых количеств K^+ от базальной к апикальной стороне эпителиальной клетки. Этот процесс важен для движения жидкости через эпителий. K^+ -АТФаза насекомых в отличие от Na^+/K^+ -АТФазы и K^+/H^+ -АТФазы откачивает K^+ из клетки. Она локализована в апикальной области плазматической мембраны. K^+ -АТФаза образует грибовидные выросты размером около 10 нм, внешне напоминающие фактор F_1 . Ее активность устойчива к оубаину и специфически тормозится инсектицидом дельта-эндотоксином из *Bacillus thuringiensis*.

В эпителии кишечника одного из червей K^+ -АТФаза откачивает K^+ из клетки, создавая $\Delta\psi$, которая используется для удаления ионов H^+ из просвета кишечника. В результате рН в кишечнике поддерживается на уровне 10—11. $\Delta\mu K$ или одна из ее составляющих, по-видимому, служит движущей силой аккумуляции аминокислот в клетках эпителия посредством (K^+ , аминокислота)-симпортера.

В мембране эндоплазматического ретикулума и внешней клеточной мембране животных (а также в цитоплазматической мембране

бактерий) имеется Ca^{2+} -АТФаза E_1E_2 -типа, которая переносит Ca^{2+} из цитозоля в просвет ретикулума или в межклеточное пространство. Нет никаких свидетельств тому, что образуемая $\Delta\bar{\mu}\text{Ca}$ может использоваться для совершения полезной работы. По всей вероятности, единственной функцией Ca^{2+} -АТФазы служит регуляция $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле.

Известно несколько примеров транспорта анионов, не зависимо-го от $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ и $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$. В разд. 3.5.7 был рассмотрен один из них: галородопсин, транспортирующий ионы Cl^- в клетки *H. halobium* за счет энергии света. Эта помпа возвращает в клетку ионы Cl^- , которые постоянно ею теряются электрофоретически, перемещаясь через мембрану в направлении изнутри наружу. У моллюска *Aplysia californica* подобная функция выполняется Cl^- -АТФазой, локализованной во внешней клеточной мембране. Фермент чувствителен к ванадату.

Солончаковое растение *Limonium vulgaris* выделяет соль на поверхность листьев посредством особой железы, состоящей из клеток, во внешней мембране которых обнаружена Cl^- -АТФаза. Предполагают, что этот фермент электрогенно откачивают ионы Cl^- из клетки, а образуемая $\Delta\psi$ (внутри клетки знак «+») используется для электрофоретического переноса ионов Na^+ вслед за Cl^- .

Некоторые вещества аккумулируются бактериями за счет энергии АТФ или фосфоенолпирувата. Наиболее разработанным примером такого рода является фосфоенолпируваттрансферазная система, катализирующая два процесса — фосфорилирование глюкозы фосфоенолпируватом и аккумуляцию этого сахара в виде глюкозо-6-фосфата некоторыми бактериями. При этом разность в величинах свободной энергии фосфоенолпирувата и глюкозо-6-фосфата используется для создания большого градиента сахара между клеткой и средой.

В заключение следует подчеркнуть, что все перечисленные выше системы представляют собой особые механизмы, совершающие осмотическую работу. Огромное большинство процессов концентрирования веществ поддерживается энергией $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ или $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$. Что же касается мембранной работы химического и механического типов, то здесь во всех без исключения описанных случаях движущей силой служит протонный или натриевый потенциал. Вот почему пока нет оснований постулировать существование какой-либо иной мембранной энергетической «валюты», кроме $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ и $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$.

Некоторые итоги и перспективы мембранной биоэнергетики (заключение)

8

8.1. Фундаментальные исследования

Из всего изложенного выше ясно, что многие проблемы мембранной биоэнергетики уже решены, но, по-видимому, еще больше предстоит узнать в ближайшем будущем. Стремительное развитие этой области науки хорошо иллюстрируется следующими двумя обстоятельствами: о протонной энергетике впервые стало известно всего четверть века назад, а решающие успехи в описании натриевого мира, альтернативного протонному, были достигнуты буквально в самое последнее время, уже после того как были написаны первые страницы этой книги. Поэтому вряд ли можно сомневаться, что на карте превращений энергии в мембранах есть еще много белых пятен.

В частности, остается неясным, как далеко простираются границы «натриевого мира». Представляется весьма вероятным, что помимо бактерий, перечисленных в предыдущей главе, есть и другие микроорганизмы, прежде всего морские и щелочеустойчивые, которые также используют Na^+ в качестве сопрягающего иона. В этом отношении интересны, например, морские эукариотические водоросли.

Что касается прокариот, располагающих Na^+ -циклом, то здесь остается неясным: существуют ли $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -генераторы, использующие энергию света, сколько $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$ -генераторов может быть локализовано в дыхательной цепи и каковы молекулярные механизмы генерации и использование $\Delta\bar{\mu}\text{Na}$. Последний вопрос не решен даже для H^+ -транспортирующей дыхательной цепи.

Остаются неопределенности в вопросе о том, каковы этапы *переноса электрона между двумя фотосистемами* в хлоропластах и цианобактериях.

Неясно также, происходит ли трансмембранный перенос зарядов на этапе $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ фотосистема II; поэтому все еще нельзя составить окончательного суждения об *эффективности фотосинтетической редокс-цепи*.

Гораздо больший прогресс достигнут в изучении *циклической редокс-цепи бактерий-фотосинтетиков*. Здесь уже ясно, что генерация $\Delta\mu\text{H}$ есть результат взаимодействия электрон-транспортной «полупетли» Митчела, включающей хлорофиллы, феофитин, хиноны и цитохром *c*, и системы Q-цикла, подобной таковой в митохондриях. Для одного из $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов (для реакционных центров *Rhodospseudomonas vridis*) получены как структурные (рентгено-структурный анализ высокого разрешения), так и функциональные (прямое измерение внутримолекулярных смещений зарядов) характеристики, позволившие выяснить принцип действия данного преобразователя энергии. Он состоит во встречном движении электрона и протона, направленном поперек мембраны, причем перенос электрона ответствен за генерацию 95% мембранного потенциала, а остальные 5% приходятся на перенос протона.

В Q-цикле также, по-видимому, происходит встречное движение электрона и протона, однако на долю электрона, транспортируемого между двумя гемами цитохрома *b*, приходится только 40% общего пути переноса зарядов.

Вклады электрона и протона в превращение энергии *НАДН-КоQ-редуктазой и цитохромоксидазой* пока остаются неизвестными. Ясно лишь, что в последнем случае H^+ переносится на значительное расстояние в глубь мембраны.

В *бактериородопсине и трансгидрогеназе* через мембрану транспортируется только H^+ , но не e^- . Светозависимая генерация $\Delta\psi$ бактериородопсином складывается из двух основных стадий. Одна из них (меньшая по амплитуде) обусловлена переносом протона в периплазму от шиффова основания, которым крепится ретиналь к белку. Другая (большая) стадия есть результат переноса протона из цитоплазмы к шиффову основанию.

Два ключевых вопроса остаются неясными применительно к этому механизму: 1) почему сродство шиффова основания к протону резко снижается после изомеризации остатка ретиналя под действием света и 2) каким образом переносится протон от шиффова основания в периплазму и из цитоплазмы к шиффову основанию? Дальнейшая информация здесь может быть получена посредством направленного мутагенеза и ряда других методов, но окончательное решение проблемы вряд ли возможно без рентгено-структурного анализа с атомным разрешением. Описанный более десяти лет назад Р. Хендерсоном общий контур семи α -спиральных колонн сегодня уже не может удовлетворить исследователей бактериородопсина.

Дальнейший анализ структуры и функции H^+ -АТФ-синтазы необходим для выяснения принципа действия этого важнейшего потребителя $\Delta\mu\text{H}$. Все еще неясна стехиометрия $\text{H} : \text{АТФ}$. Обсуждаются величины 2 и 3. Если верна величина 2, то возможен «прямой» механизм, предполагающий, что два протона, переносимые через F_0 , поглощаются непосредственно при образовании той молекулы H_2O ,

которая получается в результате превращения АДФ и фосфата в АТФ. Другая возможность состоит в том, что синтез АТФ некоторым образом непрямо сопряжен с переносом двух (трех?) протонов через мембрану. Как и в упомянутых выше случаях, структурные исследования высокого разрешения крайне нужны для понимания принципа работы этого ферментного комплекса.

Мембранология находится еще в самом начале пути к пониманию механизма H^+ -АТФаз E_1E_2 -типа, обнаруженных во внешней клеточной мембране растений и грибов. Здесь может быть полезно сравнительное изучение этих ферментов и Na^+/K^+ -АТФазы, поскольку H^+ -АТФазы были описаны гораздо позже и потому изучены не столь подробно, как Na^+/K^+ -АТФаза. Еще позже была открыта H^+ -АТФаза тонопласта. Механизм ее действия совершенно неясен.

Что касается тех потребителей $\Delta\bar{\mu}H$, которые осуществляют *концентрирование веществ* в клетках или органеллах, то большинство такого рода систем, по-видимому, уже описано. Некоторые *переносчики* очищены и реконструированы в протеолипосомы. В ряде случаев исследован механизм их действия, хотя без решающих успехов, так что до сих пор приходится довольствоваться гипотетическими схемами, основанными на косвенных (главным образом кинетических) данных. $\Delta\bar{\mu}H$ -Зависимый транспорт белков и нуклеиновых кислот — одна из наиболее интересных проблем в этом разделе биоэнергетики.

Для всех перечисленных выше преобразователей энергии применимы традиционные методы исследования структуры и функции белков. Такие подходы, видимо, недостаточны, если речь идет об H^+ - и Na^+ -моторах. Прогресс в понимании этих, пожалуй, наиболее своеобразных мембранных трансформаторов энергии требует разработки совершенно новых подходов. Эта проблема представляется особенно важной, поскольку белковые субъединицы, вращающиеся в плоскости мембраны, могут быть составной частью не только флаголярного мотора, но и переносчиков макромолекул, H^+ -АТФ-синтазы и т. п.

При изучении механизма транспорта протонов через мембраны необходимо иметь в виду, что H^+ как сопрягающий ион не уникален. Поэтому схемы, применимые только к H^+ , но не к Na^+ , недостаточны для объяснения всей совокупности превращения энергии в биомембранах.

Многообещающим направлением будущих исследований может стать изучение роли нитчатых и сетчатых митохондрий в качестве внутриклеточных *протонных кабелей*.

Функции протонного и натриевого потенциалов, не связанные с энергетикой, — таков еще один интригующий аспект рассматриваемых проблем. Среди них — регуляция работы мембранных ферментов посредством $\Delta\bar{\mu}H$ или $\Delta\bar{\mu}Na$, электрофорез белков и других компонентов вдоль мембран и т. д.

8.2. На пути к прикладной биоэнергетике

8.2.1. Медицинские аспекты

Дефекты дыхательной цепи. Сегодня мы находимся в самом начале пути к практическому применению знаний, полученных исследователями энергетики биомембран. Это справедливо, в частности, для медицинских аспектов биологии.

Уровень образованности врачей в области биоэнергетики хорошо иллюстрируется тем фактом, что они все еще часто рассматривают инъекцию АТФ как способ снабжения энергией больного при патологиях энергетического обмена. Такая практика продолжается, хотя простой расчет показывает, что количество АТФ, гидролизуемое человеком до АДФ и фосфата за 1 сут, равно в среднем 40 кг, т. е. в миллион раз больше количества АТФ, получаемого с инъекцией.

В литературе есть достаточно сообщений о патологиях, сопровождающихся тем или иным нарушением в системе окислительного фосфорилирования. По-видимому, таких сообщений было бы гораздо больше, если бы врачи располагали простыми методами диагностики подобных нарушений.

Описаны случаи мутаций в любом из трех дыхательных $\Delta\mu H$ -генераторов. Так, в группе А. Л. Ленинджера было показано, что митохондрии новорожденного, погибшего в возрасте 4 мес, дефицитны по одному из FeS-компонентов НАДН-КоQ-редуктазы. А. Пападимитриу и соавторы сообщили о сильном торможении НАДН-цитохром *c*-редуктазы в сердечных митохондриях новорожденной, умершей через 4 недели после рождения. Оказалось, что дефект обусловлен неполноценностью среднего звена дыхательной цепи, а именно уменьшением количества энзиматически восстанавливаемого цитохрома *b*.

Р. Капальди, Б. Чанс и их коллеги описали нарушение того же звена в митохондриях скелетных мышц семнадцатилетней девушки. Здесь также оказалось, что количество восстанавливаемого дыхательной цепью цитохрома *b* резко (в 6 раз) снижено по сравнению с нормой. При этом в КоQH₂-цитохром *c*-редуктазном комплексе отсутствуют по крайней мере четыре типа субъединиц, в то время как уровни цитохромов *c*₁, *c*, *a* и *a*₃ находятся в пределах нормы. Дальнейшие исследования показали, что описанные нарушения были причиной мышечной слабости и лактатного ацидоза, присущих пациентке. Инъекции 10 мг менадиона (витамина К₃) и 1 г аскорбата, производимые каждые 6 ч, привели к частичному восстановлению нарушенной скорости регенерации креатинфосфата в мышце больной после физической нагрузки. Если до лечения эта скорость была в 40 раз меньше, чем в норме, то затем она возросла примерно до 50% нормы. Резко улучшилось и самочувствие пациентки. В течение года, предшествовавшего лечению, девушка могла пройти без отдыха расстояние не больше 100 м и обычно передвигалась в инва-

лидной коляске. Через двое суток после начала инъекций она проходила без остановки около 1 км и уже не пользовалась коляской.

Благоприятный эффект менадиона легко объяснить его способностью шунтировать свободным окислением начальный и в некоторой степени также и средний сегменты дыхательной цепи.

Как уже отмечалось выше, *КоQН*-цитохром *c*-редуктаза и особенно *НАДН*-*КоQ*-редуктаза блокируются широким кругом чужеродных гидрофобных веществ. В таких случаях интересно было бы исследовать возможный благоприятный эффект менадиона.

К сожалению, менадион не в состоянии помочь, если повреждение цепи находится в цитохромоксидазной области. Пример подобной патологии был описан М. А. Джонсоном и сотрудниками, показавшими, что определенные виды миопатии коррелируют с исчезновением *цитохромоксидазы* из некоторых типов скелетных мышц.

Резкое снижение уровня цитохромоксидазы было отмечено в митохондриях хвостатого тела мозга у больных, страдающих болезнью Хантингтона. Предполагают, что этот дефект дыхательной цепи вызывает атрофию хвостатого тела.

С. Меррил и М. Харрингтон (1985) сделали обзор некоторых врожденных заболеваний, наследуемых по материнской линии и связанных с нарушением структуры и функции митохондрий. Среди этих патологий есть миопатии, энцефаломиопатии, кардиомиопатии, зрительные нейропатии и ряд других.

Помимо наследственных, бывают патологии окислительного фосфорилирования, обусловленные интоксикациями. Так, хроническое потребление этанола бабуином вызывает двукратное снижение концентрации цитохромоксидазы и ее активности, а также некоторое уменьшение содержания фосфолипидов (прежде всего фосфатидилхолина и кардиолипина) благодаря активации фосфолипазы A_2 . Отмечено также, что у крыс, получавших этанол, ослабляется связь фактора F_1 с митохондриальной мембраной и снижается эффективность окислительного фосфорилирования. В крови пациентов, страдающих первичным желчным циррозом, обнаружены аутоиммунные антитела к *АТФ/АДФ-антипортеру*. Резкое торможение окисления пирувата, α -кетоглутарата и пальмитоилкарнитина наблюдается в митохондриях бегунов на длинные дистанции.

Иногда биоэнергетические дефекты связаны с нарушением изолирующих свойств митохондрии мембран, а не с торможением или отсутствием тех или иных мембранных ферментов. Этот вряд ли удивительно, если учесть, что даже небольшое увеличение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий, которая исходно крайне мала, приводит к снятию протонного контроля.

Впервые патология с подобным нарушением энергетики была описана Л. Эрнстером, Р. Люфтом и их коллегами (1959). У пациентки, страдавшей мышечной слабостью, была взята биопсия одной из скелетных мышц и выделены митохондрии. Как оказалось, у таких митохондрий отсутствовал протонный контроль. Этот дефект

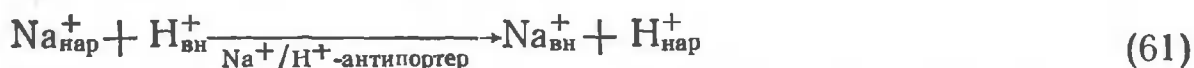
не был следствием гипертиреоза, также сопровождающегося гиперметаболизмом и снижением протонного контроля.

Синдром Рейе — острое детское заболевание (энцефалопатия и жировая инфильтрация внутренних органов) — сопровождается появлением в сыворотке крови больших количеств дикарбоновых жирных кислот, вызывающих снятие протонного контроля и разобщение. Многие лекарства и яды обладают *протонофорной активностью*. Среди них дикумарин и его аналог антикоагулянт фенилин, бензимидазол и другие гербициды, а также ряд антибактериальных препаратов.

Описаны также нарушения *натриевой энергетики*, присущей внешней клеточной мембране. Примером тому может быть синдром Фалькони, когда (Na^+ , метаболит)-симпортеры мембраны щеточной каемки утрачивают способность к энергозависимому транспорту метаболитов.

Рак: роль Na^+/H^+ -антипортера. Na^+/H^+ -Антипортер служит важнейшим механизмом регуляции рН в эукариотических клетках. Показано, что Na^+/H^+ -антипортер участвует в передаче гормональных сигналов на аппарат синтеза ДНК. Ряд гормонов при посредничестве фосфатидилинозитдифосфата, диацилглицерида и протеинкиназы С активирует Na^+/H^+ -антипортер. В результате ионы водорода откачиваются из клетки в обмен на ионы Na^+ , градиент которых поддерживается Na^+/K^+ -АТФазой. Защелачивание, в свою очередь, необходимо для активации синтеза ДНК гормонами.

Существует большая группа данных, что *целый ряд онкобелков и ростовых факторов активирует тот или иной этап фосфатидилинозитного каскада и в итоге включает Na^+/H^+ -антипорт*. Можно полагать, что совместное действие Na^+/K^+ -АТФазы и Na^+/H^+ -антипортера (уравнения 60, 61) участвует в злокачественном перерождении ткани:



Этот механизм должен быть особенно важен для тех опухолей, в которых активирован гликолиз, что, в общем, характерно для раковых клеток.

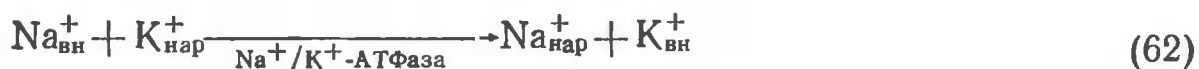
В наиболее быстро растущих опухолях гликолиз образует 15—40% всей массы АТФ (против 5—20% в нормальных клетках). В некоторых крайних случаях, как, например, в клетках асцитного рака, вклад гликолиза возрастает до 50%. Повышенная роль гликолиза становится понятной, если учесть, что обычно опухоль находится в гипоксических условиях из-за худшего кровоснабжения.

Na^+/H^+ -Антипортер призван поддерживать цитоплазматическую $[\text{H}^+]$ на уровне, достаточно низком, чтобы разрешить синтез ДНК, несмотря на постоянную продукцию ионов H^+ гликолизом. Но если это так, то пролиферацию раковых клеток можно было бы затормо-

зять агентами, специфически блокирующими Na^+/H^+ -антипортер или способствующими возвращению назад в клетку ионов H^+ , откачиваемых антипортером.

К сожалению, пока не найдено специфических ингибиторов с высоким сродством к Na^+/H^+ -антипортеру. Амилорид, тормозящий антипортер при концентрации около 10^{-4} М, в гораздо меньших количествах блокирует Na^+ -каналы.

Что касается второго из названных выше подходов, то здесь перспективным представляется использование K^+/H^+ -антипортера — *нигерицина*, который, действуя в паре Na^+/K^+ -АТФазой, может изменить направление потока ионов через внешнюю клеточную мембрану:



Как показали опыты Л. Б. Марголиса и И. А. Розовской, нигерицин действительно прекращает синтез ДНК в клетках асцитного рака. При рН, характерном для асцитной жидкости (6,9), 5×10^{-6} М нигерицин снижал внутриклеточный рН с 6,6 до 6,3. Эта последняя величина ниже порогового значения рН_{вн} для синтеза ДНК в асцитной клетке.

Еще одна возможность закислить цитоплазму — это активировать гликолиз. Не исключено, что именно снижением рН в опухолевых клетках объясняется благоприятное терапевтическое действие гипергликемии при некоторых злокачественных заболеваниях. Можно надеяться, что как нигерицин, так и гипергликемия будут действовать на пролиферацию прежде всего опухолевых клеток, а не нормальных, где скорость гликолиза существенно ниже.

Рак: противоопухолевое действие проникающих катионов. По данным Л. Чена и сотрудников, метилродамин (родамин 123), проникающий через мембраны в катионной форме, тормозит рост клеток карциномы. Как отмечалось в разд. 6.2.4, метилродамин движется в цитоплазму и далее в матрикс митохондрий под действием $\Delta\psi$, образуемой соответственно Na^+/K^+ -АТФазой и $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ -генераторами дыхательной цепи. Накопление метилродамина внутри митохондрий вызывает торможение дыхания. Такой эффект может стимулировать гликолиз (снимается пастеровский эффект), а следовательно, способствовать закислению цитоплазмы. Последнее должно подавлять синтез ДНК, как это было показано в предыдущем разделе.

Опыты, проведенные Ю. Н. Антоненко, показали, что не только производные родамина, но и еще ряд противоопухолевых препаратов являются проникающими катионами. По данным В. А. Драчева и Д. Б. Зорова, освещение дезэнергизует митохондрии в клетке, прокрашенной этилродамином. Сообщалось также, что некоторые опу-

холи специфически накапливают гемин. В этих случаях световая терапия оказывается эффективной.

Рассматривая подобные данные, необходимо учесть, что проницаемость фосфолипидных мембран для гидрофобных катионов значительно ниже, чем для анионов той же гидрофобности. Движение катионов через мембрану особенно затруднено, если оно происходит против сил электрического поля. Это означает, что катион, например родамин, будет быстро аккумулироваться во внешнем клеточном слое ткани, но вряд ли достигнет следующих слоев. Чтобы сделать это, родамину пришлось бы выйти из клетки первого слоя, двигаясь против поля («—» внутри клетки). Движение катиона в глубь ткани по межклеточному пространству сильно затруднено из-за плотной упаковки клеток.

В опухоли ситуация меняется; там упаковка не столь плотна и регуляторна, как в норме. Здесь катион может достичь внутренних клеточных слоев, диффундируя по межклеточному пространству. Вот почему можно надеяться, что проникающие катионы-ингибиторы будут влиять преимущественно на опухолевые, а не на нормальные ткани.

Отмечено, что катионные антибиотики тетрациклины, которые специфически блокируют синтез белка в митохондриях, сильно тормозят рост опухолей, вызванных канцерогенами, а также развитие трансплантальной гипернефромы. Эти и ряд других наблюдений указывают, что *митохондрии могут быть мишенью при химиотерапии рака*.

Другой аспект проблемы был рассмотрен А. Л. Ленинджером, показавшим, что повреждение раковых клеток цитотоксическими макрофагами в клеточной культуре сопровождается почти полным торможением НАДН-КоQ-редуктазы. Механизм этого эффекта остается неясным.

В какой-то мере сходный эффект был описан при изучении паркинсонизма, вызванного деградацией допамин-образующих нейронов (черной субстанции) под действием 1-метил-4-фенил-метил-1, 2, 3, 6-тетрагидропиридина. Действующим началом оказался один из продуктов окисления названного вещества: 4-фенил-N-метилпиридиний-катион (MPP⁺), электрофоретически накапливающийся в митохондриях и блокирующий дыхательную цепь между НАДН-дегидрогеназой и КоQ. Можно задаться вопросом, почему страдает именно черная субстанция. В данном конкретном случае ответ известен: именно в этой ткани мозга происходит энзиматическое образование MPP⁺ из предшественника. Во многих аналогичных ситуациях достаточной информации не существует. Так, пока неизвестно, почему введение в куриное яйцо антимицина А, специфического ингибитора КоQH₂-цитохром c-редуктазы, блокирует формирование сердца, в то время как другие органы эмбриона продолжают свое развитие.

Действие антимикробных агентов, направленное на системы мембранной энергетики. Мембранные системы микроорганизмов в известной мере *подобны, но не идентичны* таковым млекопитающих.

Поэтому можно надеяться, что удастся найти ингибиторы, специфически блокирующие энергетические системы микро-, но не макроорганизма. Иногда такой подход оказывается успешным. Например, были синтезированы оксинафтохиноны, очень низкие концентрации которых полностью подавляют средний сегмент дыхательной цепи митохондрий из патогенного простейшего (кокцидии) *Eimeria tenella*. При этом митохондрии млекопитающих остаются незатронутыми. Ряд нафтохинонов обладает антималярийной активностью, специфически подавляя дыхательную цепь *Plasmodium lophurae* и *P. vivax*.

Если лекарственный препарат действует на мембранные системы как микробов, так и человека, то он безопасен только при наружном употреблении. Таков, например, грамицидин D, образующий H^+ - Na^+ - и K^+ -проницаемые каналы в фосфолипидных бислоях.

Недавно показано, что в сыворотке крови человека существует система, убивающая грамотрицательные бактерии посредством канал-образующего белкового фрагмента. Этот фрагмент может образоваться при расщеплении бактериями тромбина. Процесс требует определенных рецепторов на внешней и протонного потенциала на внутренней бактериальных мембранах. Все эти свойства (протеолиз, рецепторы и необходимость $\Delta\bar{\mu}H$) присущи некоторым колицинам — бактерицидным белкам, образуемым определенными штаммами *E. coli*.

Еще одна аналогия мембраноактивной системы микроба и млекопитающего была описана Л. Д. Юнгом и соавторами. Как цитотоксический эффект *Entamoeba histolytica*, так и умерщвление клеток-мишеней иммунной системой достигается сходным образом действующими белками, которые деэнергизируют внешнюю мембрану клетки млекопитающего посредством образования в них ион-проводящих пор.

Известны антибактериальные препараты, по характеру действия не имеющие отношения к биоэнергетике, которые накапливаются в бактериях за счет $\Delta\bar{\mu}H$. Таковы, например, стрептомицин и гентамицин. В случае гентамицина активной оказалась $\Delta\psi$ -составляющая $\Delta\bar{\mu}H$. То же обнаружено при изучении 2-N-метилэллиптициния, убивающего *Streptococcus pneumoniae*. Мутант *S. pneumoniae*, имеющий сниженную $\Delta\psi$, оказался устойчивым к этому лекарству.

Иногда не вход, а выброс антибиотика оказывается энергозависимым. Так, штамм *E. coli* с плазмидой, обеспечивающей устойчивость к тетрациклину, активно откачивает этот агент из клетки. Подобные отношения показаны для штаммов, устойчивых к арсенату и арсениту. Такие эффекты следует учитывать при разработке стратегии антибактериальной терапии.

Открытие «натриевого мира» может иметь значение для лечения патологий, вызываемых *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* и другими его представителями. В борьбе с такими бактериями препараты, снижающие $\Delta\bar{\mu}H$, должны быть малоэффективны. В то же

время, комбинируя протонофор с моненсином, можно надеяться получить препарат, обладающий бактерицидным действием.

По мнению Г. Вольфарта и Н. Букеля, благоприятный эффект моненсина на рост телят можно объяснить его действием на *Veillonella alcalescens*, живущую в рубце жвачных. Как отмечалось в разд. 7.1.1, эта бактерия располагает Na^+ -транспортирующей декарбоксилазой.

8.2.2. Два примера возможного технологического применения мембранной биоэнергетики

Биотехнология развивается столь стремительно, что дать здесь обзор многочисленных аспектов технической биоэнергетики невозможно: для этого потребовалось бы еще одна, отдельная книга. Необходимо затронуть лишь две проблемы, которые представляются перспективными в связи с прогрессом в понимании устройства мембранных преобразователей энергии.

Регенерация АТФ за счет энергии света. Среди ключевых проблем энзиматической инженерии называют *регенерацию АТФ*. Существует несколько путей синтеза АТФ из АДФ и фосфата. Например, можно неэнзиматически получить из ацетилхлорида ацетилфосфат, субстрат ацетилфосфокиназы, фосфорилирующей АДФ до АТФ. Этот фермент, будучи получен из термофильной бактерии, отличается большой стабильностью. Данный метод требует постоянного притока ацетилфосфата в реакционную смесь, где происходит биотехнологический процесс, обеспечиваемый энергией АТФ.

Гораздо удобнее регенерировать АТФ прямо в том объеме, где он утилизируется. Изящный путь решения проблемы состоит в использовании бактериальных хромофоров или хлоропластов, способных к синтезу АТФ из АДФ и фосфата за счет световой энергии.

Другой подход — использование протеолипосом. Термофильные бактерии могли бы служить источником всех необходимых ингредиентов: $\Delta\mu\text{H}$ -генерирующих ферментов, H^+ -АТФ-синтазы и липидов. Как уже отмечалось в разд. 1.7, липиды таких бактерий могут образовывать очень прочную мембрану, фактически представляющую собой бислой, в котором «два монослоя» ковалентно связаны друг с другом.

Протеолипосомы, построенные из названных выше компонентов, могли бы быть стабильной системой регенерации АТФ. В качестве $\Delta\mu\text{H}$ -генератора перспективен бактериородопсин из *H. halobium*, которая не только гало-, но и термофильна.

Натриевый цикл у полезных бактерий. Использование световой энергии для получения биомассы является важным аспектом технической биоэнергетики. Здесь особый интерес представляют *цианобактерии*. Поскольку эта группа микроорганизмов относится к царству бактерий, к ним можно применить весь арсенал бактериальной

генетической инженерии. В то же время они располагают системой образования O_2 и углеводов из H_2O и CO_2 .

Чтобы внести заметный вклад, например, в обеспечение индустрии СССР топливом за счет биомассы цианобактерий, необходимо повысить выход этой биомассы, поскольку при имеющихся величинах продуктивности (около 20 г водорослей/ m^2 в 1 день) потребовался бы водоем площадью $10^5 km^2$. В этом отношении следовало бы обратить внимание на *цианобактерии, использующие Na^+ -цикл* в своей цитоплазматической мембране. Дело в том, что эти бактерии могут продолжать размножаться и образовывать биомассу даже тогда, когда «цветущий» водоем защелочился до такой степени, что обычные представители протонного мира в нем уже не выживают.

Еще одно преимущество «натриевых» бактерий — их большая устойчивость в неблагоприятных, в частности агрессивных средах. Как уже отмечалось в разд. 7.4, наиболее распространенный первый ответ мембраны на повреждающее воздействие — это повышение протонной проводимости и, следовательно, рассеяние энергии, если энергетика базируется на циркуляции протона. В случае же натриевой энергетики повышение H^+ -проводимости приведет к превращению $\Delta\psi$ в ΔpNa без существенного снижения общей $\Delta\mu Na$. Первый пример цианобактерий с «натриевой» цитоплазматической мембраной был описан в группе автора И. И. Броуном и сотрудниками. Им оказалась алкало- и галотолерантная *Oscillatoria brevis*.

Можно полагать, что *Spirulina* из оз. Чад также относится к «натриевым» цианобактериям, поскольку для этого водоема характерны щелочной рН и высокая концентрация Na^+ . Температура воды в этом экваториальном озере тоже достаточно высока. Устойчивость к высокой температуре служит еще одним фактором, благоприятным для жизни в агрессивных средах, поскольку как ферменты, так и мембраны термофилов отличаются повышенной стабильностью. Существенно, что биомассу спироулины можно использовать не только как топливо, но и как пищу.

Вообще щелоче- и термоустойчивые бактерии, по-видимому, перспективны при поиске путей совершенствования различных микробиологических производств, имеющих дело с агрессивными средами. В частности, «натриевые» метанобактерии (см. разд. 7.2.3) могут представлять интерес для селекции микробов, способных образовывать метан из самых разнообразных отходов.

* * *

Одна из поразительных особенностей процессов превращения энергии в биомембранах — это трансмембранный перенос поистине огромных количеств протонов и ионов натрия. Так, у взрослого человека через внутренние мембраны митохондрий в день переносится количество протонов, равное примерно 1% массы тела. Проходя сквозь мембрану, протон движется в электрическом поле, достигающем $150 kV \cdot cm^{-1}$. Часть этой массы ионов H^+ , пересекающих гид-

рофобный барьер мембраны по H^+ -проводящим путям $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторов, тотчас возвращается назад, двигаясь через мембрану по H^+ -путям АТФ-синтазы и других потребителей $\Delta\bar{\mu}H$. Другая часть перемещается вдоль *митохондриальных филаментов*, достигающих в некоторых клетках длины 50 мкм. Эффекты, вызываемые этими крупномасштабными потоками заряженных частиц, представляют особый интерес. Здесь мы должны быть готовы к неожиданностям.

$\Delta\bar{\mu}H$, $\Delta\bar{\mu}Na$... Что следующее? Ограничены ли способы полезного использования ионных градиентов теми случаями, которые описаны в этой книге? И не может ли заряд, движущийся по белковой молекуле в поле напряженностью более ста киловольт, сделать нечто совсем еще неизвестное?

Здесь уместно вспомнить, что электрический ток был открыт Гальвани. Так биолог подарил физикам новую главу их науки. Как знать, не ждет ли физиков еще один такой подарок?

Рекомендуемая литература

- Бакеева Л. Е., Зоров Д. Б., Скулачев В. П., Ченцов Ю. С. Мембранный электрический кабель. 1. Нитчатые митохондрии фибробластов // Биол. мембраны, 1986. Т. 3. С. 1130—1136.
- Болдырев А. А. Введение в биохимию мембран. М., 1986.
- Говинджи О. Д., Уитмарш Дж. Фотосинтез. М., 1987. Т. 1.
- Гринюс Л. Л. Транспорт макромолекул у бактерий. М., 1986.
- Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М., 1984.
- Никольс Д. Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. М., 1985.
- Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. Мембранно-активные комплексы. М., 1974.
- Ракер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. М., 1979.
- Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., 1969.
- Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М., 1972.
- Скулачев В. П. Гипотеза о биологической функции Na^+/K^+ -градиента как резервной форме энергии // Успехи совр. биол., 1978. Т. 88. С. 163—180.
- Скулачев В. П. Рассказы о биоэнергетике. М., 1982.
- Скулачев В. П. Натриевая энергетика живых систем // Биол. мембраны, 1986. Т. 3. С. 5—25.
- Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран. М., 1988.
- Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. М., 1977.
- Chemiosmotic proton circuits in biological membranes / Ed. by V. P. Skulachev and P. C. Hinkle // L., 1981.
- Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. X-ray structure analysis of a membrana protein complex Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromatophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* // J. Mol. Biol., 1984. Vol. 180. P. 385—398.
- Harold F. M. A study on bioenergetics. N. Y., 1986.
- Henderson R., Unwin P. N. T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy // Nature, 1975, Vol. 257. P. 29—32.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism // Nature, 1961. Vol. 191. P. 144—148.
- Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation // Biol. Rev. Cambridge Physiol. Soc., 1966. Vol. 41. P. 455—502.
- Mitchell P. Chemiosmotic coupling and energy transduction. Bodmin, 1968.
- Racker E., Stoerkenius W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation // J. Biol. Chem., 1974. Vol. 249. P. 662—663.
- Tokuda H., Unemoto T. Characterization of the respiration-dependent Na^+ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* // J. Biol. Chem., 1982. Vol. 257. P. 10007—10014.
- Wikström M., Krab K., Saraste M. Cytochrome oxidase — a synthesis. L., 1981.

Предметный указатель

- Аденилатциклаза 184, 185
Аденилимидодифосфат (АМРРNP) 139
Аденозин 5'-дифосфат (АДФ) 20—23, 134, 135, 246
— ингибирование F_1 -АТФазы 134
— и разобщение жирными кислотами 180
Аденозин-5'-монофосфат (АМФ) 22
Аденозин-3', 5'-монофосфат (циклический) (цАМФ) 138, 184, 185, 195
Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) 23, 63, 246
— в хромаффинных гранулах 126
— конвертируемая энергетическая валюта 16—18, 20
— синтазы, H^+ - и Na^+ -зависимые *См.* соответственно АТФ-синтаза, H^+ и Na^+
— синтез из ацетилфосфата 246
Аденозинтрифосфатаза
— транспортирующая Ca^{2+} *См.* АТФаза, Ca^{2+}
— Cl^- *См.* АТФаза, Cl^-
— E_1E_2 -типа 122—124, 218
— F_0F_1 -типа 122—124
— H^+ *См.* АТФаза, H^+
— H^+/K^+ *См.* АТФаза, H^+/K^+
— K^+ *См.* АТФаза, K^+
— Na^+ *См.* АТФаза, Na^+
— Na^+/K^+ *См.* АТФаза, Na^+/K^+
Аденозинтрифосфатсинтаза
— транспортирующая H^+ *См.* H^+ -АТФ-синтаза
— транспортирующая Na^+ *См.* Na^+ -АТФ-синтаза
АДФ *См.* Аденозин-5'-дифосфат
АДФ (АТФ), H^+ -симпортер 161
АДФ/ФФ_n-антипорт 160
Адреналин 126
Адренодоксин-редуктаза 191
Адренорецепторы 185
Адриамицин 28, 161
Азолектин 137
Актомиозин 22, 178
Аламетицин 167
Алифатические спирты 23, 106
Алкалофилы 138, 221, 224, 226
Альдостерон 190
Амилорид 243
Аминокислот транспорт 145, 158
АМФ *См.* Аденозин-5'-монофосфат
Амфотерицин 177
Антенна светособирающая 66, 197
Антимицин А 86, 244
Антипортер дикарбоксилатов 193
Антипортер K^+/H^+ 35, 194, 243
Антипортер HPO_4^{2-} /малат²⁻ 152
Аппарат Гольджи 13, 14, 30, 122, 124, 128, 141
Аргининфосфаткиназа 21
Арсенат 169
Архебактерии 27, 118
Аскарида 97, 98
Аскорбат 70, 79, 101, 191, 240
Аспартат : глутамат-аминотрансфераза 163, 193

- Аспартилфосфатный интермедиат 124
 Асцит 200, 242, 243
 Асцитная карцинома Эрлиха 127, 243
 Атебрин 41
 АТФ См. Аденозин-5'-трифосфат
 АТФ/АДФ-антипортер 100, 137, 148, 153—161, 163, 181, 194, 195, 241, 242
 АТФ/АДФ-транслоказа См. АТФ/АДФ-антипортер
 АТФаза, Ca^{2+} 15, 122, 226, 236
 АТФаза, Cl^- 236
 АТФаза, H^+
 — в анаэробных бактериях 123, 124, 217
 — в мембранах Гольджи 124
 — в окаймленных пузырьках 127
 — в плазмалемме клеток почки 125
 — в хромаффинных гранулах 126
 — в протеолипосомах 123
 — в эпителии мочевого пузыря 124
 — лизосомная 128
 — классификация 121, 122
 — определение 121
 — плазмалеммная 125, 126
 — — в протеолипосомах 125
 — — отношение $\text{H}^+/\text{АТФ}$ 125
 — типа E_1E_2 122—124
 — типа F_0F_1 122—124
 — тонопласта 125, 127
 — эндоплазматического ретикулу-
 ма 124, 128
 — эндосомная 124, 128
 АТФаза, H^+/K^+ 13, 122, 127
 АТФаза, K^+ 35, 146, 235
 АТФаза, Na^+
 — бактериальная 216, 217, 220, 228, 232
 — животная 217, 234
 АТФаза, Na^+/K^+ 16, 116, 122, 128, 217, 220, 226, 234, 235, 242
 АТФ-синтаза, H^+
 — в промитохондриях 167
 — в протеолипосомах 28, 32, 70, 82, 97, 133, 137, 138
 — в системе протеолипосомы —
 мембранный фильтр 32, 136
 — в тилакоиде 74
 — в хлоропластах 75, 122, 132, 137, 140, 198
 — в хроматофорах 61
 — в цианобактериях 88, 122, 134
 — ген 130
 — концентрация в митохондриаль-
 ной мембране 140
 — механизм 136, 137
 — митохондриальная 122, 131, 132, 138
 — определение 123, 130
 — отношение $\text{H}^+/\text{АТФ}$ 124
 — потребность в двухвалентных
 катионах 125
 — реконструкция 132
 — субъединицы 130—132
 — трехмерная структура 132, 133
 — у *E. coli* 130
 АТФ-синтаза, Na^+ 222, 226, 232
 Атрактилозид 160, 161
 Аттрактанты 171, 196—200
 Ацетил-КоА 79, 184, 185
 Ацетилфосфат 246
 — киназа 246
 Ацетоацетат 80
 Ацидоз 240
 Ацидофилы 138, 217, 218, 226
 Аэротаксис 196
 Бактериоид 125
 Бактериородопсин
 — аминокислотная последователь-
 ность 103
 — аспартат, необходимый для актив-
 ности 111, 112
 — в аттрактантном эффекте света
 114
 — в протеолипосомах 32, 42, 105, 136
 — в системе протеолипосомы — кол-
 лодиевая пленка 33
 — генерация $\Delta\mu\text{H}$ 41, 102, 109, 113
 — двумерные кристаллы 105
 — замена аминокислотных остатков
 106, 111, 112
 — и латеральный перенос $\Delta\mu\text{H}$ 198

- квантовый выход 112
- конформационные изменения 110
- потребность в катионах 110
- принцип функционирования 102
- расщепление протеиназами 27, 28, 30, 103, 112
- сдвиг рК шиффова основания 102, 111
- темновая адаптация 109
- тирозины, необходимые для активности 112
- трехмерная структура 103, 104
- фотоцикл 107, 108
- электрогенные стадии 110, 111
- Бактериоруберин 107
- БАЛ См. Британский антильюзит
- БАЛ-чувствительный фактор См. Негемовый железосерный белок в $CoQH_2$ -цитохром *c*-редуктазе
- Бактериофаг
 - и белок оболочки 167, 168
 - транспорт ДНК 168, 169
- Бактериофеофитин 34, 44, 45, 49, 52, 53, 55, 57, 59, 66
- Бактериохлорофилл 34, 49, 50—56, 59, 60, 66
 - *a* 44
 - димер 44, 49, 52—55, 57, 61
 - фотоокисление кислородом 45, 55
- Барбитураты 81
- Белок
 - заякоривание в мембране 28, 29
 - ингибитор F_1 131, 135
 - киназы 116, 184, 196
 - латеральное движение в мембранах 30, 207, 208
 - процессинг 162, 163
 - Риске См. Негемовый железосерный белок в $CoQH_2$ -цитохром *c*-редуктазе
 - связывающий валин 167
 - — изолейцин 167
 - — лейцин 167
 - — мальтозу 167
 - сообщающий чувствительность к олигомицину 131
 - — митохондрий 162, 163
 - — хлоропластов 168

- транспорт через мембрану
- — бактерий 168, 169
- Бензойная кислота 41
- Бислойная мембрана См. Мембрана, плоский бислой
- Биотин 214
- Биоэнергетика
 - биотехнологические аспекты 246
 - определение 10
 - отношение к другим биологическим наукам 9
 - раковой клетки 242—244
 - эволюционные аспекты 22, 228
- Бифитонилглицерин 27
- Болезнь Хантингтона 242
- Бонгкрековая кислота 161, 180, 181
- Британский антильюзит 86
- Бурый жир 183—186, 192
- Буферы $\Delta\mu H$ 62, 74, 75
- Валиномицин 35, 123, 137, 146, 158, 160, 203
- Ванадат 123, 124, 126, 127, 236
- Викасол 192, 240
- Витамин А 117
- Витамин K_1 68
- Витамин K_3 См. Менадион
- Внешняя клеточная мембрана См. Плазмалемма
- Высокоэнергетическое соединение, определение 21
- Галактоза 25
- Галородопсин 113, 114, 229, 236
- Галотолерантная бактерия Ba_1 216, 234
- Галофилы 102, 106, 115, 229
- Ганглиозид 27
- Гексааминорутений 87
- Гексокиназа 27, 140, 195
- Гем b_h 60, 66—68, 72, 73, 78, 84, 87
- b_l 45, 60, 66—68, 72, 73, 78, 84, 86, 87
- хлориновый 95
- Гемоглобин 80, 206
- Генератор $\Delta\mu H$
 - внутреннее сопротивление 113
 - вторичный 118

— первичный 41, 117
 — соотношение переноса H^+ и e^- 120
 Гентамицин 245
 2-Гептил-4-оксихинолин-N-оксид
 (HQN O) 74, 86, 186, 214—216,
 224
 Гидрогеназа 98
 Гидрогенпероксидаза 193
 Гидроксиламин 100, 123, 127
 Гидрофобные ионы См. Липофиль-
 ные ионы
 Гипергликемия 243
 Гипернефрома 244
 Гипертиреонидное состояние 242
 Гипоксия 204
 Гипофиз 127
 Гистон 168
 Гликоген 187
 Гликолиз 97, 121, 129, 151, 180, 183,
 212, 232, 242, 243
 Гликолипидсульфат 107
 Гликолипиды 27
 Глицерин 27, 28, 184, 232
 Глутаконил-КоА 214
 Глутамат/аспартат-антипортер 193
 Глутатион 80
 Глюкоза
 — в ганглиозиде 25
 — как гликолитический субстрат 97,
 186
 — транспорт в *E. coli* 144
 — фотосинтез 137
 Глюкозо-6-фосфат 195, 236
 Гормоны, механизм действия 116
 Градиент концентрации ионов Na^+
 См. $\Delta\mu Na$
 Грамицидин D 158, 245
 Гуанозин 5'-дифосфат (ГДФ) 21, 79,
 116, 161
 Гуанозин-3', 5'-циклический моно-
 фосфат (цГМФ) 116
 Движение
 — бактерий 169
 — простейших 169
 — сперматозоидов 169
 Девесковинида 177, 178

Дезоксирибонуклеиновая кислота
 (ДНК)
 — биосинтез 243
 — — регуляция изменением рН 243
 — — роль K^+ 243
 — митохондриальная 84, 90
 — транспорт через бактериальные
 мембраны 168, 169
 Декарбоксилаза
 — глутаконил-КоА 214
 — α -кетоглутарата 161
 — метилмалонил-КоА 214, 223
 — Na^+ -зависимая 213—214, 227
 — оксалоацетата 213
 Дельта-эндотоксин 235
 Диазафлавин 98
 ДТ-диафараза 192
 Диафрагма (мышца) 203
 Диацилглицерин 195, 205, 232, 242
 N, N-Дибензил-N, N-диметиламмоний
 36
 Дибромтимохинон 74
 Дигидрофитол 107
 Дигидрофолатредуктаза 165, 166
 Дикумарол 192
 2,4-*p*-Динитрофенол 175, 180
 Дио-9 141
 1,3-Дифосфоглицерат 79
 3-(3,4-Дихлорфенил)-1,1-диметилмоче-
 вина (диурон) 68, 74, 203
 N,N-Дициклогексилкарбодиимид
 (ДЦКД), эффект на
 — K^+/H^+ -антипортер 194
 — Ca^{2+} -АТФазу 236
 — H^+ -АТФазу 226
 — — в плазмалемме растений и гри-
 бов 124
 — — в тонопласте 125
 — — в хромаффинной грануле 126
 — — у *Lactobacillus casei* 123
 — Na^+ -АТФазу 223, 226
 — Na^+/K^+ -АТФазу 218
 — Na^+ -АТФ-синтазу 226
 — вращение хлоропласта 176
 — H^+ -пирофосфат-синтазу 141
 — синтез АТФ при метаногенезе 98
 — термогенин 183
 — трансгидрогеназу 143

- фактор F_0 130, 135
- фактор F_1 130, 135
- фототаксис *Halobacterium halobium* 114
- цитохром *b* 86
- цитохромоксидазу 94
- Диэтилстилбестрол 124, 127, 134, 223, 226
- Доксорубицин *См.* Адриамицин
- Дыхательный контроль *См.* Протонный контроль
- Дыхательное фосфорилирование 76, 81, 160
- Дыхательная цепь
 - в фотосинтетических бактериях 95
 - источники восстановительных эквивалентов 77
 - митохондриальная 77, 94
 - Na^+ -зависимая 214—216
 - несопряженная *См.* Свободное дыхание
 - определение 76
 - превращение энергии 76
 - у гетеротрофных аэробных бактерий 95
- Железа двухвалентного ион как донор электронов 98, 99, 144
- Жирные кислоты
 - десатурация 206
 - десорбция гексокиназы с митохондрией 195
 - дикарбоновые 241
 - как терморегуляторные разобщители 186—188, 195
 - ковалентное связывание с белком 28, 49
 - β -окисление 77, 80, 152, 153, 182, 183
 - структура 23
 - транспорт 152—155
 - элонгация 206
- Жирный ацилкарнитин 153—155, 205
- Жирный ацил-*КоА* 153—155, 160, 180, 185, 195, 205
- синтаза 157

- Зеленые фотосинтезирующие бактерии
 - анаэробные 49
 - аэробные 49
- Зимняя спячка 186

Имидодифосфат 140

Инозиттрифосфат 116, 195

Инсулин 127, 219

Калий-транспортирующая система *A* (*TrkA*) 146, 148, 150

Кальция ион

- аккумуляция в митохондриях 146, 151, 194, 195, 205
- активация Na^+ -АТФазы 218
- активация фосфолипазы A_2 195
- активация фоторедокс-цепи 216
- в фототаксисе цианобактерий 39
- выброс из митохондрий 149, 205
- как вторичный посредник 195
- транспорт по гигантским митохондриям 205, 206

Канал натриевый 243

Канцероген 243

Канцерогенез, роль антипортера Na^+/H^+ 242

Карбоксиатрактилозид 159—161, 179

Кардиолипид 26, 89, 160, 242

Кардиомиопатия 241

Карнитин 152—156

Карнитин/жирный ацилкарнитин-антипортер 153

Каротиноидный сдвиг, электрохромный *См.* Измерение электрической разности потенциалов

Каротиноиды 35, 56, 107

Каталаза 194

α -Кетоглутарат 79, 161, 241

— дигидрогеназа 79, 242

Кластер FeS *См.* Негемовый железосерный белок

Колицин 245

Комплекс I *См.* НАДН-КоQ-редуктаза

Комплекс II *См.* Сукцинатдегидрогеназа

Комплекс III *См.* CoQH_2 -цитохром *c*-редуктаза
 Комплекс IV *См.* Цитохромоксидаза
 Комплекс bc_1 *См.* CoQH_2 -цитохром *c*-редуктаза
 Комплекс b_6f *См.* PQH_2 -пластоцианин-редуктаза
 Комплекс фотосинтетических реакционных центров (бактериальный)
 — аминокислотная последовательность 48, 49
 — в протеолипосомах 88
 — в системе протеолипосомы — коллоидная пленка 57
 — генерация $\Delta\bar{\mu}\text{H}$ 56, 57
 — кристаллизация 48
 — последовательность переноса электронов 55
 — расположение редокс-групп 52, 53
 — субъединичный состав 47, 48
 — трехмерная структура 50, 51
 Конъюгация бактерий 168
 Кортизон 190
 Коэнзим А (CoA) 78, 154, 156, 206
 Коэнзим Q (CoQ)
 — в бактериальной CoQH_2 -цитохром *c*-редуктазе 58—61
 — в дыхательной цепи 77, 86, 95, 99
 — в комплексе бактериальных фотосинтетических реакционных центров 53—56
 Коэнзим М 98
 CoQH_2 -Цитохром *c*-редуктаза
 — в бактериальной фоторедокс-цепи 60, 61, 121
 — в дыхательной цепи 58, 83
 — в протеолипосомах 83
 — в эмбриогенезе 244
 — процессинг субъединиц 166
 — расположение в мембране 85
 — редокс-центры 84
 — сердцевинные белки 84
 — субъединица, связывающая FeS_{III} 84—86
 — субъединица, связывающая цитохром *c* 84, 85
 — субъединичный состав 84
 — у *P. denitrificans* 85

— у *Thiobacillus ferrooxidans* 99
 Креатинфосфат 21, 212, 240
 — киназа 21
 Ксенобиотики, окисление 190
 β -Лактамаза 167
 Лактат 77, 79, 151, 158, 190, 211, 213, 224, 226
 — дегидрогеназа 163
 Лактат, H^+ -симпортер 150, 151
 Лактоза, H^+ -симпортер 158—160
 Лейкоцит, вспышка свободного дыхания 191
 Лидер-пептидаза 163, 165
 Лизосома 14, 122, 124, 128
 Лизофосфолипиды 195
 Липаза 185
 Липолиз 182
 Липолисахаридов транспорт 168
 Липопротеины 30
 Липосома 28
 Липофильные ионы 36, 56, 243
 Малат 77, 97, 193
 Малат-аспартат-глутаматный челнок 187, 192
 Малатдегидрогеназа 193
 Магния ион 44
 — унипорт в хлоропластах 195
 Медь 77, 89, 90, 92—94
 Мелибиоза 167
 Меллитин 166, 167
 Мембрана
 — внешняя клеток эукариот *См.* Плазмалемма
 — граница раздела как проводник H^+ 205
 — классификация 12
 — определение 12
 — плоский бислой 23, 27, 33, 36—38
 Менадион 192, 240
 Менахинон (MQ) 44, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 95, 215
 2-Меркаптоэтансульфонат *См.* Коэнзим М
 Метгемоглобин 80

Метан 98, 224
 Метаногенез 98, 223, 247
 Метиламин 41
 Метилмалонил-КоА 214, 222, 223
 Метилродамин (родамин-123) 39, 194, 201—205, 243
 Миелопероксидаза 191
 Микостерол 27
 Микросома *См.* Эндоплазматический ретикулум
 Микротрубочки 204, 205
 Миксотиазол 86
 Миопатия 240—242
 Митохондриальный ретикулум 200, 202, 206, 207, 212
 Митохондрия
 — биогенез 162—166
 — внешняя мембрана 13, 16
 — внутренняя мембрана 13
 — гигантская 200—203
 — движение 177
 — забуферивание $\Delta\bar{\mu}H$ 212
 — измерение $\Delta\phi$
 — — микроэлектродом 34
 — — синтетическими проникающими ионами 35
 — контакт 202, 203, 205
 — латеральный транспорт
 — — $\Delta\bar{\mu}H$ 204
 — — жирных кислот 206
 — — Ca^{2+} 205
 — — кислорода 205
 — набухание при мышечной работе 190
 — нитчатая 199, 203, 206
 — окраска родамином 40, 204
 — слияние мембран 167
 — содержание фосфолипидов 206
 — транспорт Ca^{2+} 205
 — форма 199
 Молибден 96
 Моненсин 158, 214, 221, 226, 246
 Мотор H^+ 16, 61, 139, 232, 233
 Муреин 30
 Муцидин 86

НАД *См.* Никотинамидадениндинуклеотид

НАДН-дегидрогеназа 80, 187, 208
 НАДН-КоQ-редуктаза
 — бактериальная 82, 83, 88, 96
 — в митохондриях 76, 81
 — в протеолипосомах 81
 — в раковых клетках, ингибирование 243
 — в хроматофорах 83
 — генерация $\Delta\bar{\mu}H$ 82, 120
 — гены 82
 — дефицит у человека 240
 — концентрация в митохондриальной мембране 94
 — обращение 144
 — отношение $H^+/\bar{\mu}$ 82
 — перенос электронов 82, 83
 — расположение в мембране 81
 — редокс-центры 80
 — состав субъединиц 81
 — у *Thiobacillus ferrooxidans* 99
 НАДН-цитохром b_5 редуктаза (Фл₅) 190
 НАДФ *См.* Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 НАДФН-адреноредоксинредуктаза 191
 НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза 190
 Надпочечник 126
 Невропатия 241
 Негемовое железо
 — в комплексе реакционных центров 48, 49, 56
 — в фотосистеме II 70
 Негемовые железосерные белки 45
 — в КоQH₂-цитохром *c*-редуктазе 46, 60, 77, 83, 84—86
 — в НАДН-КоQ-редуктазе 77, 80—83
 — в нециклической фоторедокс-цепи зеленых бактерий 66
 — в PQH₂-пластоцианинредуктазе 71—74, 87
 — в фотосистеме I 69
 — самоокисляющиеся 216, 217
 Нигерицин 158, 160, 194, 224, 242
 Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) 61, 77, 78, 141—144, 206

Никотинамидадениндинуклеотидфос-
 фат (НАДФ) 61, 62, 66, 67, 74,
 80, 81
 Нистатин 177
 Нитрат 125, 127
 — как окислитель редокс-цепи 96
 — редокс-потенциал 78, 96
 — редуктаза 96
 Нитрит 95, 97
p-Нитрофенол 40—42
 Норадrenalин 126, 180, 183—186
 Нуклеозиддифосфаткиназа 161
 Na^+/H^+ -Антипортер 151, 220, 221
 Na^+ -АТФаза *См.* АТФаза, Na^+
 Na^+ -Движущая сила (ΔS) 19
 Na^+ -Декарбоксилаза *См.* Декарбок-
 силаза Na^+ -зависимая
 Na^+/K^+ -градиент как буфер $\Delta\mu\text{H}$ 17,
 61, 209—211, 228, 229
 Na^+ -Контроль 31
 Na^+ , Метаболит-симпортеры 219—
 222, 224—226, 242
 Na^+ -Мотор 169, 170, 221, 225
 Na^+ -НАДН-мена (уби)хионредукта-
 за 214—216
 Na^+ , Пролин-симпортер 219
 Na^+ -Цикл 226—228, 232—235,
 246
 Обратный перенос электронов 63, 98,
 144, 145
 Ожирение 186
 Окаймленные гранулы 201
 Оксалоацетат 79, 97, 213
 Оксидаза D-аминокислот 194
 Оксинафтохинон 245
 Олигомицин 125, 134, 136, 141, 180,
 217
 Опухолевая клетка
 — регуляция pH 127, 243
 — Эрлиха *См.* Асцитная карцинома
 Эрлиха
 Осморегуляция 145
 Осмотическая работа, определение
 144
 Отношение P/O 100—102, 190
 Оубаин 217—219, 235

Пальмитоилкарнитин 155, 189, 241
 Паркинсонизм 192, 242
 Пастера эффект 179, 240
 Пероксисома 14, 193
 Пиранин 40
 Прицидин 77
 Пирофосфат неорганический ($\text{ФФ}_\text{н}$)
 22, 141, 161, 211
 Пирофосфат-синтаза, H^+ 34, 61,
 140—142, 211
 Пируват 77, 97, 213, 218, 240
 — дегидрогеназа 77, 219
 Плазматическая 199
 Плазмалемма 122, 124—125, 211, 231,
 232
 Плазмалоген 25
 Пластохинон 44, 67—70, 74, 190, 216
 Пластоцианин 66—69, 73, 87
 PQH₂-Пластоцианинредуктаза 68, 69,
 71—74, 88
 Плотный контакт 202
 Поглощение и освобождение H^+ ,
 быстрое измерение 40, 41
 Поджелудочная железа 127
 Потребление этанола, хронический
 эффект на митохондриях 241
 Промитохондрих 167
 Проникающие ионы, синтетические
См. Липофильные ионы
 Пропанол 186
 Пропионат 97, 214, 222, 223
 Пропионил-CoA 214, 223
 Протеинфосфатазы 196
 Протеолипид 132
 Протеолипосома
 — ассоциация с коллоидной плен-
 кой 33, 34
 — метод реконструкции 32
 — определение 32
 Протометр 114, 116, 169, 196, 197
 Протондвижущая сила (Δp) 19
 Протонный контроль 31, 81, 100, 136,
 140, 168, 179, 241
 Протонный цикл *См.* Хемосмотиче-
 ская теория
 Протонофор 93, 99, 123, 173, 179,
 196—204, 213—218, 221—224, 228,
 231

Пурпурные фотосинтезирующие бактерии 34, 49, 62, 66, 70

Разность рН (ΔpH) 20, 40, 41, 74, 75, 194, 209, 211, 212, 221, 226

Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$)

— в распределении мембранных белков 52

— в тилакоиде 75

— измерение 31—39

— — в отдельной клетке 39

— — в системе «мембранные пузырьки — мембранный фильтр» 34

— — в системе «протеолипосомы — коллодиевая пленка» 33, 34, 37, 56

— — микроэлектродом 34, 35, 125

— — по каротиноидному сдвигу 39, 40, 53, 56, 70

— — по распределению природных ионов 35, 36

— — синтетическими проникающими ионами 36—38

— определение 12

— превращение в ΔpH 194, 209, 211, 220

Разность электрохимических потенциалов

— ионов H^+

— — забуферивание 209—212

— — как конвертируемая энергетическая валюта 16, 17, 235

— — определение 16, 17

— — перенос 197, 198, 205, 206

— — у бактерий, как функция $\text{pH}_{\text{нар}}$ 226, 227

— ионов Na^+ ($\Delta\mu_{\text{Na}}$) 15, 16, 97, 144, 213, 214, 220, 222—225, 229—232

Разобшение терморегуляторное

— в буром жире 183—186

— в мышцах 179, 180

— в растениях 187, 188

Разобщитель *См.* Протонофор

Регуляция рН в цитоплазме 123, 124, 125, 128, 220, 221, 226—228

Редокс-петля 93, 228, 229

Репелленты 171—173, 196, 197

Редокс-цепь

— в анаэробных бактериях 95—98, 117

— дыхательная *См.* Дыхательная цепь

— фотосинтетическая *См.* Фоторедокс-цепь

Ретиналь 102, 106, 107, 109, 113, 117

Рибонуклеаза 168

Рибонуклеиновая кислота (РНК)

— информационная 169

— рибосомальная (5S) 229—231

Родамин 39, 40, 203, 243

Родамин-123 *См.* Метилродамин

Родопсин

— зрительный

— — аминокислотная последовательность 115

— — генерация $\Delta\psi$ 116

— — каскад цГМФ 116

— — расположение в мембране 115

— — фотоцикл 116

— сенсорный *См.* Сенсорный родопсин

Родохинон 98

Ростовые факторы 242

Ротенон 80, 81, 95, 102, 186, 187, 191, 203, 240

Салициловая кислота 41

Сафранин О 202

Сахароза/ H^+ -антипортер 150

Свободное дыхание 71, 179, 190—193

Секреторные пузырьки (гранулы) 121, 126, 232

Сенсорный родопсин галобактерий 114, 115, 196

Серотонин 127

Симбионты эукариот и прокариот

— движение 177

Симпортер Cl^- , H^+ 113

Симпортер H_2PO_4^- , H^+ 100, 137, 150, 151, 162, 194

Симпортер K^+ , H^+ 148, 210
 Симпортеры H^+ , метаболит 61, 121, 124, 150, 151, 220
 Синаптические пузырьки 127
 Синдром Рейе 242
 Синдром Фалькони 242
 Система расщепления воды хлоропластов и цианобактерий 67, 71
 Слизистая желудка 16, 127
 — — АТФаза, *См.* АТФаза, H^+/K^+
 Сквален 106
 Соотношение H^+/\bar{e}
 — в бактериальной циклической фоторедокс-цепи 87
 — в дыхательной цепи 102
 — в НАДН-КоQ-редуктазе 81, 82, 83, 95
 — в нециклической фоторедокс-цепи хлоропластов 68
 Соотношение H^+/O
 — в дыхательной цепи *E. coli* 118
 — в митохондриальной дыхательной цепи 94, 100
 Соотношение $H^+/АТФ$ 100, 101, 137, 138
 Сопрягающий ион 13, 14, 229, 230, 232
 Сперматозоид 200
 Специальная пара бактериохлорофилла *См.* Бактериохлорофилльный димер
 Спирохета 177
 Спироплазма 176
 Стероидные гормоны 196, 208
 Стероиды 27, 206
 Стрептомицин 245
 Субклеточные бактериальные пузырьки 32, 33, 123
 Субмитохондриальные пузырьки 34, 35, 84
 Сукцинат 79, 96, 101, 149, 222, 230
 — дегидрогеназа 76
 Сукцинил-КоА 222, 223
 Сульфит 134, 138
 Сульфолипиды 106
 Сфинголипиды 27
 Сфингомиелин 27

Таксис бактериальный 172, 197
 Термоацидофил 23
 Термогенез сократительный 182, 190, 191
 Термогенин 180—183
 Терморегуляторная функция $\Delta\bar{\mu}H$
См. Разобщение терморегуляторное
 Термофилы 20, 106, 246
 Термофильная бактерия PS3 89, 95
 Тетрабутиламмоний 36
 Тетраметил-*p*-фенилендиамин 214
 Тетрафенилборат 37—39
 Тетрафенилфосфоний 37—39, 214
 Тетрациклин 244
 Тилакоид 66, 74, 75, 212
 Тиосульфат 100
 Тиоцианат 187
 Тироидные гормоны 186, 193, 195
 Тонопласт 121, 125, 141, 232
 Трансгидрогеназа 17
 — в митохондриях 77, 141, 142
 — в протеолипосомах 141, 142
 — в системе «протеолипосомы — мембранный фильтр» 33
 — в хроматофорах 61, 141
 — метаболическая функция 143
 — механизм 142
 — определение 141
 — упаковка в мембране 143
 — энергетика 141
 Трансдуцин 116
 Трансформация генетическая 168
 Триметилолово 124
 Трифосфоинозит *См.* Инозиттрифосфат

Убихинон *См.* Коэнзим Q
 Умбеллиферон 40
 Унипорт K^+
 — в бактериях 219
 — в митохондриях 194
 — в хлоропластах 194

Фаг *См.* Бактериофаг
 Фактор окисления (фактор Слейте-

ра) *См.* Негемовый железосер-
 ный белок в $KoQH_2$ -цитохром с-
 редуктазе
 Фактор F_0 28, 32, 123
 — аминокислотная последователь-
 ность 131
 — ген 131
 — определение 131
 — проводимость для H^+ 135, 136,
 175, 210
 — процессинг субъединиц 162, 165
 — расположение в мембране 132—
 134
 — состав субъединиц 131
 — чувствительность к олигомицину
 136
 — эффект ДЦКД 123, 136
 Фактор F_1 28, 32, 145
 — аминокислотная последователь-
 ность 131
 — ген 131
 — гидролиз АТФ 134
 — ингибирование АТФ 134
 — каталитический центр 134
 — одноцентровый гидролиз АТФ 135,
 168
 — определение 130
 — отделение от мембраны 132
 — процессинг субъединиц 166
 — связывание нуклеотидов 134, 139
 — синтез связанного АТФ 135
 — состав субъединиц 121, 131, 132
 — трехмерная структура 133
 — эффект ДЦКД 136, 138
 Фактор F_6 132
 Фактор T_u 167
 Феназинметосульфат 70, 94
 о-Фенантролин 57, 71
 Фенилдикарбаундекаборан 36
 4-Фенил-N-метилпиридин 243
 Феофитин 66, 67, 70
 Ферредоксин 68, 69
 Ферредоксин-НАДФ $^{+}$ -редуктаза 68,
 69
 Ферроцианид 93
 Фитостерол 27
 Флавинадениндинуклеотид 65, 68
 Флавиномононуклеотид 65, 80, 81

Флавиновый цикл 83
 Флагелла
 — бактериальная 169, 170
 — эукариотическая 169
 Флагеллин 169, 221, 232
 Фобородопсин 114, 196
 Формиат 97, 218
 — дегидрогеназа 97
 Фосфатаза щелочная 284
 Фосфатидилглицерин 23, 26, 106
 Фосфатидилглицерофосфат 107
 Фосфатидилинозит 23, 26
 Фосфатидилинозит-5,6-дифосфат 26,
 195, 206
 Фосфатидилсерин 26
 Фосфатидилхолин 25, 26, 27
 Фосфатидилэтаноламин 26, 168
 Фосфат неорганический
 — — переносчик в митохондриях *См.*
 Симпортер- $H_2PO_4^-$, H^+
 Фосфат/3-фосфоглицерат-антипортер
 162
 Фосфатидная кислота 23
 3-Фосфоглицеральдегид 77
 2-Фосфоглицерат 20
 Фосфодиэстераза
 — специфичная к цГМФ 116
 Фосфолипаза 195, 241
 Фосфорилирование
 — дыхательное *См.* АТФ-синтаза,
 H^+
 — субстратное 16, 80, 98, 185, 222,
 232
 Фосфоенолпируват 17, 145
 — трансфераза 236
 Фотоллиз воды *См.* Система расщеп-
 ления воды
 Фоторецептор
 — диск 33, 116
 — клетка 116
 Фоторедокс-цепь
 — нециклическая
 — — в зеленых бактериях 62, 117
 — — в хлоропластах и цианобакте-
 риях 66, 87, 118
 — циклическая
 — — в пурпурных бактериях 34—45,
 117

— в хлоропластах и цианобактериях 66, 88

Фотосистема I 66, 68, 87

— в протеолипосомах 68

— локализация в ламеллах стромы 139

— механизм генерации $\Delta\bar{\mu}H$ 69, 70

— — переноса электронов 69

— регуляция 196, 197

— субъединичный состав 68

Фотосистема II 66, 70, 88, 216

— активация Na^+ (Ca^{2+}) 168

— в тилакоиде 139

— гомология с бактериальным реакционным центром 49, 71

— донор электронов Z 71

— и латеральный транспорт $\Delta\bar{\mu}H$ 198

— механизм генерации $\Delta\bar{\mu}H$ 71

— — переноса электронов 71

— регуляция 196, 197

— тетрафенилбор как донор электронов 39

Фототаксис 39

Фотофосфорилирование 62, 69, 74, 75, 137, 246

Фторид 140, 224

Фумарат 97

— в протеолипосоме 97

— редуктаза 97

— у *Wolinella succinogenes* 97

Фуникулозин 86

Хемиосмотическая теория 139, 153—155

Хинон 56, 194

Хлорида транспорт 14, 113, 114, 146, 147

Хлорная АТФаза См. АТФаза, Cl^- - m -Хлорокарбонилцианидфенилгидразон (ХКФ) 215, 217, 221—225

Хлоропласт

— внешняя мембрана 13, 124, 160

— вращение 175

— забуферивание $\Delta\bar{\mu}H$ 211

— измерение $\Delta\psi$ микроэлектродами 34

— каротиноидный сдвиг 39

— локальная ΔpH 139

— редокс-метр 196

— фоторедокс-цепь 66

— функции $\Delta\bar{\mu}H$ 60

Хлорофилл a_{680} 66

Хлорофилл a_{700} 66

Холерный токсин 221

Холестерин 25, 27, 177

Хроматофор 33, 39—41, 43, 56, 60—62, 140, 142, 212, 232, 246

Хромаффинные гранулы 126, 127, 150, 232

Цереброзид 27

Цианид 87, 93, 114, 187, 189

Цианин 203

Цианобактерии

— движение 175, 198

— измерение $\Delta\psi$

— — посредством микроэлектродов 35

— — — родамина 39

— латеральный перенос $\Delta\bar{\mu}H$ 198, 204

— микроплазматесмы 197, 204, 205

— производство биомассы 246

— протометр 196

— фоторедокс-цепь 66, 216

Цикл Кребса 28, 79, 96, 186

Цикл Q

— в дыхательной цепи 61, 77, 78

— в хлоропластах и цианобактериях 66, 74

— и протометр 196

— у *P. denitrificans* 86

— у фотосинтетических бактерий 60

Циклоз 176, 177

Цинк 86

Цирроз 241

Цитохалазин 176

Цитохром

— определение 44

— тетрагемовый c-типа 47, 53, 58, 62

— a_1 94, 95, 98

— a_2 94

— aa_3 См. Цитохромоксидаза

- *b* 45, 60, 66, 71, 76, 83, 86, 93, 98, 191, 242
- *b*₂ 163, 190
- *b*₅ 186, 187, 206, 207
- *b*₆ 66, 73, 84
- *b*₅₅₉ 70, 71
- *c* 20, 35, 46, 58, 83, 86, 89, 94, 98, 187, 192, 206, 240
- *c*₁ 45, 60, 66, 71, 83, 86, 88, 163, 166, 240
- *c*₂ 45, 46, 53, 61, 89
- *cd* 95
- *d* 95
- *f* 46, 66, 69, 73, 92
- *o* 61, 95, 158
- *P*-450 190, 191, 206

Цитохромоксидаза

- аминокислотная последовательность 88
- биосинтез 88, 195
- в протеолипосоме 32, 88, 89
- в системе «протеолипосома — мембранный фильтр» 33
- в цианобактериях 88
- дефицит у человека 241
- истощение по субъединице III 94
- как H⁺-помпа 94
- концентрация в митохондриальной мембране 206
- механизм Q-цикла См. Цикл Q
- определение 88
- отношение заряд/электрон 93
- связывание цитохрома с 28, 89—92
- соотношение H⁺/e⁻ 76, 94
- структура трехмерная 90—92
- субъединицы
 - биосинтез 89
 - состав 89, 90
 - транспорт 162—167
- редокс-потенциал 92
- редокс-центры 76, 89, 92
- у млекопитающих 89
- у *Nitrobacter agilis* 95
- у *P. denitrificans* 90, 95
- у *Rhodopseudomonas sphaeroides* 94
- у термофильных бактерий 90, 95

- у *Thiobacillus ferrooxidans* 94, 99
- у *Thiobacillus novellus* 95
- упаковка в мембране 89
- Цитрат 219
- Цитратный цикл См. Цикл Кребса

Черная мембрана См. Мембрана, плоский бислой

Черная субстанция 244

Щелевые контакты 202, 203

Эволюционные аспекты биоэнергетики См. Биоэнергетика, эволюционные аспекты

Электронный парамагнитный резонанс 80, 83

Эндоплазматический ретикулум 14, 122, 190, 205, 207, 208

Эндосома 122, 124, 128

Энцефаломиопатия 242

Энцефалопатия 242

N-Этилмалемид 126, 141, 160, 190, 210

Этилродамин 39, 198, 202, 203, 243

Ядро 14, 169, 195

Acidoaminococcus fermentans 214

Acinebacter calcoaceticus 39

Bacillus alcalophilus 221, 227

— *firmus* 222

— *subtilis* 169

— *turningiensis* 235

— YN-1, алкалофильная 222

Bdellovibrio bacteriovorus 161, 172

Caldariella acidophila 27

Candida albicans 204

Chara 176

Chlorobium 64, 231

Chromatium vinosum 43, 231

Clostridium pasteurianum 48, 123
— *sympiosum* 214

Eimeria tenella 245
Endomyces magnussii 204
Entamoeba histolytica 245
Escherichia coli
— АТФаза, K^{+} 35, 146, 235
— АТФ-синтаза, H^{+} 131
— буфер $\Delta\mu H$ 210
— выброс тетрациклина 244
— гомеостаз внутриклеточного pH 220
— движение теней 179
— колицин 245
— муреиновый липопrotein 30
— НАДН-КоQ-редуктаза 81, 95
— нитратредуктаза 83
— осморегуляция 145
— отношение H^{+} /АТФ 124
— отношение H^{+}/e 95
— отношение H^{+}/O 119
— пролин, Na^{+} -симпортер 219, 229
— регуляция клеточного деления 197
— структура базального тела 171
— трансгидрогеназа 143
— транспорт растворимых веществ 144, 158, 229
— F_0 128, 136
— F_1 128
— фаговая инфекция 168
— флагеллярный мотор 169, 170
— цитохром *d* 95
— цитохром *o* 95

Flexibacter 175
Fusobacterium nucleatum 214

Haemophilus influenzae 169
Halobacterium halobium 102, 106,
113—115, 196, 198, 210, 219, 236

Klebsiella aerogenes 213, 214
— *pneumoniae* 214

Lactobacillus casei 123, 124, 125, 130
Leishmania donovani 200

Methanobacterium thermoautotrophicum 148, 223
Methanococcus volta 224, 226
Mixotricha paradoxa 177
Mycobacterium phlei 190, 219

Neurospora 125, 166
Nitella 203
Nitrobacter 95, 100, 119
Nitrosomonas europae 100, 119

Oscillatoria brevis 202, 216, 247

Paracoccus denitrificans 82, 83, 85,
89, 95, 96, 118, 119
Peptococcus aerogenes 214
Phormidium uncinatum 175, 198, 204,
210
Plasmodium lophurae 245
— *vivax* 245
Polytomella agilis 200, 201
Propionigenium modestum 213, 217,
222, 223, 226, 227, 229, 234
Pseudomonas stutzeri 216
 ΔpK 209—211, 217, 222, 235, 236
 ΔpNa 151, 209—211, 217—220, 224

Reticulum mitochondriale См. Митохондрияльный ретикулум
Rhodopseudomonas sphaeroides 43,
61, 88, 95, 118
— *viridis* 43, 47, 48, 51—56, 58, 118
Rhodospirillum rubrum 43, 47, 61, 89,
118, 136, 140, 143, 144, 172, 211
Rickettsia prowazekii 161

Salmonella typhimurium 170, 172, 214,
219, 227
Spirulina 247
Streptococcus 230
— *cremoris* 151
— *faecalis* 123, 130, 151, 216, 217,
227, 234

— *pneumoniae* 245
Synechococcus 176

Tenebrio molitor 153

Thermus thermophilus 90

Thiobacillus ferrooxidans 98, 99, 100,
117, 199, 144

— *novellus* 95

Veilonella alcalensis 214, 232, 246

Vibrio alginolyticus

— — АТФ-синтаза, Na^+ 226

— — Na^+ -зависимая дыхательная
цепь 214—217, 234

— — (Na^+ -метаболит)-симпортеры
219

— — Na^+ -мотор 169, 221, 222, 234

— — Na^+ -сопряженное окислительное
фосфорилирование 224—226, 233

— — Na^+ -цикл 226, 227, 230, 234, 235

— — H^+ -энергетика 232

— *cholerae* 215, 222, 245

— *costicola* 214, 215

— *parahaemolyticus* 216, 245

Wolinella succinogenes 97

Именной указатель

Абдулаев Н. Г. 103
Ави-Дор Я. (Avi-Dor Y.) 216
Адлер Дж. (Adler J.) 171—173
Алим М.И.Г. (Alleem M.I.H.) 99
Антоненко Ю. А. 243
Ануин П. Н. (Unwin P. N.) 105, 108
Арчаков А. И. 207
Асадов А. А. 55

Бакеева Л. Е. 202
Балчевски М. (Baltscheffsky M.) 140, 143
Белицер В. Н. 101
Берг Г. (Berg H.) 172—174
Бертон М. (Burton M.) 200, 201
Бланкеншип Р. Е. (Blankenship R. E.) 67
Бликс А. (Blix A.) 183
Боекема Э. Дж. (Boekema E. J.) 133
Бойер П. (Boyer P.) 135
Боумэн Э. (Bowman E.) 126
Бремер Б. (Bremer B.) 169
Броди А. Ф. (Brodie A. F.) 190, 219
Броун И. И. 247
Бубенцер Г. Д. (Bubenzer H. J.) 202
Букель Н. (Buckel N.) 246
Булычев А. А. 35

Верле Дж. П. (Wehrle J. P.) 152
Виноградов А. Д. 134, 139
Войников В. К. 188

Вольфарт Г. (Wohlfarth G.) 246
Вуд П. М. (Wood P. M.) 88
Выгодина Т. В. 181

Гаррахан П. (Garrahan P.) 222
Глин И. (Glynn I.) 222
Гофер А. (Gopher A.) 87
Грав Г. (Grav H.) 183
Грингат С. (Greengut S.) 207
Гутман М. (Gutman M.) 87

Дайзенхофер Дж. (Deisenhofer J.) 48, 53, 54
Даниэльсон Л. (Danielson L.) 141
Дель Кастилло Дж. (Del Castillo J.) 218
Джонсон М. А. (Johnson M. A.) 241
Дибров П. А. 221
Димрот П. (Dimroth P.) 213, 222, 223
Драчев В. А. 205
Драчев Л. А. 38, 108, 109
Драчева С. М. 57
Дьюэл Д. (Duel D.) 86

Зиберт Ф. (Siebert F.) 113
Зоров Д. Б. 39, 203

Йоханссон Б. (Johansson B.) 183

Кабак Г. Р. (Kaback H. R.) 160

- Кагава Я. (Kagawa Y.) 32, 135, 137
 Каденбах Б. (Kadenbach B.) 92
 Капальди Р. (Capaldi R.) 240
 Каплан Н. (Kaplan N.) 141
 Каулен А. Д. 109
 Киношита Н. (Kinoshita N.) 217
 Кларк Д. Дж. (Clarke D. J.) 123
 Кливленд Л. Р. (Cleveland L. R.) 177
 Клингенберг М. (Klingenberg M.) 160
 Кодама Т. (Kodama T.) 216
 Коловик С. (Colowick S.) 141
 Константинов А. А. 86—88, 94
 Корана Х. Г. (Khorana H. G.) 103, 106, 112
 Костырко В. А. 216
 Козн Г. Н. (Cohen G. N.) 158
 Крамер В. А. (Cramer W. A.) 73
 Кун Н. (Kuhn N.) 92
- Лабедан Б. (Labedan B.) 169
 Ланкастер Дж. Р. (Lancaster J. R.) 224
 Ларди Г. (Lardy H.) 181
 Левицкий Д. О. 155
 Ленинджер А. Л. (Lehninger A. L.) 186, 240, 244
 Леонард К. (Leonard K.) 85, 86
 Либерман Е. А. 37, 142
 Люфт Р. (Luft R.) 241
- Марголис Л. Б. 243
 Маслов С. П. 179
 Мейсель М. Н. 204
 Меррил С. Р. (Merril S. R.) 241
 Мильгром Я. М. 134
 Митчелл П. (Mitchell P.) 19, 58, 61, 81, 87, 93, 94, 142, 155, 158, 171, 209
 Михель Х. (Michel H.) 48
 Моценок Е. Х. 176
 Мур Дж. (Moore J.) 200, 201
 Мураталиев М. Б. 134
- Набиев И. Р. 105
 Никольс Д. (Nicholls D.) 30, 186, 193
 Никольс П. (Nicholls P.) 32
 Нирен Р. (Nyren R.) 140
 Нойперт В. (Neupert W.) 140
- Овчинников Ю. А. 103, 105, 112, 115, 131, 217
 Ониши Т. (Ohnishi T.) 91
 Остерхельт Д. (Oesterhelt D.) 102, 107
- Панде С. (Pande S.) 156
 Пападимитриу А. (Papadimitriou A.) 240
 Парвин Р. (Parvin R.) 156
 Педерсен П. Л. (Pedersen P. L.) 152
 Перски Г. (Perski H.) 223, 224
 Прессмэн Б. (Pressman B.) 181
 Принс Р. С. (Prince R. C.) 67
 Провербио Ф. (Proverbio F.) 218
 Пфаннер Н. (Pfanner N.) 168
 Пфениг Н. (Pfennig N.) 222
- Ракер Э. (Racker E.) 32, 35, 82, 132, 133, 137
 Рамсей Р. (Ramsay R.) 156
 Рикенберг Г. (Rickenberg H.) 158
 Розен Б. (Rosen B.) 230
 Розовская И. А. 243
 Роттенберг Г. (Rottenberg H.) 160
 Ротуэлл Н. (Rothwell N.) 186
 Роузман М. (Roseman M.) 207
 Рууге Э. К. 88
- Саламма Ф. Р. (Salamma F. R.) 89
 Сампер М. (Sumper M.) 206
 Самуилов В. Д. 64
 Сарасте М. (Saraste M.) 92
 Северина И. И. 39
 Сигман Д. (Sigman D.) 135
 Скоу И. (Skou J.) 217
 Смирнова И. А. 216
 Смит Р. Э. (Smith R. E.) 183
 Смит С. О. (Smith S. O.) 108

Сток М. (Stock M.) 186
Стокениус В. (Stoeckenius W.) 102,
107, 137

Таббос П. (Tubbs P.) 156
Тамм С. Л. (Tamm S. L.) 177
Танака К. (Tanaka K.) 204
Танигуси С. (Taniguchi S.) 216
Титер Р. (Teather R. M.) 158
Тихонова Г. В. 99
Токуда Х. (Tokuda H.) 215
Торн М. (Thorn M.) 86
Триссл Г. В. (Trissl H. W.) 56
Тройбле Г. (Träuble H.) 206

Унемото Т. (Unemoto T.) 214, 215
Уолдегиоргис Дж. (Woldegiorgis G.)
161
Уотербери Дж. (Waterbury J.) 175
Уэст И. (West I.) 158, 209

Фелдмэн Р. (Feldman R.) 135
Феррис Ф. Дж. (Ferris F. G.) 222
Фишер Р. (Fisher R.) 143
Фойсснер Л. (Foissner L.) 203
Френкель Г. (Fraenkel G.) 154
Фридмэн С. (Freedman S.) 154

Хамаиде Ф. (Hamaide F.) 215
Харольд Ф. М. (Harold F. M.) 123,
216

Харрингтон М. (Harrington M.) 241
Хатефи Я. (Hatefy Y.) 143
Хендерсон Р. (Henderson R.) 85, 103,
105
Хесс Б. (Hess B.) 113
Хильперт В. (Hilpert W.) 223
Хифнер Д. (Heefner D.) 216
Хэдер Д. (Häder D.) 35

Цофина Л. М. 181
Цыбакова Е. Т. 101

Чанс Б. (Chance B.) 240
Чен Л. Б. (Chen L. B.) 39, 194, 203,
243
Ченцов Ю. С. 202
Чумаков К. М. 230, 231

Шац Г. (Schatz G.) 82, 165, 168
Шенхайт П. (Schönheit P.) 223, 224
Шинк Б. (Schink B.) 222
Шувалов В. А. 54, 55

Эйзенбах М. (Eisenbach M.) 173
Энгельгардт В. А. 76, 189
Эрнстер Л. (Ernster L.) 141, 241

Юнг Л. Д. (Young L. D.) 245

Оглавление

Список принятых сокращений	5
От автора	7
Введение	8
 Глава 1. Основные понятия мембранной биоэнергетики	 12
1.1. Мембраны с точки зрения биоэнергетики	12
1.2. Сопрягающие ионы	13
1.3. Конвертируемые энергетические «валюты» живой клетки	16
1.4. Разность электрохимических потенциалов ионов H^+ и Na^+ ($\Delta\mu\bar{H}$ и $\Delta\mu\bar{Na}$)	18
1.5. Аденозинтрифосфат	20
1.6. Липидный компонент биомембран	23
1.7. Липидный бислой	27
1.8. Мембранные белки	28
 Глава 2. Специфические методы мембранной биоэнергетики	 31
2.1. Измерение мембранного потенциала ($\Delta\psi$)	31
2.1.1. Протеолипосомы	32
2.1.2. Прямое измерение генерации $\Delta\psi$ протеолипосомами, сорбированными на коллодиевой пленке	33
2.1.3. Измерение $\Delta\psi$ в интактных клетках и органеллах	34
2.2. Измерение быстрых процессов протонирования — депротонирования	41
 Глава 3. Первичные $\Delta\mu\bar{H}$ -генераторы	 43
3.1. Циклическая светозависимая редокс-цепь фотосинтезирующих бактерий	43
3.1.1. Основные компоненты и принцип их действия	43
3.1.2. Комплекс реакционных центров	47
3.1.3. КоQ-Цитохром с-редуктаза	58
3.1.4. Пути использования $\Delta\mu\bar{H}$, образованной циклической редокс-цепью	61
3.2. Нециклическая светозависимая редокс-цепь зеленых бактерий	62

3.3. Нециклическая светозависимая редокс-цепь хлоропластов и цианобактерий	66
3.3.1. Принцип действия	66
3.3.2. Фотосистема I.	68
3.3.3. Фотосистема II.	70
3.3.4. PQH_2 -Пластоцианин-редуктаза	71
3.3.5. Судьба $\Delta\bar{\mu}H$, образованной фотосинтетической редокс-цепью хлоропластов	74
3.4. Дыхательная цепь	76
3.4.1. Принцип действия	76
3.4.2. Источники восстановительных эквивалентов	77
3.4.3. НАДН-КоQ-Редуктаза	80
3.4.4. $CoQH_2$ -Цитохром c-редуктаза	83
3.4.5. Цитохромоксидаза	88
3.4.6. Укороченные дыхательные цепи, генерирующие $\Delta\bar{\mu}H$	95
3.4.7. Пути и эффективность использования $\Delta\bar{\mu}H$, образуемой дыхательной цепью. Отношение P/O	100
3.5. Бактериородопсин	102
3.5.1. Принцип действия	102
3.5.2. Структура бактериородопсина	103
3.5.3. Липиды бактериородопсиновых бляшек	106
3.5.4. Фотоцикл бактериородопсина	107
3.5.5. Светозависимый транспорт протонов бактериородопсином	109
3.5.6. Другие ретиналь-содержащие белки	113
3.6. Первичные $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы: заключение	117
 Глава 4. H^+ -АТФазы — вторичные $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторы	121
4.1. Определение и классификация	121
4.2. H^+ -АТФаза облигатно анаэробных бактерий	123
4.3. H^+ -АТФаза внешней клеточной мембраны растений и грибов	124
4.4. H^+ -АТФаза тонопласта	125
4.5. Немитохондриальные H^+ -АТФазы клеток животных	126
4.5.1. H^+ -АТФаза хромаффинных гранул	126
4.5.2. Другие H^+ -АТФазы	127
4.5.3. H^+/K^+ -АТФаза слизистой желудка	127
4.6. Соотношение функций H^+ -АТФаз	128
 Глава 5. Потребители $\Delta\bar{\mu}H$	130
5.1. Химическая работа за счет $\Delta\bar{\mu}H$	130
5.1.1. H^+ -АТФ-Синтаза	130
5.1.2. H^+ -Пирофосфат-синтаза	140
5.1.3. H^+ -Трансгидрогеназа	141
5.2. Осмотическая работа за счет $\Delta\bar{\mu}H$	144
5.2.1. Определение и классификация	144
5.2.2. $\Delta\psi$ как движущая сила	146
5.2.3. ΔpH как движущая сила	148
5.2.4. Общая $\Delta\bar{\mu}H$ как движущая сила	150
5.2.5. $\Delta\bar{\mu}H$ -Зависимые транспортные каскады	151
5.2.6. Карнитин как пример трансмембранного переносчика химической группировки	152
5.2.7. Некоторые примеры $\Delta\bar{\mu}H$ -зависимых белков-переносчиков	157
	269

5.2.8. Роль $\Delta\bar{\mu}H$ в транспорте макромолекул	162
5.3. Механическая работа за счет $\Delta\bar{\mu}H$: движение бактерий	169
5.3.1. Структура флагеллярного мотора бактерий	170
5.3.2. $\Delta\bar{\mu}H$ вращает ротор флагеллярного мотора	171
5.3.3. Возможный механизм H^+ -мотора	173
5.3.4. $\Delta\bar{\mu}H$ -Зависимая подвижность прокариот, не содержащих флагелл и внутриклеточных органелл	175
5.3.5. Подвижные симбионты эукариот и прокариот	177
5.4. $\Delta\bar{\mu}H$ как источник энергии для образования теплоты	178
5.4.1. Три способа превращения метаболической энергии в теплоту	178
5.4.2. Терморегуляторная активация свободного дыхания у животных	179
5.4.3. Терморегуляторная активация свободного окисления у растений	187
Глава 6. Регуляция, транспорт и стабилизация протонного потенциала . .	189
6.1. Регуляция $\Delta\bar{\mu}H$	189
6.1.1. Альтернативные функции дыхания	189
6.1.2. Регуляция потоков восстановительных эквивалентов между цитозолем и митохондриями	192
6.1.3. Взаимопревращение $\Delta\psi$ и ΔpH	194
6.1.4. Отношение системы контроля $\Delta\bar{\mu}H$ к основным регуляторным механизмам эукариот	195
6.1.5. Контроль $\Delta\bar{\mu}H$ у бактерий	196
6.2. Транспорт энергии вдоль мембран в форме $\Delta\bar{\mu}H$	197
6.2.1. Общие положения	197
6.2.2. Перенос $\Delta\bar{\mu}H$, образуемой светозависимыми $\Delta\bar{\mu}H$ генераторами, вдоль мембран галобактерий и хлоропластов	198
6.2.3. Трансклеточный перенос энергии в трихомах цианобактерий	198
6.2.4. Структура и свойства нитчатых митохондрий и митохондриального ретикулума	199
6.3. $\Delta\bar{\mu}H$ -Буферы	208
6.3.1. Градиенты Na^+ и K^+ как $\Delta\bar{\mu}H$ -буфер у бактерий	208
6.3.2. Другие системы стабилизации $\Delta\bar{\mu}H$	211
Глава 7. Натриевый мир	213
7.1. Генераторы $\Delta\bar{\mu}Na$	213
7.1.1. Декарбоксилазы, транспортирующие Na^+	213
7.1.2. Na^+ -Транспортирующая дыхательная цепь	214
7.1.3. Na^+ -Транспортирующие АТФазы	216
7.2. Утилизация $\Delta\bar{\mu}Na$, образуемой первичными $\Delta\bar{\mu}H$ -генераторами	219
7.2.1. Осмотическая работа	219
7.2.2. Механическая работа	221
7.2.3. Химическая работа	222
7.3. Как часто используется Na^+ -цикл живыми клетками?	226
7.4. Возможные эволюционные отношения между протонным и натриевым миром	228
7.5. Общая схема соотношений протонного и натриевого циклов	232
7.6. Превращение энергии в биомембранах без участия H^+ и Na^+	235

Глава 8. Некоторые итоги и перспективы мембранной биоэнергетики (заключение)	237
8.1. Фундаментальные исследования	237
8.2. На пути к прикладной биоэнергетике	240
8.2.1. Медицинские аспекты	240
8.2.2. Два примера возможного технологического применения мембранной биоэнергетики	246
Рекомендуемая литература	249
Предметный указатель	250
Именной указатель	265

Учебное издание

Скулачев Владимир Петрович

**БИОЭНЕРГЕТИКА.
МЕМБРАННЫЕ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛИ ЭНЕРГИИ**

Редактор *А. С. Орлова*
Младшие редакторы *Е. В. Бурова, Е. И. Попова*
Художник *В. Н. Хомяков*
Художественный редактор *Т. А. Коленкова*
Технический редактор *Г. А. Виноградова*
Корректор *С. К. Завьялова*

ИБ № 7781

Изд. № Е—597. Сдано в набор 23.03.89. Подп. в печать 24.08.89. Т—16319.
Формат 60×90^{1/16}. Бум. кн.-журн. Гарнитура литературная. Печать высокая.
Объем 17,00 усл. печ. л. 17,00 усл. кр.-отт. 18,15 уч.-изд. л. Тираж 5000 экз.
Зак. № 1346. Цена 90 коп.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул.,
д. 29/14.

Московская типография № 8 Государственного комитета СССР по печати,
103898, Москва, Центр, Хохловский пер., 7.

**Биохимия мембран: Учеб. пособ. для биол. и мед.-
Б63 биол. спец. вузов/Под ред. А. А. Болдырева. Кн. 6.
В. П. Скулачев. Биоэнергетика. Мембранные преобразо-
ватели энергии. — М.: Высш. шк., 1989. — 271 с.: ил.**

ISBN 5-06-000467-8

Книга продолжает серию, посвященную изложению современного состояния биохимии мембран. В ней рассмотрено соотношение протонного потенциала и АТФ. Даны представления о белках-генераторах протонного потенциала: дыхательных ферментах, бактериородопсине и ферментах фотосинтетических редокс-цепей. Описаны проблемы механизма действия H^+ -АТФ-синтазы и пространственной организации мембранной энергетики клетки. Приведены новейшие данные по «натриевой энергетике» бактерий. Рассмотрены эволюционный и регуляторный аспекты мембранной энергетики.

**Б 1903010000(4309000000)—484 КБ—48—21—88
001(01)—89**

**ББК 28.05
57.04**