

VIII

Трансформация энергии в биомембранах



XXIV

Перенос электронов
и трансформация энергии
в биомембранах

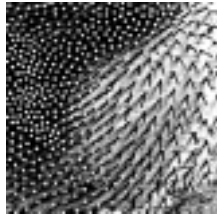
XXV

Биофизика сократительных систем

XXVI

Биофизика процессов рецепции

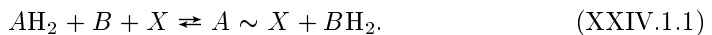
Перенос электронов и трансформация энергии в биомембранах



§ 1. Общая характеристика преобразования энергии в биомембранах

Процессы трансформации энергии при электронном транспорте в мембранах некоторых бактерий, митохондрий, хлоропластов и хроматофоров обладают фундаментальным сходством. Во всех этих системах происходит использование энергии электронного потока для синтеза молекул АТФ. Механизмы этого процесса, однако, во многом непонятны.

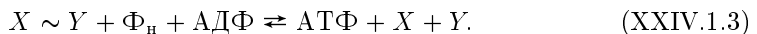
Существует большое количество различных гипотез относительно механизма мембранного фосфорилирования, которые отличаются друг от друга включением в схемы синтеза АТФ различных окислительно-восстановительных реакций и компонентов сопряжения при трансформации энергии. На ранних этапах обсуждался возможный механизм химического сопряжения переноса электронов в ЭТЦ с синтезом АТФ. В этих гипотезах сопряжения предполагали образование высокоэнергетического соединения переносчика электрона A и интермедиата X , участвующего в процессе переноса энергии на стадии переноса электрона от A к B :



На следующей стадии энергия от $A \sim X$ переносится к $X \sim Y$, где Y также как и X является интермедиатом только в процессах переноса энергии и не содержит компонентов ЭТЦ:



Наконец, на третьем этапе происходит фосфорилирование нефосфорилированного макроэрга $X \sim Y$ и трансфосфорилирование до химически стабильной молекулы АТФ:



Как видно из реакций (XXIV.1.1)–(XXIV.1.3), перенос энергии от пары (AH_2, B) на АТФ осуществляется путем сдвига вправо химического равновесия, ведущего к появлению избытка АТФ.

▽ Возможно ли осуществление этого принципа в чистом виде в биологических мембранах? Согласно расчетам, макроэргический характер фосфатной связи в АТФ обусловлен энергией отталкивания атомов вследствие избыточной отрицательной электронной плотности на атомах кислорода в фосфорных остатках.

Поэтому сама макроэргическая связь $\sim P$ может образовываться за счет направленного индукционного перемещения электронной плотности в промежуточных соединениях, при котором избыток электронной энергии не диссипирует в теплоту за время гидролиза. Следовательно, для осуществления эффективного энергетического сопряжения способом смещения электрохимического равновесия необходимо, чтобы избыток электронной энергии, сосредоточенный на химических связях промежуточных нестабильных соединений, за время реакции не диссипировал в теплоту, а сохранялся, трансформируясь без потерь в энергию конечного стабильного макроэргического соединения (АТФ). \square

Известно (см. гл. X–XII), что рассеяние избытка энергии в процессах электронно-колебательной релаксации в конденсированной фазе (мембранные белки) протекает за 10^{-11} – 10^{-12} с. Это означает, что бездиссипативная передача энергии по химическому пути возможна, если весь процесс трансформации энергии произойдет в один элементарный акт за 10^{-11} – 10^{-12} с. Только в этом случае избыток электронной энергии, сосредоточенный на определенных связях атомных групп нестабильных промежуточных соединений, не успеет диссипировать в теплоту в ходе электронно-колебательной релаксации. Ясно, насколько трудно осуществить последовательно все превращения (XXIV.1.1)–(XXIV.1.3) за столь короткое время. Это тем более очевидно, что в процессе должны принимать участие несколько низкомолекулярных соединений, которые, согласно предположению, исходно пространственно разделены в мембране, а затем диффундируют к месту реакции. Отсюда следует важный вывод, что высокоэффективное энергетическое сопряжение, основанное на сдвиге химического равновесия в цепи реакций, включающих нестабильные соединения, не может осуществляться в конденсированной фазе. Для этого необходим единый комплекс молекул, где трансформация энергии происходит в один акт без тепловых потерь. Именно таким комплексом и является фермент АТФ-синтетаза. Неудачи в поисках химических соединений между компонентами электрон-транспортной цепи и переносчиков энергии привели к необходимости рассмотрения других принципов сопряжения. Наибольшее признание получила хемиосмотическая теория Митчела, согласно которой перенос электронов по электрон-транспортной цепи приводит к переносу протонов через гидрофобный барьер мембраны. Сформулированный в общей форме хемиосмотический принцип сопряжения Митчела предполагает, что перенос электронов связан с синтезом АТФ через образование трансмембранной разности электрохимических потенциалов [см. (V.3.12)] ионов водорода $\Delta\bar{\mu}H^+$:

$$\Delta\bar{\mu}H^+ = F\Delta\varphi + 2,3 RT\Delta pH, \quad (\text{XXIV.1.4})$$

где $\Delta\varphi$ — разность электрических потенциалов, ΔpH — разность концентраций водородных ионов по обе стороны мембраны, F — число Фарадея, R — газовая постоянная, T — температура. Считают, что энергия $\Delta\bar{\mu}H^+$ используется для синтеза АТФ из АДФ и Φ_n с помощью особого фермента — мембранной АТФ-синтетазы (H^+ -АТФаза). Однако молекулярные механизмы, посредством которых при переносе электронов происходит трансмембранный перенос протонов, а также механизм образования АТФ с помощью АТФазы остаются предметом дискуссий.

§ 2. Электрон-транспортные цепи

В митохондриях образование доноров электронов (НАДН, сукцината и др.) дает начало переносу электронов во внутренней мембране от НАДН и сукцината к кислороду, сопряженному с транслокацией протонов.

Известно около 20 переносчиков электронов, составляющих ЭТЦ митохондрий; это основные элементы структуры митохондрий, на которые приходится около 25% белка митохондриальных мембран. Среди переносчиков только НАД, флавины и убихинон является двухэлектронными, в то время как остальные компоненты ЭТЦ — одноэлектронные.

Белковые компоненты переносчиков влияют на окислительно-восстановительные превращения переходных металлов, входящих в их состав, а также создают специфическое диэлектрическое и химическое окружение при переносе электронов (ср. § 4 гл. XIV).

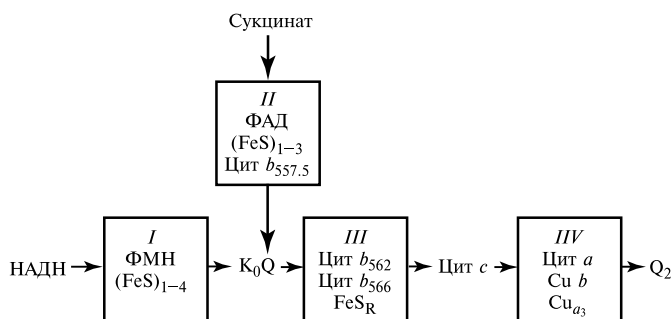


Рис. XXIV.1.

Мультиферментные комплексы, составляющие дыхательную цепь митохондрий

Как правило, в ЭТЦ переносчики электронов расположены в последовательности, при которой их среднеточечные окислительно-восстановительные потенциалы $E_{1/2}$ возрастают от отрицательных значений, приблизительно соответствующих водородному электроду, до значения, приближающегося к потенциалу, при котором происходит восстановление O_2 до H_2O . Окисление НАДН ($E_{1/2} = -320$ мВ) молекулярным кислородом влечет за собой общее изменение потенциала приблизительно на 1,1–1,2 В. Эта разность окислительно-восстановительных потенциалов, включающая ряд более мелких перепадов, и есть та движущая сила, которая в обычных условиях приводит к синтезу АТФ. Переносчики электронов расположены асимметрично в мембране, что приводит к зависимости кажущихся среднеточечных окислительно-восстановительных потенциалов отдельных переносчиков от значений трансмембранного и поверхностного потенциалов.

Фракционирование препаратов внутренней мембраны митохондрий из сердца быка привело к разделению митохондриальной электрон-транспортной системы на четыре белково-липидных комплекса:

- I. НАДН: убихинон-оксидоредуктаза.
- II. Сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза.
- III. Убихинол: феррицитохром *c*-оксидоредуктаза.
- IV. Цитохром *c*: кислород-оксидоредуктаза.

Таблица XXIV.1.

Свойства комплексов цепи переноса электронов митохондрий (по I. Hatefi, I. M. Galante, 1978)

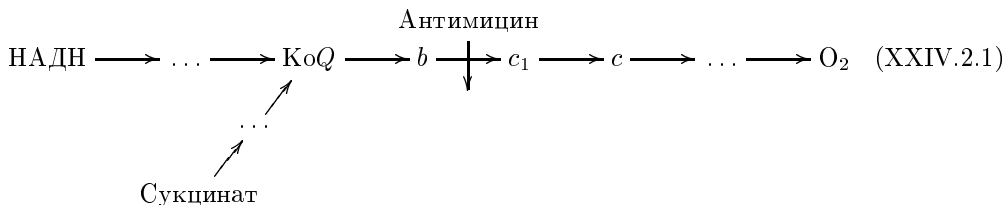
Комплекс	Соотношение в мембране	Молекулярная масса комплекса	Количество полипептидов в комплексе	Компоненты комплексов	Молекулярное соотношение компонентов в комплексе	Специфические ингибиторы
I. НАДН: КоQ-оксидоредуктаза	1	< 700	16-18	ФМН Негемовое железо Убихинон	1 16-18 4	Ротенон Амитал Пирицидин
II. Сукцинат: КоQ-оксидоредуктаза	2	200	4	ФАД Негемовое железо Цитохром <i>b</i>	1 7-8 1	α -Теноилтрифторацетон
III. КоQH ₂ : цитохром <i>c</i> -оксидоредуктаза	3	250	8-9	Цитохром <i>b</i> Цитохром <i>c</i> ₁ Негемовое железо Убихинон	2 1 1 ≥ 1	Антимицин А
IV. Цитохром <i>c</i> : O ₂ -оксидоредуктаза	7	150-200	7	Цитохром <i>a</i> Цитохром <i>a</i> ₃ Медь	1 1 2	Цианид Азид СО

Полная ЭТЦ состоит из четырех отдельных мультиферментных комплексов (рис. XXIV.1), которые принято обозначать цифрами I, II, III, IV. Некоторые свойства этих комплексов приведены в табл. XXIV.1. Каждый комплекс состоит, как правило, не менее чем из пяти субъединиц; часть из них несет на себе кофакторы, между которыми возможен перенос электронов. Комплексы входят в ЭТЦ в различных соотношениях.

На рис. XXIV.2 показана предполагаемая организация электрон-транспортных комплексов I-IV и АТФазы (F_0F_1) во внутренней мембране митохондрий.

Комплекс III занимает важное место в энергетическом обмене не только в ЭТЦ митохондрий, но и в хлоропластах, хромофорах, а также в некоторых бактериях. Поэтому ниже более детально рассмотрен перенос электронов в этом комплексе.

Наиболее простой является линейная последовательность переноса электронов в дыхательной цепи, в частности в комплексе III:



Эта схема хорошо согласуется с наблюдением, что ингибирование электронного переноса в митохондриях антимицином приводит к увеличению восстановленности

убихинона и цитохромов *b* и уменьшению восстановленности цитохромов *c* и *c*₁. Однако оказалось, что в присутствии сукцината и антимицина *A* добавка кислорода или феррицианида приводит к восстановлению цитохромов *b*, в то время как согласно линейной схеме (XXIV.2.1) должно было бы наблюдаться его окисление. Существует еще целый ряд кинетических особенностей, которые наряду с эффектом «сверхвосстановления» цитохромов *b* заставляют отказаться от линейной схемы (XXIV.2.1). П. Митчелом (1975) для объяснения сложного поведения цитохромов *b* в комплексе *III* была предложена схема так называемого *Q*-цикла (рис. XXIV.3).

В отличие от линейной схемы здесь предполагается отсутствие непосредственного окислительно-восстановительного контакта между цитохромами *b* и *c* (*c*₁); их взаимодействие друг с другом осуществляется через убихинон.

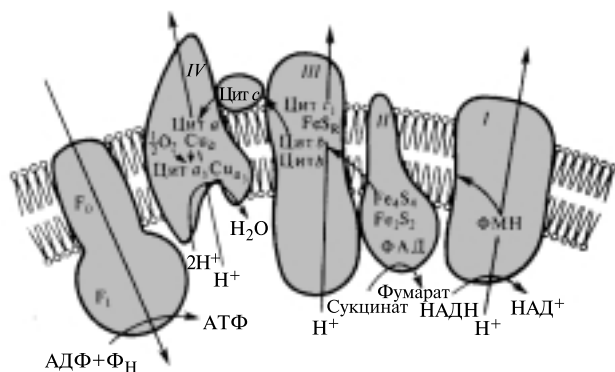


Рис. XXIV.2.

Электрон-транспортная цепь дыхания и сопрягающий комплекс во внутренней мембране митохондрий:

I-IV — электрон-транспортные комплексы, *F*₀, *F*₁ — сопрягающий комплекс (H^+ -АТФаза)

Электроны между комплексами переносятся с помощью мобильных переносчиков — убихинона (не показан) и цитохрома (цит) *c*. Двигаясь диффузно через липидный слой мембраны, убихинон связывает между собой комплексы *I* и *III*, а также комплексы *II* и *III*. Цитохром *c* также выполняет аналогичную «челночную» функцию на участке между комплексами *III* и *IV*, диффундируя вдоль поверхности мембраны. Не исключена возможность непосредственного переноса электронов от одного комплекса к другому

▽ Детальное рассмотрение строения фотосинтетической цепи электронного транспорта будет проведено в гл. XXVII. Здесь лишь необходимо отметить, что фотосинтетические ЭТЦ, подобно митохондриальной, построены по блочному принципу (см. рис. XXIV.2). Для всех этих цепей характерна асимметричная организация переносчиков электронов в мембране, согласованная с ориентацией АТФазы. Сходство простирается также и на АТФазы, которые имеют практически идентичный субъединичный состав. Сравнительный анализ электрон-транспортных комплексов, участвующих в преобразовании энергии, приводит к выводу что они составляют структурно-функциональную основу электрон-транспортных

биоэнергетических процессов. Электрон-транспортные комплексы можно рассматривать как необходимую для этого минимальную функциональную единицу. При этом отдельные подвижные переносчики электронов играют подчиненную роль, обеспечивая перенос электрона между комплексами. Очевидно, созданные природой и отобранные в результате эволюции комплексы переносчиков оказались достаточно универсальными, чтобы удовлетворить энергетические потребности различных организмов. □

На рис. XXIV.4 приведены в единой энергетической шкале все три энергопреобразующих комплекса митохондрий, а также фотосинтетические РЦ фотосинтезирующих бактерий и хлоропластов.

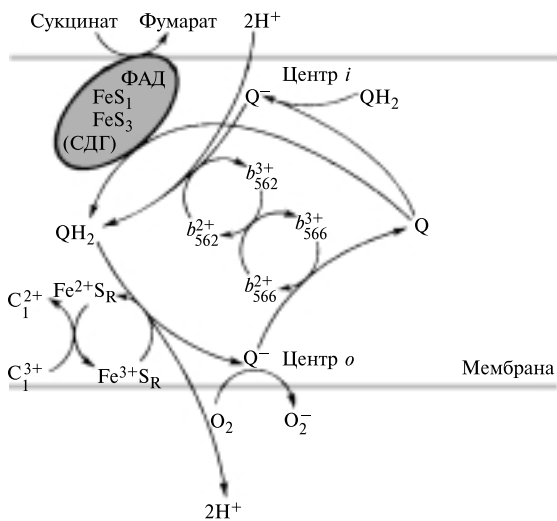


Рис. XXIV.3.

Q-цикл Митчела

Предполагают наличие двух мест реакций, в которых участвует убиноин, — так называемые центры *i* и *o*, локализованные, по-видимому, на противоположных сторонах мембраны. В центре *o* убиноин окисляется до убинона с освобождением двух протонов, причем один электрон от убинола поступает к железосерному белку Риске, а затем к цитохрому *c*₁, в то время как другой поступает к цитохрому *b*₅₆₆. Восстановленный семихиноном цитохром *b*₅₆₆, в свою очередь, восстанавливает цитохром *b*₅₆₂. Электрон от цитохрома *b*₅₆₂ используется для восстановления убинона в центре *i*

В ЭТЦ пурпурных фотосинтезирующих бактерий (см. гл. XXVII, XXVIII), поглощающих свет в дальней красной области, энергии кванта света хватает только на то, чтобы для организации потока электронов использовать лишь комплекс III. Использовать цитохром-оксидазу (комплекс IV) им удастся только в аэробных условиях (несерные пурпурные бактерии). Восстановить НАД бактерии могут лишь за счет обратного транспорта электронов, который начинается на уровне хинонов и захватывает комплекс I.

В фотосинтезе высших растений для переноса электронов от фотосистемы II (ФС II) к фотосистеме I (ФС I) может быть использован комплекс III *b*_{6-f}-комплекс). Поэтому представляется естественным сходство акцепторных сторон фотосинтетических реакционных центров (РЦ) бактерий и ФС II зеленых растений, когда в том и другом случаях происходит сопряжение РЦ с комплексом III. Существует также определенное сходство донорной части РЦ пурпурных бактерий и ФС I высших растений в значениях окислительно-восстановительных потенциалов переносчиков, находящихся в донорной стороне РЦ. В обоих случаях происходит сопряжение комплекса III с фотосинтетическими РЦ.

§ 3. Механизмы транслокации протонов и генерации $\Delta\bar{\mu}H^+$ в дыхательной и фотосинтетической цепях электронного транспорта

Механизмы сопряжения. Асимметрично локализованные комплексы переносчиков функционируют так, что перенос электрона сопровождается транслокацией протона через мембрану. Возможны различные механизмы этого сопряжения (см. § 4 гл. XXII). Во-первых, предполагают существование асимметрично расположенных специальных мембранных белков, переносящих протон. Их сродство к протону и протонсвязывающие свойства меняются при переносе электрона, что и приводит к соответствующим изменениям концентрации протонов на обеих сторонах мем-

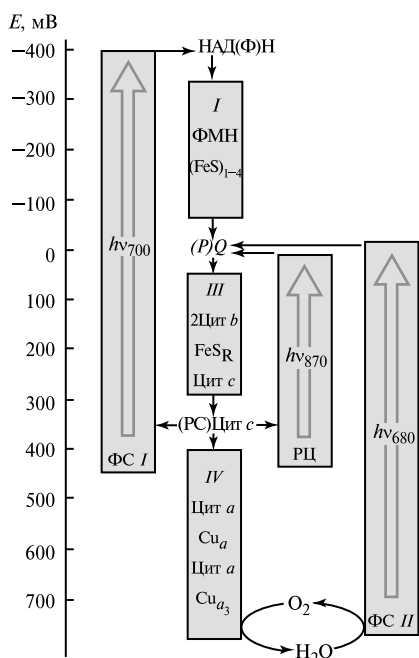


Рис. XXIV.4.

Сопряжение различных электрон-транспортных комплексов в ЭТЦ митохондрий, хлоропластов и хроматофоров

Дыхательная цепь митохондрий представлена тремя комплексами (I, III, IV), способными окислять НАДН до воды. Фотосинтетические ЭТЦ представлены соответствующими РЦ. В центре рисунка находится комплекс III, содержащий цитохром типа *b*, цитохром типа *c* и железосерный белок Риске (FeS_R). Донором электронов для него является убихинон *Q* или пластохинон *PQ*, акцептором — цитохром *c* (цит *c*) или пластоцианин *PC*. Среди комплексов, способных генерировать $\Delta\bar{\mu}H^+$, комплекс III, по-видимому, является наиболее универсальным, поскольку присутствует в ЭТЦ митохондрий, хлоропластов и хроматофоров. Остальные комплексы молекул переносчиков, участвующие в преобразовании энергии, являются более специфическими и присутствуют лишь у определенных групп организмов

браны. Во-вторых, возможно образование редокс-зависимого протонного канала в белковой части переносчика электронов. В этом случае переносчик электронов должен одновременно выполнять функции и протонного насоса. Предполагают, что транслокация протонов при окислительно-восстановительных превращениях переносчиков происходит либо за счет конформационных изменений самих переносчиков (или специального протонофорного белка), либо за счет редокс-зависимого протонирования — депротонирования. Пока неясно, каким образом происходит транспорт протонов против поля. Так, в случае цитохромоксидазы предполагают, что наиболее гидрофобная третья субъединица цитохромоксидазы формирует редокс-зависимый протонный канал. Важную роль в транслокации протона, видимо, играют окислительно-восстановительные превращения гема цитохрома *a*. Об этом свидетельствуют чувствительность этого цитохрома к протонам матрикса

и зависящий от наличия третьей субъединицы окислительно-восстановительный потенциал цитохрома *a* (рис. XXIV.5).

В-третьих, перенос протона может быть обусловлен работой подвижных переносчиков, которые, восстанавливаясь на одной стороне мембраны, одновременно с электроном присоединяют протон, а затем диффундируют на другую сторону мембраны, где происходит окисление переносчика и выброс протона за счет диссоциации в примембранную область. В соответствии с этим П. Митчел предположил, что в каждом протонпереносящем сегменте ЭТЦ переносчики водорода ($2H^+ + 2e^-$) чередуются с переносчиками электронов ($2e^-$) (рис. XXIV.6), образуя редокс-петлю. Согласно схеме редокс-петли, переносчик водорода *D* передает водород переносчи-

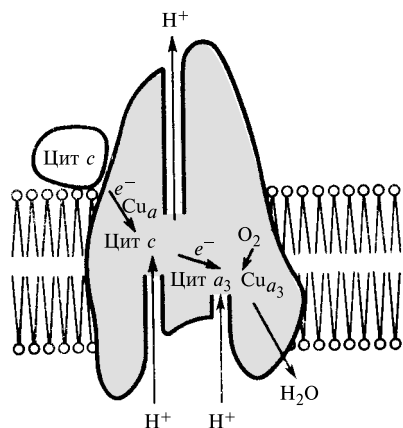


Рис. XXIV.5.

Цитохромоксидаза как редокс-зависимая протонная помпа

Функция цитохромоксидазы заключается не только в поглощении протонов, необходимых для восстановления кислорода до воды, но и в переносе протонов из внутренней фазы наружу

ку *A*, находящемуся на противоположной стороне мембраны. При окислении *D* и восстановлении *A* происходит освобождение двух протонов в среду. Электроны от *A* трансмембранно переносятся на другой переносчик электронов *B*. Можно представить, что переносчик водорода, будучи незаряженным, подобно хинону, диффундирует по градиенту концентрации к *A*. В то же время перенос электронов от *A* к *B* происходит против электрического поля, образующегося при трансмембранном переносе протонов. При такой организации электронного транспорта окисление донора электронов *DH* конечным акцептором *B*, находящимся на той же стороне мембраны, сопряжено с трансмембранным переносом протонов и, следовательно, генерирует на мембране $\Delta\bar{\mu}H^+$. Перенос двух электронов в редокс-петле сопровождается транслокацией двух протонов.

Три комплекса ЭТЦ в дыхательной цепи *I*, *III* и *IV* играют роль генераторов $\Delta\bar{\mu}H^+$, сопрягающих перенос электронов с трансмембранным переносом протонов. Действительно, для изолированных комплексов доказана способность генерировать $\Delta\bar{\mu}H^+$ при встраивании их в липосомы из фосфолипидов. Таким образом, эти комплексы являются не только структурной единицей переноса электронов, но и функциональной единицей сопряжения переноса электронов с образованием АТФ. □

в наружной поверхности мембраны. Не исключено также и дополнительное участие протонпереносящих белков, которое может вызывать наблюдаемые в экспериментах отклонения величины H^+ / e^- от 2.

В первые моменты освещения появление электрического поля происходит за счет локальных потенциалов, созданных в результате фотохимического переноса электрона ФС I и ФС II. Затем транслокация H^+ пластохиноном также дает свой вклад в разность электрических потенциалов, увеличивая положительный заряд внутри тилакоида. По направлению образованного поля происходит электрогенное движение хорошо проникающих через мембрану ионов, которые своими зарядами компенсируют мембранный электрический потенциал $\Delta\phi$, тем самым облегчая пере-

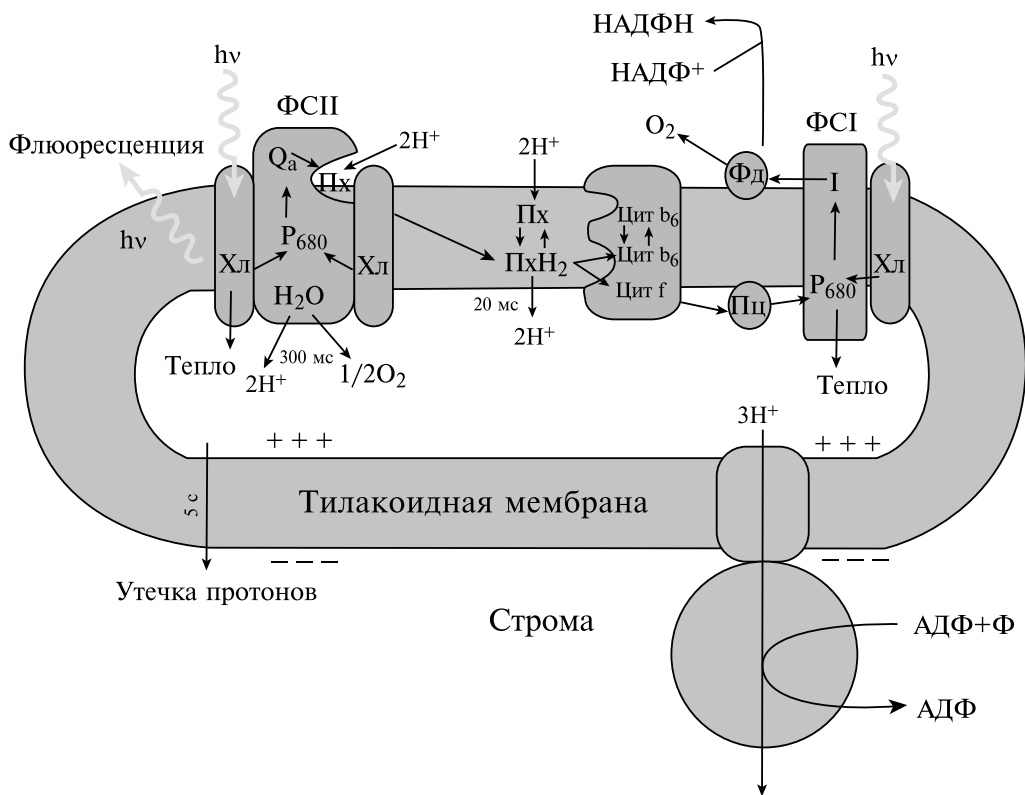


Рис. XXIV.7.

Схема трансмембранного переноса протонов в фотосинтетической мембране

нос протонов и одновременно способствуя увеличению $\Delta\mu\text{H}^+$. В хлоропластах такими компенсирующими ионами являются K^+ , Mg^{2+} и Cl^- .

Возможна и противоположная ситуация, когда индуцируется стехиометрический обмен с протоном катионов — антипорт, и анионов — симпорт (см. § 2, гл. XXI). Если скорость антипорта и симпорта ионов близка к скорости транслока-

ции протона ЭТЦ, химический потенциал протонов с каждой стороны мембраны будет возвращаться к исходному и значение ΔpH , создаваемое электронным транспортом, будет минимальным, а электрическая составляющая трансмембранного потенциала — максимально высокой. Наоборот, электрогенное движение заряженных ионов по направлению поля максимально увеличит ΔpH и уменьшит мембранный потенциал. В определенных условиях взаимодействие этих процессов может обратить в нуль сумму обоих компонентов, что фактически и происходит в присутствии разобщителей (см. § 2 гл. XXI). Таким образом, действительная величина электрохимического градиента в стационарных условиях будет зависеть от соотношения скоростей всех указанных процессов ионного транспорта.

Рассмотрим возможность использования самого понятия ΔpH внутри частиц малого размера, какими являются клеточные органеллы: хлоропласты, хроматофоры и митохондрии. При переносе протонов происходит подкисление внутренней фазы тилакоида и сдвиг pH до значений pH 5, что соответствует концентрации H^+ , равной 10^{-5} М во внутритилакоидном пространстве. Учитывая, что осмотический объем одного тилакоида составляет $(1 \div 6) \cdot 10^6$ нм³, нетрудно подсчитать, что в водной фазе внутритилакоидного пространства одного тилакоида находится всего лишь от 6 до 36 протонов. Это более чем на порядок ниже числа ЭТЦ в тилакоиде, которое приближается к ~ 300 . Между тем общее число протонов, перенесенных в тех же условиях стационарного освещения в отсутствие фосфорилирования во внутреннюю фазу тилакоида, составляет около 100 протонов на одну ЭТЦ. Это означает, что не менее 99% всех протонов связано во внутренней фазе с буферными группами, природа которых до конца неизвестна.

Следует учесть также функциональную и структурную неоднородность тилакоида, связанную с латеральной гетерогенностью мембран. Комплексы ФС II локализованы в местах контакта тилакоидов гран, ФС I и АТФ-синтетазный комплексы — в зонах свободного контакта со стромой в ламелярных тилакоидах и маргинальных торцовых участках тилакоидов гран. Цитохромный комплекс и пластохинон равномерно распределены в латеральном плане мембраны. Диффундирующий внутри тилакоида пластоцианин имеет разную долю восстановленных молекул в центре тилакоида и на краях. Скорость транспорта электронов по ЭТЦ зависит от pH внутри тилакоида и pH стромы. Для тилакоидов, собранных в граны, может иметь значение нехватка протонов в тонком водном слое между дисками для образования PQH_2 из-за медленной диффузии ионов из стромы через узкую межгранную щель. Реалистичное описание зависимости внутритилакоидного pH и числа поглощенных на свету протонов от pH стромы дает математическая модель, описывающая диффузный перенос протонов через мембрану тилакоида путем обмена H^+ с внутримембранными кислотными группами (Тихонов). Таким образом, все процессы электронного и протонного транспорта и их сопряжения необходимо рассматривать в распределенной гетерогенной системе.

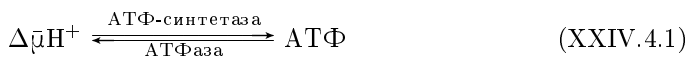
При столь малых объемах тилакоида поверхностные заряды мембраны также могут влиять на поведение ионов в прилегающем к мембране диффузном электрическом слое (см. § 5 гл. XVIII). Размеры данного слоя сравнимы с расстояниями между близкими поверхностями тилакоидных мембран, обращенных в сторону матрикса. Очевидно, значительная часть протонов не выходит внутрь тилакоида, а остается связанной внутри мембраны в метастабильных протонных пулах. Распределение H^+

внутри тилакоида носит не равномерный, а локальный характер, соответствующий протонсвязывающим свойствам участков мембраны. Вследствие такого рода латеральной гетерогенности тилакоидных мембран внутреннее пространство может разделяться на отдельные сравнительно изолированные друг от друга компартменты, между которыми протонное равновесие устанавливается медленно. В частности, известны данные, когда в ответ на короткие вспышки света происходит синтез АТФ, а значение рН внутри тилакоида практически не меняется, оставаясь около 7,5–8,0. Возможно, что протоны, выделяющиеся при разложении воды и окислении пластогидрохинона, попадают к АТФ-синтезным центрам, мигрируя вдоль поверхности мембраны и не выходя в водную фазу внутритилакоидного пространства. Основой для недиффузионного латерального переноса протона по примембранному слою могут быть ионогенные группы белков (в первую очередь карбоксильные группы), образующие системы кооперативных Н-связей, обеспечивающих возможность переноса протона по эстафете Н-связей. Есть основания предполагать, что латеральный поток протонов к АТФазе в определенных условиях имеет место в ФС II.

Таким образом, смысл параметра $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ как движущей силы синтеза АТФ носит в значительной степени общий термодинамический характер. Действительная проблема состоит здесь не в значении $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ и сопоставлении его с количеством образованных молекул АТФ, а в механизмах внутримолекулярных превращений в АТФ-синтезном комплексе. \square

§ 4. АТФазный комплекс

В настоящее время протонные АТФазы выделены практически из всех типов сопрягающих мембран: митохондрий, хлоропластов, хроматофоров. АТФазный комплекс, или H^+ -АТФаза, — обратимый фермент, обладающий как АТФ-синтезными, так и АТФазными функциями. Синтез АТФ осуществляется за счет $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$, а гидролиз АТФ приводит к тому, что протонная АТФаза сопряженно генерирует трансмембранную разность электрохимического потенциала H^+ . Таким образом, в H^+ -АТФазе происходят процессы по общей схеме



АТФазный комплекс (F_0F_1 -АТФаза) состоит из растворимой АТФазы (фактор F_1) и мембранных компонентов (комплекс F_0). Общая топография АТФазного комплекса приведена на рис. XXIV.8.

Считают, что F_0 формирует канал, по которому протоны поступают к активному центру АТФазы. Проводимость протонов носит специфический характер и подавляется антибиотиком олигомицином и ДЦКД (N, N'-дициклогексилкарбодимид) — ингибиторами H^+ -АТФазы. Особым образом организованный канал обеспечивает прохождение протона через всю мембрану из водной фазы в гидрофобную область мембраны, а затем из нее в воду по другую сторону липопротеинового барьера. Основную роль в переносе играет ДЦКД-связывающий протеолипид. Предполагают, что он располагается поперек мембраны, так что полярная часть оказывается на внешней поверхности мембраны митохондрий и служит входом в

канал. Наиболее вероятным механизмом переноса протона представляется эстафетная передача по протон-донорным и протон-акцепторным группам аминокислот, включая остатки *арг*, *тир* и *глю*.

Предполагая, что индивидуальный перенос H^+ (либо вдоль водородных связей, либо путем туннелирования между центрами) происходит на величину, не превосходящую 0,2–0,3 нм, легко подсчитать, что для того, чтобы пересечь всю мембрану (4–5 нм), число групп должно быть не менее 15–20.

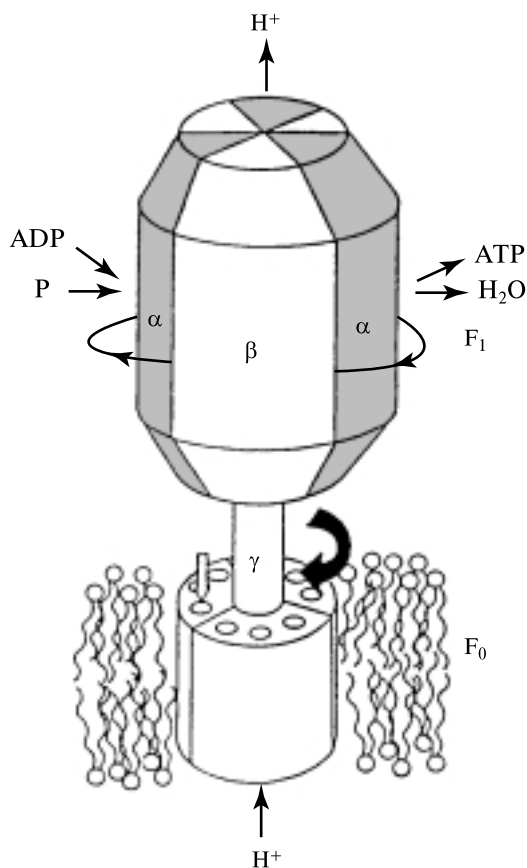
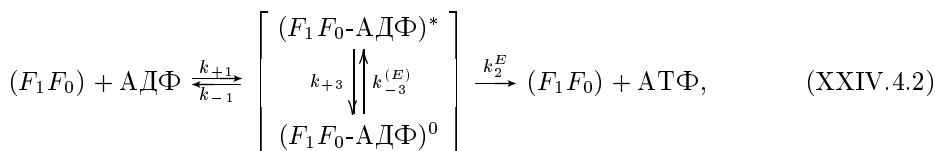


Рис. XXIV.8.
Строение H^+ -АТФазного комплекса
(по J. K. Lanyi, 1995)

Для выяснения функции отдельных субъединиц был успешно использован иммунохимический анализ, а также различные препаративные методы, позволившие получать молекулы F_1 без тех или иных субъединиц. Основные каталитические свойства фактора F_1 обеспечиваются α - и β -субъединицами, где расположены места связывания нуклеотидов с разным средством. α -субъединица фермента содержит некаталитические центры, обладающие высоким средством к АДФ и высокой специфичностью ее связывания. На β -субъединице локализованы активные центры АТФазной реакции, субстратом для которой служит комплекс Mg^{2+} -АТФ (свобод-

ные Mg^{2+} и АТФ — конкурентные ингибиторы фермента). Минорные субъединицы (γ, δ, ϵ), в отсутствие которых сохраняется АТФазная активность, обеспечивают процессы пассивной утечки H^+ через АТФазу, регуляцию АТФазной активности, а также связывание каталитического сектора с мембраной. Работа АТФазы сопровождается кооперативными конформационными перестройками, затрагивающими четвертичную структуру фермента, для чего требуется приток энергии. Так, в мембранах хлоропластов АТФаза находится в латентной форме, которая может активироваться с изменением четвертичной структуры при освещении в присутствии ионов Mg^{2+} и SH-групп, при создании на мембране протонного градиента или действии внешнего электрического поля. Схема строения H^+ -АТФазы приведена на рис. XXIV.8.

Переходы между различными состояниями можно представить в виде:



где $(F_1F_0\text{-АДФ})^*$ и $(F_1F_0\text{-АДФ})^0$ — активная и неактивная формы H^+ -АТФазы в комплексе с АДФ, индекс E в символах $k_2^{(E)}$, $k_{-3}^{(E)}$ означает, что соответствующие процессы требуют притока энергии. Характерные времена переходов ($1/k_{+3} \approx 1/k_{-3}$) между состояниями * и 0 должны составлять несколько секунд, что намного медленнее, чем непосредственные реакции синтеза и гидролиза АТФ ($10^{-3}\text{-}10^{-2}$ с). Отсюда следует, что энергизация H^+ -АТФазы происходит не во время ее функционирования, а предшествует ему.

§ 5. Механизм энергетического сопряжения

Согласно хемиосмотическому механизму захват энергии, выделяющейся в процессах электронного транспорта, осуществляется за счет создания трансмембранной разности $\Delta\bar{\mu}H^+$, а перенос энергии к АТФ-синтазе обеспечивается потоком протонов через ее протонный канал.

Синтез АТФ из АДФ и Φ_n может происходить в мембранных везикулах и в отсутствие переносчиков электронов. Для этого необходимо лишь тем или иным образом создать трансмембранную разность электрохимических потенциалов H^+ на мембране, в которой находится АТФ-синтаза. Такого рода процессы синтеза АТФ наблюдаются в липосомах из фосфолипидов, в состав которых помимо АТФ-синтазы входит бактериородопсин (см. гл. XXIX), способный под действием света переносить H^+ через мембраны. Аналогично, синтез АТФ можно осуществить, создав разность $\Delta\bar{\mu}H^+$ с помощью «кислотно-щелочного удара» или прикладывая разность электрических потенциалов. В действительности проблема состоит в том, чтобы понять, каким образом компоненты $\Delta\bar{\mu}H^+$ взаимодействуют с H^+ -АТФазой, не вовлекая непосредственно перенос электрона в ЭТЦ.

Хемиосмотический принцип трансформации энергии не может объяснить непосредственного молекулярного механизма синтеза АТФ. Согласно одному из первых вариантов хемиосмотической гипотезы, образование АТФ сопряжено с распадом

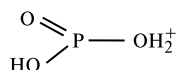
высокоэнергетического предшественника $X \sim Y$. Считали, что существуют некие компоненты (подвижные в липидах ионы) X и Y , находящиеся в мембране в виде XH^+ и YOH^+ , которые могут диссоциировать: $XH \rightleftharpoons X^- + H^+$; $YOH \rightleftharpoons YO^- + H^+$.

В митохондриальной мембране у внешней стороны происходит реакция конденсации [см. (XXIV.1.1)–(XXIV.1.3)]



Эта реакция сильно сдвинута вправо за счет повышения трансмембранного ΔpH и движения анионов X^- и YO^- к внешней поверхности под действием сил трансмембранного электрического поля. На схеме (XXIV.5.1) природа X и Y по-прежнему остается неизвестной. Однако главный недостаток хемиосмотического принципа сопряжения состоит в том, что роль $\Delta \bar{\mu}H^+$ здесь сводится лишь к пассивному фактору, сдвигающему химические равновесия в системе реакций. В самом деле, величина $\Delta \bar{\mu}H^+$ в соответствии с представлениями классической термодинамики и кинетики определяет среднестатистическую вероятность, или среднее число актов переноса протонов между поверхностями мембраны, разделенными энергетическим барьером $\Delta \bar{\mu}H^+$ [ср. (XIV.1.1)]. Однако само по себе значение $\Delta \bar{\mu}H^+$ не раскрывает молекулярных механизмов процесса прохождения единичного протона через H^+ -АТФ-синтазу и синтеза АТФ в активном центре. Иными словами, несмотря на успех хемиосмотической теории, доказавшей роль $\Delta \bar{\mu}H^+$ в качестве движущей силы синтеза АТФ, одного лишь концентрационного градиента протонов недостаточно для понимания молекулярного механизма сопряжения. Необходимо принимать во внимание активную роль протонов, непосредственно взаимодействующих с макромолекулярным комплексом H^+ -АТФазы.

Согласно представлениям Митчела, в активный центр АТФазы нагнетаются протоны, которые непосредственно восстанавливают фосфорильный кислород неорганического фосфата в активном центре, образуя соединения типа



Преодоление энергетического барьера элементарного акта синтеза АТФ достигается за счет «горячих» протонов, которые разгоняются электрическим полем в протонном канале H^+ -АТФазы. Таким образом, передача энергии $\Delta \bar{\mu}H^+$ должна была бы осуществляться здесь путем трансформации кинетической энергии протонов. Но в конденсированной фазе, где релаксация возбужденных степеней свободы происходит быстро (10^{-12} – 10^{-11} с), такой механизм также невозможен. Не спасает положение и представление о некоем аккумуляторе, в котором должны накапливаться протоны, движущиеся внутри АТФ-синтазы до тех пор, пока не наберется энергия, достаточная для синтеза одной молекулы АТФ.

Можно было бы попытаться использовать только электрическую составляющую $\Delta \phi$ в качестве движущей силы, смещающей полярные группы в ходе элементарного акта. Однако тогда необходимо сделать предположение, что все падение напряжения на мембране реализуется в активном центре на расстояниях действия химических или, в крайнем случае, межмолекулярных сил, т. е. на 0,3–0,4 нм. Это представляется нереальным (Л. А. Блюменфельд).

∇ В действительности проблему синтеза АТФ в H^+ -АТФ-синтетазе следует рассматривать исходя из общих представлений о роли электронно-конформационных взаимодействий в механизмах ферментативного катализа (гл. XIV).

Как известно, элементарный акт катализа осуществляется в активном центре фермента спонтанно, когда в нем достигается реакционноспособная конфигурация между реагирующими группами субстрата и фермента, расположенными на расстояниях порядка длин химических связей. На стадиях взаимодействия субстрата и фермента при образовании активной конфигурации и затем при отщеплении образовавшегося продукта в ферменте происходят конформационные изменения. Такие внешние факторы, как температура, ионная сила раствора, вязкость, могут влиять на эти релаксационные стадии. Однако непосредственный акт катализа в сформированной активной конфигурации уже не требует тепловой энергии активации. □

Именно с этими представлениями согласуются результаты Дж. Бойера. Элементарный акт образования АТФ может происходить в активном центре H^+ -АТФазы в условиях дезэнергизации мембраны, когда $\Delta\bar{\mu}H^+ = 0$, и даже в активном центре изолированного фактора F_1 , находящегося в растворе. Однако валовой синтез АТФ при дезэнергизации практически не происходит. Изучение реакций изотопного обмена ^{18}O ($ATP \rightleftharpoons H_2^{18}O$) показало, что стадией, определяющей крайне низкую скорость валового синтеза АТФ в отсутствие $\Delta\bar{\mu}H^+$, является освобождение синтезированного АТФ из активного центра (Boyer P. D.). Именно этот процесс ускоряется (в 1000 раз) при энергизации мембраны. Таким образом, энергия $\Delta\bar{\mu}H^+$ используется в основном для вытеснения прочносвязанного АТФ из каталитического центра фермента. Энергия также расходуется и при связывании ферментом фосфата и АДФ, причем каталитические центры функционируют, чередуясь в определенном порядке. Все это означает, что энергия $\Delta\bar{\mu}H^+$ расходуется не на стадии элементарного акта образования ковалентной связи АДФ \sim Ф в активном центре фермента, а влияет на процессы связывания ферментом субстрата и освобождения продукта реакции из активного центра.

Согласно одной из схем, в комплексе существуют два активных центра, которые могут находиться либо в открытом, либо в закрытом состоянии. Связывание АДФ и Ф в одном центре вызывает такое изменение конформации, которое способствует высвобождению АТФ из другого центра. Аналогично этому, в процессе гидролиза АТФ связывание и гидролиз АТФ приводят к быстрой диссоциации АДФ и Ф_n из альтернативного центра. Роль компонентов $\Delta\bar{\mu}H^+$ состоит в протонировании определенных молекулярных групп ΔpH или изменении положения полярных групп под действием электрического поля $\Delta\phi$. При этом (см. § 3 гл. XIV) изменяется характер движения отдельных групп белка в конформационном потенциале. Это и может непосредственно влиять на формирование фермент-субстратного комплекса при связывании субстрата и на отщепление продукта реакции, т. е. на процессы, происходящие в ходе конформационной релаксации.

Так, считается, что энергия $\Delta\phi$ используется для движения комплекса предсинтезированной АТФ⁴⁻ с лигандами некаталитического центра $[ATP Mg 3RNH_3]^{2+}$ к внутренней поверхности мембраны, где и происходит диссоциация АТФ в матрикс. Когда движущей силой синтеза АТФ является ΔpH , а не $\Delta\phi$, то транслокация положительно заряженного комплекса АТФ с лигандами осуществляется под дей-

ствием локальных электрических полей, которые возникают при протонировании аминокислотных остатков вблизи активного центра и депротонировании остатков вблизи некаталитического центра. В целом процессы связывания АТФ и субстрата $\text{АДФ} + \text{P}_n$ в активном и неактивном центрах должны быть строго сбалансированы по зарядам, что может достигаться фиксированной системой положительно (NH_3^+ , Mg^{2+}) и отрицательно (COO^-) заряженных групп.

Схема синтеза АТФ в активном центре. Рассмотрим теперь модели работы H^+ -АТФ-синтетазы, где используются новые данные о структурных перестройках, приводящих к изменению состояния каталитических центров (см. рис. XXIV.8) (Boyer P. D., Walker J., Skou J, 1997).

Сопрягающий фактор АТФазы (фактор F_1 для митохондрий или CF_1 для хлоропластов) представляет собой полифункциональный белок, имеющий сложную четвертичную структуру. Он построен из трех типов крупных субъединиц (α , β , γ с молекулярной массой 30 000–60 000) и двух типов минорных субъединиц δ , ϵ с молекулярной массой 11 000–20 000). Стехиометрия комплекса ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Разложение его на отдельные субъединицы ведет к потере ферментативной активности. «Шляпка» высотой 80 Å и шириной 100 Å (Walker J., 1994) грибовидного выроста H^+ -АТФазы соответствует фактору F_1 , частично погруженному в мембрану, а основание — гидрофобным белкам комплекса F_0 , который включает три типа полипептидов (a, b, c) с молекулярными массами от 6500 до 30 000 и обеспечивает связывание фактора F_1 с мембраной и перенос протонов при работе фермента. На каждую пару α - β -субъединиц приходится по одному полипептиду a , по два белка b и по 9–12 копий c -белка водорастворимого комплекса. Субъединицы α и β гомологичны, они уложены в белковые глобулы, которые образуют единый ансамбль, в котором α - и β -субъединицы расположены поочередно вокруг γ -субъединицы, имеющей вид слегка изогнутого стержня длиной 90 Å. Существуют кинетические и структурные доказательства наличия 3-х взаимодействующих гидролитических мест, по одному на каждой β -субъединице, отделенных друг от друга на 120 градусов. γ -субъединица как бы выступает из глобулы CF_1 , играя роль связующего звена между мембранами F_1 и водорастворимыми F_0 фрагментами АТФазы.

Было показано, что комплекс F_1 может поворачиваться вокруг оси, совпадающей по направлению с субъединицей γ . При повороте на 120° каждая из α - и β -субъединиц переместится на место другой такой же α - и β -субъединицы, а при повороте на 60° соседние α - и β -субъединицы поменяются местами (см. рис. XXIV.8).

Недавно появились прямые доказательства такого рода вращения субъединицы γ относительно «сидящего» на ней фактора сопряжения F_1 (Noji et al, 1997). Японские ученые наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа движение γ -субъединицы при гидролизе АТФ молекулой F_1 . Три β -субъединицы комплекса F_1 были иммобилизованы на неподвижной подложке, а к концу γ -субъединицы был химически «пришит» флуоресцирующий фрагмент нити актина длиной ~ 1 микрон. В ходе функционирования фермента и гидролиза АТФ происходило вращение нити актина, которое прекращалось в отсутствие АТФ. Движущей силой вращения этого молекулярного мотора является попеременное протонирование и депротонирование функционально важных аминокислотных остатков в ферменте. В результате индуцируются направленные электростатические взаимодействия, «толкающие» всю структуру комплекса по направлению вращения. Таким образом кооперативные

структурные перестройки активных центров, необходимые для работы H^+ -АТФазы, находят свое выражение в реальном вращении субъединиц относительно друг друга.

В силу некоторой асимметричности вращение F_1 -комплекса переводит его β -субъединицы при каждом повороте в новое положение, где они попадают в другое микроокружение. Это и приводит к изменению состояния и конформационной перестройке активных центров, при вращении молекулы F_1 .

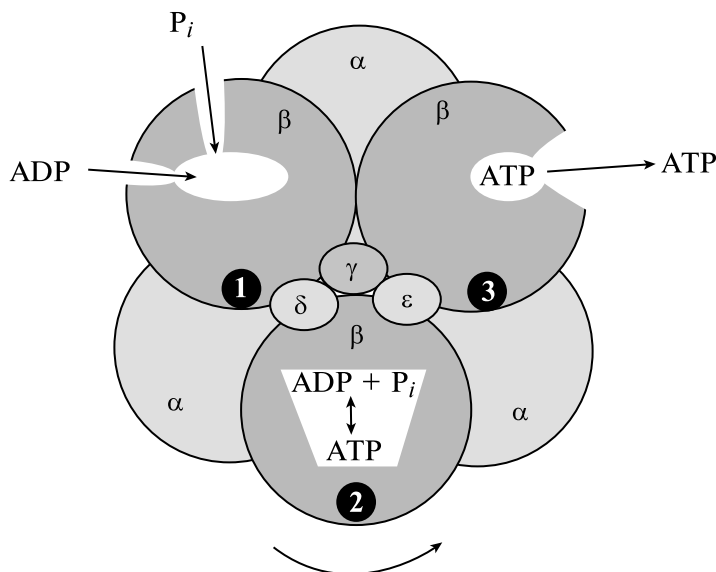


Рис. XXIV.9.

Схема, иллюстрирующая энергозависимые изменения состояния каталитических центров

Каждый из трех активных центров в результате вращения F_1 -комплекса может поочередно находиться в одном из трех конформационных состояний, которые различаются по степени сродства молекул ATP, ADP и P к каталитическому центру.

На рис. XXIV.9 схематически показана смена состояний центра при вращении β -субъединиц. В состоянии 1 центр β -субъединицы открыт и в нем связываются молекулы ADP и P, которые сравнительно слабо удерживаются центром. Вращение и конформационные перестройки комплекса F_1 переводят этот центр в состояние 2, где происходит непосредственно синтез ATP.

Здесь ADP и P прочно фиксируются в каталитическом центре, находясь в активной конфигурации, необходимой для образования ковалентной связи между фосфатными группами ADP и P. Поэтому на этой стадии, как уже говорилось выше, не требуется притока энергии извне (Boyer P. D.). В этом состоянии 2 в каталитическом центре самопроизвольно идут акты образования и разрыва ковалентной

связи ADP–P, поскольку константа равновесия реакции



близка к единице.

На следующем этапе центр переходит в состояние 3, где за счет энергозависимой структурной перестройки происходит ослабление прочной связи молекулы ATP с центром и выход ее наружу. На освободившееся место приходят из раствора новые молекулы ADP и P. Описанные перестройки носят кооперативный характер и затрагивают состояние всех трех каталитических центров β -субъединиц комплекса F_1 . Поскольку весь цикл включает три этапа, а в H^+ -АТФазе имеется 3 субъединицы, то после каждого структурного перехода в растворе появляется новая молекула ATP.

Комплекс F_0 может рассматриваться как вращающийся ансамбль субъединиц с 9–12 остановками, позволяющий прерывать поток протонов. Временное связывание протонов может осуществляться остатком Asp-6L на каждой субъединице. Каждый поворот γ -субъединицы внутри комплекса (или ансамбля $\alpha_3\beta_3$ -субъединиц вокруг субъединицы γ) происходит в соответствии с тем, заполнено ли гидролитическое место ATP или ADP и P. Эти конформационные изменения (механические изменения структуры) обеспечивают перенос 3-х или 4-х протонов через мембрану на каждый третий этап цикла. Связывание, гидролиз и освобождение АТФ и АДФ в F_0 – F_1 АТФазе зависит от величин и геометрии расположения заряда в активном месте.

Пока еще не ясна природа и расположение заряженных молекулярных групп, ответственных за непосредственное вращение молекулярного мотора H^+ -АТФазы. В целом кооперативная перестройка структуры H^+ -АТФазы связана с направленным характером электронно-конформационных взаимодействий. Движущая сила — компоненты $\Delta\mu\text{H}^+$ — изменяет электронное состояние в локальной области активного центра. В результате развиваются конформационно-релаксационные процессы, происходит изменение четвертичной структуры (вращение F_1 -комплекса), что необходимо как для связывания субстрата, так и для отщепления продуктов реакции, образовавшихся в активном центре.