

Активный транспорт



§ 1. Натрий-калиевый насос

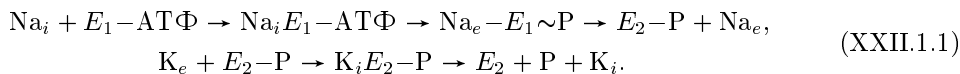
Существование градиентов концентрации Na, K и Ca между внутри- и внеклеточной средой — основное условие поддержания потенциала покоя [см. (XIX.2.10)] и электрической возбудимости нервных и мышечных клеток. Ионы, способные проникать через мембрану, могут накапливаться в клетке или вытесняться из нее в соответствии с градиентом мембранного электрохимического потенциала. Так, несмотря на существование значительного градиента концентрации K^+ между клетками и средой, эти ионы находятся почти в равновесии. Градиент концентрации и градиент потенциала направлены в противоположные стороны.

∇ Распределение Na значительно отличается от равновесного: оба компонента пассивного потока — по градиенту концентрации и в направлении электрического поля — направлены внутрь клетки. Для поддержания низкого неравновесного уровня концентрации Na^+ в клетке необходим механизм активного выведения в среду. Такого рода системы активного транспорта обеспечивают перенос ионов против градиента электрохимического потенциала за счет энергии АТФ (Na^+ -насос плазматических мембран, Ca^{2+} -насос мембран саркоплазматического ретикулума; см. гл. XXV) или энергии окислительно-восстановительных реакций (H^+ -насос митохондрий, хлоропластов и других энергосопрягающих мембран; см. гл. XXIV). Активный транспорт Na^+ в нервных клетках осуществляется Na^+ , K^+ -АТФазой, локализованной в плазматических мембранах. □

Первые успехи в исследовании Na^+ , K^+ -АТФазы принадлежат Дж. С. Скоу (1957). Он изучал расщепление АТФ в препаратах мембран из нервов краба и показал, что гидролиз значительной части АТФ зависит от совместного действия ионов Na и K. Стимулируемая ионами Na^+ и K^+ -АТФазная активность подавляется убаином. Повышение концентрации убаина оказывало одинаковое подавляющее действие как на транспорт Na^+ , так и на активность АТФазы. Результаты количественных измерений показали, что при гидролизе одной молекулы АТФ происходит транспорт двух ионов K внутрь клетки и выведение трех (иногда двух) ионов Na из клетки. Таким образом, сложилось представление, что Na^+ -насос представляет собой локализованную в плазматической мембране клетки ферментную систему, осуществляющую перенос Na^+ из клетки во внеклеточную среду, а K^+ — в обратном направлении. Насос транспортирует ионы Na против градиентов электрохимических потенциалов за счет сопряжения ионообменных процессов с гидролитическим расщеплением АТФ Mg^{2+} -зависимой Na^+ , K^+ -стимулируемой АТФазой.

Na^+ , K^+ -АТФаза-фермент состоит из двух полипептидных цепей с молекулярной массой 84 000 и 5700, которые формируют большую и малую субъединицы фермента. Белок прочно связан с фосфолипидами, полное удаление которых из мембран приводит к исчезновению АТФазной активности.

Схема работы насоса предполагает последовательное протекание нескольких реакций в средах разного ионного состава в присутствии Mg^{2+} и АТФ с участием белка — фермента в двух состояниях E_1 и E_2 .



На внутренней стороне мембраны в присутствии Na^+ и Mg -АТФ происходит фосфорилирование белка. В ходе реакции освобождается АДФ. В результате фосфорилирования конформация белка изменяется таким образом, что обеспечивается переход Na^+ на внешнюю поверхность мембраны Na_e , а белок переходит в состояние $E_2 - \text{P}$. На следующей стадии изменяется сродство фермента к ионам K и Na , так что связывается K_e^+ . Затем K^+ переносится внутрь, а белок $E_2 - \text{P}$ дефосфорилируется и возвращается к исходному конформационному состоянию. Конформационные изменения АТФазы сопровождаются переносом K^+ и Na^+ в разных направлениях.

Ионофорные центры связывания K^+ и Na^+ удалены в белке от каталитического центра фермента. В этом центре за счет энергии гидролиза АТФ индуцируются конформационные переходы между состояниями E_1 и E_2 всего белка, в которых АТФаза обладает разным сродством к K^+ и Na^+ . Таким образом все компоненты функционируют в согласованном кооперативном режиме.

На рис. XXII.1 показана схема организации активного центра Na^+ , K^+ -АТФазы. Как видно, молекула АТФ ($\text{Ad}-\text{R}-\text{P}_\alpha-\text{P}_\beta-\text{P}_\gamma$) расположена оптимально для переноса P_γ фосфатного остатка на белковый домен и фосфорилирование аспартат-369. Перенос P_γ на аспартат-369 обеспечивается лизином, который образует дополнительные стабилизирующие контакты с кислородом остатка P_γ . Конформационный переход $E_1 \rightarrow E_2$ связан с взаимодействием в области каталитического центра пептидных участков 145–285 и 342–779.

Отличительной особенностью Na^+ , K^+ -АТФазы по сравнению с независимой АТФ-синтетазой (гл. XXIV) является наличие в ней промежуточных фосфорилированных форм фермента $E_1 - \text{P}$, $E_2 - \text{P}$.

Помимо гидролиза АТФ в Na^+ , K^+ -АТФазе происходит также гидролиз связи между карбоксильной группой аспартат-369 и P_γ -фосфатным остатком (асп₃₆₉–CO–O–H₂PO₃).

Конкретный механизм трансформации энергии, необходимой для транспорта ионов и конформационных перестроек $E_1 \rightleftharpoons E_2$ в белке, основан на представлениях о перегруппировке атомов, которые образуют эфирные связи соответственно между атомами фосфора P_γ и кислорода в АТФ и в аспартат + β -карбоксил-фосфатном производном белка.

Различные модели должны учитывать электростатические взаимодействия положительно заряженных атомов фосфора, а также зависимость энергии связей от их углов и длин в разных атомных конфигурациях. Так, при длине связи между кислородом и P_γ -атомом в АТФ 0,168 нм энергия связи составляет 400 кДж/моль.

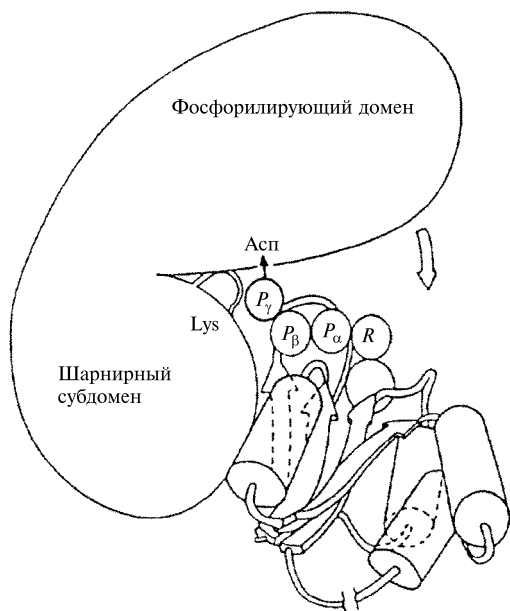


Рис. XXII.1.

Схематическое изображение структуры каталитического центра Na^+ , K^+ -АТФазы. Показано расположение молекулы АТФ ($\text{Ad}-\text{R}-\text{P}_\alpha-\text{P}_\beta-\text{P}_\gamma$) между нуклеотид-связывающим доменом (α -спирали изображены в виде цилиндров, а β -структуры — в виде изогнутых стрелок) и фосфорилирующим доменом. Перенос фосфата на аспарат фосфорилирующего домена предположительно сопровождается смещением шарнирного домена (по W. R. Taylor, N. M. Green, 1989).

При увеличении длины связи ее энергия связи уменьшается, что облегчает ее разрыв при гидролизе. Предполагается (Репке, 1992), что в карбоксил-фосфорилированном производном происходит изменение числа и перегруппировка кислородных лигандов из пленарной конфигурации в пирамидальную. В пирамидальной конфигурации атом фосфора находится в центре треугольника (рис. XXII.2), образованного на плоскости тремя атомами кислорода (штриховые линии). Два других атома кислорода находятся вне плоскости и образуют более слабые связи, которые легко разрываются, что необходимо для реакций фосфорилирование/дефосфорилирование.

На рис. XXII.2 приведена гипотетическая схема гидролиза АТФ Na^+ , K^+ -АТФазой, соотнесенного с переносом ионов. Вначале происходит фосфорилирование β -аспарагинкарбоксилата в белке E_1 фосфорным остатком P_γ молекулы АТФ. Координационные связи Mg^{2+} (стадия 2) изменяют углы связи $\text{O}-\text{P}-\text{O}$ до 90° , так что одна из $\text{P}-\text{O}$ связей выходит из плоскости, удлиняется и становится слабее.

Перегруппировка кислородных лигандов на стадии $2 \rightarrow 3$ облегчает отрыв АДФ и образование макроэргической связи (стадия 4). Образованный комплекс $\text{Na}_e-E_1 \sim \text{P}$ выносит Na наружу.

Аналогичное образование внеплоскостной слабой $\text{P}-\text{O}$ связи с карбоксилком происходит и на стадии $5 \rightarrow 6$ в белке в состоянии E_2 . Тем самым облегчается последующее дефосфорилирование $E_2 \rightarrow \text{P}$ на стадиях 6, 7, сопряженное с трансмембранным переносом $\text{K}_e^+ \rightarrow \text{K}_I^+$ и возвращением белка в исходное состояние E_1 .

Выброс трех моль Na^+ требует энергии около 19 кДж при нормальных физиологических условиях, а энергия, освобождающаяся при гидролизе макроэргической связи в комплексе $\text{Na}_1 E_1$ АТФ составляет 24 кДж/моль. Транспорт двух моль K^+

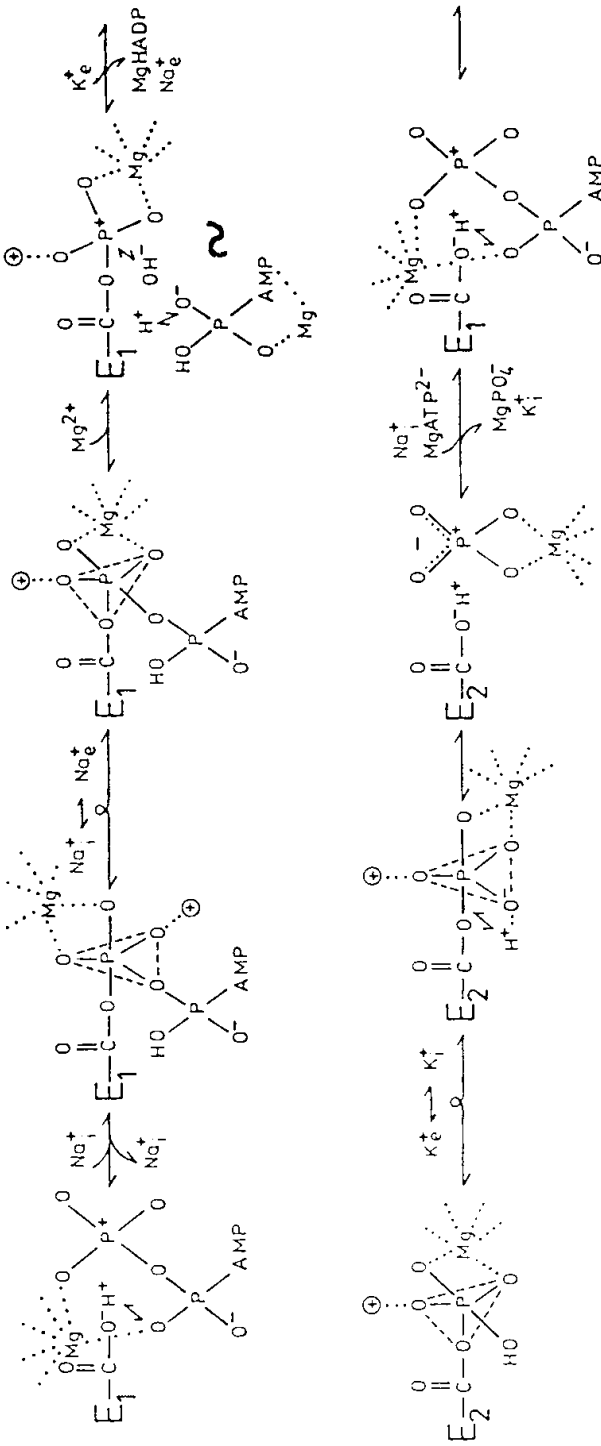
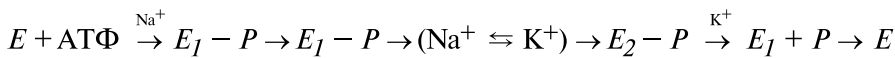
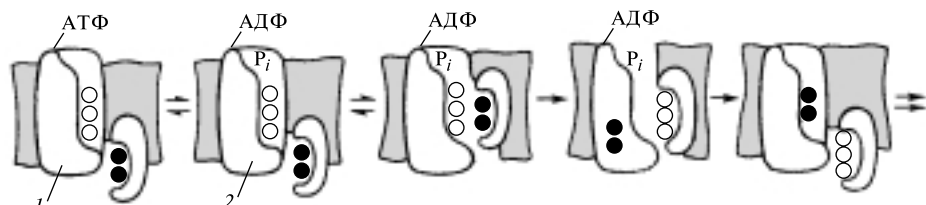


Рис. XXII.2.

Гипотетическая схема процесса гидролиза АТФ Na⁺, K⁺-АТФазой (объяснения в тексте) (по К. R. Perke, R. Schön, 1993).

Перенос фосфатной группы с АТФ на карбоксильную группу аспартата в молекуле фермента (стадии 1–4) а также дефосфорилирование фермента (стадии 5–7) включает перегруппировку кислородных лигандов (стадии 2–3 и 5–6), в результате которой изменяются геометрия и свойства ионофорных центров. При этом фермент переходит из конформации E₁ к конформации E₂. Ионы Mg²⁺ и положительно заряженные боковые группы аминокислот (обозначены на схеме в виде ⊕), взаимодействуя с атомами кислорода, понижают энергию активации перегруппировки лигандов и способствуют последующему отщеплению АДФ. Расщеплению O–P связи на стадии 3–4 предшествует образование комплекса, включающего АТФ, фермент E и два иона Mg²⁺.



а

б

в

г

д

Рис. XXII.3.

Рабочий цикл димера Na^+ -насоса в режиме Na^+/K^+ -обмена

а) связывание Na^+ и K^+ в полостях субъединиц, б) Na -зависимое фосфорилирование большой субъединицы, в), г) обмен катионами между субъединицами, д) K^+ -зависимое дефосфорилирование и выброс ионов;

1 — большая субъединица, 2 — малая субъединица; полыми кружками изображены Na^+ , зачерненными — K^+ ; P_i — фосфат, E — фермент

внутри клетки требует ~ 16 кДж, а энергия, освобождающаяся при разрыве связи $\text{K}_e - \text{E}_2 - \text{P} \rightarrow \text{K}_e + \text{E}_2 + \text{P}$, порядка 18 кДж/моль. Освобождающаяся энергия используется для переноса Na^+ и K^+ от ионофорных центров в соответствующее примембранное пространство.

Рассмотрим теперь гипотетические схемы обмена ионами. На рис. XXII.3 изображена последовательность превращений функционального димера Na^+ , K^+ -АТФазы, основанная на конформационных превращениях и обмене ионов Na и K в полости белка. Ионообменная полость открывается с внутренней поверхности мембраны, а внешний вход в эту полость (канал) закрыт гидрофобным контактом липидов и белков. Гидролитический центр расположен на большой субъединице с внутренней стороны мембраны. Большой α -полипептид пронизывает мембрану, а гликопротеин (малая β -субъединица) расположен на ее наружной стороне. В исходном состоянии ионообменные полости субъединиц могут заполняться катионами только из примембранных слоев. Эти полости, как предполагается, из-за стерических затруднений могут вмещать три иона Na и лишь два иона K .

Присоединение АТФ индуцирует конформационные изменения, в результате которых сродство большой субъединицы к Na^+ значительно возрастает. Одновременно увеличивается и эффективный отрицательный заряд ионообменной полости за счет близко расположенной отрицательно заряженной фосфатной группы АТФ.

В результате последующих конформационных перестроек три иона Na оказываются замкнутыми в ионообменной полости большой субъединицы. На этой стадии сродство большой субъединицы к Na^+ понижается, а к K^+ повышается. Состояние $E \sim P$ энергетически невыгодно, и фермент переходит из «напряженного» состояния в стабильное состояние $E - P$. \square

Дальнейшее протекание реакции и обмен ионов связаны с участием малой субъединицы. Предполагается, что субъединицы димера могут незначительно смещаться друг относительно друга в результате тепловых флуктуаций. Когда полость малой субъединицы совмещается с полостью большой субъединицы, между ними может происходить обмен катионами. За время жизни стабильного фосфорилированного состояния возможность для обмена ионами между субъединицами реализуется неоднократно. Если в каком-либо из этих случаев в полости малой субъединицы оказывается два иона К, то возникает состояние, изображенное на рис. XXII.3, в. В этом состоянии обмен ионами между полостями энергетически выгоден.

▽ Замена трех ионов Na на два иона К в большой субъединице (стадия в-г) вновь приводит к возникновению конформационно-неравновесного состояния системы. Уменьшение числа положительных зарядов в полости большой субъединицы сопровождается исчезновением большого активационного барьера, препятствующего дефосфорилированию фермента и отщеплению отрицательно заряженной фосфатной группы. При этом происходит открывание полости большой субъединицы во внутриклеточную среду. После диссоциации АДФ и P_i фермент возвращается в исходное состояние. □

Изменение сродства ион-связывающих центров может быть обусловлено изменением их геометрии при связывании АТФ, а также при фосфорилировании и дефосфорилировании фермента. Катионы, находясь в ион-связывающих полостях, образуют координационные связи с кислородсодержащими группами полипептидных цепей. При перестройке анионного окружения катионов происходит замещение ионов одного вида на другие катионы.

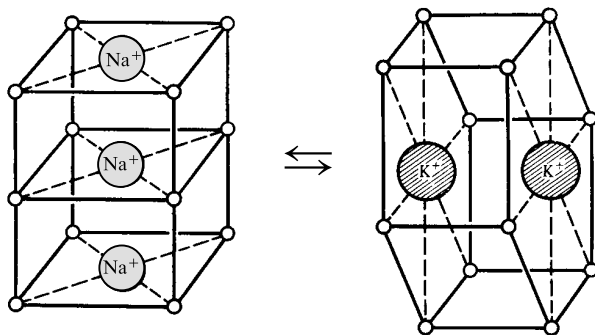


Рис. XXII.4.
Две конформации Na-полости Na^+ , K^+ -АТФазы

Согласно теоретическим расчетам, четыре атома О, расположенные в одной плоскости на определенных расстояниях, могут образовывать Na^+ -специфичную ячейку, а шесть атомов О — K^+ -специфичную ячейку. Исходя из этого можно предполагать, что ион-связывающая полость большой субъединицы содержит 12 атомов О, которые попеременно могут образовывать координационную сферу для трех ионов Na^+ или двух ионов K^+ (рис. XXII.4). Переход между этими состояниями, соответствующими связыванию трех ионов Na или двух ионов К, т. е. перегруппировка лигандов, может являться основным энергозависимым процессом, обеспечивающим Na^+/K^+ -обмен в Na^+ -насосе (В. А. Твердислов).

При заполнении Na^+ -полости катионами из примембранных областей первый катион, попавший в полость, определяет тип симметрии лигандов и повышает вероятность попадания в полость катионов того же вида. Энергизованное состояние фермента возникает тогда, когда в результате фосфорилирования конфигурация лигандов перейдет в состояние, изображенное в правой части рис. XXII.4, когда в полости еще осталось три иона Na . Это «напряженное» состояние фермента снимается при замене трех ионов Na на два иона K . Таким образом, энергия АТФ расходуется вероятнее всего на упорядоченное изменение сродства ион-связывающих центров к катионам, а само перемещение субъединиц осуществляется уже за счет тепловых колебаний.

§ 2. Активный транспорт кальция

Ca^{2+} -зависимая АТФаза, сопряженная с мощным Ca^{2+} -насосом, локализована в мембранах саркоплазматической сети и имеет некоторые сходные черты с Na^+ , K^+ -АТФазой. Ca^{2+} -АТФаза состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой около 100 000 и относительно высоким содержанием гидрофобных аминокислот (аминокислоты с неполярными боковыми цепями). Для работы Ca^{2+} -зависимой АТФазы также необходимо присутствие фосфолипидов.

Работу Ca^{2+} -АТФазы изучают на фрагментах саркоплазматического ретикула, выделяемых из мышечной ткани, а также на мембранных пузырьках, которые образуются в определенных условиях в смеси очищенного препарата Ca^{2+} -АТФазы с фосфолипидами (реконструированная система — протеолипосомы; см. § 2 гл. XV).

Схема работы Ca^{2+} -АТФазы может быть представлена следующим образом. На первом этапе происходит связывание Ca^{2+} и АТФ. Эти соединения связываются с разными центрами на внешней поверхности мембранного пузырька. Константа связывания Ca^{2+} составляет порядка 10^7 M^{-1} . На втором этапе АТФ гидролизуетс с образованием фосфорилированного фермента. Образование фермент-фосфатного комплекса можно обнаружить по включению в белок радиоактивного изотопа ^{32}P из АТФ, меченной по фосфату. Образующаяся фосфорилированная форма фермента $E\sim\text{P}$ конформационно неустойчива и претерпевает изменение пространственной структуры так, что ион-связывающие участки оказываются отделенными от внешней среды. Изменение конформации Ca^{2+} -АТФазы проявляется в изменении сигнала ЭПР спиновой метки, присоединенной к белку, в связи с изменением подвижности метки.

На следующем этапе цикла происходит изменение сродства Ca^{2+} -связывающих центров к ионам Ca одновременно с изменением характера связи фосфатной группы с ферментом. Энергия, ранее сосредоточенная в макроэргической фосфатной связи комплекса $E\sim\text{P}$, расходуется на изменение константы связывания ионов Ca с ферментом. Как и в случае Na^+ , K^+ -АТФазы, изменение сродства обусловлено, по-видимому, изменением расположения полярных групп, образующих координационные связи с Ca^{2+} . Вследствие происшедшего изменения пространственной структуры фермента ионы Ca получают доступ во внутреннее пространство мембранных пузырьков и выбрасываются во внутренний объем. Константа связывания Ca^{2+} при образовании стабильной фосфорилированной формы фермента уменьшается от 10^7 до 10^3 M^{-1} .

На основании соотношения (V.1.12), связывающего константу химического равновесия с изменением свободной энергии в ходе реакции ΔG_0 , т. е. $\Delta G_0 = -RT \ln K$, можно найти, что изменение свободной энергии при уменьшении константы связывания от 10^7 до 10^4 M^{-1} составляет 17,8 кДж/моль. Таким образом, суммарные затраты энергии на перенос Ca^{2+} через мембрану примерно вдвое меньше энергии гидролиза АТФ (около 40 кДж/моль при pH 9), которой хватает на перенос двух ионов Ca. Вследствие десорбции Ca^{2+} с фермента суммарный положительный заряд в ион-связывающей полости уменьшается, что значительно облегчает десорбцию фосфата. В результате этих превращений фермент вновь приходит в исходное состояние.

§ 3. Электрогенный транспорт ионов

Активный транспорт ионов может быть электронейтральным или электрогенным. Транспортная система электронейтральна в том случае, если ее функционирование сопровождается обменом внутриклеточных ионов на внеклеточные в соотношении «заряд на заряд». В такой ситуации система активного транспорта является лишь средством поддержания концентрационных градиентов и не участвует непосредственно в создании разности потенциалов на клеточной мембране. Потенциал на мембране создается тогда только за счет диффузии ионов по градиентам концентрации.

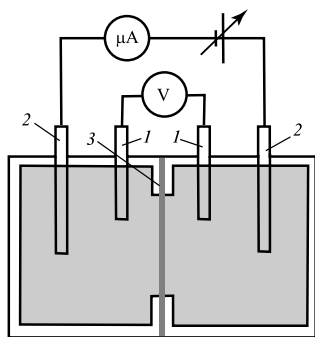


Рис. XXII.5.

Принципиальная схема измерения тока короткого замыкания на коже лягушки:

1 — измерительные электроды, 2 — тоновые электроды, 3 — кожа лягушки

В том случае, если количество зарядов, переносимых в одном направлении в единицу времени, не компенсируется суммой зарядов, переносимых в противоположном направлении, транспортный механизм непосредственно участвует в создании дополнительной разности потенциалов на мембране. Например, в электрогенном режиме работает Na^+ -насос, обменивая три иона Na на два иона K. □

Системы электрогенного активного транспорта были впервые выявлены и наиболее подробно изучены на коже лягушки, а впоследствии и на других эпителиальных тканях. Если разделить две камеры, содержащие раствор Рингера, участком кожи лягушки, то между наружной и внутренней поверхностями кожи возникает разность потенциалов, достигающая 100 мВ (внутренняя поверхность кожи положительна по отношению к внешней). Подавая от внешнего источника ЭДС противоположного направления (рис. XXII.5), можно скомпенсировать разность потенциалов

на коже до нуля (так называемый режим короткого замыкания кожи). В этих условиях пассивный перенос ионов должен прекратиться (так как нет ни градиентов концентрации, ни разности потенциалов) и односторонние потоки пассивно транспортируемых ионов — выравняться. Однако в действительности поток меченого Na^+ , направленный от наружной поверхности кожи к внутренней, намного превышает поток Na^+ в противоположном направлении. Суммарный поток Na^+ через кожу лягушки пропорционален значению электрического тока. Таким образом, значение тока короткого замыкания пропорционально скорости активного транспорта Na^+ , направленного от наружной к внутренней поверхности кожи.

Процесс активного транспорта Na^+ в коже лягушки со стороны слизистой оболочки (наружная поверхность кожи) в сторону серозной оболочки (внутренняя поверхность кожи) близок по механизму к переносу ионов через эпителий в кишечнике и почечных канальцах. Общая схема переноса Na^+ через слой клеток эпителия представлена на рис. XXII.6.

Во многих эпителиальных тканях обнаружена система активного электрогенного транспорта Cl^- . Вклад этих систем в ток короткого замыкания обычно намного меньше тока активного транспорта Na^+ .

У растительных клеток вклад электрогенных транспортных систем в мембранный потенциал в целом значительно выше, чем в клетках животных. Это проявляется в том, что значение мембранного потенциала клетки намного превышает

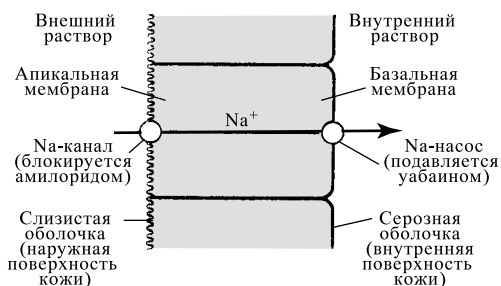


Рис. XXII.6.

Активный транспорт натрия в эпителиальных тканях

максимально возможный уровень потенциала, создаваемого за счет пассивной диффузии ионов, в частности уровень равновесного калиевого потенциала. Так, мембранный потенциал в гифах грибов *Neurospora* составляет -200 мВ, а значение нернстовского потенциала для K^+ равно -133 мВ. В клетках листа элодеи, ряски, харовых водорослей мембранный потенциал достигает значений 250 – 270 мВ (цитоплазма отрицательна), что превышает уровень равновесного K^+ -потенциала на 100 – 120 мВ. Добавление в среду ингибиторов дыхания приводит к деполяризации клеток до уровня равновесного K^+ -потенциала. Предполагают, что высокий уровень мембранного потенциала в клетках растений поддерживается АТФ-зависимой системой активного электрогенного транспорта H^+ из цитоплазмы в наружную среду. В качестве альтернативной гипотезы существует предположение о наличии в плазмалемме растительных клеток цепи переноса электронов, функционирование которой сопряжено с поглощением H^+ из цитоплазмы и выделением H^+ в наружную среду (редокс-помпа, см. § 3 гл. XXIV).

Выражение для мембранного потенциала можно получить, используя аппарат кинетики химических реакций. Так, если в клеточной мембране существует система активного транспорта Na^+ наружу, а пассивно переносятся ионы K , Na и Cl , то стационарные потоки K^+ , Na^+ и Cl^- , направленные внутрь клетки и в наружную среду, с учетом влияния мембранного потенциала φ можно записать в таком виде:

| | |
|--|---|
| <i>Входящий поток</i> | <i>Выходящий поток</i> |
| $[\text{K}_o]k_{\text{K}} \exp(\varphi F/RT)$ | $[\text{K}_i]k_{\text{K}}$ |
| $[\text{Na}_o]k_{\text{Na}} \exp(-\varphi F/RT)$ | $[\text{Na}_i]k_{\text{Na}} + [\text{Na}_i]k_a$ |
| $[\text{Cl}_o]k_{\text{Cl}} \exp(\varphi F/RT)$ | $[\text{Cl}_i]k_{\text{Cl}}$ |

Здесь k_{K} , k_{Na} , k_{Cl} — константы скорости, характеризующие пассивное проникновение ионов K , Na и Cl через мембрану; k_a — константа скорости активного транспорта; индексы o и i относятся к концентрациям ионов в наружной среде и цитоплазме клеток.

В стационарном состоянии сумма всех входящих потоков равна сумме выходящих потоков (потоки Cl^- в противоположных направлениях обычно равны друг другу). Условие равенства входящих и выходящих потоков имеет вид

$$[\text{K}_o]k_{\text{K}} \exp\left(-\frac{\varphi F}{RT}\right) + [\text{Na}_o]k_{\text{Na}} \exp\left(-\frac{\varphi F}{RT}\right) = [\text{K}_i]k_{\text{K}} + [\text{Na}_i]k_{\text{Na}} + [\text{Na}_i]k_a. \quad (\text{XXII.3.1})$$

Решая уравнение (XXII.3.1) относительно потенциала, получим

$$\varphi = -\frac{RT}{F} \ln \frac{k_a[\text{Na}_i] + k_{\text{K}}[\text{K}_i] + k_{\text{Na}}[\text{Na}_i]}{k_{\text{K}}[\text{K}_o] + k_{\text{Na}}[\text{Na}_o]}. \quad (\text{XXII.3.2})$$

Первый член в числителе подлогарифмического выражения отражает активность электрогенного ионного насоса. Если активный транспорт неэлектрогенен, то этот член отсутствует и выражение (XXII.3.2) становится идентичным уравнению Гольдмана [см. (XXI.1.2)] для мембранного потенциала, обусловленного пассивными ионными потоками.

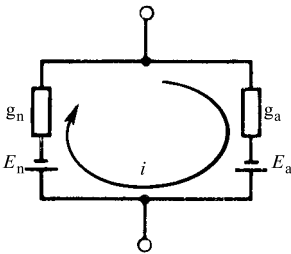


Рис. XXII.7.

Упрощенная эквивалентная электрическая схема мембраны, содержащей параллельно функционирующие электрогенный насос и каналы пассивной диффузии ионов:

g_n и g_a — проводимости каналов пассивной диффузии и системы активного транспорта, E_n и E_a — соответствующие им ЭДС.

Другой подход к описанию мембранного потенциала, создаваемого за счет пассивной диффузии и электрогенного транспорта ионов, основан на анализе эквивалентной электрической схемы мембраны. Простейшим электрическим аналогом является схема, состоящая из двух параллельно соединенных цепей (рис. XXII.7).

Это так называемая модель электрогенного насоса с утечкой. Левая ветвь цепи соответствует путям пассивной диффузии, причем g_n — суммарная проводимость мембраны по диффузионным каналам, а электродвижущая сила E_n представляет собой диффузионный потенциал, рассчитываемый по (XXI.1.2). Правая ветвь цепи соответствует электрогенному насосу, проводимость которого равна g_a , а ЭДС E_a .

Если ЭДС насоса отличается от диффузионной ЭДС, то в рассматриваемой цепи течет круговой ток i , который создает дополнительное падение напряжения на сопротивлении $1/g_n$. Таким образом, суммарную разность потенциалов на мембране можно записать в виде

$$\varphi = E_n + i/g_n. \quad (\text{XXII.3.3})$$

Уравнение (XXII.3.3) показывает, что мембранный потенциал в этом случае можно рассматривать как сумму диффузионной составляющей и электрогенной компоненты. Силу тока в цепи i можно выразить по закону Ома:

$$i = \frac{E_a - E_n}{1/g_a + 1/g_n}. \quad (\text{XXII.3.4})$$

После преобразований и подстановки (XXII.3.4) в (XXII.3.3) получаем формулу, описывающую мембранный потенциал в рамках рассматриваемой эквивалентной схемы:

$$\varphi = \frac{g_n}{g_n + g_a} E_n + \frac{g_a}{g_n + g_a} E_a. \quad (\text{XXII.3.5})$$

Вопрос о том, какой вклад вносит проводимость насоса g_a в суммарную проводимость мембраны, в настоящее время окончательно не выяснен. Это в первую очередь относится к мембранам растительных клеток. Электрогенный насос обычно уподобляют генератору тока, т. е. считают, что его внутреннее сопротивление намного больше сопротивления мембран для пассивного потока ионов ($g_a \ll g_n$); а иногда — источнику ЭДС ($g_a \gg g_n$).

Выражение для ЭДС насоса можно получить, рассматривая условие термодинамического равновесия для сопряженных реакций гидролиза АТФ и активного переноса ионов через мембрану. В случае H^+ -насоса получим

$$E_a = \frac{\Delta\mu}{\nu F} - \frac{RT}{F} \ln \frac{[H_i]}{[H_o]}, \quad (\text{XXII.3.6})$$

где $\Delta\mu$ — изменение свободной энергии в ходе химической реакции (гидролиз АТФ); ν — стехиометрический коэффициент, отражающий количество транспортируемых протонов при гидролизе одной молекулы АТФ; $[H_i]$ и $[H_o]$ — концентрации протонов в цитоплазме и внешней среде. Уравнение (XXII.3.6) предсказывает зависимость ЭДС насоса как от рН среды, так и от рН цитоплазмы.

Функциональная роль электрогенного H^+ -насоса растительной клетки состоит в регуляции рН цитоплазмы. Кроме того, градиент рН, создаваемый на мембране, способствует процессам накопления сахаров и аминокислот при сопряжении этих процессов с пассивным потоком H^+ .

§ 4. Транспорт протонов

В функционировании биоэнергетических систем важное место принадлежит транспорту протонов. Перенос электронов в энергосопрягающих мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий сопровождается трансмембранным переносом H^+ и образованием градиента электрохимического потенциала этого иона $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, который включает электрический (мембранный потенциал) и концентрационный (градиент pH) компоненты:

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+} = RT \ln(c_i/c_o) + zF(\phi_i - \phi_o) = zF\Delta\phi - 2,3RT\Delta pH. \quad (XXII.4.1)$$

В приведенном выражении индексы i и o относятся к растворам, находящимся внутри и снаружи замкнутой мембранной системы. В сопрягающих мембранах локализованы также АТФ-синтетазные системы, через каналы которых осуществляется пассивное движение H^+ по градиенту электрохимического потенциала (подробнее см. гл. XXIV). В последнее время возрастает интерес к латеральному транспорту H^+ по поверхности мембран, а также по микроструктурам цитозоля.

▽ Перенос H^+ через мембраны может осуществляться механизмами трех типов. В некоторых мембранах существуют подвижные переносчики протонов (пластохинон в фотосинтетической мембране хлоропластов). Возможны также конформационные переходы мембранного белка при связывании протона на одной стороне мембраны и депротонировании белка с другой стороны мембраны, сопряженные с поворотом макромолекулы в мембране, при котором присоединенный протон пересекает мембрану. Наконец, протоны могут транспортироваться через мембрану по специализированным структурам — H^+ -каналам. Протонный канал представляет собой узкую полость, образованную полярными группами белка. □

Протонный канал — важный компонент всех H^+ -АТФаз. Он образован гидрофобной частью субъединицы сопрягающего фактора — комплексом CF_0 . По H^+ -каналу протоны поступают к каталитическому участку транспортной системы, в котором осуществляется сопряжение переноса H^+ с реакциями синтеза—гидролиза АТФ. Таким образом, основными узлами H^+ -насосов являются протонный канал и активный центр.

Транспорт протонов по H^+ -каналам обычно сравнивают с переносом H^+ по регулярной решетке, образованной системой водородных связей, аналогичной таковой во льду. В структуре льда возможны переходы протона от одной молекулы воды к соседней (см. § 4 гл. IX). В результате возникает ионная пара, состоящая из положительно заряженного иона гидроксония H_3O^+ и гидроксила OH^- . В отсутствие электрического поля обмен протонами происходит хаотично, однако при создании разности потенциалов возникает направленная миграция дефектов. В итоге достигается быстрое смещение протонов вдоль упорядоченной цепи водородных связей.

В некоторых кристаллах (например, имидазол), которые содержат систему водородных связей, ориентированных в определенном направлении, подвижность протона в направлении цепи H^+ -связей в 10^3 раз выше, чем в перпендикулярном направлении. В биологических мембранах системы водородных связей, по которым транспортируются протоны, образованы полярными группами, не участвующими в формировании H -связей α -спирали полипептидной цепи. Для формирования сквоз-

ной трансмембранной структуры, транспортирующей H^+ , необходимо около 20 аминокислотных остатков.

Эстафетная передача протонов возможна лишь при чередовании стадий перескока протона и поворотов химических связей в области образовавшегося дефекта (рис. XXII.8). Как видно из рисунка, транслокация одного протона по цепи протекает в две стадии. Сначала происходит перескок протона от группы к группе (рис. XXII.8, I), а затем поворот группы (на рис. XXII.8, II поворот вокруг связи C—O), в результате которого происходит дополнительное смещение заряда, и система связей возвращается в исходное состояние. В результате поворота химической группы или молекул воды образуется конфигурация, не допускающая возврата протона в начальное положение. В жесткой структуре α -спирали повороты групп крайне затруднены; поэтому система H-связей α -спирали не способна проводить протоны.

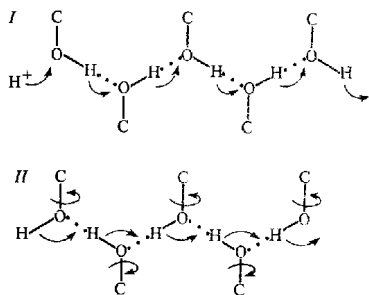


Рис. XXII.8.

Проведение протона по цепи H-связей:

I — стадия перескока протона, II — стадия поворота групп (миграция поворотного дефекта)

На стадии миграции ионного дефекта лишь некоторая часть от полного заряда протона смещается за счет перескока H^+ от группы к группе. Остальная часть заряда смещается за счет поворота полярной группы. Во льду, например, доля ионного дефекта в переносе заряда составляет 0,62 от полного заряда протона. Благодаря разделению заряда протона при переносе между ионным и поворотным дефектами, существенно снижается энергетический барьер переноса H^+ через мембрану. Высота барьера определяется уровнем электростатической энергии заряда в ионном канале и оценивается по формуле Борна [см. (XX.1.1)]. Как следует из этой формулы, уменьшение транспортируемого заряда в два раза по сравнению с зарядом протона приводит к 4-кратному уменьшению энергии активации переноса H^+ через мембрану. Характерные подвижности ионного и поворотного дефектов составляют 10^{-3} и 10^{-4} см/В·с соответственно. Согласно расчетам, время миграции ионного и поворотного дефекта через мембрану толщиной 5 нм не превышает 0,25 мкс и 2,5 мкс соответственно.

Величина активационного барьера переноса протона сильно зависят от расстояния между донорно-акцепторными парами. В большинстве случаев в системе водородных связей расстояние между ядрами атомов составляет 0,23–0,27 нм. Увеличение расстояния на 0,1 нм приводит к пропорциональному росту барьера на величину 125–250 Дж/моль. Это значит, что изменение расстояний между ориентированными парами в белке всего на 0,1–0,2 нм может служить затвором протонной проводимости белка. Фактором, влияющим на протонную проводимость белка

могут быть внешние электрические поля (трансмембранные) и наличие заряженных групп. Время элементарного акта переноса протона сравнимо с временами вибраций и флуктуаций длин связей вследствие атомных колебаний, т. е. лежит в пределах $(10-50) \cdot 10^{-15}$ с. Методы моделирования молекулярной динамики (гл. XI, § 3) позволяют вычислить траектории движения протона, преодолевающего барьер при переходе между двумя группами. Так была вычислена траектория перехода протона от глутамата-35 лизозима к атому кислорода молекулы субстрата (Воршелл). В результате случайных флуктуаций зарядов и диполей взаимодействующих групп за время ~ 16 пс создается переходная конфигурация с пониженным барьером, благоприятная для перехода протона. Поскольку последующий перескок протона происходит за несколько фемтосекунд (10^{-15} с), то лимитирующей стадией переноса протона является образование активной конфигурации атомов при случайных флуктуациях (\sim пс).

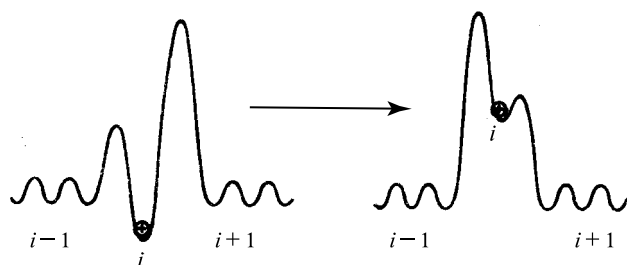


Рис. XXII.9.

Энергозависимые изменения структуры барьеров в ионном канале активной транспортной системы:

i — потенциальный минимум

В общем виде систему активного транспорта рассматривают как трансмембранный канал с большим числом участков связывания H^+ , в котором транслокация протонов происходит за счет последовательных перескоков H^+ между участками связывания. Такой ионный канал может работать как ионный насос, если структура энергетических барьеров претерпевает динамические изменения за счет энергообеспечивающей реакции, например изменяются константа диссоциации протон-связывающих участков канала и высота соседних барьеров. В этом случае протон будет освобождаться преимущественно с одной стороны мембраны, а поглощаться — с другой. □

На рис. XXII.9 показаны профили потенциальной энергии H^+ для основного и энергизованного состояния канала, формируемого бактериородопсином в мембранах галофильных бактерий (см. гл. XXIX). В основном состоянии протон занимает наиболее глубокую потенциальную яму, соответствующую главному участку связывания. Этот участок доступен с цитоплазматической стороны мембраны, но отделен от внешней среды высоким энергетическим барьером. При поглощении бактериородопсином кванта света энергетический уровень участка связывания и высота барьеров изменяются таким образом, что протон высвобождается во внешний раствор. Изменение высоты активационных барьеров, обусловленное небольшими изменениями конформации H^+ канала, может быть связано с изменением pK_a средства к протону аминокислотных остатков переносчиков H^+ (гл. XXIX).

Рассмотренная схема может быть распространена на H^+ -насосы, использующие в качестве источника энергии разность окислительно-восстановительных потенциалов. В этом случае разные конформационные состояния канала соответствуют окисленной и восстановленной форме ферментов — переносчиков электрона. Аналогичным образом можно описать АТФ-зависимый транспорт протонов.