

ФОТОСИНТЕЗ

В ДВУХ ТОМАХ

Под редакцией ГОВИНДЖИ

ТОМ 1

Перевод с английского
канд. физ.-мат. наук А. О. Ганаго,
И. Б. Ганаго и
А. Н. Мелкозернова

под редакцией
акад. А. А. Красновского и
проф. Ф. Ф. Литвина



Москва «Мир»

1987

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ГЛАВА
К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ
О ПРЕОБРАЗОВАНИИ ЭНЕРГИИ
ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ

Дональд Р. Орт, Говинджи
(Donald R. Ort, Govindjee)

Список сокращений

БХл	бактериохлорофилл
ДБМИБ	2,5-дибром-3-метил-6-изопропил- <i>n</i> -бензохинон
ДГДГ	дигалоктазилдиацилглицерол
ДСХ	диацилсульфохинонэтилглицерол
МГДГ	моноголактозилдиацилглицерол
ССК	светособирающий комплекс
Фд	ферредоксин
Фео	феофитин
Ф-N-P	ферредоксин-NADP — оксидоредуктаза
ФС	фотосистема
Хл	хлорофилл
Цит	цитохром
CF ₀	внутримембранная часть комплекса ферментов сопрягающего фактора
CF ₁	наружная по отношению к мембране часть комплекса ферментов сопрягающего фактора
ΔG_{ATP}	потенциал переноса фосфорильной группы в реакции образования АТФ
P680	первичный донор электронов в фотосистеме II
P700	первичный донор электронов в фотосистеме I

Краткое содержание

Задача данной главы состоит в том, чтобы дать читателю информацию о структурных компонентах фотосинтетической мембраны и механизмах реакций, составляющих процесс фотосинтеза. По мере возможности структура и функция рассмат-

риваются совместно. При таком подходе становится более очевидной их взаимосвязь. Однако во многих случаях современный уровень наших знаний вынуждает ограничиваться таким изложением проблемы, при котором структура и функция рассматриваются по отдельности, а затем проводится их сопоставление.

Можно с уверенностью говорить о том, что исследования фотосинтеза в настоящее время быстро развиваются благодаря новым данным о молекулярной структуре различных функциональных компонентов фотосинтетических мембран. Наиболее ярким примером является недавно полученная рентгеноструктурная информация о реакционном центре фотосинтезирующей бактерии *Rhodospseudomonas viridis*. Эти сведения оказались очень своевременными: их можно непосредственно и незамедлительно использовать для выяснения механизма первичных процессов фотосинтеза. С другой стороны, получение новой информации о структуре может сыграть решающую роль в определении будущих направлений исследования первичных реакций фотосинтеза и процессов переноса электронов. Благодаря сходству между реакционными центрами не выделяющих кислород фотосинтезирующих бактерий и реакционными центрами фотосистемы (ФС) II растений можно ожидать, что успехи в изучении реакционных центров из *Rh. viridis* позволят глубже проникнуть в устройство фотосистемы II.

Получение рентгеноструктурных данных о кристаллах мембранных белков — это лишь один путь изучения структуры компонентов фотосинтетического аппарата. Огромный прогресс достигнут в последние годы в работах по выделению и секвенированию генов, кодирующих полипептиды хлоропластных мембран. Полученная информация позволила построить двумерные модели упаковки этих полипептидов, основанные на их профилях гидрофобности. К примеру, анализ гидрофобности для индивидуальных полипептидных субъединиц комплекса цитохромов b_6/f позволил указать возможное расположение трех гемов и Fe_2-S -центра. Полученные выводы используются при построении современных схем переноса электронов с участием этого комплекса. Банк данных о молекулярной структуре пополняется результатами измерений рассеяния нейтронов и электронов, сведениями из электронной микроскопии и иммунохимии, исследованиями спектров резонансного комбинационного рассеяния, линейного и кругового дихроизма, ЯМР и ЭПР.

Порою кажется, что исследования механизмов реакций и исследования структуры компонентов фотосинтетической мембраны уже сливаются воедино, образуя цельную и гармоничную картину. Поэтому перспективы качественного прогресса в понимании фотосинтеза сегодня замечательны как никогда. В данной главе мы попытались подытожить современные представле-

ния о преобразовании энергии света в химическую энергию, обеспечивающую восстановление NADP⁺ и синтез АТФ в растениях. Повсюду, где это было возможно, упомянуты и исследования фотосинтезирующих бактерий.

I

ВВЕДЕНИЕ

Наши представления о химическом составе и о структуре мембран фотосинтезирующих организмов, содержащих хлорофилл (Хл) или бактериохлорофилл (БХл), существенно углубились за последние годы. Огромным успехом в этой области стала недавно выполненная работа по кристаллизации компонента фотосинтетической мембраны — реакционного центра из бактерии *Rhodospseudomonas viridis*, являющегося комплексом бактериохлорофилла с белком (Deisenhofer et al., 1985 a, b; Michel, Deisenhofer, 1986). Тем не менее наши сведения об организации и ориентации компонентов мембран, содержащих хлорофилл, далеко не полны, и это не позволяет до конца понять механизмы процессов поглощения света и запасания световой энергии, транспорта электронов и движения протонов. Поэтому целью исследований по фотосинтезу остается выяснение структуры мембран в связи с функцией их компонентов. В последнее время в этом направлении достигнуты впечатляющие успехи, хотя до полного понимания структурной организации и функционирования фотосинтетического аппарата еще далеко.

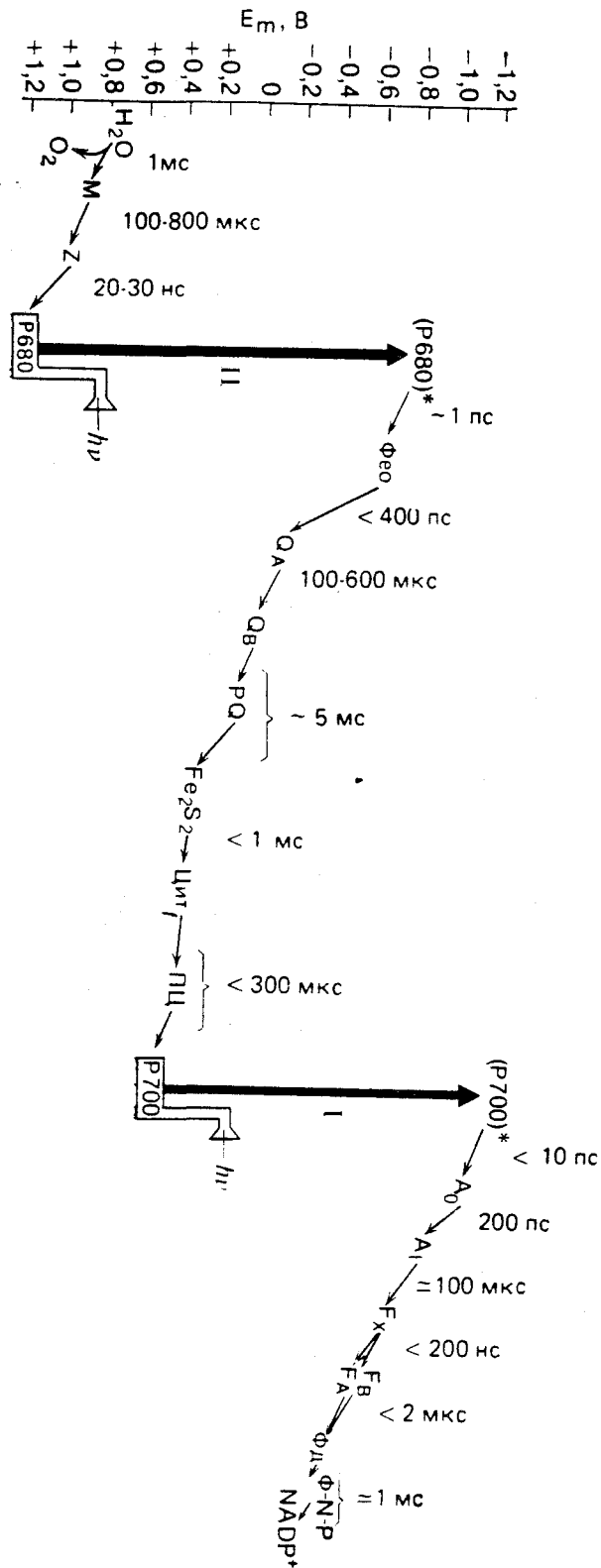
В этой обзорной главе мы попытались свести воедино современные данные об организации белковых компонентов мембраны хлоропластов и о том, какие функции выполняют различные белки. Что касается исследований по фотосинтезирующим бактериям, читателю можно порекомендовать обзорные работы (Amesz, Knaff, 1985; Blankenship, 1985; Michel, Deisenhofer, 1986; Norris, 1986) и различные главы данного тома.

Следует иметь в виду, что сходство между фотосинтезирующими бактериями и растениями оказывается гораздо более глубоким и важным, чем различие между ними. Многие основные представления сформировались в результате сравнительного изучения «бактериального» и «растительного» фотосинтеза (гл. 2). Параллели между бактериями и растениями существуют на многих уровнях структуры и функции, и только окисление воды можно считать единственным отличием фотосинтеза растений. При этом нельзя забывать, что цианобактерии, являющиеся несомненно прокариотами, осуществляют процесс фотосинтеза, в том числе и выделяют кислород, и в этом по сути не отличимы от высших растений. Поразительные параллели между фотосинтезом бактерий и растений указывают на эндо-

симбиотическое происхождение хлоропластов — в результате «вторжения» прокариотических организмов (Whatley et al., 1979). Гипотеза об эндосимбиотическом происхождении хлоропластов косвенно подтверждается многочисленными данными, полученными при морфологических, биохимических и генетических исследованиях (Gray, Doolittle, 1982). В пользу родственной связи между современными цианобактериями и древними вторгшимися в клетку симбионтами убедительно свидетельствуют результаты анализа рибосомной РНК красных водорослей *Rhodophyta* (Fox et al., 1980). Наличие филогенетической связи между бактериями и хлоропластами зеленых растений установлено менее точно, но это, возможно, объясняется лишь тем, что прокариотический «предок» хлоропластов либо утрачен, либо еще не найден. Высказывается предположение о том, что эволюционным предшественником хлоропластов зеленых водорослей и высших растений могут служить представители рода *Prochloron* (Stanier, Cohen-Bazire, 1977; Griddings et al., 1980). Как бы то ни было, представление о симбиотическом происхождении хлоропластов позволяет по-настоящему понять замечательное сходство между фотосинтезом у бактерий и растений. (Более подробное обсуждение этого вопроса можно найти в работе Govindjee, Satoh, 1986.)

В течение более чем двух десятков лет наши представления о фотосинтезе, в ходе которого выделяется кислород, формировались под влиянием всем хорошо знакомой Z-схемы электронного транспорта (Hill, Bendall, 1960; история вопроса изложена в работе Govindjee, Govindjee, 1975). Z-схема оказалась удобным педагогическим приемом для того, чтобы ввести понятие о двух последовательно работающих фотохимических реакциях и об электронах, движущихся «вниз» по энергетическим уровням от сильного восстановителя к сильному окислителю, которые образуются в каждой из фотосистем при поглощении света. Главный недостаток Z-схемы в том, что в настоящее время еще мало точных сведений о движении электронов «вниз» по энергетическим уровням. Глядя на упрощенный вариант Z-схемы (к примеру, на рис. 1), можно вообразить, будто транспорт электронов между фотосистемами происходит по хорошо известной цепи переносчиков, тогда как на самом деле электроны от многих реакционных центров фотосистемы II могут накапливаться в некоторых пулах, подобно электронам, донированным одним реакционным центром при последовательном поглощении нескольких квантов света.

Фотосинтетическая мембрана растения осуществляет замечательную реакцию: она превращает энергию поглощенных квантов света в окислительно-восстановительный потенциал NADPH и в потенциал реакции переноса фосфорильной группы



в молекуле АТФ. При этом происходит преобразование энергии из очень короткоживущей ее формы в форму достаточно долгоживущую; стабилизированная таким образом энергия может быть гораздо позже использована в биохимических реакциях растительной клетки, в том числе и в реакциях, приводящих к восстановлению углекислоты. Процесс преобразования энергии света в энергию стабильных продуктов можно ради простоты обсуждения разделить на дискретные стадии и представить его в виде отдельных реакций, приводящих к согласованным циклическим превращениям в обеих фотосистемах. Однако такой анализ может быть использован лишь в качестве педагогического приема. Хотя для процесса фотосинтеза необходимы обе фотосистемы, реакции в них не обязательно должны происходить в унисон, поскольку, как уже сказано, может осуществляться накопление электронов на переносчиках между фотосистемами.

Первый этап преобразования энергии — это поглощение света одной из многих молекул хлорофилла (см. гл. 6) или связанными с ними «вспомогательными» пигментами. Такая пигментная «антенна» должна быть достаточно велика, чтобы обеспечить эффективное поглощение света, особенно в тех случаях, когда его не хватает. Поэтому молекул, поглощающих свет, намного больше, чем реакционных центров, которые в конечном счете используют энергию возбуждения для химической реак-

←
РИС. 1

Современная Z-схема, описывающая последовательность расположения переносчиков в электрон-транспортной цепи при фотосинтезе, сопровождающемся выделением кислорода.

Показано время, необходимое для осуществления отдельных реакций; приведены также окислительно-восстановительные потенциалы средней точки E_m . 7. Воду окисляет комплекс фотосистемы II (на рисунке обозначен II). Челночный перенос электронов от комплекса фотосистемы II к расположенному между фотосистемами комплексу цитохромов b_6/f , в состав которого входит Fe-S-центр Риске (Fe_2S_2), цитохром f (Цит f) и цитохром b_6 (на рисунке не показан), осуществляется пулом подвижного липофильного переносчика — пластохинона (ПХ, PQ). В свою очередь комплекс цитохромов b_6/f восстанавливает небольшой пул водорастворимого металлопротеина — пластоцианина (ПЦ), который служит для передачи восстановительных эквивалентов на комплекс фотосистемы I (обозначен I). Таким образом, несмотря на то что последовательность реакций переноса электронов при фотосинтезе известна, нельзя считать, что переносчики функционируют в полностью детерминированной цепи. Другие обозначения на рисунке: М — комплекс, накапливающий заряды при выделении кислорода; Z — пластохинол (восстановленный пластохинон), являющийся донором электронов для P680, хлорофилла реакционного центра в фотосистеме II; Фео — феофитин; Q_A — первый хиноновый акцептор электронов; Q_B — второй хиноновый акцептор электронов; A_0 — молекула типа хлорофилла a ; A_1 — возможно, пластохинон; F_X , F_B , F_A — Fe-S-центры X, B, A; Фд — ферредоксин; Ф-N-P — ферредоксин-NADP⁺-редуктаза; NADP⁺ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат. (Govindjee, Eaton-Rye, 1986.)

ции. Возбуждение, возникшее в молекуле пигмента, поглотившей квант света, передается от нее к другой молекуле пигмента, от той — к следующей, и т. д. по всей антенне, до тех пор пока оно не будет «захвачено» особой молекулой хлорофилла в реакционном центре (см. гл. 5 и 7). Затем возбужденная молекула хлорофилла в реакционном центре отдает электрон молекуле акцептора, химическая природа которой зависит от того, о какой именно фотосистеме идет речь. Хотя фотохимические реакции, происходящие в реакционных центрах двух фотосистем, различны, обе фотосистемы осуществляют преобразование энергии, запасенной в результате смещения электронов и ядер в возбужденной светом молекуле хлорофилла *a*, в энергию восстановленной молекулы акцептора электронов и окисленной молекулы хлорофилла (см. гл. 8). Перенос электронов происходит поперек диэлектрического слоя в фотосинтетической мембране. Поэтому часть энергии запасается в виде энергии электрических зарядов, расположенных асимметрично по отношению к мембране. Реакции между окисленными молекулами хлорофилла и донорами водорода приводят к образованию ионов водорода, при этом сохраняется асимметрия расположения зарядов относительно мембраны. Таким образом эта асимметрия преобразуется в трансмембранный электрохимический потенциал ионов водорода. Каким-то, пока еще не понятным, способом разность потенциалов ионов водорода используется для осуществления реакции переноса фосфорильной группы при синтезе АТФ.

В данной главе основное внимание обращено на последние достижения в исследовании природы упомянутых процессов преобразования энергии. Цель главы в том, чтобы, с одной стороны, дать общие представления о связанных с мембраной реакциях фотосинтеза с выделением кислорода, а с другой — послужить введением к более подробному описанию отдельных процессов в различных главах этого двухтомника. Мы стремились разъяснить основные понятия и дать картину современного уровня наших знаний; поэтому меньше внимания уделено истории возникновения идей и получения подтверждающих их фактов. Во многих случаях мы ссылаемся не на оригинальные работы, как бы важны они ни были, а на недавно опубликованные обзоры, где они упомянуты.

II

ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ И ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Фотосинтез начинается с поглощения света. Согласно принципу Франка — Кондона (Franck, Condon), при поглощении света электрон в молекуле переходит с низшего колебательного под-

уровня основного электронного состояния на один из высших колебательных подуровней возбужденного электронного состояния. По классической теории электромагнитная волна возбуждает колебания диполя, и время, необходимое для поглощения света, имеет тот же порядок величины, что и период одного колебания, т. е. 10^{-15} с, или 1 фемтосекунда (фс) (для длины волны света 400 нм период колебания составляет $1,33 \cdot 10^{-15}$ с). Если под действием света молекула перешла в одно из высших электронных возбужденных состояний, то происходит быстрая (за 10—100 фс) релаксация (внутренняя конверсия) в первое синглетное возбужденное состояние. При этом значительная часть поглощенной энергии теряется и становится недоступной для преобразования в химическую энергию (например, при возбуждении молекул хлорофилла светом с длиной волны 400 нм поглощенная энергия составляет 72 ккал/моль, из них почти 30 ккал/моль теряется при релаксации). Энергия первого возбужденного синглетного состояния расходуется в нескольких дезактивационных процессах первого порядка, и квантовый выход переноса энергии возбуждения Φ_{tr} можно записать в виде

$$\Phi_{tr} = \frac{k_{tr}}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_{tr}} \quad (1)$$

где k_f — константа скорости для флуоресценции, k_{ic} — константа скорости для безызлучательной релаксации (внутренняя конверсия); k_{isc} — константа скорости перехода в иные электронные состояния (интеркомбинационная конверсия), например в триплетное состояние; k_{tr} — константа скорости для переноса энергии. При обычных условиях константа скорости k_{isc} в фотосинтетических системах пренебрежимо мала. В реакционном центре дезактивация возбужденного состояния происходит главным образом путем фотохимической реакции, поэтому нужно учитывать ее константу скорости k_p ; квантовый выход фотохимической реакции зависит еще и от концентрации открытых реакционных центров [Q]:

$$\Phi_p = \frac{k_p [Q]}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_{tr} + k_p [Q]} \quad (2)$$

В этом разделе мы кратко рассмотрим процессы поглощения света, флуоресценции и переноса энергии возбуждения. Читателю можно порекомендовать обзорные работы по переносу энергии (Кнох, 1975; гл. 7 в этом томе; van Grondelle, Amesz, 1986); основные представления о поглощении света описаны в работах (Rabinowitch, Govindjee, 1969; Sauer, 1975; Clayton, 1977).

Энергетические уровни (а следовательно, и спектры поглощения) фотосинтетических пигментов можно рассчитать, зная их дипольные моменты переходов, которые в свою очередь вычисляются из волновых функций, описывающих распределение электронной плотности в основном и возбужденном состояниях:

$$\sim |\mu_{01}|^2; \quad \mu_{01} = \iiint \psi_0 \mu \psi_1 dx dy dz \quad (3)$$

где ϵ — коэффициент экстинкции; $|\mu_{01}|^2$ — сила диполя; μ_{01} — дипольный момент; ψ_0 и ψ_1 — электронные волновые функции основного и возбужденного электронных состояний соответственно; μ — оператор дипольного момента. Волновые функции ψ_0 и ψ_1 связаны с электронными плотностями молекулярных орбиталей. Используя аппарат квантовой механики и численные методы расчета, Шипман (см. гл. 6) вычислил спектры поглощения хлорофиллида *a* (а следовательно, и хлорофилла *a*); результаты расчета согласуются с данными опытов. Поэтому можно считать, что законы поглощения света адекватно описывают процесс поглощения и в столь сложных молекулах, как те, что участвуют в фотосинтезе.

Спектры поглощения несут информацию не только о том, какие пигменты присутствуют в системе, при каких длинах волн они поглощают свет и какова их концентрация, но также и о собственном времени жизни флуоресценции (т. е. о времени жизни возбужденного состояния, которое наблюдалось бы в том случае, когда флуоресценция является единственным каналом дезактивации):

$$\tau_0^{-1} \simeq 3 \cdot 10^{-9} (\tilde{\nu}_m)^2 \cdot \Delta \tilde{\nu} \epsilon_m \quad (4)$$

где τ_0 — собственное время жизни флуоресценции; $\tilde{\nu}_m$ — волновое число (в см^{-1}) для максимума поглощения, соответствующего переходу в первое синглетное возбужденное состояние (в случае хлорофилла — в красной области спектра); волновое число $\tilde{\nu} = 1/\lambda$, где λ — длина волны; $\Delta \tilde{\nu}$ — ширина полосы поглощения на уровне $\frac{1}{2} \epsilon_m$, выраженная в см^{-1} ; ϵ_m — молярный коэффициент экстинкции, выраженный в $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Для хлорофилла *a* расчет дает $\tau_0 = 15$ нс.

У высших растений в поглощении света участвуют три группы пигментов: каротиноиды, хлорофилл *b* и хлорофилл *a*; все они связаны с белковыми комплексами. В фотосистеме II найдены три основных хлорофилл-белковых комплекса: CP-47 с

молекулярной массой $M_r \sim 50$ кДа¹, СР-43 массой $M_r \sim 47$ кДа и ССК-II, содержащий четыре полипептида массой 29, 27, 26 и 25 кДа. Каждый из комплексов СР-47 и СР-43 содержит около 50 молекул хлорофилла *a*; с каждым полипептидом комплекса ССК-II связано 10—13 молекул Хл *a*+Хл *b*. Соотношение Хл *a*:Хл *b* для комплекса ССК-II равно 1:3 (см., например, главу 3 в этом томе). В фотосистеме I также найдены три основных комплекса: СР-62, СР-58 и ССК-I (содержащий четыре полипептида массой 23, 22, 21 и 20 кДа). С каждым из комплексов СР-62 и СР-58 связано около 50 молекул хлорофилла *a*. Комплекс ССК-I удалось разделить на два: ССК-Ia и ССК-Ib; первый из этих комплексов состоит из полипептидов массой 23 и 22 кДа, второй — из полипептидов массой 20 кДа. Каждый из комплексов ССК-Ia и ССК-Ib содержит 38 молекул хлорофилла *a* и 12 молекул хлорофилла *b* (Malkin, 1986). Хлорофилл *a* реакционного центра фотосистемы II, P680, и хлорофилл *a* реакционного центра фотосистемы I, P700, находятся, по всей видимости, в комплексах СР-47 и СР-62 соответственно.

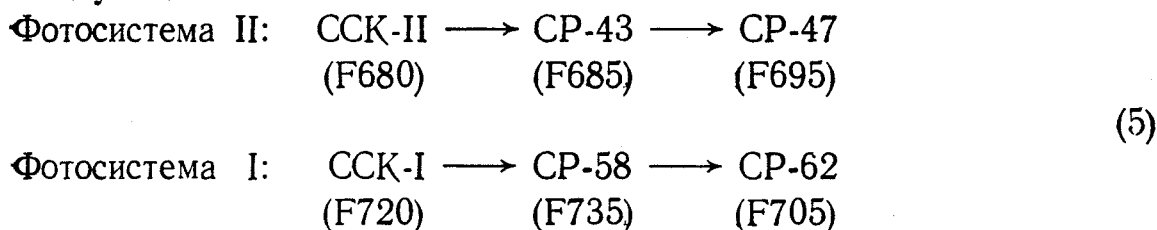
Хлорофилл *a* присутствует в растениях в нескольких формах. Их обозначают: Хл a_{660}^2 , Хл a_{670} , Хл a_{677} и Хл a_{684} в комплексе ССК-II; Хл a_{660} , Хл a_{670} , Хл a_{677} и Хл a_{684} в комплексах СР-43 и СР-47; Хл a_{662} , Хл a_{668} , Хл a_{679} , Хл a_{687} , Хл a_{695} и Хл a_{705} в фотосистеме I (смесь комплексов СР-62, СР-58, ССК-Ia и ССК-Ib). При низкой температуре (4 К) в спектре флуоресценции тилакоидных мембран видны пять полос: при ~ 680 нм (F680), при 685 нм (F685), 695 нм (F695), 720 нм (F720) и при ~ 735 нм (F735). Результаты, полученные в нескольких лабораториях (см., например, Kramer et al., 1985, и обзор Murata, Satoh, 1986), позволяют предположить, что полоса F680 принадлежит хлорофиллу a_{677} в комплексе ССК-II (при 77 К эта полоса не видна из-за чрезвычайно эффективного переноса энергии от ССК-II к СР-43/СР-47). Предполагают, что полоса F685 обусловлена хлорофиллом a_{677} комплекса СР-43 (эта полоса ярче всего проявляется в спектре именно этого комплекса). Есть предположение о том, что полоса F695 возникает в результате рекомбинации зарядов в паре P680⁺ феофитин⁻ и высвечивается возбужденной молекулой феофитина. Однако возбуждение может переноситься на Хл a_{684} в комплексе СР-47, который также может флуоресцировать около 685 нм, или на Хл a_{677} в комплексе СР-43, который может флуоресцировать при 685 нм. Таким образом, обе полосы F685 и F695 принадлежат фотосистеме II. Предполагают, что полоса F720

¹ Обозначение СР от Chlorophyll-protein, хлорофилл-белок. — Прим. перев.

² Числа соответствуют положению максимумов в спектре поглощения (в нанометрах). — Прим. перев.

обусловлена хлорофиллом a_{695} , а полоса F735 — хлорофиллом a_{705} ; их принадлежность индивидуальным комплексам пока не установлена. Еще одна полоса флуоресценции F705, наблюдающаяся лишь при определенных условиях, может возникать в результате рекомбинации зарядов в паре $P700^+A_0^-$ в фотосистеме I (см. обзор Murata, Satoh 1986).

Подводя итоги, можно представить перенос энергии в виде следующей схемы:



где F680 и т. п. соответствуют полосам флуоресценции при температуре 4—77 К.

Более подробное описание процессов поглощения света и флуоресценции можно найти в следующих работах: о высших растениях (хлоропласты и листья) (Briantais et al., 1986), о зеленых водорослях (Govindjee, Satoh, 1986), о красных и синезеленых водорослях (Fork, Mohanty, 1986), о фотосинтезирующих бактериях (Amesz, Vasmel, 1986)¹.

Б

ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Исходя из выдвинутого Эмерсоном и Арнольдом (Emerson, Arnold) представления о фотосинтетической единице, т. е. об ансамбле светособирающих молекул, обслуживающих один реакционный центр, Гаффон и Воль (Gafron, Wohl, 1936 a, b) обсуждали вопрос о переносе энергии возбуждения в такой единице. Для того чтобы объяснить, почему под действием слабого света может почти мгновенно начаться выделение кислорода, пришлось предположить, что энергия, поглощенная разными молекулами антенны, доставляется в одно и то же место. Более или менее прямое доказательство существования переноса энергии от одного пигмента к другому было получено в давних опытах по сенсibilизированной флуоресценции, т. е. по тушению флуоресценции молекул-доноров и разгоранию флуоресценции молекул-акцепторов. Обычно считают, что такой перенос энергии, равно как и перенос энергии между молекулами хлорофилла a , описывается резонансным механизмом в рамках

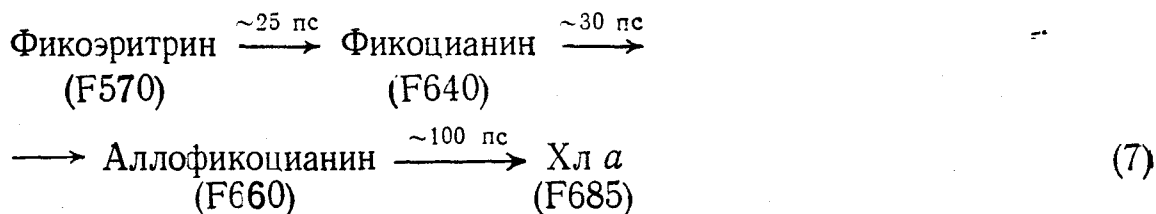
¹ Данные по обычным и низкотемпературным спектрам различных форм хлорофилла ранее подытожены в обзоре Литвина Ф. Ф. и Синещекова В. А. в книге: Bioenergetics of Photosynthesis. (Govindjee, ed.), Acad. Press., New York, 1975. — Прим. перев.

теории Фёрстера (см. обзоры по переносу энергии van Grondelle, 1985; van Grondelle, Amesz, 1986):

$$k_{tr} = \frac{9000 \ln 10 k^2}{128 \pi^5 n^4 N \tau_0 R^6} \int_0^{\infty} \frac{f_d(\nu) \varepsilon_a(\nu) d(\nu)}{\nu^4} \quad (6)$$

где k — ориентационный фактор, определяемый величиной угла α между дипольными моментами переходов в молекуле донора и молекуле акцептора и углами β_1 и β_2 , которые образуют эти диполи с соединяющим их радиус-вектором ($k = \cos \alpha - 3 \cos \beta_1 \cos \beta_2$); n — показатель преломления среды; N — число Авогадро; τ_0 — собственное время жизни флуоресценции молекулы донора; R — расстояние между молекулой донора и молекулой акцептора; $f_d(\nu)$ — нормированный спектр флуоресценции молекул донора; $\varepsilon_a(\nu)$ — спектр поглощения молекул акцептора. Величина, обратная скорости переноса, представляет собой время переноса энергии; для ансамблей молекул хлорофилла a она имеет порядок пикосекунд.

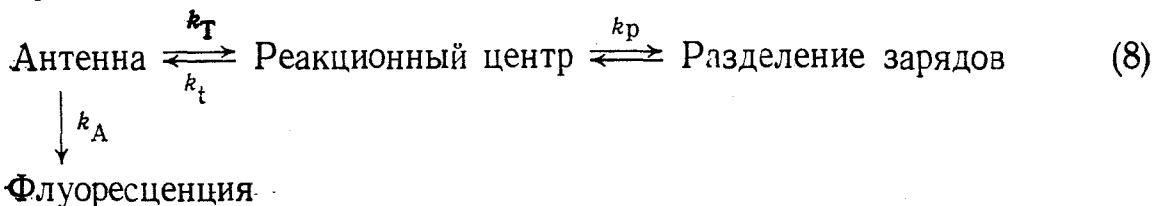
Недавно проведенные измерения с пикосекундным временным разрешением, позволяющие непосредственно зарегистрировать последовательно возникающие изменения флуоресценции индивидуальных компонентов, показали (Yamazaki et al., 1984; Bruce et al., 1986) следующую картину переноса энергии. Например, у красных водорослей времена переноса энергии составляют (см., например, рис. 2):



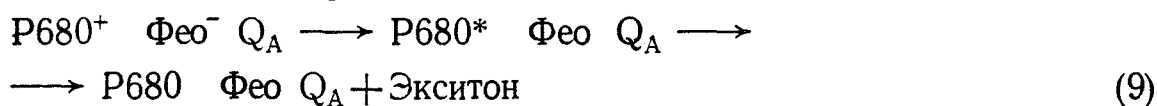
где F570 и т. п. обозначают полосы флуоресценции соответствующих пигментов и длины волн их максимумов в нанометрах. Перенос энергии от криптофиллина к фикоцианину происходит за время $t_{1/2}$ всего лишь около 10 пс (Hanzlik et al., 1985).

Эффективность переноса энергии от ССК-II к СР-43 должна составлять почти 100%, поскольку флуоресценция комплекса ССК-II наблюдается лишь при температурах ниже 30 К, да и то в виде небольшой полосы. Эффективность переноса энергии от хлорофилла b к хлорофиллу a тоже должна достигать почти 100%, поскольку флуоресценция хлорофилла b почти никогда не наблюдается. Тем не менее в антенне происходит и некоторая растрата энергии, поскольку антенна флуоресцирует. Основным фактором, определяющим эффективность, является время, необходимое для того, чтобы возбуждение достигло реакционного центра и привело к разделению зарядов. Можно

представить это в виде схемы:



где k_T и k_t представляют собой константы скорости переноса энергии к реакционному центру и от него соответственно. Приведенная картина слишком проста, поскольку на самом деле имеет место гетерогенность флуоресценции, проявляющаяся в том, что кривые затухания флуоресценции нельзя описать одной экспонентой (см., например, Karukstis, Sauer, 1983; Moya et al., 1986). В хлоропластах и зеленых водорослях измерены следующие времена затухания флуоресценции: около 100—200 пс (быстрые компоненты: 50—80 пс и 150—200 пс), 400—500 пс (промежуточный компонент), и 1,2—2,5 нс (медленный компонент). Эти компоненты приписывают затуханию возбуждения хлорофилла *a* в фотосистеме I (50—80 пс) и в фотосистеме II (150—200 пс). Опыты по экситон-экситонной аннигиляции и исследования процессов разделения зарядов позволяют предположить, что лишь быстрые компоненты (≤ 200 пс) отражают первичный перенос энергии от антенны к реакционному центру (см. обсуждение в работе Geacintov et al., 1986). Происхождение компонентов промежуточной длительности остается пока не ясным; для их теоретического описания используют представление о гетерогенности фотосинтетических единиц фотосистемы II (α и β -единицы) (Butler et al., 1983). Интересное, хотя и не доказанное, объяснение природы медленного компонента (и переменной флуоресценции) состоит в том, что он обусловлен реакцией, обратной первичному разделению зарядов (см., например, Klimov, 1984):



где P680 — хлорофилл *a* реакционного центра фотосистемы II, Фео — феофитин, Q_A — первый хиноновый акцептор электронов в фотосистеме II. Рекомбинация зарядов происходит эффективно, если хинон находится в восстановленном состоянии Q_A^- и переноса электрона от Фео $^-$ на хинон не происходит. Результаты недавних экспериментов (Mauzerall, 1975) подтверждают гипотезу о рекомбинационной природе переменной флуоресценции, но в других опытах (Moya et al., 1986; Shatz, Holzworth 1986) эта гипотеза не подтвердилась.

Прямая регистрация появления электрических сигналов (разности потенциалов, возникающей за счет разделения заря-

и
Д
О
К
О
И
О
1
Р
Р
Р
В
Н
Т
Г
С
Г
С
Т
Г
Т
К
Л
Т
е
с
б
в
в
д
(
р
и
о
н
ф
т
м
д
к
у
р
с
к
2

дов) после возбуждения вспышкой света длительностью 30 пс от пикосекундного лазера показывает, что эти сигналы возникают за время не более 175 пс (Trissl, Kunze 1985). Таким образом, суммарное время, необходимое для переноса энергии и разделения зарядов, не превышает 175 пс; мы полагаем, что оно меньше чем 50—80 пс для фотосистемы I и меньше чем 150—200 пс для фотосистемы II; иначе разделение зарядов в реакционном центре не может эффективно конкурировать с флуоресценцией. Измерения показали, что в фотосистеме I время разделения зарядов меньше чем 10 пс (Fenton et al., 1979).

При переносе (миграции) энергии происходят «перескоки» возбуждения от одной молекулы к другой (случайное блуждание) (гл. 7). Время затухания возбуждения (время жизни экситона) τ является, согласно уравнению (10), суммой двух слагаемых: среднего времени, необходимого для того, чтобы возбуждение впервые попало на реакционный центр («время первого прохода»), и времени жизни экситона, чьи случайные блуждания начинаются из реакционного центра:

$$\tau = \alpha N \tau_j + N \cdot (k_p^{-1}) \quad (10)$$

где α зависит от параметров решетки; N — число молекул в антенне; τ_j — время перескока возбуждения от одной молекулы к другой; k_p — константа скорости фотохимической реакции. Можно рассматривать два предельных случая, в одном из которых время жизни возбуждения определяется его «диффузией», а реакционный центр преобразует энергию с очень высокой скоростью, т. е. время первого прохода оказывается гораздо больше, чем $N/k_{\text{фх}}$; в противном случае, когда время жизни возбуждения определяется срабатыванием центра, преобладает второе слагаемое. Еще не до конца ясно, какова ситуация в действительности, но уже понятно, что время τ_j очень мало (0,1—0,7 пс), а квантовый выход фотохимической реакции почти равен единице (см. обсуждение в работе Geacintov et al., 1986).

Распределение энергии возбуждения между фотосистемами I и II может изменяться. Под действием света, поглощаемого в основном фотосистемой II, образуется так называемое «состояние 2»; под действием света, возбуждающего главным образом фотосистему I, образуется состояние 1. В состоянии 2 относительное возбуждение фотосистемы I по сравнению с фотосистемой II оказывается больше, чем в состоянии 1. Причин тому две: переход из состояния 1 в состояние 2 приводит, во-первых, к увеличению сечения поглощения света фотосистемой I и уменьшению сечения поглощения для фотосистемы II, а во-вторых, к увеличению переноса энергии от фотосистемы II к фотосистеме I (так называемый «спилловер» — переливание через край).

В обзорной работе (Staehelin, Arntsen, 1983) рассматривается природа изменений, происходящих в хлоропластах высших растений при переходе из одного состояния в другое. По-видимому, в этом случае переход из состояния 1 в состояние 2 сопровождается миграцией светособирающего комплекса ССК-II на относительно большие расстояния, из области фотосистемы II в область фотосистемы I. Предполагают, что под действием света, поглощаемого в основном фотосистемой II, происходит накопление восстановленного пластохинона, который активизирует киназу, что приводит к фосфорилированию комплекса ССК-II и последующей его миграции. Таким образом подтверждается идея об изменении сечений поглощения света для фотосистем I и II. Однако в случае красных водорослей никакого обратимого фосфорилирования белка не найдено, и полученные данные указывают на изменения в переносе энергии от фотосистемы II к фотосистеме I. В работе Бруса и др. (Bruce et al., 1986) распределение энергии возбуждения в состоянии 1 и 2 у красной водоросли *Porphyridium cruentum* исследовано по кинетикам разгорания и затухания флуоресценции при 77 К. В состоянии 2 свечение при 690 нм, обусловленное хлорофиллом *a*, связанным с фотосистемой II, разгорается и затухает быстрее, чем свечение при 720 нм, обусловленное хлорофиллом *a*, связанным с фотосистемой I, тогда как в состоянии 1 свечение при 720 нм разгорается быстрее и затухает несколько раньше, чем свечение при 690 нм. Анализ кинетических кривых показал, что результаты согласуются с представлением о возрастании переноса энергии от хлорофилла *a* фотосистемы II к хлорофиллу *a* фотосистемы I в состоянии 2 по сравнению с состоянием 1. В то же время при переходе из состояния 1 в состояние 2 не наблюдали изменений в скорости переноса энергии от фикоэритрина к фикоцианину и далее к аллофикоцианину. В настоящее время ясно, что механизмы перехода между состояниями 1 и 2 у разных организмов (у красных, сине-зеленых и зеленых водорослей и высших растений) могут быть различны (см., например, разные главы в книге Govindjee et al., 1986 и обзор Fork, Satoh, 1986).

III

ТИЛАКОИДНАЯ МЕМБРАНА ХЛОРОПЛАСТОВ

A

МОРФОЛОГИЯ ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЫ

У фотосинтезирующих организмов содержащие хлорофилл мембраны, где под действием света происходят описанные выше процессы, представляют собой хорошо различимые плоские

Л
Т
Н
Р
Л
Р
Ф
Т
I
М
Л
Т
Т
Л
Г
Л
С
У
Т
С
П
М
П
Р
Д
С
М
С
Л
О
Н
М
Т
П
Д
Л
Л
Л
П
С
С
И
М
М

ламеллярные везикулы; у эукариот они часто занимают значительную часть объема хлоропласта (гл. 3). Наружные поверхности ламеллярных мембран зачастую плотно прижаты к наружным поверхностям соседних ламеллярных мембран, но количество и размеры областей межмембранных контактов и образующихся при этом стопок мембран могут сильно изменяться.

Полученные на тонких сколах электронные микрофотографии, показывающие распространенность межмембранных контактов, стали уже привычными (см., например, Staehelin et al., 1977). Такие контакты между поверхностями фотосинтетических мембран наблюдают как у высших растений, так и у водорослей. Однако картина трехмерной пространственной организации тилакоидных мембран гораздо менее известна даже исследователям, работающим в области фотосинтеза. В то же время, анализируя огромное количество данных о молекулярных характеристиках тилакоидной мембраны и о гетерогенности распределения ее компонентов, нельзя не прийти к выводу о том, что особенности «суперструктуры» хлоропластных мембран следует учитывать при исследовании функции тилакоидной мембраны.

Сведения о пространственном расположении и взаимосвязи тилакоидных мембран в хлоропласте получены из моделей, построенных на основе электронно-микроскопических фотографий последовательных тонких срезов (Paolillo, Falk, 1966; Brangeon, Mustardy, 1979), замораживания и травления реплик (см., например, Staehelin et al., 1977), результатов сканирующей электронной микроскопии (Mustardy, Janossy, 1979). Эти методы дали сходные результаты об основных особенностях пространственной структуры стопок тилакоидных мембран и о связях между стопками мембран (гранами). Основы современных представлений о «суперструктуре» тилакоидных мембран были заложены еще в работе (Paolillo, Falk, 1966). Микрофотография одного тонкого среза мембран хлоропласта не может дать истинного представления о сложной трехмерной архитектуре стопок мембран, какое можно получить из анализа последовательных тонких срезов. Полагают (Paolillo, Falk, 1966), что множество плоских мембран, слегка наклоненных по отношению друг к другу, располагается по спирали на наружной поверхности цилиндрической сердцевины плотноупакованных дисков. Предполагается, что каждая из спирально уложенных мембран прикреплена к диску в стопке, и за счет этого прикрепления внутреннее пространство этих двух мембран оказывается непрерывным. Соединения мембран устроены таким образом, что каждый диск связан с несколькими спирально уложенными мембранами, и каждая из тех мембран связана с несколькими разными дисками. Соседние стопки мембран, по-видимому, соединены узкими мостиками между спирально уложенными мембранами, при

этом внутреннее пространство мембран образует единую непрерывную полость. Рассматривая двумерную картину, которую дает одиночный тонкий срез, можно принять поперечное сечение цилиндрической сердцевины, или стопки дисков, за область прижатых друг к другу мембран в гране, тогда как спирально уложенные плоские мембраны и их сетчатые соединения с дисками будут выглядеть как не прижатые друг к другу ламеллы стромы.

Изучение развития пространственной архитектуры тилакоидных мембран в онтогенезе хлоропластов (Brangeon, Mustardy, 1979) позволило построить модель последовательности событий, ведущих к упаковке мембран в стопки. Некоторые следствия этой модели интересны с точки зрения интерпретации результатов опытов по распаду мембранных стопок при уменьшении концентрации катионов. На ранней стадии дифференциации пластид тилакоидные мембраны наблюдаются в виде немногочисленных сплюснутых ламелл. В полученной трехмерной модели видны многочисленные отверстия (перфорация) в этих плоских мембранах. Предполагается, что именно вокруг этих отверстий начинают образовываться грани. Структурные данные интерпретированы следующим образом. Края каждого из отверстий являются точками роста мембраны, причем новая тилакоидная мембрана нарастает и над исходной мембраной, и под ней. Такое многослойное образование считают зародышем стопки мембран (граны), а связи между соседними отверстиями, образующиеся при изгибах и перекручивании исходной «родительской» мембраны, приводят к формированию стопки мембраны (граны) с пышным окружением в виде единой спирально закрученной плоской мембраны (т. е. исходной, родительской ламеллярной мембраны). Такая единая спираль растет все дальше и дальше, и развитие продолжается до тех пор, пока вокруг каждой стопки дисков не образуется от пяти до десяти спиралей, каждая из которых во многих местах связана с дисками, т. е. внутреннее пространство каждой спирально уложенной мембраны непрерывно переходит во внутреннее пространство многочисленных дисков, и наоборот, внутреннее пространство каждого диска непрерывно связано с внутренним пространством многих спирально уложенных мембран.

Обращают на себя внимание две особенности этой модели процесса образования стопок мембран. Во-первых, возникновение контактов между поверхностями мембран рассматривается здесь как процесс роста, а не упаковки ранее сформировавшихся мембран. Во-вторых, предлагаемая интерпретация данных означает, что образовавшаяся стопка мембран (грана) постепенно обрастает многочисленными спирально уложенными мембранами, каждая из которых во многих местах связана с дисками.

Обе эти особенности модели по сути своей означают, что структура мембранных стопок должна быть относительно стабильной, и их образование является в большой степени необратимым процессом. Тем не менее давно известно сообщение (Izawa, Good, 1966), многократно подтвержденное последующими работами, о том, что нативные контакты между мембранами нарушаются, когда выделенные тилакоидные мембраны (хлоропласты без наружной оболочки) помещают в среду с низкой концентрацией солей. На двумерных картинах мембраны выглядят большими и плоскими, иногда они неплотно попарно прижаты друг к другу, и не видно никаких структур, похожих на стопки мембран (граны). Данные электронной микроскопии с использованием метода замораживания — травления показывают, что при распаде стопок мембран происходит рандомизация распределения частиц, наблюдаемых на поверхностях скола (Staehein et al., 1977). Эти факты, по-видимому, означают, что в отсутствие достаточного количества катионов исчезают те силы, которые могут удерживать исключительно текучую мембрану (см. ниже) в упорядоченной и почти статической пространственной конфигурации, и в результате наблюдаются бесструктурные плоские мембраны. Если затем снова добавить соли, то возникает взаимное притяжение ламелл, и вновь формируются стопки мембран. Образование мембранных стопок часто происходит случайно, но при повторном их появлении в результате добавления солей вновь получившаяся структура очень похожа, по крайней мере на двумерной картине, на исходную структуру (Izawa, Good, 1966). Более того, при этом опять-таки обнаруживается гетерогенность распределения частиц, наблюдаемых на поверхности скола, между участками мембран в областях межмембранных контактов и вне этих областей. Этот факт означает, что очень сложная архитектура тилакоидных мембран полностью развитого хлоропласта может быть обратимо разрушена, так что появляются плоские мембраны, не связанные друг с другом, а затем вновь образуются нативные межмембранные контакты. Однако тщательный анализ распада мембранных стопок при удалении катионов, проведенный по данным электронной микроскопии с использованием метода замораживания — травления, показал, что восстановление подлинно нативной структуры возможно лишь до того момента, когда начинают расширяться сетчатые соединения между дисками и спирально уложенными мембранами (Staehein et al., 1977).

С процессом упаковки мембран в стопки связана удивительная неравномерность распределения компонентов мембраны между участками в областях межмембранных контактов и вне этих областей (гл. 3). Поскольку находящиеся на относительно большом расстоянии друг от друга функциональные комплексы

должны быть связаны в процессах транспорта электронов и протонов и переноса энергии возбуждения, суперструктуру тилакоидных мембран следует рассматривать как важный параметр во многих процессах фотосинтеза, описываемых в этой книге. Однако с самого начала необходимо иметь в виду, что ни один из фундаментальных процессов фотосинтеза не определяется всецело наличием или отсутствием контактов между тилакоидными мембранами. Те мембраны, которые не образуют стопок в результате генетических особенностей или уменьшения концентрации солей, сохраняют свою целостность и способны поглощать свет, осуществлять перенос электронов и протонов, синтезировать АТФ и восстанавливать NADP^+ , причем изменения в эффективности или скорости этих процессов либо вообще не наблюдаются систематически, либо оказываются небольшими. Тем не менее есть указания на то, что неравномерное распределение пигмент-белковых комплексов, связанное с образованием стопок мембран, является необходимой особенностью регуляторных механизмов, определяющих баланс энергии возбуждения между двумя фотосистемами и тем самым обеспечивающих эффективность процесса фотосинтеза на слабом свете (Staehelin, Arntzen, 1983; см. также разд. II.Б). Следует признать, что на сегодняшний день остается непонятным, важен ли процесс образования стопок тилакоидных мембран для фотосинтеза в целом и какие преимущества он дает растению.

Б ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЫ

1 СОСТАВ МЕМБРАН

Для мембран тилакоидов, как и для всех других биологических мембран, характерна двуслойная структура, образованная молекулами диацилдиглицеролов. По-видимому, единственным исключением среди всех биомембран является плазматическая мембрана термоацидофильной археобактерии *Thermoplasma*, представляющая собой один слой, образованный липидом с полиизопреноидной цепью $\text{C}_{40}\text{H}_{82}$ (Langworthy, 1977). Липиды, образующие двуслойную мембрану, являются амфипатическими молекулами; в состав каждой из них входит полярная головка и неполярные хвосты (ацильные цепи). В двуслойной мембране находятся более 60 различных полипептидов, большинство из которых являются компонентами четырех больших амфипатических интегральных белковых комплексов тилакоидной мембраны. Помимо глицеролипидов двуслойная тилакоидная мембрана

П
С
Р
М
I
П
П
а.
П
У.
К
Р
К
а
н
ц
л
х.
в.
(
с
н.
п
х.
п
в
н
в.
ф
м
н
н
М
ц
т
(
т
к
в
с
л
н
м
27

содержит большое количество хлорофилла, концентрация которого достигает 90 мМ (рассчитано, что объем тилакоидной мембраны составляет 11 л на 1 моль хлорофилла (Flores et al., 1983)). В отличие от глицеролипидов молекулы хлорофилла прочно связаны со специфическими группами мембранных полипептидов.

а. Липиды

Помня о том, что хлоропласты, по-видимому, произошли от прокариотических организмов (Whatley et al., 1979), не стоит удивляться тому, что состав глицеролипидов двуслойной тилакоидной мембраны сильно отличается от состава других мембран у растений. Весовое содержание ацильных липидов в тилакоидной мембране составляет около 35%. Примерно 70% этих ацильных липидов представлены двумя необычными и сильно ненасыщенными гликолипидами, это моногалактозилдиацилглицерол (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерол (ДГДГ). «Головки» этих гликолипидов не несут заряда, но имеют полярный характер. Кроме того, данные липиды необычны исключительно высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (Quinn, Williams, 1978). Считают, что тилакоидные мембраны содержат лишь три других вида диацильных липидов. Два из них — фосфатидилглицерол (анионный) и фосфатидилхолин (биполярный ионный) распространены широко, но сульфолипид хлоропластов — диацилсульфохиновозилглицерол (анионный липид) (ДСХ) почти нигде более не встречается в природе.

Гликолипиды тилакоидных мембран хлоропластов необычны в том отношении, что они не очень широко распространены у нефотосинтезирующих организмов и почти полностью отсутствуют в тех мембранах, изучение которых послужило основой формирования биохимии мембран (например, в плазматических мембранах красных кровяных клеток, в дисковидных мембранах наружных сегментов палочек сетчатки, в мембранах миелиновых оболочек, в плазматических мембранах *E. coli*). Липиды МГДГ и ДГДГ составляют более 80% общего количества диациловых липидов скользящей термофильной факультативно фотосинтезирующей зеленой бактерии *Chloroflexus auranticus* (Kenyon, 1978) и обнаруживаются в большом количестве в фотосинтетических мембранах некоторых цианобактерий, но, за исключением этих случаев, встречаются в природе редко и лишь в малых количествах. Вместе с тем эти гликолипиды нельзя считать необычными, поскольку, будучи главными диацильными липидами в тилакоидных мембранах, они тем самым являются наиболее распространенными полярными диациловыми липидами в биоте (Gounaris, Barber, 1983).

В настоящее время вопросы о специфике функциональной роли этих липидов в фотосинтетических мембранах и в самом процессе фотосинтеза вызывают значительный интерес исследователей. Известны три разные, не исключающие друг друга предположения относительно особой роли отдельных гликолипидов, причем авторы двух из них исходят из гипотезы о специфической связи этих гликолипидов с определенными интегральными комплексами полипептидов в мембране. Одно из предположений состоит в том, что специфические молекулы липидов нужны, чтобы стабилизировать встраивание белковых комплексов в двухслойную мембрану (Dubasq, Tremolieres, 1983; Sprague et al., 1985). Например, полагают, что конусообразная форма молекулы МГДГ может способствовать укреплению той части липидного бислоя, которая окружает глобулярные интегральные белки в мембране хлоропласта (Israealachvili et al., 1980). Другое предположение состоит в том, что специфические взаимодействия между гликолипидами и мембранными белками необходимы, чтобы оптимизировать работу этих белков как ферментов. К примеру, в опытах по самосборке оказывается, что МГДГ необходим для переноса энергии между сольубилизованными хлорофилл-белковыми комплексами (Siefertman-Harms et al., 1982), а также для активации комплекса сопрягающего фактора (Pick et al., 1984). Когда идет речь о такого рода взаимодействии мембранных белков с ацильными липидами, обычно полагают, что для него требуется существование стабильной липидной оболочки вокруг погруженной в мембрану части белка; впрочем, возможно, что это условие не является абсолютно необходимым. Многочисленные факторы, полученные на хорошо изученных системах, приводят к выводу о том, что интегральные белки действительно изменяют динамику жидкого липидного бислоя (см., например, Chapman et al., 1979). Несмотря на то что вносимые белком возмущения являются близкодействующими и не распространяются дальше, чем на несколько липидных слоев, вполне возможно, что в мембране со столь высоким содержанием белка, как тилакоидная, не остается невозмущенных липидов. Однако это сформировавшееся в последнее десятилетие представление о долгоживущей липидной оболочке, окружающей интегральные мембранные белки и связанной с ними, по-видимому, не подтверждается данными ЯМР (Brown et al., 1977; Oldfield et al., 1978; Rice et al., 1979). Результаты измерений ЯМР показывают, что в течение 100 мкс все липиды перемешиваются. Но даже эти данные не могут служить основанием для окончательных выводов об отсутствии устойчивых липидных оболочек вокруг некоторых определенных белков в еще не исследованных мембранных системах, например в мембранах тилакоидов. Тем не менее, учи-

П
Т
П
И
П
Т
С
Л
С
Ц
К
С
Р
Л
М
С
Л
В
Т
Т
С
С
б.
К
К
С
Р
Л
Д
К
М
В
С
С
Д
Д
К
Д
П
П
2

тывая множество установленных фактов, можно, по-видимому, предположить, что результаты исходных опытов со спиновыми и флуоресцентными метками, на основе которых сложилось представление о долгоживущих липидных оболочках, были истолкованы неверно (Pink et al., 1984). Таким образом, с одной стороны, нельзя исключить существования устойчивых белково-липидных ассоциатов в тилакоидной мембране, но, с другой стороны, нет убедительных доказательств того, что такие ассоциаты существуют в других мембранных системах.

Третье предположение, касающееся специфической роли гликолипидов в тилакоидной мембране, также основано на представлении о стабильной упаковке липидов в двуслойной мембране. В соответствии с предположением (Israealachvili et al., 1980) о конусообразной форме молекул хлоропластного липида МГДГ считают, что этот липид может стабилизировать участки мембраны, имеющие наибольшую кривизну, а число таких участков в стопках тилакоидных мембран очень велико (Murphy, 1982; Murphy, Woodrow, 1983). Если такие структуры на основе МГДГ действительно существуют в нативных мембранах тилакоидов, то, учитывая изложенное выше о распаде стопок тилакоидных мембран в среде, обедненной катионами, следует считать, что этот липид может существовать и в плоской двуслойной мембране.

б. Полипептиды

Почти все дальнейшее содержание данной главы относится к описанию четырех главных функциональных полипептидных комплексов в тилакоидной мембране. Комплекс фотосистемы I содержит реакционный центр и сопутствующие белки, с которыми связаны светособирающие молекулы хлорофилла; комплекс фотосистемы II содержит в дополнение к тому полипептиды, участвующие в окислении воды. Комплекс цитохромов *b₆/f* катализирует транспорт электронов между двумя фотосистемами, а комплекс сопрягающего фактора катализирует образование АТФ. Полипептидные компоненты четырех этих комплексов составляют основную часть мембранных белков как по массе, так и по относительному молярному содержанию. В последующих разделах мы рассмотрим структуру и функцию каждого из этих комплексов в отдельности.

Количественное содержание трех электрон-транспортных комплексов в тилакоидной мембране обязательно нужно знать для того, чтобы понимать, каким образом происходящие в них процессы взаимодействуют и определяют механизм и кинетику переноса электронов. В настоящее время ясно, что не существу-

ет строгого стехиометрического соотношения ни между самими комплексами, ни между их количеством и суммарным количеством хлорофилла в мембране, которое выполнялось бы для всех видов высших растений и водорослей. Тем не менее наблюдается замечательное постоянство стехиометрического соотношения электрон-транспортных комплексов в пределах одного, наиболее подробно изученного вида *Spinacia oleracea* L. Для шпината, выросшего на свету высокой интенсивности (больше чем $600 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) в широком спектральном диапазоне, отношение количества этих комплексов составляет почти 1:1:1, причем на каждый комплекс приходится около 600 молекул хлорофилла (т. е. соотношение 1:1:1:600 Хл) (Graan, Ort, 1984; Whitmarsh, Ort, 1984). Важно отметить, что относительное количество активных центров фотосистемы II в хлоропластах шпината (1:600 Хл) получено в опытах, где количественно определяли способность хлоропластов окислять воду (Whitmarsh, Ort, 1984) или восстанавливать пластохинон (Graan, Ort, 1984), в то время как относительное количество центров фотосистемы II (один центр на 300 или 400 молекул хлорофилла) было найдено по измерениям индуцированного светом восстановления первичного хинонового акцептора Q_A (Melis, Anderson, 1983; Whitmarsh, Ort, 1984) или индуцированного светом окисления первичного хинонового донора электронов Z (Babcock et al., 1983) в реакционных центрах фотосистемы II. Пока еще трудно сказать, чем обусловлено расхождение полученных результатов. Однако следует указать на одно важное обстоятельство: в двух рассмотренных случаях определяли различные величины, и не исключено, что именно этим и объясняется обнаруженное противоречие. При изучении способности окислять воду или восстанавливать пластохинон фактически измеряется количество центров, способных работать периодически и возвращаться в исходное состояние по меньшей мере раз в секунду. В то же время в опытах, где регистрируют образование Q_A^- или Z^+ , измерения проводятся фактически в стационарных условиях, и определяется способность центра хотя бы однажды перейти в соответствующее состояние. Возможно, в первом случае измеряется количество активных центров фотосистемы II, выделяющих кислород, тогда как во втором случае в дополнение к ним регистрируются и те центры, которые не способны к непрерывному выделению кислорода. В роли таких центров с низкой активностью могут выступать центры, еще не вернувшиеся в исходное состояние или не полностью развившиеся центры. Действительно, в недавней работе (Graan, Ort, 1986) показано, что некоторые из центров фотосистемы II способны окислять воду, но не могут восстанавливать пластохинон; эти центры способны к многократным фотопревращениям

А/А

Л
Е
Р
Э
Е
В
М
Е
1
С
Т

1
1
С
д
ф
б
г
н

2
д

з
в
с
п
н
н
ч
и
з
м
п
з
н
р
н
—

3

лишь в присутствии галогенизированных хиноновых акцепторов. В двух независимых работах (Strotmann et al., 1973; Frash et al., 1980) показано, что в мембранах хлоропластов шпината на один комплекс сопрягающего фактора приходится около 850 молекул хлорофилла. Полученные их авторами оценки основаны на стехиометрии субъединиц сопрягающего фактора $\alpha_2\beta_2$; в то же время новые опыты свидетельствуют в пользу стехиометрии $\alpha_3\beta_3$ (разд. VII). Учитывая эту поправку, получаем, что на один комплекс сопрягающего фактора приходится около 1100 молекул хлорофилла, т. е. в мембране присутствует чуть больше чем 0,5 сопрягающего фактора в расчете на электрон-транспортную «единицу».

в. Углеводы

Углеводы обычно рассматривают как третий класс молекул, встречающихся в биологических мембранах. Они никогда не находятся в мембранах в свободном виде, но всегда ковалентно связаны с мембранными белками или липидами, причем углеводы всегда находятся на поверхности мембран, а не в ее гидрофобной фазе. Хлоропластные мембраны тилакоидов содержат большое количество углеводов благодаря высокому содержанию гликолипидов. В то же время в этих мембранах, по-видимому, нет гликопротеинов (Keegstra, Cline, 1982).

2

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН

Характерной особенностью тилакоидных мембран при физиологических значениях pH является их отрицательный поверхностный заряд. Полагают, что присутствие зарядов, фиксированных на обеих поверхностях тилакоидной мембраны, приводит к повышению концентрации противоположно заряженных ионов (катионов) в непосредственной близости от поверхности мембраны (Barber, 1980). В идеальном случае электрический потенциал, создающий этот диффузный слой противоионов вблизи мембраны, уменьшается по экспоненциальному закону при удалении от мембраны. Тот факт, что тилакоидные мембраны не описываются этой идеализированной моделью, пожалуй, ярче всего проявляется в том, сколь велик разброс значений поверхностной плотности зарядов, полученных разными авторами на основе измерений и расчетов в рамках электростатической теории. Полученные значения плотности зарядов на наружной поверхности мембраны тилакоида составляют от $-0,005$ до $-0,035$ Кл·м⁻² при нейтральных pH (Barber, 1980).

Несмотря на трудности адекватного описания и количественного определения поверхностной плотности зарядов на тилакоидной мембране, ясно, что поверхностные потенциалы и неоднородность в распределении зарядов на мембране играют важную роль в некоторых функциональных аспектах фотосинтеза. Что касается структуры тилакоидных мембран, особенно интересна роль поверхностных зарядов в процессе укладки мембран в стопки. Считают, что взаимное притяжение поверхностей двух тилакоидных мембран в большой степени обусловлено вандерваальсовыми силами, действующими между мембранными белками (Barber et al., 1977). Однако маловероятно, чтобы электростатическое экранирование зарядов диффузным слоем противоионов могло само по себе свести к нулю силы отталкивания, действующие между фиксированными зарядами (Sculley et al., 1980) и тем самым обеспечить тесное сближение поверхностей соседних мембран, наблюдаемое в гранах [на расстоянии 4 нм]. (Nir, Peas, 1973) Каким же путем достигается низкая плотность поверхностных зарядов, необходимая для того, чтобы доминирующими стали вандерваальсовы силы притяжения? Объяснить это можно, исходя из следующих предположений: либо катионы взаимодействуют с отрицательными зарядами на поверхности и образуют соли в реакции с фиксированными зарядами (Dupies et al., 1981), либо частицы, несущие на себе отрицательные заряды высокой плотности, должны преимущественно удаляться из области межмембранных контактов (Barber, 1980). Характерной особенностью обоих этих механизмов является важная роль катионов в экранировании поверхностных зарядов.

Многие факты указывают на то, что для образования стопок мембран необходим светособирающий пигмент-белковый комплекс фотосистемы II. Таким образом, в соответствии с только что рассмотренными предположениями о том, какие силы определяют упаковку мембран в стопки, можно полагать, что именно комплекс ССК-II обеспечивает необходимое равновесие между силами отталкивания фиксированных отрицательных зарядов и вандерваальсовыми силами притяжения, и, таким образом, одного электростатического экранирования фиксированных отрицательных зарядов оказывается достаточно для того, чтобы вандерваальсовы силы стали преобладающими. Опыты по самосборке мембран показывают, что пузырьки из фосфатидилхолина, не связывающиеся между собой даже в присутствии катионов, начинают слипаться при встраивании в них комплекса ССК-II (Mullet, Arntzen, 1980). Далее, в настоящее время ясно, что доступный с поверхности мембраны сегмент полипептидной цепи комплекса ССК-II, необходимый для упаковки мембран в стопки под действием катионов, может, кроме того,

претерпевать увеличение плотности мембран уже не достижима. Можно видеть в том, что роль в слипании мембран размером 8 нм системы II

Исключением являются кислоты в гранах в степени обуславливающей количество катионов в жидком состоянии ниже нуля. Видов растительности у переходов, к переходам гранах (1984). Характерно участвует липиды глицерола составляет собою точку плавления липидов часто на мембранах имеющий влияние фазовое изменение фатидилглицерола в мембранах имеют низкую

Не только и другие фазы мембраны. В жидком состоянии по мере увеличения гранальных мембран липиды межмембранных контактов (Paris et al., 1981) о том, что характерные для мембраны с жирными кислотами (Fato et al.,

количества тилаклов и не играют фотосинтезу особенно важную роль. Укладка мембран на поверхности обусловлена взаимодействием зарядов мембран. Вероятно, диффузным действием силы зарядов сближение мембран происходит на расстояниях, достигаемых для сил притяжения предположительно за счет фиксации, несущие и, должны обеспечить конформацию мембран.

слипание стопок мембран — это процесс, связанный с только силами притяжения, что именно происходит между мембранами с отрицательными зарядами, чтобы предотвратить сближение по поверхности фосфатидиллипидов в присутствии мембранных комплексов. В последнее время появились данные о упаковке мембран, кроме того,

препятствовать фосфорилированию (Barber, 1982). Фосфорилирование увеличивает плотность отрицательных зарядов на поверхности мембраны; электростатическое экранирование становится уже не достаточным, и образование стопок мембран затрудняется. Модификация этой модели взаимодействия мембран состоит в том, что пигмент-белковые комплексы, играющие главную роль в слипании мембран, локализованы в отдельных частицах размером 8 нм и не образуют тесной связи с центрами фотосистемы II (Staehelin, Dewit, 1984).

Исключительно большое содержание ненасыщенных жирных кислот в глицеролипидах тилакоидных мембран в значительной степени обуславливает высокую текучесть этих мембран в относительно широком диапазоне температур. Глицеролипиды, количество которых велико в тилакоидной мембране, остаются в жидком состоянии даже при нескольких десятках градусов ниже нуля. Удивительно, что в мембранах тилакоидов многих видов растений методом дифференциальной сканирующей калориметрии удается зарегистрировать обратимые эндотермические переходы, которые почти наверняка обусловлены фазовыми переходами глицеролипидов (Raison, Wright, 1983; Low et al., 1984). Характер переходов указывает на то, что в них обычно участвует лишь малая доля (от 5 до 10%) от общего количества глицеролипидов. Эндотермический процесс, представляющий собой слипание молекул липидов, имеющих высокую точку плавления, в небольшие комочки геля, окруженные молекулами липидов в жидкокристаллической фазе; такой переход часто называют разделением фаз. Полагают, что глицеролипид, имеющий высокую точку плавления и обуславливающий разделение фаз при температурах выше 0°, — это дипальмитоилфосфатидилглицерол; считают, что он может вызывать затвердевание небольшого количества липидов, которые в его отсутствие имеют низкую температуру плавления (Raison, Wright, 1983).

Не только природа глицеролипидов, образующих бислои, но и другие факторы также могут влиять на общую текучесть мембраны. Интегральные мембранные белки изменяют динамику жидкого липидного бислоя, понижают текучесть мембраны по мере уменьшения отношения липид/белок. В самом деле, гранальные участки тилакоидов кажутся менее текучими, и отношение липид/белок в них ниже, чем в тилакоидах вне областей межмембранных контактов (Murphy, Woodrow, 1983; Gouparis et al., 1983). Противоположную тенденцию отражают данные о том, что хиноны с длинной изопреноидной цепью, характерные для мембран, запасаящих энергию, увеличивают текучесть мембраны, что обусловлено чередованием молекул хинонов с жирными кислотами глицеролипидов, образующих бислои (Fato et al., 1984). В мембранах тилакоидов шпината активные

молекулы, входящие в пластохиноновый пул, присутствуют в концентрации около 1 мМ [из отношения 1 молекула пластохинона на 100 молекул хлорофилла (Graap, Ort, 1984) и объема тилакоидной мембраны 11 л на 1 моль хлорофилла (Flores et al., 1983)]; концентрация пластохинона в углеводородной фазе мембраны может в 2—3 раза превышать эту величину.

Проницаемость тилакоидных мембран для неорганических ионов имеет важное значение, поскольку перенос ионов обеспечивает компенсацию зарядов при поглощении протонов; она имеет важное значение и для других процессов, например регуляции активности ферментов в строме. Проницаемость тилакоидных мембран для более крупных молекул, например для глюкозы или различных углеводов, образующихся в качестве промежуточных продуктов в восстановительном цикле CO_2 , также имеет важное значение для биохимических процессов. Мембраны тилакоидов необоснованно считаются необычно легко проницаемы для растворенных молекул по сравнению с другими биологическими мембранами. Помимо тех случаев, когда высокая проницаемость мембраны была обусловлена процедурой выделения или последующей работы с выделенными мембранами (например, замораживанием), следует иметь в виду, что представление о легкой проницаемости мембран складывалось без учета того обстоятельства, что отношение площади поверхности мембраны к объему заключенной внутри нее водной фазы тилакоидов необычайно велико, и, кроме того, тилакоидные мембраны действительно хорошо проницаемы для одного физиологически важного аниона, а именно Cl^- . Объем водной фазы, заключенной в тилакоидных мембранах шпината, суспендированных в среде с осмолярностью 0,1, почти равен объему самой тилакоидной мембраны, т. е. около 11 л на 1 моль хлорофилла (Flores et al., 1983). Судя по сравнительным микрофотографиям хлоропластов *in situ*, полученным с помощью электронного микроскопа (см., например, Nir, Pease, 1973), объем водной фазы в этом случае может составлять всего лишь половину объема тилакоидной мембраны. Площадь мембраны тилакоида в расчете на одну из ее поверхностей равна примерно $1,85 \cdot 10^6 \text{ м}^2$ на 1 моль хлорофилла (Thomas et al., 1956; Flores et al., 1983); поэтому отношение площади ее поверхности к внутреннему объему несравненно выше, чем в других хорошо изученных биологических мембранах (к примеру, в плазматических мембранах красных кровяных клеток, в митохондриальных мембранах или в одноламеллярных лецитиновых пузырьках). Из-за этого различия трудно получить какую-либо информацию, непосредственно сравнивая измеренное на столь разных мембранах время установления равновесных концентраций молекул, проникающих сквозь эти мембраны. Сравнение кажущихся коэффициентов

проницаемости показывает, что проводимость тилакоидных мембран для большинства неорганических ионов и органических метаболитов нельзя считать необычно высокой. Так, например, коэффициент проницаемости тилакоидной мембраны равен по оценкам для сахарозы $4,1 \cdot 10^{-11}$ см·с⁻¹ (Flores et al., 1983), а для ионов Na⁺ $3 \cdot 10^{-8}$ см·с⁻¹ (Barber, 1972). Для других типов мембран получены значения коэффициентов проницаемости от $2 \cdot 10^{-10}$ до $2 \cdot 10^{-11}$ см·с⁻¹ для сахарозы и от $5 \cdot 10^{-6}$ до $5 \cdot 10^{-10}$ см·с⁻¹ для ионов Na⁺ (Jain, Wagner, 1980). Таким образом характеристики проницаемости мембраны тилакоидов попадают в диапазон значений, типичных для биологических мембран. Однако проводимость тилакоидных мембран для ионов Cl⁻ оказывается необычно высока, по крайней мере в сравнении с проводимостью других энергопреобразующих мембран. Существует предположение о том, что в мембране тилакоида существует некий переносчик ионов Cl⁻ (Vambutas, Schechter, 1983), однако это еще не доказано.

В РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ В ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЕ

1 ТРАНСМЕМБРАННАЯ АСИММЕТРИЯ

Насколько нам известно, трансмембранная асимметрия интегральных белков в нативных биологических мембранах является абсолютной. Это значит, что ориентация всех молекул данного белка в мембране всегда одна и та же. Такое единообразие ориентации можно предсказать, исходя из постулированного механизма встраивания полипептидов в мембрану при их сборке (Sabatini et al., 1982). Такая же асимметрия должна, очевидно, наблюдаться и в случае фотосинтетических мембран; многочисленные экспериментальные данные подтверждают это предположение. Асимметрия биологических мембран вообще и фотосинтетических мембран в частности создает структурную основу для направленного (векторного) функционирования фотосинтетической мембраны при преобразовании световой энергии.

Распределение различных диацильных липидов между внутренним и наружным слоем двуслойной тилакоидной мембраны также асимметрично, но эта асимметрия не абсолютна; иными словами, каждый из липидов присутствует и в том и в другом слое, но в разных количествах. Несмотря на разногласия между исследователями по некоторым вопросам, можно сформулировать общепринятые представления о важных качественных осо-

бенностях распределения липидов между слоями мембраны. Считают, что внутренний слой содержит более половины диацильных липидов тилакоидной мембраны и обогащен липидами МГДГ и ДСХ. Напомним о предположении относительно участия МГДГ в стабилизации внутреннего радиуса мембраны на изгибах с наибольшей кривизной: здесь уже подразумевается, что внутренний слой мембраны обогащен этим липидом. Наружный слой двуслойной мембраны, по-видимому, содержит более половины всего количества фосфатидилглицерола, тогда как липид ДГДГ относительно равномерно распределен между слоями мембраны.

2

ЛАТЕРАЛЬНАЯ АСИММЕТРИЯ

Существование латеральной асимметрии в распределении компонентов тилакоидной мембраны проявляется в различной архитектуре мембран в областях межмембранных контактов и вне этих областей. По сути дела, представление о том, что асимметричное распределение некоторых компонентов мембраны необходимо для образования стопок мембран, связано с предполагаемой ролью отдельных липидов в стабилизации сильно искривленных краевых участков гранальных дисков и с необходимостью удалить белковые комплексы, несущие поверхностный заряд высокой плотности, из областей межмембранных контактов.

Мембраны, упакованные в стопки, характеризуются меньшим содержанием липидов по отношению к хлорофиллу или белку. Наблюдается заметная латеральная асимметрия в распределении диацильных липидов (Grouparis et al., 1983). Хотя принято считать, что состав диацильных липидов в областях межмембранных контактов и вне этих областей различен, по-видимому, результаты таких опытов зависят от того, каким способом фракционировали мембраны. Тем не менее с этим согласуются данные, что мембраны, упакованные в стопки, обеднены по сравнению с нефракционированными тилакоидами двумя основными диацильными липидами тилакоидных мембран — МГДГ и ДГДГ.

Известно много независимых фактов, свидетельствующих о том, что комплексы фотосистемы I и II находятся в разных областях мембраны (Anderson, 1982; Andersson, Naehnel, 1982; Naehnel, 1984; Vallon et al., 1985). Это противоречит ранее отмеченному обстоятельству — необычно низкой вязкости глицеролипидной фазы мембраны. По современным представлениям большинство реакционных центров фотосистемы II и находящиеся рядом с ними комплексы ССК-II и компоненты, окисляющие воду, локализованы в областях межмембранных контактов,

причем их подвижность вдоль мембраны ограничена вандерваальсовыми силами притяжения, действующими между поверхностями соседних мембран. Реакционные центры фотосистемы I и находящиеся рядом с ними светособирающие хлорофилл-белковые комплексы локализованы преимущественно в тех частях мембраны, которые обращены к строме, т. е. в краевых областях мембран, упакованных в стопки, а также в спирально уложенных мембранах, окружающих грани. Предполагается, что комплексы фотосистемы I удаляются из областей межмембранных контактов под действием электростатического отталкивания, действующего на ту часть комплекса, которая доступна с наружной поверхности мембраны и несет поверхностный заряд высокой плотности (Barber, 1982). Электронно-микроскопические исследования (Miller, Staehelin, 1976) показывают, что комплексы сопрягающего фактора распределены в мембране так же, как комплексы фотосистемы I. Комплекс цитохромов b_6/f , по-видимому, распределен весьма равномерно (Cox, Andersson, 1981; Peters et al., 1983) и сохраняет латеральную подвижность, что позволяет ему диффундировать в область межмембранных контактов и обратно.

Латеральная асимметрия в распределении белковых комплексов мембраны и, по всей вероятности, ее гликолипидов всецело определяется упаковкой мембран в стопки (грани). В естественно образовавшихся хлоропластах, не имеющих гран, наблюдается лишь случайное, равномерное распределение четырех белковых комплексов в мембранах тилакоидов (Arntzen, 1978). Распад стопок мембран в хлоропластах, содержащих грани, под действием уменьшения концентрации катионов также приводит к рандомизации распределения комплексов в плоскости мембраны (Staehelin et al., 1977; Arntzen, 1978).

IV

КОМПЛЕКС ФОТОСИСТЕМЫ I

Для удобства обсуждения комплекс фотосистемы I тилакоидной мембраны можно охарактеризовать так: этот комплекс полипептидов способен к фотоиндуцированному окислению пластоцианина (или цитохрома c у некоторых водорослей), к восстановлению ферредоксина и генерации несимметричного трансмембранного распределения электрических зарядов.

A

СОСТАВ И СТРУКТУРА

Для того чтобы выполнить свою функцию, полипептиды комплекса фотосистемы I должны связать и ориентировать пигменты, поглощающие свет, расположить в нужном порядке компо-

Таблица 1. Полипептиды тилакоидной мембраны

Комплекс		M_r ¹⁾ , кДа	Связь с функциональными компонентами		Кодирование ²⁾
Комплекс фото-системы I	Сердцевина	70	(I)	P700, A ₀ , Xл a	Xп
		25	(II)	— — —	Я
		20	(III)	Пластоцианин	Я
		18	(IV)	FeS	Xп (?)
		16	(V)	FeS	Я
		8	(VI)	FeS	Я
ССК I	4 полипептида от 19 до 24			Xл a+b	Я
Комплекс фото-системы II	Сердцевина	47		P680, Фео, Xл. a, Z, Q _A	Xп
		43			
		34	Q _B		
		10	Цит. b ₅₅₉		
	ССК II	33	Мп(?)	Xп	
		28	Xл a, b	Я	
		26	Xл a, b	Я	
	Периферийные	24	Xл a, b	Я	
		33	Ca ²⁺ (?), Cl ⁻ (?)	Я	
		23	Ca ²⁺ (?)	Я	
Комплекс цитохромов b ₆ /f		17			Я
		33, 34	Цит. f	Xп	
		23	Цит. b ₆	Xп	
		20	Fe ₂ S ₂	Я	
Комплекс сопрягающего фактора	CF ₁	17	— — —	Xп	
		59	(α) — — —	Xп	
		56	(β) — — —	Xп	
		37	(γ) — — —	Я	
		18	(δ) — — —	Я	
	CF ₀	13	(ε) — — —	Xп	
		17	(I) — — —	Xп	
		11	(II) — — —	Я	
		9	(III) — — —	Xп	
Ферредоксин-NADP — оксидоредуктаза		33		FAD	Я
Ферредоксин		11		FeS	Я
Пластоцианин		10,5		Cu	Я

¹⁾ В большинстве случаев приведены значения молекулярной массы, оцененные по подвижности полипептидов при электрофорезе в условиях, когда комплексы диссоциируют. Значения молекулярных масс, встречающиеся в литературе, могут отличаться от приведенных здесь, причем иногда весьма значительно, что объясняется различиями в использованных процедурах приготовления образцов и в условиях электрофореза. В некоторых случаях неясно, сообщают ли исследователи из разных лабораторий об идентичных или о похожих, но различных полипептидах.

²⁾ Xп — полипептид закодирован в геноме хлоропласта, Я — полипептид закодирован в ядерном геноме.

ненты реакционного центра, участвующие в первичных процессах переноса электронов и генерации зарядов, разместить молекулы, играющие роль доноров и акцепторов электронов для реакционного центра. Комплекс фотосистемы I содержит по меньшей мере 13 различных полипептидов, около 200 молекул хлорофил-

ла, неизвестное число молекул каротиноидов, 3 Fe-S-центра и, возможно, одну или большее число молекул хинона.

Так называемое ядро, или сердцевина (core) комплекса фотосистемы I содержит шесть различных полипептидных субъединиц в случае высших растений, но лишь четыре субъединицы в случае цианобактерий и зеленых водорослей (гл. 5). Полипептидные субъединицы комплекса высших растений нумеруют от I до VI в порядке убывания молекулярной массы (табл. 1). Полагают, что ядро комплекса содержит димер субъединиц I, который образует реакционный центр фотосистемы I, и по одной полипептидной субъединице меньших масс. Есть веские доводы в пользу того, что два полипептида с массой около 70 кДа в реакционном центре (субъединица I) на самом деле не идентичны и представляют собой либо полностью различные полипептиды, либо несколько отличающиеся друг от друга структурные варианты одного и того же полипептида (Chua et al., 1975; Bag-Nup et al., 1977). Потеря субъединиц IV, V и VI из ядра комплекса под действием детергентов коррелирует с исчезновением сигналов ЭПР, приписываемых трем Fe-S-акцепторам электронов в фотосистеме I (гл. 5). Есть несколько фактов, доказывающих, что субъединица III облегчает восстановление окисленного P700⁺ пластоцианином и связывает пластоцианин с комплексом фотосистемы I (Haehnel et al., 1980). Функциональная роль субъединицы II в переносе электронов еще не ясна; возможно, что эта субъединица не участвует непосредственно в транспорте электронов.

Некоторые из семи или большего числа остальных полипептидов в комплексе фотосистемы I участвуют в связывании и ориентировании светособирающих молекул хлорофилла и вспомогательных пигментов (Thornber, 1986). Особенно интересен с точки зрения выяснения организации пигментов в фотосистеме I тот факт, что недавно удалось найти полипептиды, связывающие хлорофилл *b* (Haworth et al., 1983; Lam et al., 1984 a, b; Ortiz et al., 1984). Прежде считали, что отличительной чертой комплекса фотосистемы I является отсутствие белков, связывающих хлорофилл *b*. Сейчас очевидно, что три или четыре полипептида с молекулярными массами от 19 до 24 кДа объединяются в комплексы и кооперативно связывают как хлорофилл *a*, так и хлорофилл *b*. Отношение количества хлорофилла *a* к количеству хлорофилла *b* в этом выделенном хлорофилл-связывающем комплексе равно примерно 3,5 (Haworth et al., 1983), тогда как для интактного комплекса фотосистемы I это отношение по имеющимся оценкам составляет 10 (для некоторых водорослей ситуация несколько иная, как отмечено в работе Wollman, Verma, 1982). Ясно, что белки, связывающие хлорофиллы *a* и *b* в фотосистеме I, отличаются от таковых в

фотосистеме II (Lam et al., 1984 b) (см. также разд. II.A). Однако особенности синтеза этих белков в точности аналогичны особенностям синтеза белков, связывающих хлорофиллы *a* и *b* в фотосистеме II: те и другие синтезируются на рибосомах в цитоплазме как более крупные полипептиды-предшественники, которые затем попадают в хлоропласт и там «дозревают» до функционально активного состояния.

Б ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Как уже говорилось, реакционный центр фотосистемы I у высших растений состоит из двух полипептидов массой около 70 кДа. Первичный донор электронов в реакционном центре фотосистемы I обозначают P700, поскольку в оптическом дифференциальном спектре фотоокисленного первичного донора наблюдается максимальное выцветание около 700 нм. Окисленный первичный донор P700⁺ является слабым окислителем по сравнению с окисленным первичным донором P680⁺ в фотосистеме II (потенциал $E_{m,7}$ составляет около 480 мВ для P700⁺ и около 1200 мВ для P680⁺). Разностный оптический спектр позволяет идентифицировать P700⁺ как некий катион хлорофилла *a*, но до сих пор нет единого мнения в вопросе о том, является ли первичный донор мономером или димером хлорофилла (см. гл. 2, а также Hongu et al., 1985). Данные и аргументы в пользу различных точек зрения рассмотрены в обзоре (Rutherford, Heathcote, 1985).

За время не более 10 пс после поглощения фотона светособирающими пигментами фотосистемы I возбужденный P700* отдает электрон молекуле акцептора, связанной с комплексом реакционного центра (рис. 1). Ориентация реакционного центра в мембране обеспечивает разделение зарядов в направлении, перпендикулярном поверхности мембраны (рис. 3); таким образом создается трансмембранная разность электрических потенциалов. Хронологическая последовательность открытия различных акцепторов электронов в фотосистеме I почти полностью противоположна последовательности переноса электронов в хлоропластах, поскольку для обнаружения более ранних акцепторов требуется аппаратура со все более высоким временным разрешением. Первый из известных акцепторов, восстанавливаемых донором P700*, обозначается A₀; почти с полной определенностью можно сказать, что по своей структуре это молекула типа хлорина. Судя по оптическим спектрам (Fenton et al., 1979; Swarthoff et al., 1982) и спектрам ДЭЯР (Fajer et al., 1980), это, по всей вероятности, молекула хлорофилла. Восстановлен-

ный акцептор A_0^- является гораздо более сильным восстановителем, нежели первый из известных акцепторов электрона в фотосистеме II (по оценкам, потенциал средней точки для A_0^- составляет около -1100 мВ, тогда как измеренный потенциал для I^- в фотосистеме II равен приблизительно -600 мВ). Таким образом, разделение зарядов в фотосистеме I охватывает диапазон гораздо более отрицательных окислительно-восстановительных потенциалов по сравнению с фотосистемой II.

Разделение зарядов, возникшее в результате фотохимической реакции между $P700^+$ и A_0^- , стабилизируется в дальнейшем путем переноса восстановительного эквивалента от A_0^- к A_1 , который происходит за время около 200 пс (рис. 1). Химическая природа акцептора A_1 не известна, но это определено не хлорофилл *a* и, возможно, вообще молекула не хлорофиллового типа (Rutherford, Heathcote, 1985). По своей сверхтонкой структуре спектр ЭПР этого акцептора напоминает сигнал II (Heathcote, Evans, 1980); поэтому возможно, что A_1^- может быть еще одним «специфическим» семихиноном, участвующим в переносе электронов при фотосинтезе.

В ДОНОРЫ ЭЛЕКТРОНОВ В ФОТОСИСТЕМЕ I

Непосредственно донорами электронов для фотосистемы I могут являться небольшие гидрофильные белки, способные передвигаться во внутреннем пространстве тилакоидных пузырьков. У некоторых эукариотических водорослей и многих цианобактерий донором является цитохром типа *c*, очень похожий на *te*, что найдены в бактериях и митохондриях. У высших растений и большинства водорослей непосредственным донором для фотосистемы I является пластоцианин (ПЦ) (рис. 1 и 3). Оказывается, что некоторые виды цианобактерий и эукариотических водорослей содержат оба этих металлопротеина, причем их относительное количество определяется количеством доступных металлов Cu и Fe.

Осуществлено кристаллографическое изучение структуры пластоцианина (Colman et al., 1978); описаны два возможных участка переноса электронов внутрь и наружу металлопротеина, причем один из этих участков имеет гидрофобный характер, а другой несет поверхностный заряд относительно высокой плотности. Тот факт, что для быстрого восстановления окисленного $P700^+$ требуется присутствие катионов (Haehnel et al., 1980), может означать, что в этом процессе играет роль ионное экранирование, что в свою очередь указывает на возможность взаимодействия между отрицательно заряженным участком молеку-

лы пластоцианина и отрицательно заряженным участком на субъединице III центрального комплекса (core complex) фотосистемы I.

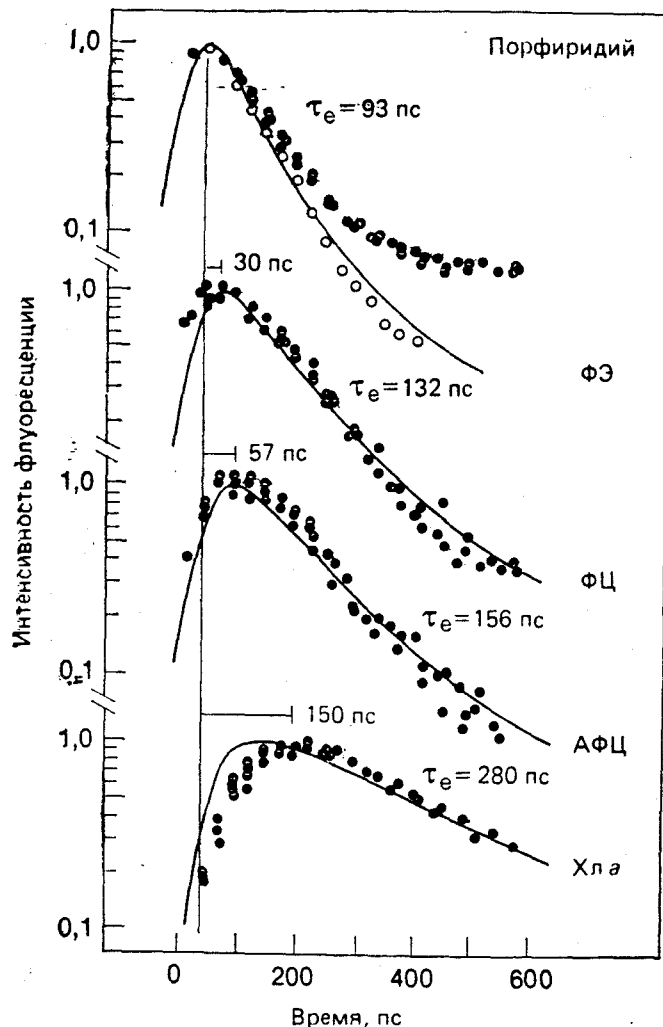


РИС. 2

Кривые разгорания и затухания флуоресценции отдельных пигментов у *Porphyridium cruentum*.

ФЭ — фикоэритрин; ФЦ — фикоцианин; АФЦ — аллофикоцианин; Хл *a* — хлорофилл *a*. У вершины каждой кривой указано время, соответствующее максимуму флуоресценции; оно показывает величину запаздывания по отношению к возбуждающему импульсу света. Время τ_e характеризует затухание флуоресценции. На кривой для ФЭ светлые кружки соответствуют быстрому компоненту затухания. (Данные взяты из работы: Yamazaki et al., 1984.)

Г ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ НА АКЦЕПТОРНОЙ СТОРОНЕ ФОТОСИСТЕМЫ I

По спектрам ЭПР, измеренным при низких температурах, в препаратах фотосистемы I идентифицированы три различных Fe-S-центра (Malkin, 1982; гл. 5 и 8 данной книги). Полагают,

h_g-

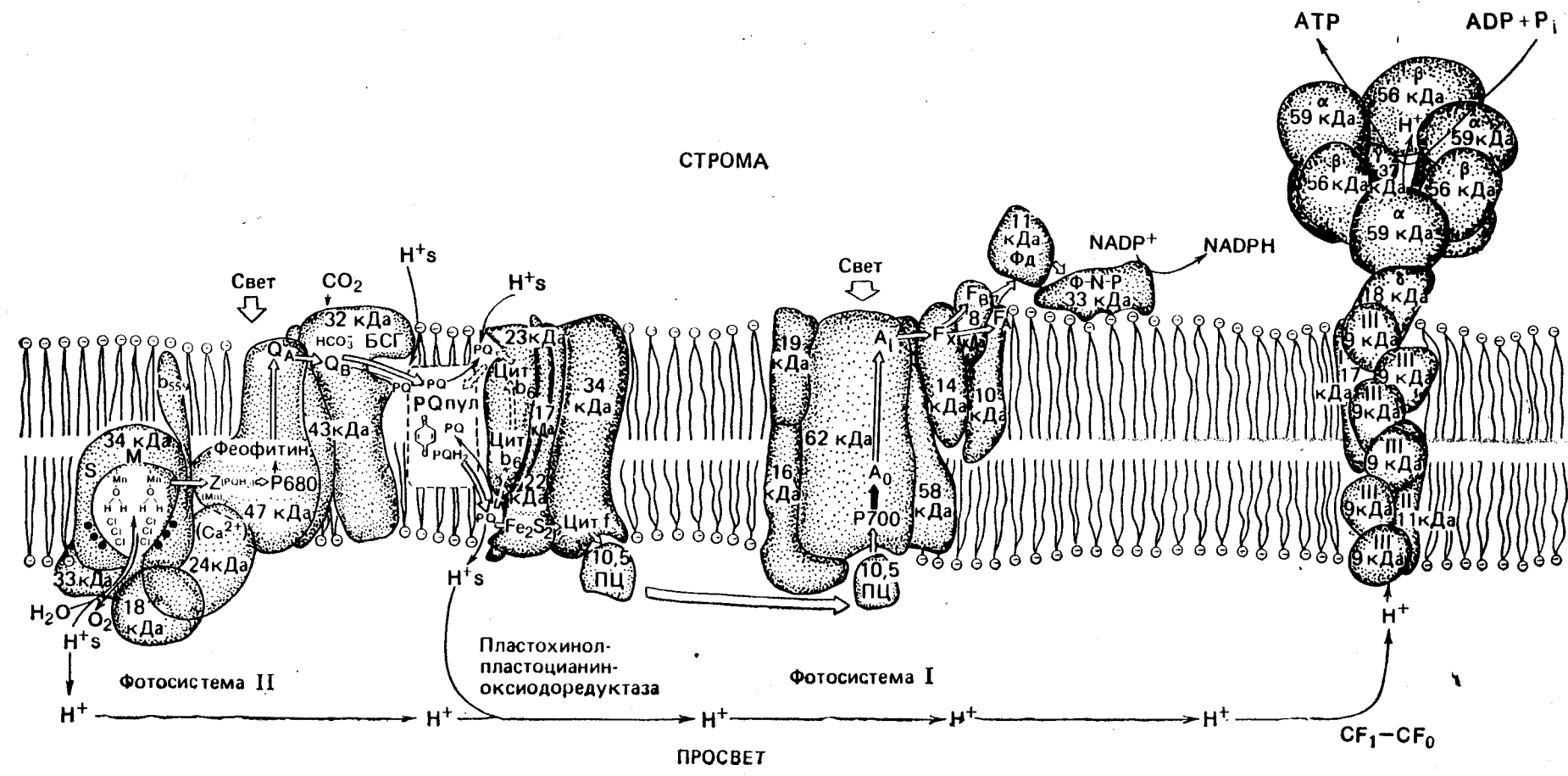


РИС. 3

Схема расположения четырех основных полипептидных комплексов в глицеролипидном слое тилакоидной мембраны. Четыре комплекса обозначены как фотосистема II, пластохинон-пластоцианин—оксидоредуктаза, фотосистема I и сопрягающий фактор CF₁—CF₀ (АТФ-синтаза). Используются также следующие обозначения: S — состояние комплекса, выделяющего кислород (см. рис. 4); БСГ (НВР) — белок, связывающий гербициды; α, β, γ, δ, ε — субъединицы CF₁; I, II, III — субъединицы CF₀. Остальные обозначения те же, что на рис. 1. Приблизительные значения молекулярных масс указаны в килодальтонах (кДа). (Govindjee, Eaton-Rye, 1986.)

что эти центры, обозначаемые F_A , F_B и F_X , являются центрами типа 4Fe-4S (Evans, 1982) и связаны с субъединицами IV, V и VI центрального комплекса фотосистемы I (см. также рис. 1 и 3). Число этих Fe-S-центров примерно стехиометрическое по отношению к P700 (Rutherford, Heathcote, 1985); их характерной особенностью является исключительно низкий окислительно-восстановительный потенциал средней точки; измеренные значения $E_{m,7}$ равны: -730 мВ для F_X , -590 мВ для F_B , -550 мВ для F_A (Evans, 1982). То обстоятельство, что эти акцепторы электронов присутствуют в примерно равных количествах, а их потенциалы последовательно уменьшаются, возможно говорит о том, что в цепи переноса электронов центры расположены последовательно и в том порядке, в котором они здесь перечислены. Однако интерпретировать имеющиеся данные сложно, и истинное расположение центров еще не ясно, но простая линейная последовательность кажется маловероятной.

Прежнее представление о том, что центр F_B находится в линейной цепи переноса электронов перед центром F_A , пересмотрено ввиду новых данных (см. обзор Rutherford, Heathcote, 1985); сейчас считается, что F_A и F_B работают параллельно, образуя вместе конечный акцептор электронов в реакционном центре фотосистемы I, и, следовательно, оба они ответственны за восстановление растворимого ферредоксина на наружной поверхности тилакоидной мембраны (рис. 3). Наряду с сигналами ЭПР, связанными с окислительно-восстановительными превращениями этих акцепторов, наблюдаются изменения и в оптическом спектре поглощения, известные как P430. Происхождение этого сигнала, по-видимому, лучше всего объясняется совместными вкладами обоих центров F_A и F_B (Rutherford, Heathcote, 1985).

Исходя из измеренного значения окислительно-восстановительного потенциала для F_X , наиболее логично считать, что этот акцептор расположен в последовательной цепи переноса электронов перед центрами F_A и F_B . В действительности есть мало прямых доказательств того, что F_X^- играет роль донора электронов для F_A и F_B ; некоторые факты указывают на то, что F_X работает параллельно с двумя другими Fe-S-центрами (см., например, Niyama, Fogk, 1980). Однако наименее противоречивая интерпретация имеющихся данных состоит в том, что F_X находится в цепи переноса электронов между A_0 и параллельно с работающими акцепторами F_A и F_B , как показано на рис. 1 и 3.

Ферредоксин, растворимый в стромальной фазе хлоропласта, осуществляет перенос электронов от реакционного центра фотосистемы I к $NADP^+$; в результате образуется $NADPH$, необходимый для фиксации CO_2 (гл. 17). Восстановление $NADP$ катализирует ферредоксин- $NADP^+$ — оксидоредуктаза (Ф-N-P), свя-

занная с наружной поверхностью тилакоидной мембраны вне областей межмембранных контактов (Jennings et al., 1979). Диссоциация этого флавопротеина от мембраны приводит к существенному уменьшению сродства фермента к ферредоксину (Forty et al., 1983).

V

КОМПЛЕКС ФОТОСИСТЕМЫ II

С точки зрения проблемы, рассматриваемой в этой главе, комплекс фотосистемы II можно определить как структурное образование, способное поглощать свет, окислять воду, восстанавливать пластохинон и создавать несимметричное трансмембранное распределение электрических зарядов и генерировать химический потенциал ионов водорода.

A

СОСТАВ И СТРУКТУРА

Комплекс фотосистемы II должен содержать: полипептиды, связывающие светособирающие пигменты и ориентирующие их; компоненты, участвующие в индуцированной светом реакции переноса электрона от первичного донора к первичному акцептору; полипептиды, участвующие в последующих реакциях переноса электронов по цепи акцепторов, а также компоненты, осуществляющие окисление воды и последующее донирование электронов. Обычно комплекс фотосистемы II (например, из шпината) содержит по меньшей мере 11 различных полипептидов (стехиометрическое соотношение их не определено), порядка 200 молекул хлорофилла *a*, 100 молекул хлорофилла *b*, 50 молекул каротиноидов, не менее 3 молекул пластохинона (Q_A , Q_B , Z), один атом железа, 1 или 2 молекулы цитохрома b_{559} , две молекулы феофитина *a* (Фео), 4 атома марганца, неизвестное количество хлорида и, возможно, кальций.

Идентифицированные к настоящему времени полипептиды комплекса фотосистемы II перечислены в табл. 1 и на рис. 3. Следует напомнить читателю о том, что составление таблицы пришлось на то время, когда изучение состава фотосистемы II с помощью разнообразных новых методов идет очень быстро; поэтому возможно, что таблицу придется пересматривать в ближайшем будущем. В самом деле, есть сведения о полипептидах, не приведенных в таблице (см., например, Green et al., 1982; Ljungberg et al., 1984; Takahashi, Asada, 1985), причем на дан-

ном этапе еще не всегда возможно со всей определенностью установить, получают ли при разных процедурах выделения одинаковые полипептиды или различные и лишь похожие. Вопрос о том, действительно ли комплекс фотосистемы II содержит полипептиды именно в таком соотношении, в настоящее время еще не решен и остается спорным. До сих пор не достаточно данных для того, чтобы принять одну из гипотез и отвергнуть другие. И хотя остается еще очень много вопросов о составе комплекса фотосистемы II, на которые сегодня еще нет ответа, следует заметить, что в последние годы исследования в этой области развивались такими быстрыми темпами, какие редко удавалось достичь в области фотосинтеза (см., например, Inoue et al., 1983; Van Gorkom, 1985; Renger, Govindjee, 1985; Govindjee et al., 1985; Dismukes, 1986).

Так называемое ядро, или сердцевина (core) комплекса фотосистемы II состоит из пяти гидрофобных полипептидов; его можно отделить от других компонентов тилакоидной мембраны после разрушения мембраны одним из нескольких детергентов. Ядро содержит около 50 молекул хлорофилла *a*, связанных с полипептидами массой 47 и 43 кДа (Camm, Green, 1980). Есть некоторые основания полагать, что в этом комплексе из двух полипептидов может осуществляться первичное фотохимическое разделение зарядов, т. е. функция реакционного центра фотосистемы II. Однако может оказаться (Green, Camm, 1984; Nakatani et al., 1984), что полипептид массой 43 кДа лишь несет на себе хлорофилл *a* и обеспечивает перенос энергии возбуждения, и тогда реакционным центром фотосистемы II является единственный полипептид массой 47 кДа. Однако другие данные недавно позволили сделать иное предположение: реакционный центр фотосистемы II (P680 и феофитин) и акцепторы хиноновой природы локализованы в комплексе из двух полипептидов с массой 30—34 кДа (Deisenhofer et al., 1985 в; Michel, Deisenhofer, 1986). Это предположение основано на гомологии аминокислотных последовательностей полипептидов комплекса реакционного центра фотосистемы II и полипептидов комплекса реакционного центра пурпурных фотосинтезирующих бактерий (Michel, Deisenhofer, 1986). Однако к настоящему времени эти два полипептида комплекса реакционного центра фотосистемы II еще не удалось выделить так, чтобы сохранилась их связь с молекулами хлорофилла.

Ясно, что наименьший полипептид ядра фотосистемы II (его масса 10 кДа) является апопротеином цитохрома b_{559} (Widger et al., 1984 a), однако роль этого загадочного цитохрома далеко не ясна. Полагают, что, несмотря на малые размеры, цитохром b_{559} пронизывает бислой тилакоидной мембраны. Самые последние данные показывают, что апопротеин цитохрома b_{559}

может на самом деле представлять собой олигомер (возможно, тетрамер), в который наряду с полипептидом массой 10 кДа входит полипептид массой 4,4 кДа (W. Widger, W. Stryer, личное сообщение).

Присутствие в фотосистеме II трех полипептидов с массами около 33 кДа обусловлено вескими биохимическими причинами, но вряд ли можно сомневаться в том, что этот факт лишь запутает исследователей фотосинтеза. Два из этих трех полипептидов входят в ядро фотосистемы II, причем один является апопротеином для вторичного хинонового акцептора Q_B (Kyle, 1985), а другой каким-то образом участвует в окислении воды (Ghanotakis, Yocum, 1985; Kambara, Govindjee, 1985). Третий полипептид является периферическим мембранным белком, он тоже участвует в окислении воды, но его роль почти не известна (Kuwabara et al., 1985). Два других периферических мембранных белка комплекса фотосистемы II имеют массу 23 кДа и 17 кДа (Ghanotakis et al., 1985); они также требуются для окисления воды, в том смысле что способность препаратов окислять воду уменьшается при удалении этих полипептидов и в соответствующих условиях восстанавливается при повторном встраивании каждого из них (Govindjee et al., 1985). В некоторых системах эти два полипептида могут вообще отсутствовать (Koike, Inoue, 1985).

В настоящее время считается, что три или четыре полипептида (массами 29, 27, 26 и 25 кДа), связываясь между собой, образуют нативный светособирающий комплекс, несущий молекулы хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов. Полипептид массой 26 кДа является одним из наиболее распространенных в большинстве хлоропластов высших растений, однако нет единого мнения о величине стехиометрического соотношения между этими полипептидами. Есть данные, указывающие на гораздо большее разнообразие (по сравнению с тем, что показано в табл. 1) молекулярных масс полипептидов светособирающего комплекса, кодируемых геномом ядра клетки. Многообразие возможных структур комплекса ССК-II следует также из множественности кодирующих его генов (Coruzzi et al., 1983). Ясно, что между полипептидами комплекса ССК-II существует значительная структурная гомология. К примеру, наблюдались перекрестные иммунологические реакции для двух основных полипептидов аналогичного комплекса из *Chlamydomonas* (Chua, Blomberg, 1979). С каждым реакционным центром фотосистемы II объединяются многочисленные копии комплекса ССК-II; их типичное количество для таких растений, как шпинат или горох, выросших на ярком свете, составляет от 15 до 20.

На рис. 3 различные полипептиды фотосистемы II изображены в виде единого комплекса. Цель этого рисунка лишь в том,

чтобы наглядно представить полипептидный состав фотосистемы II, но не в том, чтобы предложить структурную модель комплекса. Те полипептиды, которые по современным представлениям пронизывают мембрану, показаны именно в таком виде. На рисунке изображена лишь одна копия каждого полипептида и указаны компоненты, предположительно связанные с каждым из них.

Б

ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

В фотосистеме II связаны воедино одноэлектронные процессы переноса заряда в реакционном центре, четырехэлектронные реакции окисления двух молекул воды и двухэлектронное восстановление пластохинона. Первичное разделение зарядов в реакционном центре фотосистемы II, как и во всех других реакционных центрах, включает в себя чрезвычайно быстрый индуцированный светом перенос электронов между двумя хлориновыми молекулами, в данном случае между хлорофиллом *a* и феофитином *a* (гл. 8; см. также рис. 1). Первичный донор электронов в фотосистеме II — это хлорофилл *a*, обозначаемый P680, так как длинноволновый максимум изменений поглощения, наблюдаемых при его окислении, находится при 680 нм. Вопрос о том, локализовано ли окисленное состояние P680⁺ на одной или на двух молекулах хлорофилла *a*, в настоящее время еще не решен, и возможно, что этот вопрос частично является семантическим (Hoff, 1982). Партнером катиона P680⁺ в первичной радикальной паре является восстановленный мономер феофитина, чаще всего обозначаемый I⁻ (Климов и Красновский, 1982).

Поскольку реакция образования первичной пары радикалов происходит исключительно быстро, энергия возбужденного донора P680* в ходе первичного переноса заряда почти не теряется (van Gorkom, 1985). Однако стабилизация фотохимически разделенных зарядов на время, типичное для биохимических реакций, сопровождается значительной потерей свободной энергии, что видно из сравнения средноточечных окислительно-восстановительных потенциалов для I/I⁻ (около —600 мВ) и для окисляющего его акцептора Q_A/Q_A⁻ (около —200 мВ). Акцептор Q_A — это молекула пластохинона, прочно связанная с полипептидом реакционного центра, возможно с полипептидом массой 47 кДа (акцепторы электронов в фотосистеме II рассмотрены в обзоре Vermaas, Govindjee, 1981). При восстановлении акцептора Q_A анионом I⁻ образуется анион семихинона. Окислительно-восстановительные реакции пластохинона, связанного с белком реакционного центра, необычны в двух отношениях:

1) этот пластохинон не может быть дважды восстановлен и
 2) будучи восстановленным, он не связывает протона, по крайней мере за времена, характерные для переноса электрона, т. е. за миллисекунды. Молекула Q_A в реакционном центре расположена достаточно близко к атому негемового железа в состоянии высокоспинового двухвалентного иона (high spin non-heme ferrous iron atom) и находится в электронном взаимодействии с ним (Nugent et al., 1981), но роль этого взаимодействия еще не понятна. Накопленные факты показывают, что валентность железа, по-видимому, не изменяется при изменении окислительно-восстановительного состояния хинона (Petruoleas, Diner, 1982).

Перенос электрона от I^- к Q_A происходит за сотни пикосекунд, т. е. на порядок медленнее, чем первичное разделение зарядов. Однако рекомбинация зарядов между I^- и $P680^+$ происходит еще в 100 раз медленнее; поэтому стабилизация заряда на Q_A^- осуществляется почти со стопроцентной квантовой эффективностью (см., например, обсуждение в работе van Gorkom, 1985).

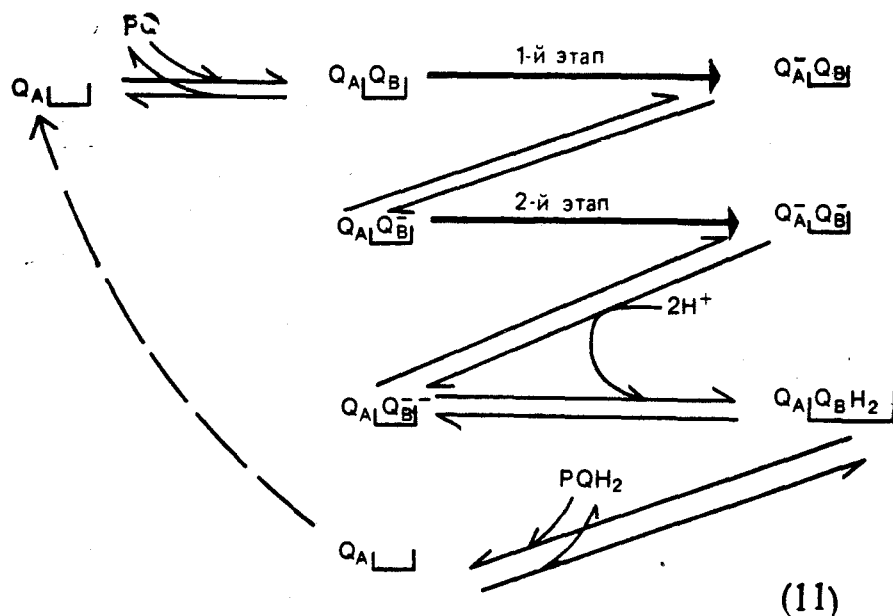
В РЕАКЦИИ НА АКЦЕПТОРНОЙ СТОРОНЕ ФОТОСИСТЕМЫ II

Комплексы фотосистемы II содержат два разных пластохинона в роли последовательно действующих акцепторов электронов. Мы уже упоминали первый из этих акцепторов Q_A и отметили его необычные свойства, связанные с одноэлектронным восстановлением. Второй акцептор Q_B обратимо связывается (см. гл. 9, а также Crofts, Wraight, 1983) с полипептидом сердцевины фотосистемы II, имеющим массу 33 кДа; известно, что оборот этого полипептида происходит быстрее, чем в случае любого другого белка тилакоидной мембраны (Kyle, 1985; см., однако, Metz et al., 1985). Этот вторичный акцептор действует как двухэлектронный шлюз; он связывает одноэлектронные процессы переноса заряда в реакционном центре с восстановлением пула свободного пластохинона таким образом, что электроны переносятся только попарно.

1 ДВУХЭЛЕКТРОННЫЙ ШЛЮЗ

Для описания работы двухэлектронного шлюза в фотосистеме II предложена схема, совпадающая с той, которую позднее предложили для пурпурных фотосинтезирующих бактерий (Crofts, Wraight, 1983). Предполагаемая последовательность

реакций такова:



После первого срабатывания реакционного центра электрон стабилизируется на первичном хиноновом акцепторе Q_A и затем в течение нескольких десятков микросекунд переносится на вторичный хиноновый акцептор Q_B . Это равновесная реакция; константа равновесия ее по имеющимся оценкам составляет около 20 (Crofts, Wraight, 1983). Затем, когда тот же реакционный центр фотосистемы II срабатывает во второй раз, те же события повторяются. В результате образуется дважды восстановленный акцептор Q_B . В некоторый момент в ходе этого процесса из внешней водной фазы (т. е. с той стороны мембраны, которая обращена к строме) поглощаются два протона, и в результате образуется полностью восстановленный и протонированный пластохинон (пластохинол). Такой путь восстановления хинона, в котором промежуточные восстановленные состояния остаются связанными с белком, обеспечивает абсолютную асимметрию поглощения протонов, что необходимо в связи с той ролью, какую играет трансмембранная асимметрия распределения протонов в энергетическом сопряжении. Полностью восстановленный хинон гораздо слабее закреплен в месте его связывания, и почти определенно можно считать, что его диссоциация от центра фотосистемы II является одним из этапов восстановления пула пластохинона. Освободившееся место связывания хинона на полипептиде массой 33 кДа, где был связан Q_B , заполняется пластохиноном из мембранного пула.

Следует особо отметить, что именно благодаря способности акцепторного комплекса фотосистемы II стабилизировать состояние семихинона, являющегося вторичным акцептором электронов, реакция восстановления хинонов происходит в виде двух

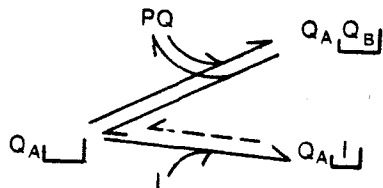
И
С
С
Г
Т
Д
Е
Н
Р
С
Р
Л
Г
И
2
У
И
Э
В
П
Р
П
В
П
Н
И
Д
П
Н
Д
Т
П
Н
Э
5

последовательных одноэлектронных стадий; тем самым согласуются одноэлектронные процессы в реакционном центре и двухэлектронные процессы в пуле пластохинона. Действительно, то обстоятельство, что восстановление пластохинона требует двух последовательных фотоактов, служит наиболее веским доказательством связи хинона с белком. Если бы хинон был свободен, две молекулы семихинона (т. е. PX-H_2 ; PQH), образовавшиеся в результате первого срабатывания двух различных реакционных центров, могли бы участвовать в реакции дисмутации с образованием PQ и PQH_2 (PX-H_2) (химия хинонов описана в работе Rich, 1985).

Интересно отметить, что некоторые анионы влияют на скорость реакций в двухэлектронном шлюзе. Так, например, добавление солей муравьиной кислоты предотвращает дальнейший перенос электронов за пределы двухэлектронного шлюза, но бикарбонат полностью восстанавливает этот перенос электронов (см., например, Vermaas, Govindjee, 1982; Eaton-Rye et al., 1985).

2 ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ГЕРБИЦИДОВ НА ФОТОСИСТЕМУ II

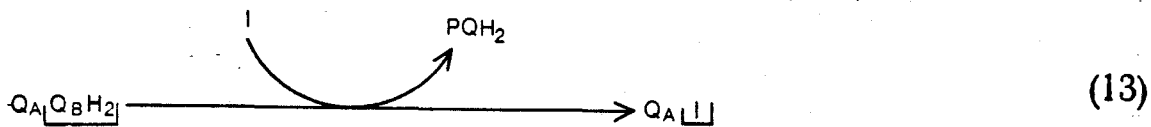
Механизм ингибирующего действия гербицидов на перенос электронов в фотосистеме II красиво вписывается в механизм восстановления пластохинона, рассмотренный выше: гербициды препятствуют окислению восстановленного Q_A^- . В независимых работах, где исследованы реакционные центры фотосинтезирующих бактерий (Wraight, 1982 b) и комплекс фотосистемы II в тилакоидах растений (Velthuys, 1982), было высказано предположение о том, что молекула ингибитора (I) может вытеснить молекулу вторичного хинонового акцептора электронов Q_B из места ее связывания.



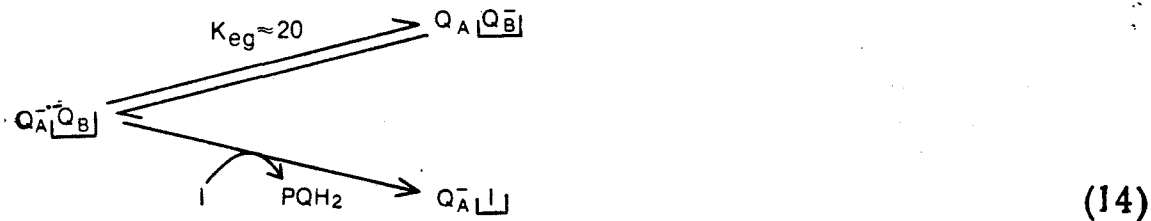
(12)

Действие ингибитора, по-видимому, является конкурентным, причем скорость высвобождения ингибитора из места связывания оказывается во много раз меньше, чем скорость высвобождения пластохинона (см., например, Vermaas et al., 1984 a, b). Такие ингибиторы, примерами которых служат триазины (например, атразин) и производные мочевины (например, диурон), не могут быть восстановлены акцептором Q_A^- , поэтому перенос электронов от этого акцептора не происходит.

Восстановленный пластохинон (пластохинол, Q_BH_2) весьма слабо закреплен в месте связывания хинона в фотосистеме II, поэтому молекула ингибитора вытесняет его еще легче, чем исходную молекулу пластохинона.



С другой стороны, семихинон Q_B^- связан с белком гораздо прочнее, чем хинон Q_B (Crofts, Wraight, 1983). В силу равновесия между Q_A и Q_B электрон, делокализованный по этим двум молекулам, проводит 95% времени на Q_B и остальное время на Q_A . По-видимому, молекула ингибитора вытесняет молекулу Q_B из места ее связывания как раз в такой момент, когда электрон находится на молекуле Q_A , поэтому возникает впечатление, будто ингибитор индуцирует обратный перенос электрона от Q_B^- на Q_A (Velthuys, Amesz, 1974).



Эти представления о механизме действия гербицидов позволили объяснить сопротивляемость к триазиновым гербицидам, развившуюся у более 20 видов сорняков на пахотных землях, ежегодно обрабатываемых такими гербицидами. Показано, что замещение единственного аминокислотного остатка в том участке полипептида фотосистемы II массой 33 кДа, к которому присоединяется хинон (см., например, Hirschberg et al., 1984 a), существенно снижает сродство для связывания триазиновых гербицидов (а также и некоторых других групп гербицидов) в комплексе фотосистемы II (Pfister, Arntzen, 1979). В таком случае эти вещества уже не могут эффективно конкурировать с хиноном Q_B за место связывания, и ингибирование переноса электронов происходит в гораздо меньшей степени. Однако это замещение одного аминокислотного остатка и обусловленная им сопротивляемость к гербицидам сопровождаются очень существенным уменьшением константы равновесия K_{eq} распределения электронов между Q_A^- и Q_B ; снижение может быть и 20-кратным (Vermaas et al., 1984 c; Robinson, 1985). Если это так, то электрон, находящийся на хиноновых акцепторах, будет проводить на Q_A уже половину времени, и можно ожидать, что на постоянном свете в любой момент времени 50% всех

реакционных центров фотосистемы II окажутся закрытыми, т. е. не способными к стабилизации зарядов, образовавшихся в результате первичной фотохимической реакции в радикальной паре $P680^+I^-$. Это согласуется с тем фактом, что у тех биотипов сорняков, которые устойчивы к гербицидам, квантовый выход оказывается на 25—30% ниже, чем у таких же растений, подверженных действию гербицидов (Ort et al., 1983).

Г ОКИСЛЕНИЕ ВОДЫ И ДРУГИЕ РЕАКЦИИ НА ДОНОРНОЙ СТОРОНЕ ФОТОСИСТЕМЫ II

1 ВОССТАНОВЛЕНИЕ $P680^+$

Восстановление $P680^+$ представляет собой сложный процесс в том смысле, что кинетика его описывается несколькими экспонентами с характерными временами от десятков наносекунд до микросекунд (гл. 8). Промежуточный донор электронов для $P680^+$ обозначают Z; это — одноэлектронный переносчик, осуществляющий перенос зарядов между системой окисления воды и реакционным центром. До сих пор не ясно, приходится ли на каждый реакционный центр один переносчик Z или большее их число, и если так, то параллельно или последовательно включены они в цепь переноса электронов (см., например, Govindjee et al., 1985).

Все известные факты подтверждают предположение о том, что индуцированный светом сигнал ЭПР, так называемый «сигнал II_{vf} » (от англ. very fast — очень быстрый) соответствует образованию Z^+ . Прямого сравнения кинетики нарастания сигнала II_{vf} с кинетикой восстановления $P680^+$, полученной оптическими методами, провести еще не удалось из-за недостаточного временного разрешения в измерениях сигналов ЭПР. Однако при использовании хлоропластов, в которых скорости восстановления $P680^+$ и нарастания сигнала II были уменьшены в результате ингибирования реакций окисления воды, наблюдали очень хорошую корреляцию между скоростями этих процессов (Boska et al., 1983).

Полагают, что Z^+ представляет собой катион пластосемихинона (PQH_2^+), образовавшийся в результате одноэлектронного окисления специфического связанного пластохинола Z, которое не сопровождалось его депротонированием (O'Malley, Babcock, 1984; O'Malley et al., 1984). Предположение это привлекательно, поскольку катион семихинона должен иметь исключительно высокий положительный окислительно-восстановительный

потенциал (возможно 1,0 В для Z/Z^+), который необходим, если этот переносчик восстанавливается комплексом окисления воды. Предположение о том, что Z^+ является катионом пластосеминхиона, подтверждается в опытах с модельными соединениями *in vitro*, для которых получены спектры ЭПР, довольно хорошо имитирующие спектр ЭПР сигнала II, наблюдаемого *in vivo* (O'Malley, Babcock, 1984; O'Malley et al., 1984).

ДЕ
БС
et
из
ЛС

2

ОКИСЛЕНИЕ ВОДЫ

Процесс фотосинтеза, идущий с выделением кислорода, нельзя считать чем-то уникальным, поскольку для каждой реакции или структурной единицы, обнаруживаемой в тилакоидной мембране, можно хотя бы на качественном уровне найти эволюционно более древнюю реакцию или структуру у одной или нескольких фотосинтезирующих бактерий, не выделяющих кислород. Окисление воды является, возможно, единственной реакцией, присущей только организмам, выделяющим кислород при фотосинтезе, но эта эволюционно новая реакция очень важна.

Для того чтобы использовать воду как источник электронов, нужно преодолеть ряд серьезных трудностей. Во-первых, необходимо согласовать образование окислительных эквивалентов в реакционном центре, происходящее как одноэлектронный процесс при поглощении каждого кванта света, с четырехэлектронным окислением воды до молекулярного кислорода. Во-вторых, следует предотвратить взаимодействие промежуточных продуктов, обладающих очень высокой реакционной способностью, с другими молекулами или каким-то образом защитить их от нежелательных реакций. В-третьих, каждая из четырех последовательных стадий окисления воды должна осуществляться с примерно одинаковой затратой свободной энергии, не превышающей количество энергии, запасаемое при поглощении одного кванта света. (Дальнейшее обсуждение см. в работе Renger, Govindjee, 1985.)

Твердо установлены следующие факты относительно процесса окисления воды. 1) Четыре электрона отщепляются от двух молекул воды в результате четырех последовательных одноэлектронных реакций; это показывает, что каждый центр фотосистемы II осуществляет окисление воды и выделение молекулярного кислорода независимо от других центров (Joliot, Kok, 1975; гл. 10 данной книги); другое предположение о кооперативной работе четырех центров фотосистемы II в процессе окисления воды не подтверждается фактами. 2) Молекулярный кислород O_2 образуется после удаления четырех электронов от воды, но ионы водорода H^+ высвобождаются по одному в ходе

Р
М
С
пр
пе
ля
та
не
ЛС
пр
и

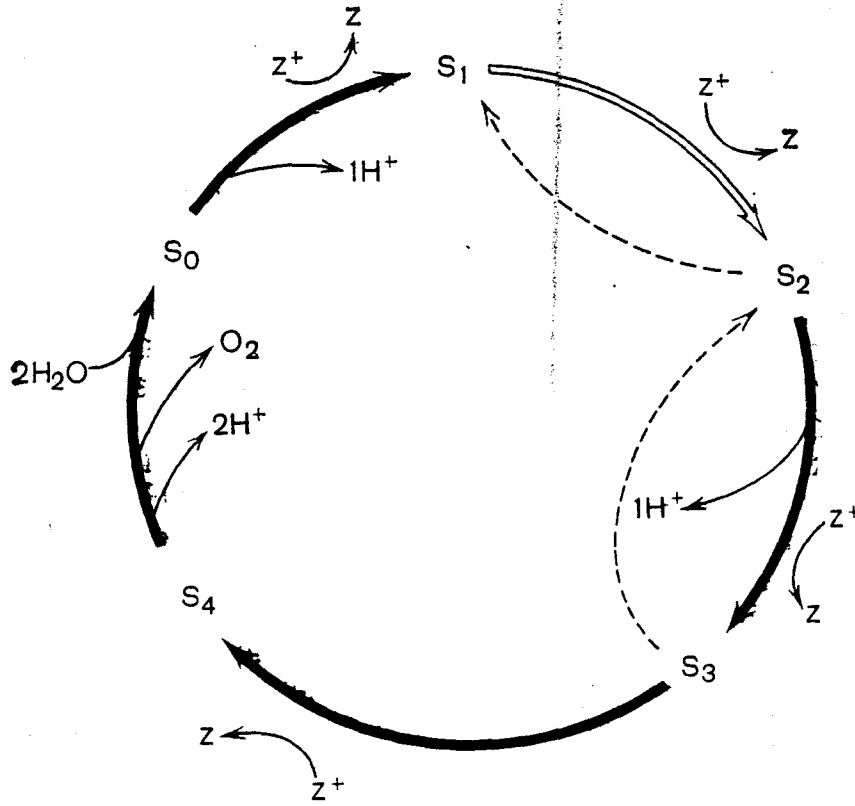
М
И
В
В

С
Ф
С

если
Г. Д.
семи-
ниями
рошо-
vivo

двух ранних стадий окисления воды, и еще два протона высвобождаются одновременно с выделением O_2 (см. обзор Govindjee et al., 1985). Таким образом, в комплексе окисления воды ни на одной из стадий процесса не накапливается более двух положительных зарядов. Эти факты легли в основу так называемой

нели-
кции
мемб-
цион-
коль-
ород-
цией,
фото-



онов,
необ-
еитов
ро-
трон-
орых,
одук-
стью,
их от
осле-
ся с
евы-
ного
nger,

РИС. 4

Модель переходов между S-состояниями при окислении воды.

Согласно этой модели, четыре электрона отщепляются от двух молекул воды при последовательных переходах между S-состояниями. При каждом из этих переходов окисленный светом Z^+ отрывает один электрон от комплекса, окисляющего воду. Это центральное положение модели согласуется с экспериментальными данными о том, что каждый центр фотосистемы II функционирует независимо, окисляя молекулу воды и выделяя кислород. Молекулярный кислород выделяется после отрыва четырех электронов. Один протон выделяется при переходе из состояния S_0 в состояние S_1 , второй — при переходе из S_2 в S_3 , и еще два — при переходе из S_3 в S_0 одновременно с выделением O_2 .

мой модели S-состояний (Joliot, Kok, 1975; гл. 10 данной книги). Известная схема, позволяющая объяснить результаты исследований механизма окисления воды, представлена в самом простом варианте на рис. 4.

Переход из любого S-состояния в следующее осуществляется, когда фотоокисленный Z^+ получает электрон от комплекса ферментов, окисляющего воду (рис. 4). Состояния S_3 и S_2 нестабильны, в темноте они релаксируют, и система не более чем

оцес-
двух
одно-
фото-
леку-
Кок,
пера-
окис-
кис-
эт
ходе

за несколько секунд переходит в состояние S_1 . Состояния S_0 и S_1 являются стабильными. Прежде было принято считать, что в мембранах, адаптированных к темноте, типичное распределение центров фотосистемы II соответствует 75% центров в состоянии S_1 и 25% центров в состоянии S_0 (Kok et al., 1970), однако теперь ясно, что в полностью адаптированных к темноте образцах почти все центры находятся в состоянии S_1 (Vermaas et al., 1984 c). Представление о том, что часть центров постоянно находится в состоянии S_0 , возникло из-за ранее не учитывавшегося эффекта: существует восстановитель, который в результате индуцируемой светом реакции переводит часть центров в состояние S_0 .

С помощью модели S-состояний удалось успешно объяснить и даже предсказать ряд фактов относительно системы окисления воды, но, несмотря на эти успехи, до сих пор очень мало известно о молекулярном механизме реакций. Установлено, что для окисления воды необходимо присутствие марганца. Разнообразные обработки, ингибирующие окисление воды тилакоидными мембранами (например, обработка трисом, NH_2OH , тепловая обработка), приводят также к высвобождению марганца, связанного с центрами фотосистемы II (см. обзор Ghanotakis, Yocum, 1985). С мембраной тилакоида связано несколько различных пулов марганца, различающихся по прочности их связи с мембраной, и это обстоятельство привело к некоторой неопределенности в вопросе о том, сколько атомов Mn необходимо для выделения кислорода. Сейчас ясно, что обеднение мембран, при котором на каждый реакционный центр приходится менее четырех атомов Mn, по крайней мере частично уменьшает способность к окислению воды (см., например, Yocum et al., 1981).

Еще в ранних работах предполагалось, что марганец играет роль накопителя зарядов, т. е. является непосредственным восстановителем для Z^+ и непосредственным окислителем воды. Однако лишь совсем недавно прямыми физическими методами удалось получить доказательства окислительно-восстановительных изменений Mn при окислении воды. Эти факты получены из измерений спектров ЭПР при низких температурах (Dismukes, Siderer, 1981; Zimmerman, Rutherford, 1984) и из анализа тонкой структуры рентгеновских спектров на краю полосы поглощения (Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS) (Kirby et al., 1981); обсуждение данных можно найти в работах (Renger, Govindjee, 1985; van Gorkom, 1985; Govindjee et al., 1985; Dismukes, 1986). До сих пор не решены вопросы о том, какова природа комплекса атомов Mn, валентность которого меняется под действием света, и какие состояния окисления Mn участвуют в этих переходах. Полученные предварительные данные о роли Mn весьма интересны еще в одном отношении: они

указывают, что при последовательных переходах между S-состояниями электроны удаляются не только из марганцевого центра, но и с его лигандных групп (см., например, обсуждение в недавней работе Kambara, Govindjee, 1985). В большинстве моделей в качестве лигандов внутренней сферы рассматриваются сами молекулы воды; таким образом, предполагается, что в последовательности реакций образуются промежуточные состояния окисления воды. Этот подход согласуется с данными о последовательном высвобождении протонов.

Необходимость присутствия ионов хлора для осуществления реакций окисления воды твердо установлена и исследована многими авторами (Hind et al., 1969; Kelly, Izawa, 1978; Critchley et al., 1982; Critchley, 1983; Baijani et al., 1984). По сравнению с марганцем ионы Cl^- лишь слабо связаны с комплексом фотосистемы II, и их роль еще менее ясна. Необходимое количество хлоридов составляет от 10 до 20 молекул на один реакционный центр фотосистемы II; вместо Cl^- можно добавлять некоторые другие ионы, например Br^- , но эффективность работы системы при этом неизменно падает (Kelly, Izawa, 1978). Правдоподобным можно считать предположение о том, что Cl^- нужен для стабилизации марганцевого центра в комплексе, окисляющем воду (Govindjee et al., 1983; Izawa et al., 1983). Предполагают далее, что Cl^- служит мостиком между соседними марганцевыми центрами и тем самым облегчает перенос электронов, и именно в этом состоит механизм стабилизации (Critchley, 1984). Эта интересная гипотеза встречает некоторые возражения, но очевидно, что какие-то анионы необходимы, чтобы скомпенсировать возрастающий положительный заряд, накапливающийся при окислении марганца, тем более, что высвобождение протонов происходит не одновременно с окислением Mn.

Недавно список неорганических ионов, необходимых для эффективного окисления воды, пополнился катионом Ca^{2+} (Inoue, Ono, 1983). Предполагают, что функционально активный Ca^{2+} прочно связан с тремя периферийными белками фотосистемы II (Ghanotakis et al., 1984). В настоящее время почти ничего нельзя сказать о специфической роли ионов Ca^{2+} в механизме окисления воды.

VI

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ МЕЖДУ ДВУМЯ ФОТОСИСТЕМАМИ

Взаимодействие центров фотосистемы I с центрами фотосистемы II происходит на двух уровнях: при распределении

между ними поглощенной энергии света и при переносе электронов. Вопрос о распределении энергии квантов, поглощенных различными пигмент-белковыми комплексами, а также механизм такого распределения обсуждаются в гл. 3. В данном разделе мы рассмотрим процесс термодинамически выгодного транспорта электронов от переносчиков с низким (более отрицательным) окислительно-восстановительным потенциалом к переносчикам с высоким (более положительным) окислительно-восстановительным потенциалом. Этот процесс служит для передачи восстановительных эквивалентов между комплексами двух фотосистем (рис. 1 и 3). Реакции транспорта электронов между двумя фотосистемами иногда рассматривают как темновой перенос электронов при фотосинтезе, имея в виду, что, после того как фотохимические процессы привели к образованию окислителя и восстановителя, для переноса электронов между ними не требуется дополнительного поглощения световой энергии (см., например, Clayton, 1980). К примеру, если в обеих фотосистемах под действием короткой вспышки света одновременно произошло разделение зарядов, то реакции переноса электронов между фотосистемами действительно происходят в темноте. Участвуют в этих реакциях пластохинон, пластоцианин и комплекс цитохромов b_6/f [интегральный мембранный комплекс полипептидов, содержащий цитохромы типа b и типа c (цитохром f)], а также Fe-S-кластер, точнее Fe-S-центр типа Риске.

А

КОМПЛЕКС ЦИТОХРОМОВ b_6/f

Мембраны, на которых происходят процессы фотосинтеза и дыхания, содержат, как в случае прокариотических, так и эукариотических организмов очень сходные структурные единицы, роль которых состоит в окислении низкопотенциального хинола и восстановлении высокопотенциального металлопротеина (Naruska et al., 1983). В тилакоидных мембранах высших растений такой комплекс окисляет пластохинол, восстановленный фотосистемой II, и восстанавливает пластоцианин, который в свою очередь будет окислен фотосистемой I (рис. 3). Чаще всего этот комплекс называют комплексом цитохромов b_6/f , но более правильное его название — пластохинол : пластоцианин — оксидоредуктаза.

1

СОСТАВ И СТРУКТУРА

Полипептидный состав хинол-металлопротеин — оксидоредуктазы фотосинтетической мембраны гораздо проще, чем состав

ПР
ан
ал
но
о
Ат
(т
оп
ли
ме
ку
ме
од
Ра
са
ин
рп
пр
та
22
гр
ци
ка
ди
чд
ди
ме
хл
пр
И:
мс
щ
ск
др
фа
нь
ли
и
из
на
по
ос
ал

аналогичного комплекса в мембранах митохондрий. Митохондриальные комплексы, полученные из различных организмов, обычно содержат десять разных полипептидов (Hauska et al., 1983), тогда как комплексы, выделенные из тилакоидов шпината и *Anabaena*, содержат лишь четыре основных субъединицы (табл. 1 и рис. 3).

Состав комплекса цитохромов b_6/f из шпината, по-видимому, описывается стехиометрическим соотношением 1:1:1:1 для полипептидов массой 34/33, 23, 20 и 17 кДа. Дублет полипептидов массой 34/33 кДа представляет собой, очевидно, результат искусственной гетерогенности в популяции апопротеинов цитохрома f , поскольку считают, что этот цитохром кодируется лишь одним хлоропластным геном (Alt et al., 1983; Willey et al., 1983). Рассматривая механизм взаимодействия компонентов комплекса, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, интересно отметить, что профиль гидрофобности (hydrophathy plot) показывает наличие лишь одного α -спирального участка, пронизывающего мембрану, как в апопротеине цитохрома f , так и в апопротеине Fe-S-центра Риске (полипептид массой 22 кДа). Далее, в случае обоих этих белков простетическая группа, участвующая в окислительно-восстановительных реакциях (т. е. гем цитохрома f и Fe_2-S_2 -центр железосерного белка), прикреплена к тому участку полипептида, который находится в контакте с водной фазой внутреннего объема тилакоидного пузырька (см. рис. 2 в работе Hauska, 1986). Два гема цитохрома b_6 прикреплены к одному и тому же полипептиду массой 23 кДа. Знание нуклеотидной последовательности для хлоропластного гена, кодирующего этот полипептид, позволило предположить, каким образом уложен полипептид в мембране. Из показателей гидрофобности следует, что полипептидная цепь может образовывать пять α -спиральных участков, пронизывающих мембрану, причем два гема расположены так, что их плоскости параллельны плоскости мембраны и находятся друг от друга на расстоянии, примерно равном толщине гидрофобной фазы мембраны (Widger et al., 1984 b). Сравнение аминокислотных последовательностей для вместе взятых хлоропластных полипептидов массой 23 кДа (апопротеин цитохрома b_6) и 17 кДа и для более крупного апопротеина цитохрома b_6 , выделенного из митохондрий дрожжей, человека, мыши и быка, выявило наличие обширных гомологичных участков для хлоропластного полипептида массой 17 кДа, содержащего 139 аминокислотных остатков, и для С-концевого участка апопротеина митохондриального цитохрома b_6 (Widger et al., 1984 b).

Методом электронной микроскопии с использованием замораживания — скалывания до сих пор не удалось идентифицировать комплекс цитохромов b_6/f в мембранах тилакоидов, но при

встраивании выделенного комплекса в липосомы он виден как частица размером 8,5 нм, находящаяся внутри мембраны. Исходя из размера частицы, сделана оценка ее молекулярной массы: получена величина около 280 кДа; это позволяет предположить, что комплекс цитохромов b_6/f образует димер (Mörschel, Staehelin, 1983). Однако по данным о стехиометрии субъединиц комплекса цитохромов b_6/f , приведенным в работе Хауска (Hauska, 1986), молекулярная масса 280 кДа соответствует тримеру комплекса. Тем не менее предположение о димерной структуре подтверждается новыми фактами о том, что количество мест связывания для ДБМИБ, ингибирующего хинолоксидазу, вдвое меньше, чем количество молекул цитохрома f (Graap, Ort, 1986). Полагают также, что димерную структуру имеет аналогичная оксидоредуктаза митохондрий (Slater, 1981; Nalecz, Azzi, 1985).

Во многих случаях вместе с комплексом цитохромов b_6/f выделяется пластохинон (Hauska, 1986). В очищенных препаратах присутствует около 0,6 молекулы пластохинона А в расчете на один комплекс (D. P. O'Keefe, личное сообщение). Этот результат также можно истолковать как следствие димерной структуры комплекса, но, разумеется, присутствие пластохинона в очищенном препарате само по себе еще не означает, что он специфически связан с комплексом или играет важную функциональную роль.

2

МЕХАНИЗМ ОКИСЛЕНИЯ ПЛАСТОХИНОЛА

Комплекс цитохромов b_6/f должен осуществить процесс, противоположный тому, что происходит при работе двухэлектронного шлюза в фотосистеме II, а именно согласовать окисление двухэлектронного переносчика (пластохинола) с восстановлением одноэлектронного переносчика (пластоцианина). Этот процесс осуществляется группой одноэлектронных переносчиков, входящих в состав комплекса. Вопрос о том, каков путь переноса электронов через комплекс, до сих пор остается спорным, но в последнее время модели, в которых предполагается линейная последовательность переносчиков, постепенно уступают место разнообразным вариантам модели Q-цикла, впервые сформулированной Митчеллом (Mitchell, 1975).

Для того чтобы изложить основные черты модели Q-цикла и ее потенциальные преимущества для описания экспериментальных данных, полезно рассмотреть простейший вариант модели, не обращая пока внимания на аномалии в поведении системы и на те усложнения модели, которые нужны для объяснения этих аномалий. Результаты циклических процессов в комп-

лексе цитохромов b_6/f таковы: происходит направленный перенос протонов через мембрану тилакоида, окисляется хинол и восстанавливается пластоцианин.

Полагают, что на комплексе цитохромов b_6/f место связывания пластохинола, так называемое место Q_z , находится вблизи

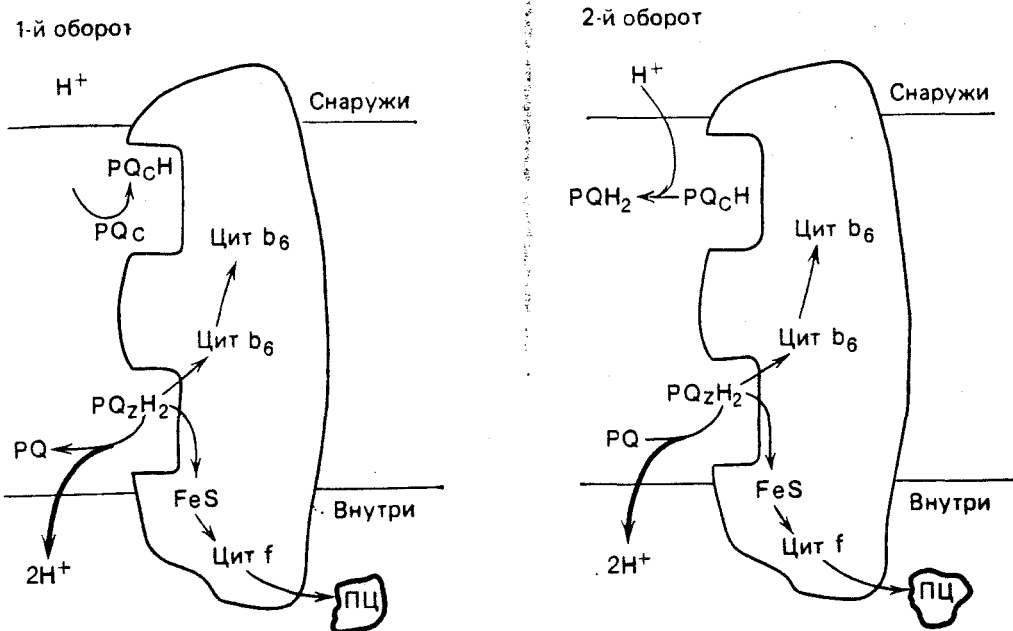


РИС. 5

Модель Q-цикла, описывающая окисление пластохинола комплексом цитохромов b_6/f .

Предполагается, что на комплексе цитохромов b_6/f место связывания этим комплексом пластохинола (Q_z) находится вблизи внутренней поверхности тилакоидной мембраны, а место связывания пластохинона (Q_c) — возле наружной поверхности тилакоидной мембраны. При первом обороте цикла в комплексе цитохромов b_6/f окисляется одна молекула хинола в месте связывания Q_z , что сопровождается высвобождением двух протонов ($2H^+$) во внутреннее пространство (просвет) тилакоида, и происходит одноэлектронное восстановление хинона в месте связывания Q_c , которое сопровождается поглощением одного протона из внешнего объема. В итоге образуется семихинон (ПХ_c-H; PQ_cH). При втором обороте цикла в том же комплексе снова происходит полное окисление хинола до хинона в месте связывания Q_z , тогда как в месте связывания Q_c семихинон восстанавливается до хинола (ПХ_c-H → ПХ-N₂, или $PQ_cH \rightarrow PQH_2$). Таким образом, в Q-цикле окисляются две молекулы пластохинола, восстанавливается одна молекула пластохинона. В результате осуществляется перенос (транслокация) четырех протонов в расчете на каждую пару электронов, достигающих $P700^+$. Другая характерная особенность модели Q-цикла состоит в том, что в ней предполагается электрически нескомпенсированное движение электронов поперек диэлектрического слоя мембраны в процессе переноса электронов от Q_z на Q_c через цитохром b_6 .

зи внутренней поверхности тилакоидной мембраны, а место связывания пластохинола, так называемое место Q_c , расположено возле наружной поверхности мембраны тилакоида (рис. 5). При оптимальных условиях в темноте место Q_z занято пластохинолом, место Q_c занято пластохиноном, Fe-S-центр Риске и цито-

ДОНАЛД Р. ФРІ, ГОВИНДЖИ

хром f восстановлены, цитохромы b окислены. Перенос окислительного эквивалента от фотосистемы I через пластоцианин приводит к удалению одного электрона с высокопотенциальных переносчиков, входящих в состав комплекса b_6/f . По-видимому, окислительный эквивалент оказывается распределен между цитохромом f и Fe-S-центром Риске (Whitmarsh et al., 1982), но для простоты можно считать, что Fe-S-центр полностью окислен, а цитохром f полностью восстановлен. Окисление Fe-S-центра Риске приводит к тому, что пластохинол PQ_zH_2 (PX_z-H_2) отдает электрон на этот центр, и в результате образуется семихинон (PQ_zH), который, как полагают, является гораздо более сильным восстановителем, нежели пластохинол PQ_zH_2 (PX_z-H_2), в частности семихинон способен восстановить расположенный рядом с ним низкопотенциальный цитохром b_6 . Когда низкопотенциальным цитохромом b_6 восстанавливается высокопотенциальный цитохром b_6 , происходит электрически нескомпенсированный перенос электрона поперек мембраны и создается мембранный потенциал. Последним событием в этой цепочке реакций является восстановление цитохромом b_6 пластохинона в месте связывания Q_c , сопровождающееся протонированием восстановленного хинона путем присоединения иона водорода из внешней фазы. Таким образом, в результате первого оборота оксидоредуктазы полностью окисляется одна молекула пластохинола, причем два иона водорода высвобождаются внутрь тилакоидного пузырька, и восстанавливается до уровня семихинона одна молекула пластохинона, причем один ион H^+ поглощается из внешней фазы. Второй оборот цикла в том же комплексе приводит к такой же последовательности событий; отличие только в том, что в результате восстановления семихинона в месте связывания Q_c образуется хинол, который диссоциирует, и это место занимает молекула пластохинона из внутримембранного пула. Реакции, происходящие во время двух последовательных оборотов цикла, схематически показаны на рис. 5.

Модель Q-цикла отличается от моделей линейного переноса электронов, предлагавшихся ранее для описания окисления хинола, двумя положениями, которые можно проверить экспериментально. Во-первых, линейные модели не предсказывают генерирование электрического поля, тогда как модель Q-цикла предсказывает это явление. Во-вторых, согласно модели Q-цикла, в результате двух оборотов цикла окисляется одна молекула пластохинола (т. е. две молекулы пластохинола окисляются до пластохинона, и одна молекула пластохинона восстанавливается до пластохинола), что сопровождается переносом четырех протонов через мембрану тилакоида, тогда как линейная схема описывает перенос лишь двух протонов. При определенных условиях опыта удалось отчетливо показать, что через мембрану

переносится больше протонов, чем можно было ожидать, исходя из линейной схемы (Velthuis, 1978; Graan, Ort, 1983; Rathenow, Rumberg, 1980; Hangarter et al., 1986). Когда на опыте было обнаружено, что при переносе электронов между фотосистемами происходит электрогенная реакция (приводящая к появлению электрического поля), это фактически послужило первым толчком для разработки модели Q-цикла для хлоропластов (Joliot, Delsome, 1974). Наличие электрогенной реакции очевидно не только из того факта, что существует медленная фаза электрохромного сдвига полосы поглощения (Joliot, Delsome, 1974), но и из эффекта замедления реакций в комплексе цитохромов b_6/f под действием мембранного потенциала (Graan, Ort, 1983).

В то же время известно большое число данных, не укладывающихся в рамки описанной выше простой модели; примеры таких трудно объяснимых фактов обсуждаются в работах (Bendall, 1982; Selak, Whitmarsh, 1982; Girvin, Cramer, 1984; Rich, 1984; Joliot, Joliot, 1985).

О том, что в тилакоидной мембране действует та или иная форма Q-цикла (иногда говорят о так называемом b -цикле; например, Joliot, Joliot, 1985), убедительно свидетельствуют многочисленные факты. Однако до сих пор не решен вопрос о том, работает ли Q-цикл при переносе электронов в стационарных условиях. К примеру, при стационарном транспорте электронов под действием мощного света через мембрану переносится не больше протонов, чем предсказывает линейная модель, и нет никаких доказательств того, что в этих условиях перенос электронов между фотосистемами является электрогенным. Некоторые исследователи склонны считать, что перенос дополнительного числа протонов, связанный с электрогенными реакциями в Q-цикле, является энергетически выгодным только в тех условиях, когда трансмембранный электрохимический потенциал мал (Bouges-Vocquet, 1981; Graan, Ort, 1983). Тот факт, что в условиях стационарного электронного транспорта отсутствует как трансмембранный перенос «избыточных» протонов, так и электрогенная стадия транспорта электронов между двумя фотосистемами, можно объяснить исходя из механизма Q-цикла, если дополнительно предположить, что при больших значениях трансмембранного потенциала протон переносится через мембрану тилакоида наружу, т. е. в ту же сторону, что и электрон, предназначенный для восстановления высокопотенциального цитохрома b_6 . Такая реакция уже не будет электрогенной, и поскольку в ходе ее не должны быть перенесены через мембрану «избыточные» протоны, она потребует меньше энергии. Однако имеющиеся на сегодняшний день данные можно с равным успехом объяснить и иными способами.

УЧАСТИЕ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМОВ b_6/f В ЦИКЛИЧЕСКОМ ТРАНСПОРТЕ ЭЛЕКТРОНОВ ВОКРУГ ФОТОСИСТЕМЫ I

В настоящее время точно известно, что ферредоксин, восстановленный фотосистемой I, может либо восстановить $NADP^+$ в реакции, катализируемой ферредоксин-NADP — оксидоредуктазой, либо участвовать в циклическом транспорте электронов через комплекс цитохромов b_6/f .

Тот факт, что в интактных хлоропластах при циклическом транспорте электронов наблюдается медленная фаза электрохромного сдвига полосы поглощения (Growther, Hind, 1980), может означать, что путь переноса электронов через комплекс цитохромов b_6/f остается одним и тем же независимо от того, приходят эти электроны от фотосистемы II или от фотосистемы I через ферредоксин. До сих пор не известно, в каком именно месте восстановительные эквиваленты, поступающие от фотосистемы I в виде растворимого ферредоксина, достигают комплекса цитохромов b_6/f и каков механизм окисления ферредоксина этим комплексом. Поскольку восстановлению цитохрома b_6 ферредоксином препятствует ДБМИБ, который является ингибитором окисления пластохинола PQ_zH_2 , возможно, что взаимодействие ферредоксина с комплексом цитохромов b_6/f происходит с участием пластохинола (Chain, 1982). Можно было бы полагать, что для функционирования ферредоксин:пластохинон — оксидоредуктазы важно только место связывания Q_c , но тогда не удастся объяснить действие ДБМИБ, который ингибирует место связывания Q_z . Прямое взаимодействие ферредоксина с местом связывания Q_z , по-видимому, исключено, так как Q_z расположено внутри мембраны и потому недоступно для ферредоксина, находящегося снаружи мембраны.

Б

ПОДВИЖНЫЕ ПЕРЕНОСЧИКИ ЭЛЕКТРОНОВ

До сих пор остается неясным, какие преимущества дает растению упаковка мембран в стопки (граны) и связанное с этим неравномерное распределение в тилакоидной мембране белковых комплексов, участвующих в транспорте электронов. Однако есть весьма серьезные основания думать, что в хлоропластах, по-видимому, должен существовать механизм, обеспечивающий перенос восстановительных эквивалентов между комплексами, расположенными далеко друг от друга. На фото-

Г
Н
Ш
Т
П
П
Ф
К
Э
Р
М
Н
Р
П
Р
К
Н
В
Т
П

на
пе
ве
м
10
ф
(S
к
в
Н
н
д
19
на
то
ед
об
п
19

он
об
ск
м
но

65

графиях, полученных с помощью электронного микроскопа, видно, что диаметр гранальных стопок мембран в хлоропластах шпината составляет от 400 до 500 нм. Предполагая для простоты расчетов, что комплексы цитохромов b_6/f распределены в плоскости мембраны равномерно, а комплексы фотосистем распределены абсолютно гетерогенно, причем реакционные центры фотосистемы II находятся лишь в областях межмембранных контактов, а реакционные центры фотосистемы I — только вне этих областей, можно оценить, что среднее расстояние, на которое должна происходить латеральная диффузия, составляет не менее 100 нм (Selak, Whitmarsh, 1984). Разумеется, гетерогенность распределения комплексов фотосистем в плоскости мембраны на самом деле не абсолютна, и учет этого обстоятельства приведет к меньшему значению длины диффузии. С другой стороны, процессу диффузии препятствуют мембранные белки и их комплексы; диффузия затруднена и в соединениях между гранальными дисками. В результате эффективная длина диффузии возрастает. Для количественной оценки этих эффектов еще нет точных данных, но ясно, что их вклады направлены в противоположные стороны и стремятся скомпенсировать друг друга.

При наибольшей скорости транспорта электронов в стационарных условиях при комнатной температуре весь цикл реакций переноса электронов между двумя фотосистемами должен совершаться примерно за 2 мс. Для того чтобы за это время молекулы вещества успели продиффундировать на расстояние 100 нм, нужно, чтобы коэффициент двумерной диффузии (диффузии в плоскости мембраны) составлял около 10^{-8} см²·с⁻¹ (Selak, Whitmarsh, 1984). В мембранах тилакоидов шпината количественное содержание трех белковых комплексов, участвующих в переносе электронов, почти одинаково (разд. II.Б.1.б). Но даже для наименьшего из этих трех интегральных мембранных белков, т. е. для комплекса цитохромов b_6/f , коэффициент диффузии оказывается на два порядка меньше (Hackenbrock, 1981), чем это нужно для того, чтобы обеспечить наибольшую наблюдаемую скорость переноса электронов между двумя фотосистемами. Поэтому пластохинон и пластоцианин остаются единственными кандидатами на роль подвижных переносчиков, обеспечивающих транспорт восстановительных эквивалентов в плоскости мембраны между двумя фотосистемами (Haehnel, 1984).

Транспорт восстановительных эквивалентов между реакционными центрами фотосистемы II и комплексом цитохромов b_6/f обусловлен почти исключительно диффузией пластохинола, поскольку перенос атома водорода с хинола на хинон во внутримембранном пуле хинонов, по-видимому, происходит значительно медленнее (Crofts, Wraight, 1983). Латеральная подвижность

и, восста-
NADP+
дородук-
электронов

лическом
электро-
1, 1980),
комплекс
от того,
отосисте-
ом имен-
е от фо-
остигают
я ферре-
цитохро-
является
то, что
мов b_6/f
но было
: пласто-
ния Q_c ,
рый ин-
е ферре-
ено, так
пно для

за дает
язанное
ембране
стронов.
хлоро-
обеспе-
жду
а фото-

пластохинона/хинола в тилакоидной мембране еще не измерена, но обычно полагают, что коэффициент диффузии для этих молекул примерно такой же, как для диацилглицеролипидов, т. е. около 10^{-8} см²·с⁻¹. Эта оценка почти наверняка завышена, поскольку молекулы нативных хинонов содержат длинную жесткую изопреноидную цепь, и из-за этого их движение в мембране будет более медленным, чем для диацилглицеролипидов (Wraight, 1979). Для убихинона-10 при комнатной температуре в гигантских митохондриях печени мыши получена оценка коэффициента диффузии $(2 \div 5) \cdot 10^{-9}$ см²·с⁻¹; основой для нее послужили измерения возгорания флуоресценции после фотовыцветания с использованием флуоресцирующего аналога убихинона (Gupte et al., 1984). Похоже, что коэффициент диффузии пластохинона в тилакоидной мембране существенно меньше, чем для диацилглицеролипидов, и, по-видимому, близок к коэффициенту диффузии убихинона в митохондриальной мембране. Несколько недостаточная латеральная подвижность пластохинона частично компенсируется тем обстоятельством, что на каждый центр фотосистемы II, или на каждый комплекс цитохромов b_6/f в тилакоидной мембране приходится около шести легко фотовосстанавливаемых молекул пластохинона (т. е. $\text{P} : 1 : 6$, Gaaп, Ort, 1984). Наибольшая величина потока восстановительных эквивалентов от реакционного центра фотосистемы II к комплексу цитохромов b_6/f при стационарном транспорте электронов будет зависеть от количества молекул пластохинола, диффундирующих от фотосистемы II к комплексу цитохромов b_6/f , и количества молекул пластохинона, идущих в обратном направлении. Но даже с учетом этих обстоятельств подвижность только пары пластохинон/хинол может оказаться недостаточной для того, чтобы объяснить ею наблюдаемую в опыте величину скорости переноса электронов между двумя фотосистемами в стационарных условиях.

Небольшой по своему размеру гидрофобный металлопротеин пластоцианин ($M_r = 10,5$ кДа в случае высших растений) обеспечивает сопряжение окислительно-восстановительных реакций в комплексе цитохромов b_6/f с фотохимическими процессами в реакционном центре фотосистемы I. В тилакоидных пузырьках шпината присутствуют две молекулы пластоцианина в расчете на каждый комплекс цитохромов b_6/f , или на каждый реакционный центр фотосистемы I (т. е. их отношение равно $2 : 1 : 1$; Gaaп, Ort, 1984). В течение некоторого времени мнения исследователей о локализации пластоцианина были противоречивы, но сейчас уже ясно, что этот белок находится в очень узком внутреннем пространстве (просвете) тилакоидного пузырька. Это пространство может быть столь узким, что расстояние между противоположными мембранами почти равно наибольшему

размеру молекулы пластоцианина, т. е. около 4 нм. Отношение площади мембраны тилакоида к внутреннему объему пузырька очень велико (Flores et al., 1983), а межмолекулярные взаимодействия на поверхности мембраны существенно уменьшают подвижность молекул воды; ввиду этих обстоятельств легко понять, почему вязкость внутренней водной фазы в этом случае гораздо выше вязкости воды в больших объемах (bulk water) (Berg et al., 1979). Поэтому значение коэффициента диффузии пластоцианина *in situ* может оказаться гораздо меньше, чем величина 10^{-6} см²·с⁻¹, полученная из расчетов по соотношению Стокса — Эйнштейна для этого белка в большом объеме воды при комнатной температуре. Одна из крайних точек зрения состоит в том, что под действием света внутреннее пространство тилакоидного пузырька сужается еще сильнее, и в результате пластоцианин вообще иммобилизуется (Haehnel, 1984 b). Однако различные экспериментальные факты подтверждают подвижность пластоцианина в процессе переноса электронов, и в настоящее время нет достаточных оснований считать, что коэффициент диффузии пластоцианина при комнатной температуре не достигает величины 10^{-8} см²·с⁻¹ (Selak, Whitmarsh, 1984).

Рассуждения по поводу подвижности пластохинона и пластоцианина в плоскости мембраны могут привести к неверному впечатлению, будто скорость переноса электронов при фотосинтезе в условиях насыщающего света почти ограничивается скоростью процесса диффузии. На самом деле при транспорте электронов в условиях максимального сопряжения пул пластохинона почти полностью восстановлен, а пул пластоцианина почти целиком окислен, и этот факт показывает, что подвижность пластохинона и пластоцианина в плоскости мембраны лишь в редких случаях может заметно ограничивать скорость стационарного переноса электронов, а возможно, и вообще не является лимитирующим фактором. В ранних работах данные о состоянии пула пластохинона приводили как свидетельство того, что скорость всего транспорта электронов ограничивается главным образом скоростью окисления пластохинола. Если бы скорость всего процесса ограничивалась скоростью диффузии одного из переносчиков электронов, то пул этого переносчика в стационарных условиях должен был бы быть наполовину окислен и наполовину восстановлен, поскольку при стационарном переносе диффузия происходит в обоих направлениях. Поэтому неизбежен вывод о том, что скорость переноса электронов в стационарных условиях при комнатной температуре никогда не ограничивается скоростью процесса диффузии; и исходя из наилучших оценок для подвижности пластохинона и пластоцианина, нет оснований ожидать, что диффузия может играть здесь роль лимитирующего фактора.

VII

ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

A

МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СООТНОШЕНИЯ

Первоначально представления о механизме сопряжения переноса электронов при фотосинтезе с образованием АТФ складывались на основе принятой тогда аналогии с субстратным фосфорилированием. Позднее получила экспериментальное подтверждение совсем иная гипотеза, названная хемиосмотической; в настоящее время именно она является основной рабочей гипотезой для объяснения экспериментальных данных по образованию АТФ при фотосинтезе и окислительных реакциях (см. обзор Jagendorf, 1975; гл. 12 в этой книге).

В хемиосмотической модели сопряжения очень важная роль отводится энергопреобразующей мембране. Мембрана, во-первых, ориентирует комплексы, участвующие в переносе электронов, и ферментный комплекс, синтезирующий АТФ, а во-вторых, служит барьером проницаемости между внутренним объемом замкнутого мембранного пузырька и внешней средой. Считается, что белковые комплексы, участвующие в сопряженных реакциях переноса электронов и протонов, ориентированы в мембране таким образом, что переносчики водорода (например, хинолы) чередуются с переносчиками электронов (например, с цитохромами). Благодаря такому чередованию часть свободной окислительно-восстановительной энергии может запасаться, когда окисление переносчика водорода переносчиком электрона приводит к направленному (векторному) переносу протона во внутренний объем тилакоидного пузырька. В результате во внутренней водной среде возрастает активность (концентрация) ионов водорода. Подобным образом восстановление переносчика водорода переносчиком электрона на наружной стороне мембраны приводит к подщелачиванию внешней водной среды. Если реакции переноса заряда компенсируются движением других ионов через тилакоидную мембрану, то в результате сопряженных процессов переноса электронов и протонов возникает различие в значениях рН во внутренней и внешней водных фазах. Ферментный комплекс, называемый сопрягающим фактором, катализирует реакции, благодаря которым термодинамически выгодное движение протонов поперек мембраны (через сопрягающий фактор) связывается с процессом фосфорилирования ADP. Вблизи состояния равновесия эти реакции обратимы, поэтому фермент может осуществлять либо синтез, либо гидролиз.

АТР, уменьшая или увеличивая при этом трансмембранную разность значений рН.

Для более полного описания энергетического сопряжения необходимо рассмотреть роль мембранного потенциала в процессе синтеза АТР. Если движение протонов через мембрану не полностью скомпенсировано по величине заряда движением других ионов, то возникает разность электрических потенциалов между двумя поверхностями диэлектрического слоя мембраны. В случаях, когда движение протонов, обусловленное переносом электронов или гидролизом АТР, направлено внутрь мембранного пузырька, необходимо учитывать вклад положительного потенциала в суммарное значение трансмембранной разности свободных энергий ионов водорода в растворе. Следовательно, суммарное значение трансмембранной разности свободных энергий складывается из концентрационного члена и слагаемого, учитывающего электрический потенциал.

Свободная энергия, обусловленная трансмембранной разностью электрохимических потенциалов, выражается количественно как изменение свободной энергии Гиббса. Концентрационный член, соответствующий переносу одного моля эквивалента H^+ из области с концентрацией $[H^+]^1$ в область с концентрацией $[H^+]^0$ в отсутствие разности электрических потенциалов, можно записать в виде

$$\Delta G = 2,3RT \cdot \lg \frac{[H^+]^0}{[H^+]^1} \quad (15)$$

Изменение энергии Гиббса составляет 5,7 кДж/моль, если концентрации протонов по разные стороны мембраны различаются в 10 раз, т. е. если разность значений рН равна 1 ед.

Изменение свободной энергии, соответствующее трансмембранной разности электрических потенциалов, можно выразить следующим образом. Изменение энергии Гиббса при переносе одного моля H^+ по градиенту электрического потенциала $\Delta\psi$ в отсутствие разности концентраций составляет

$$\Delta G = -F \cdot \Delta\psi \quad (16)$$

где F — постоянная Фарадея.

При накоплении протонов внутри тилакоидных пузырьков запасание свободной энергии обусловлено как неравновесной концентрацией, так и электрическим потенциалом. В результате изменение энергии Гиббса, соответствующее переносу одного моля H^+ из области с концентрацией $[H^+]^1$ в область с концентрацией $[H^+]^0$ при разности электрических потенциалов $\Delta\psi$ можно записать в виде

$$\Delta G = -F \cdot \Delta\psi + 2,3RT \cdot \lg \frac{[H^+]^0}{[H^+]^1} \quad (17)$$

В работах по биоэнергетике принято выражать величину свободной энергии, обусловленной неравновесным распределением ионов, в единицах электрического потенциала; для этого достаточно разделить все члены уравнения 17 на постоянную Фарадея:

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = \Delta\Psi - \frac{2,3 \cdot RT}{F} \cdot \lg \frac{[H^+]^o}{[H^+]^i} \quad (18)$$

Подставив значения постоянных, получаем для случая температуры 30 °С знакомое уравнение

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = \Delta\Psi - 60\Delta pH \quad (19)$$

Когда состояние системы энергетического сопряжения таково, что скорости процессов синтеза и гидролиза АТР равны друг другу, можно считать, что свободная энергия окислительно-восстановительных реакций, сопряженных с переносом протонов, свободная энергия гидролиза АТР и протонодвижущая сила равны между собой. Если транспорт n протонов в противоположном направлении через мембрану сопряжен с синтезом одной молекулы АТР, то получаем

$$\Delta G_{\text{АТР}} = n \cdot F \cdot \Delta\tilde{\mu}_{H^+} \quad (20)$$

где

$$\Delta G_{\text{АТР}} = \Delta G^o_{\text{АТР}} + 2,3RT \cdot \lg \frac{[\text{ADP}] \cdot [P_i]}{[\text{АТР}]} \quad (21)$$

(энергия выражена в кДж).

Правильность основного принципа хемиосмотического сопряжения, т. е. существенная роль трансмембранного потенциала и разности рН, подтверждена экспериментально (Jagendorf, 1975). К тому же вряд ли можно сомневаться в том, что расположение участников окислительно-восстановительных реакций в фотосинтетических мембранах и механизм их взаимодействия обеспечивают прямое преобразование энергии окислительно-восстановительных реакций в трансмембранную разность электрохимических потенциалов ионов водорода. Твердо установлена как кинетическая, так и энергетическая эквивалентность электрического и химического компонентов трансмембранной протонодвижущей силы для фосфорилирования АDP. В фотосинтетических и митохондриальных мембранах присутствует ферментный комплекс, способный преобразовывать энергию из электрохимического потенциала ионов водорода в потенциал переноса фосфатной группы в молекуле АТР. В последние годы внимание исследователей было обращено на получение более полной и подробной информации о молекулярном механизме процессов хемиосмотического сопряжения в тилакоидных мембранах. В частности, необходимо понять, какова связь отдельных событий

в едином сложном процессе энергетического сопряжения со структурой тилакоидной мембраны. Следует признать, что механизм собственно сопряжения синтеза АТФ с транспортом ионов все еще не раскрыт.

Б «ФОСФОРИЛИРУЮЩАЯ ЕДИНИЦА»

С точки зрения взаимосвязи структуры и функции процесс энергетического сопряжения отличается от рассмотренных выше процессов фотосинтеза. Нельзя указать ни один комплекс полипептидов, который был бы всецело ответствен за преобразование энергии окислительно-восстановительных реакций в потенциал переноса фосфатной группы в молекуле АТФ. Можно лишь рассмотреть, какие структурные компоненты тилакоидной мембраны необходимы для преобразования энергии, т. е. охарактеризовать «фосфорилирующую единицу». Количественная характеристика такой единицы (число содержащихся в ней компонентов, занимаемая ею площадь поверхности мембраны) оказывается неоднозначной, но тем не менее «фосфорилирующую единицу» можно точно определить как минимальный набор компонентов, совместно осуществляющих сопряжение индуцированного светом переноса электронов с образованием АТФ.

Сейчас уже нет сомнений в том, что обязательным условием для сопряжения транспорта электронов с синтезом АТФ является создание трансмембранной разности электрохимического потенциала ионов водорода. Направленный перенос протонов через тилакоидную мембрану происходит при окислении воды в комплексе фотосистемы II и при работе пластохинол-оксидазы в комплексе цитохромов b_6/f . Поэтому «фосфорилирующая единица» тилакоидной мембраны должна включать в себя ряд компонентов: по крайней мере один из названных комплексов, участвующих в транспорте электронов и создающих 1) асимметричное распределение протонов относительно мембраны, 2) замкнутую тилакоидную мембрану, препятствующую утечке протонов, и 3) АТФ-синтазу, способную использовать энергию, запасенную в форме электрохимического потенциала, для фосфорилирования АДФ.

1 РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СТЕХИОМЕТРИЯ КОМПОНЕНТОВ ФОСФОРИЛИРУЮЩЕЙ ЕДИНИЦЫ

Две особенности структуры и состава тилакоидной мембраны исключают возможность непосредственного физического контакта между АТФ-синтазой (т. е. комплексом сопрягающего фак-

тора) и каждым из комплексов, обеспечивающих перенос протонов и электронов. Первая причина состоит в неоднородном распределении комплексов сопрягающего фактора в тилакоидных мембранах: эти комплексы обнаруживаются только вне областей межмембранных контактов (Arntzen et al., 1969; Miller, Staehelin, 1976). Эта особенность структуры препятствует тесному сближению комплексов сопрягающего фактора с комплексами фотосистемы II, а также примерно с половиной комплексов цитохромов b_6/f , поскольку те находятся в областях межмембранных контактов. Вторая причина в том, что в мембране примерно в 4 раза меньше комплексов сопрягающего фактора по сравнению с общим количеством комплексов, переносящих протоны и электроны. Опубликованные сведения о количестве комплексов сопрягающего фактора в тилакоидных мембранах шпината (Strotmann et al., 1973; Frash et al., 1980) требуют уточнения, поскольку в ранних работах недооценивали молекулярную массу периферийной белковой части (т. е. CF_1) комплекса сопрягающего фактора (Süss, Schmidt, 1982; Moroney et al., 1983). С учетом этой поправки получается, что в мембранах тилакоидов шпината содержится примерно один комплекс сопрягающего фактора на 1100 молекул хлорофилла, т. е. соотношение количества сопрягающего фактора CF_1 , реакционных центров фотосистемы II и комплексов цитохромов b_6/f составляет приблизительно 1:2:2.

Поэтому кажется вполне очевидным, что комплексы сопрягающего фактора находятся в отдалении от большей части электрон-транспортных комплексов, снабжающих их энергией для синтеза АТФ. Подобно тому, как необходимы подвижные переносчики восстановительных эквивалентов между удаленными друг от друга комплексами, участвующими в транспорте электронов, оказываются необходимыми и способные к диффузии промежуточные продукты реакций для сопряжения процессов переноса электронов и синтеза АТФ, происходящих в различных участках мембраны.

2

ЛОКАЛИЗОВАННОЕ ИЛИ ДЕЛОКАЛИЗОВАННОЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЕ СОПРЯЖЕНИЕ?

Белковые компоненты, участвующие в преобразовании энергии, находятся в различных участках тилакоидной мембраны, и потому фосфорилирующая единица в таком случае должна содержать большое число электрон-транспортных комплексов, совместная работа которых обеспечивает запас энергии для синтеза АТФ. Действительно, недавно проведенные эксперименты показывают, что в процессе накопления протонов и создании

трансмембранного химического потенциала, достаточно большого для того, чтобы обеспечить синтез АТР, кооперативно участвуют не менее 1000 компонентов, переносящих протоны и электроны (Hangarter, Ort, 1985).

Кооперативную работу столь большого числа электрон-транспортных комплексов, приводящую к созданию такого энергетического состояния, в котором начинается образование АТР, легко описать, исходя из первоначальных представлений о полностью делокализованном процессе сопряжения. Картина такова: все находящиеся в мембране комплексы, переносящие протоны и электроны, действуют совместно, закисляя внутреннюю водную фазу тилакоидного пузырька, причем все встроенные в мембрану комплексы сопрягающего фактора в одинаковой степени оказываются доступными для накапливаемых ионов водорода. Кроме того, в модели делокализованного сопряжения предполагается, что ионы водорода, переносимые сквозь мембрану в ходе окислительно-восстановительных реакций, приходят в быстрое электростатическое и химическое равновесие со всем объемом водных фаз по обеим сторонам мембраны. Почти не возникает сомнений в том, что поток ионов водорода, связывающий окислительно-восстановительные реакции в электрон-транспортной цепи с синтезом АТР в сопрягающем факторе, *может* находиться в равновесии с окружающими мембрану водными фазами. К примеру, в классических экспериментах, впервые проведенных в лаборатории Ягендорфа в середине 60-х годов (см. обзор Jagendorf, 1975; гл. 12), продемонстрировано, что индуцированный светом перенос электронов может действительно приводить к закислению внутренней водной фазы тилакоидного пузырька и что после этого тилакоиды с подкисленной внутренней фазой могут синтезировать АТР в отсутствие переноса электронов.

Пользуясь моделью делокализованного энергетического сопряжения, удалось объяснить многие особенности преобразования энергии в тилакоидных мембранах, но она все же не позволяет полностью описать обычный ход этого процесса. Можно считать очевидным, что протоны, прошедшие через мембрану и оказывающиеся в примембранном пограничном слое, в конечном счете придут в равновесие с объемом водной фазы (это происходит, например, в упомянутых выше опытах, где реакции переноса протонов и электронов через мембрану были умышленно отделены во времени от реакции синтеза АТР). Однако приведенные факты вовсе не означают, что закисление всего внутреннего объема является необходимым этапом фосфорилирования. Иными словами, из этих фактов не следует, что связь между тем участком мембраны, где высвобождаются протоны, и тем ее участком, где они используются для фосфорилирова-

ния, обеспечивается всем внутренним объемом тилакоидного пузырька. Экспериментальные данные, полученные в нескольких лабораториях, показывают, что электрохимический потенциал протонов, участвующих в сопряжении, не обязательно находится в равновесии с потенциалом протонов объемных водных фаз, отделенных мембраной (гл. 12; Ferguson, 1985). Возможно, наиболее очевидно продемонстрировать это на опыте удалось в исследованиях по влиянию стабилизации рН во внутренней водной фазе тилакоида на то, какое количество электронов и протонов должно быть перенесено через мембрану, прежде чем будет достигнуто такое энергетическое состояние, при котором синтез АТФ начинает преобладать над гидролизом (Ort et al., 1976; Hogner, Modriankias, 1983; Hangarter, Ort, 1985). Если полагать, что ионы водорода, перенесенные сквозь мембрану в результате окислительно-восстановительных реакций, должны далее пройти через объемную водную фазу внутри тилакоидного пузырька, то следует ожидать, что добавление буфера со щелочным pK_a в эту фазу приведет к задержке в создании трансмембранной разности концентраций ионов водорода (ΔpH). В отсутствие трансмембранной разности электрических потенциалов задержка в создании ΔpH приведет в свою очередь к тому, что синтез АТФ начнется позднее, причем можно количественно предсказать, какое число циклов окислительно-восстановительных реакций дополнительно понадобится для того, чтобы начался синтез АТФ. В условиях, когда не может образоваться трансмембранная разность электрических потенциалов, синтез АТФ начнется только после того, как будут оттитрованы эндогенные щелочные группы на внутренней поверхности тилакоидной мембраны. Пороговая величина этого эндогенного буферного пула составляет в тилакоидах шпината около 60 ммоль H^+ на 1 моль хлорофилла, и для титрования такого пула требуется около 15 циклов реакций транспорта электронов и протонов (Hangarter, Ort, 1985). Это означает, что при отсутствии мембранного потенциала систему нужно возбудить по крайней мере пятнадцатью короткими вспышками света насыщающей интенсивности (под действием каждой вспышки света должен сработать каждый электрон-транспортный комплекс, причем только один раз); только после этого начнется синтез АТФ. Однако оказалось, что при введении во внутреннюю водную фазу дополнительных буферных групп в пятикратно большем количестве не наблюдается никакого увеличения числа насыщающих вспышек света, необходимых для того, чтобы начался синтез АТФ. Этот результат показывает, что путь, по которому протоны идут от того участка, где они были перенесены через мембрану, к тому участку, где их использует сопрягающий фактор, проходит не по всей внутренней водной фазе.

В итоге получается, что хлоропласты ведут себя как будто противоречивым образом. С одной стороны, огромное число (больше тысячи) окислительно-восстановительных реакций, сопровождающихся переносом протонов, кооперативно осуществляют титрование эндогенных буферных групп на внутренней поверхности мембраны и тем самым обеспечивают достижение энергетического порога для синтеза АТФ. С другой стороны, созданная при этом разность активностей протонов, по-видимому, не находится в равновесии с водными фазами по обе стороны мембраны. Возможно, что это противоречие связано с особенностями пограничного слоя между мембраной и водной фазой, которые могут привести к созданию локальных неравновесных состояний (Kell, 1979). Вряд ли можно сомневаться в том, что молекулы воды, расположенные вблизи поверхности мембраны, ориентированы менее хаотично, чем в большом объеме воды. Появилось предположение о том, что благодаря такой упорядоченности молекул в ориентированном слое воды на поверхности мембраны при некоторых условиях могут образоваться кинетически предпочтительные пути для потока протонов. Однако у этой гипотезы есть свои недостатки, поскольку она не дает объяснения другим экспериментальным фактам (Ferguson, 1985).

Мы склонны предполагать, что протонодвижущая сила, обеспечивающая сопряжение переноса электронов и синтеза АТФ в тилакоидных пузырьках, характеризуется различной степенью делокализации в зависимости от того, насколько энергизована мембрана (Flores, Ort, 1984). В условиях, когда приток энергии в систему мал, скажем, на слабом свете или при первых циклах реакций транспорта электронов, важно свести к минимуму диссипацию энергии (Hangarter, Ort, 1986), в том числе и те потери, которые происходят, если позволить протонам прийти в равновесие с объемной водной фазой. Избежать таких потерь можно при направленной диффузии, которую может обеспечить появление мощного «стока» для протонов на комплексе сопрягающего фактора, а это в свою очередь приводит к формированию градиента активности протонов между комплексом сопрягающего фактора и ближайшими к нему комплексами, переносящими электроны и протоны через мембрану. Поскольку никакой необходимости в существовании каких-либо особых каналов для потока протонов при этом нет, направленную диффузию можно представить как статистический процесс, при котором для каждого протона есть конечная вероятность прийти в равновесие с объемной водной фазой. Поэтому будет постепенно происходить подкисление внутреннего объема тилакоидного пузырька, а вместе с тем и понижение энергетического барьера между объемной водной фазой и локальными потоками

протонов, участвующих в процессе сопряжения. В условиях большого притока энергии в систему может сложиться ситуация, близкая к предельному случаю, когда внутренняя поверхность мембраны и внутренний объем тилакоидного пузырька являются для протонов эквипотенциальными, но, возможно, этот предельный случай никогда не достигается.

В

КОМПЛЕКС СОПРЯГАЮЩЕГО ФАКТОРА

1

СТРУКТУРА

Перенос фосфорильной группы на молекулу ADP за счет энергии трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов водорода катализируется белковым комплексом, который называют сопрягающим фактором (McCarty, Carmeli, 1982). Комплекс сопрягающего фактора (рис. 3) состоит из периферического мембранного белка CF_1 , связанного ионными взаимодействиями с интегральным мембранным белком CF_0 , причем каждый из белков CF_0 и CF_1 содержит по несколько субъединиц. Белок CF_1 находится на наружной поверхности тилакоидной мембраны вне областей межмембранных контактов; он содержит активные участки для синтеза АТФ. Белок CF_0 пронизывает мембрану, служит для ориентирования белка CF_1 и является каналом, по которому протоны попадают из внутреннего объема тилакоидного пузырька в белок CF_1 , расположенный на наружной поверхности мембраны.

Доступную с поверхности мембраны часть комплекса сопрягающего фактора (т. е. белок CF_1) удалось идентифицировать и локализовать с помощью электронной микроскопии раньше, чем остальные белковые комплексы тилакоидной мембраны. Белок CF_1 виден на микрофотографиях как сферический выступ на обращенной к строме поверхности тилакоидной мембраны вне областей межмембранных контактов; размеры его составляют, по-видимому, от 9 до 10 нм (Staehelin, Dewitt, 1984).

В течение долгого времени считали, что стехиометрия полипептидных субъединиц, образующих комплекс сопрягающего фактора в хлоропластах, отличается от стехиометрии соответствующих комплексов в митохондриях или у бактерий. Однако сейчас ясно, что стехиометрия субъединиц хлоропластного белка CF_1 в точности соответствует стехиометрии белка F_1 митохондрий или бактерий. В настоящее время принято считать, что белок CF_1 имеет молекулярную массу $M_r \sim 400\,000$ и состоит из пяти полипептидных субъединиц, находящихся в стехиомет-

рическом соотношении $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ (Mogoney et al., 1983; Tiedge et al., 1985). Молекулярные массы этих субъединиц приведены в табл. 1, организация субъединиц в функциональном комплексе рассмотрена в обзоре (McCarty, Mogoney, 1984).

Белок CF_0 погружен в мембрану. На фотографиях, полученных методом электронной микроскопии с использованием замораживания — скалывания, его еще не удалось идентифицировать в случае тилакоидных мембран, но в опытах с липосомами, куда встроены очищенные комплексы CF_1/CF_0 , белок CF_0 виден как внутримембранная частица размерами от 9 до 10 нм (Mörschel, Staehelin, 1983).

Субъединичный состав белка CF_0 определен еще не столь однозначно. Большинство современных данных позволяет предположить, что в него входят три различных полипептида (McCarty, Carmeli, 1982; Nelson, 1982), обозначаемые как субъединицы I, II, III. Наименьшая из субъединиц (III), по-видимому, присутствует в количестве 6 копий в расчете на один белок CF_1 . Оцененные значения молекулярной массы этих трех сильно гидрофобных полипептидов приведены в табл. 1 (см. также рис. 3).

2

РЕГУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Энергетическим субстратом для фотосинтеза служит свет. Поскольку его количество циклически меняется каждые сутки, хлоропласты вынуждены работать совсем в иных условиях, чем те системы, в которых АТФ синтезируется в процессе дыхания и которые более или менее постоянно обеспечиваются субстратом в виде восстановленных соединений углерода. Протонная АТРаза в мембранах, где происходит процесс дыхания, действует в открытой системе; этот фермент активен именно в направлении синтеза АТФ лишь потому, что на мембране постоянно поддерживается протонодвижущая сила. Сходная ситуация наблюдается и у многих фотосинтезирующих бактерий, поскольку реакции переноса электронов в процессах окисления и фотосинтеза происходят здесь в одних и тех же мембранах, и некоторые переносчики электронов наряду с сопрягающим фактором участвуют в обоих процессах (Baccarini-Melandri, Zannoni, 1978). Если бы хлоропластный фермент АТФ-синтаза/гидролаза также был активен во всех условиях, то в темное время суток, когда протонодвижущая сила не создается и потому не может сдерживать гидролазную активность этого фермента, его работа привела бы к истощению пулов АТФ в хлоропластах. Хотя с точки зрения энергетики последствия такого истощения можно считать ничтожными по сравнению с количеством энергии, за-

пасаемым за световой день, тем не менее от поддержания определенного уровня АТФ в темноте может критически зависеть сохранение оптимальных пулов субстратов, необходимых для возобновления процесса фотосинтеза в начале нового светового дня. При обычных условиях хлоропласты содержат приблизительно от 1 до 1,5 мМ нуклеотидов, из которых более 25% остается в форме АТФ даже после длительных темновых периодов (Heber et al., 1982). Для того чтобы сопрягающий фактор в хлоропластах находился в активном состоянии, требуется поддержание протондвижущей силы $\Delta\mu_{H^+}$ (McCarty, Carmeli, 1982). Следовательно, по мере того как уменьшается движущая сила синтеза АТФ, уменьшается и каталитическая активность сопрягающего фактора. Разумеется, ферменты не могут изменить величину константы равновесия, они должны катализировать как прямую, так и обратную реакцию, т. е. неактивное состояние фермента означает отсутствие как синтазной, так и гидролазной активности. Поэтому инактивация каталитической функции сопрягающего фактора, происходящая при уменьшении протондвижущей силы $\Delta\mu_{H^+}$, должна обращаться при увеличении $\Delta\mu_{H^+}$.

Наряду с переходами ферментного комплекса из активного состояния в неактивное и обратно в ответ на изменение энергизации мембраны и с влиянием термодинамических факторов на относительные скорости прямой и обратной реакции существует ряд других факторов, совместно регулирующих активность этого сложного фермента. Показано, что в световой активации комплекса сопрягающего фактора косвенным образом участвует Fe-S-белок тиоредоксин, присутствующий в строме и восстанавливаемый фотосистемой I. Восстановленный под действием света тиоредоксин способен восстановить дисульфидную связь в γ -субъединице сопрягающего фактора, и этот процесс, по-видимому, стабилизирует активное состояние, в которое фермент первоначально переходит в результате энергизации мембраны (Nalin, McCarty, 1984).

Наблюдается превосходная корреляция между индуцированной светом активацией фермента и высвобождением ADP из CF_1 . Происходящее в темноте связывание ADP с белком CF_1 хорошо коррелирует с переходом фермента в неактивную форму. Полагают, что высвобождение и последующее связывание ADP обусловлены изменениями конформации белка, сопровождающими переход между активным и неактивными состояниями (Strotmann et al., 1979). Однако истощение пула ADP само по себе не приводит к активации фермента.

Получено большое количество данных, в частности на выделенном белке CF_1 , указывающих на участие субъединицы ϵ

в регуляции активности фермента (McCarty, Moroney, 1984). К примеру, возрастание АТФазной активности выделенного CF_1 под действием нагревания, спиртов и некоторых детергентов, очевидно, сопровождается удалением или смещением субъединицы ϵ . Более того, активация, происходящая при истощении пула субъединицы ϵ , обращается в результате последующего встраивания в комплекс субъединицы ϵ . Хотя переориентацию этой субъединицы в комплексе можно представить как часть физиологического регуляторного процесса, приписывать подобную роль удалению субъединицы из комплекса, разумеется, нельзя.

Перечисление всех аллостерических регуляторов сопрягающего фактора выходит за рамки данной главы (McCarty, Carmeli, 1982). АТФазная активность зависит от анионов, таких, как карбоновые кислоты, бикарбонат и фосфат, и от катионов, в том числе Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} . Чтобы понять, каким образом осуществляются взаимодействия этих многочисленных факторов, необходима обширная дополнительная информация о сопрягающем факторе и механизме его действия.

Подводя итоги, можно описать регуляцию работы хлоропластного сопрягающего фактора следующим, по-видимому упрощенным, образом. В темноте этот фермент находится в неактивной форме, и поэтому он не способен истощать пул АТФ в строме хлоропласта. Прежде чем сможет начаться синтез АТФ, должна произойти активация фермента. Она происходит как следствие конформационных изменений белка CF_1 , вызванных действием протонодвижущей силы $\Delta\mu_{H^+}$ и состоящих скорее всего в переориентации субъединицы ϵ и в высвобождении связанного ADP. Тиоредоксин, восстановленный фотосистемой I, стабилизирует активное состояние фермента, восстанавливая дисульфидную связь в его субъединице γ . Наличие протонодвижущей силы, активировавшей фермент, обеспечивает за счет термодинамических соотношений преобладание синтеза АТФ над гидролизом. Когда освещение прекращается, каждый из этих процессов в конечном счете меняет свое направление, но важнейшим для инактивации фермента может оказаться связывание ADP с белком CF_1 , происходящее при растрате $\Delta\mu_{H^+}$.

3 КАТАЛИТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Химическая реакция в центре фотофосфорилирования состоит в переносе фосфорильной группы от молекулы-донора, в роли которого выступает вода, на молекулу-акцептор, которой является ADP. При этом кислород молекулы ADP служит мостиком во вновь образующейся ангидридной связи (Slater, 1953). Гид-

ролиз АТФ является обратной реакцией переноса фосфорильной группы; в данном случае роль донора этой группы играет АТФ, роль акцептора — молекула воды. При окислительном фосфорилировании и фотофосфорилировании ферментативный механизм сопрягающего фактора должен обеспечить использование свободной энергии, доступной в виде трансмембранного потенциала ионов водорода (отрицательная энергия), для того, чтобы компенсировать затраты свободной энергии при фосфорилировании (положительная энергия). Хотя понятно, что с точки зрения термодинамики возможно сопряжение энергетически выгодного потока протонов наружу из тилакоидного пузырька с энергетически невыгодным фосфорилированием АДФ, каталитический механизм реакции известен в настоящее время лишь в самых общих чертах. Остается до сих пор не решенным ключевой вопрос о том, как именно использует фермент химический и электрический потенциал накопленных ионов водорода для образования и разрыва ковалентных связей.

Известно по меньшей мере одно предположение (Mitchell, 1974) о прямом участии индуцирующих протонов в химической реакции фосфорилирования АДФ. Согласно этому предположению, ионы водорода, выходящие наружу из мембранного пузырька через комплекс сопрягающего фактора, протонируют связанный фосфат, образуя положительно заряженный фосфорный центр в активном участке фермента. Последующая нуклеофильная атака аниона АДФ вытесняет —O^{2-} из фосфатной группы, участвующей в образовании АТФ. Поскольку —O^{2-} не подходит на роль высвобождающейся частицы, приходится далее предполагать, что происходит двухстадийное протонирование фосфата, лигандно связанного с Mg^{2+} , и в результате этого в конечном счете высвобождается —OH_2 . Это общее предположение впоследствии модифицировалось (см., например, Boyer, 1975). Оно имеет ряд привлекательных особенностей, но недостаточно обосновано экспериментально.

Альтернативное предположение о косвенном участии индуцирующих протонов в синтезе АТФ имеет больше сторонников. Ключевым звеном в большинстве предлагаемых механизмов косвенного участия протонов является представление о том, что за счет их энергии происходят конформационные изменения фермента сопрягающего фактора, приводящие к резкому изменению константы равновесия для реакции переноса фосфатной группы. Экспериментальные данные, на основе которых сформировалось предположение о косвенной роли протонов в каталитическом механизме синтеза АТФ, получены в очень разнородных опытах, проводившихся в разных условиях. Разобраться в истинных взаимосвязях, отбросить случайные факты и получить логически связную, хотя и неполную картину помогают превос-

ходные обзорные работы (McCarty, Moroney, 1984; Merchant, Selman, 1985).

Среди современных гипотез о ферментативном механизме сопрягающего фактора наиболее полезна для интерпретации экспериментальных данных та, что сформировалась из первоначальных предположений Бойера (Boyer, 1977) и Слейтера (Slater, 1977). Они предположили, что прочно связанные ADP и P_i спонтанно образуют прочно связанный АТР, и энергия индуцирующих протонов нужна для того, чтобы вызвать конформационное изменение фермента, которое в свою очередь приводит к высвобождению прочно связанного продукта. В дальнейшем Бойер уточнял и развивал эту мысль. Одно из наиболее заметных усовершенствований модели относится к объяснению наблюдаемых на опыте взаимодействий между каталитическими центрами ферментного комплекса. Модель Бойера, описывающая «чередование мест связывания», или «энергетически зависимый механизм изменения связывания», схематично показана на рис. 6.

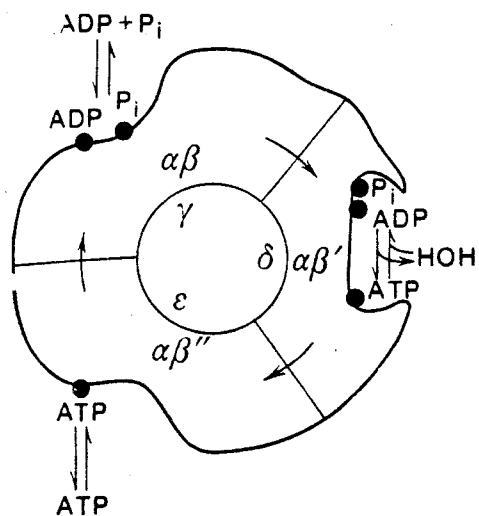


РИС. 6

Схема, иллюстрирующая чередование мест связывания в сопрягающем факторе хлоропластов.

α , β , γ , δ , ϵ — субъединицы CF_1 . Подробности см. в тексте. (Взято в упрощенном виде из работы Boyer, Kohlbrenner, 1981.)

деги учитывается стехиометрия субъединиц $\alpha_3\beta_3$, и фермент рассматривается как симметричный тример, содержащий три кооперативно функционирующих каталитических участка (Boyer, Kohlbrenner, 1981). Константы связывания субстратов и продуктов реакции в каждом из этих участков изменяются в ответ на энергозависимые конформационные изменения фермента, как упоминалось выше. Считается, что эти изменения происходят последовательно. Первый этап состоит в непрочном связывании ADP и P_i в одном из каталитических участков. На втором этапе субстраты связываются прочно, и образуется АТР с выделением H_2O . Наконец, третий этап этого каталитического «цикла» состоит в энергозависимом переходе от прочно связанного продукта к свободно диссоциируемому АТР. В завершение цикла участок связывания возвращается в состояние, подходящее для присоединения ADP и P_i . Кооперативность каталитических участков объясняется в этой модели тем, что каждый энергетически

чески зависимый конформационный переход одновременно, но по-разному изменяет характеристики связывания во всех трех каталитических центрах. Неожиданная особенность модели в том, что образование ангидридной связи происходит здесь без специальных затрат энергии и является следствием резкого уменьшения константы равновесия реакции, обусловленного микроокружением активного участка.

Предположение о том, что каталитически активный участок белка CF₁ циклически перемещается по трем субъединицам β, означает, что в каждый момент времени разные субъединицы β одного и того же белка находятся в различных конформационных состояниях. Поскольку центральная часть (core) белка, образованная субъединицами γδε, не имеет той же симметрии третьего порядка, высказывается предположение о том, что взаимодействие трех комплексов αβ с центральной частью белка несимметрично. Далее авторы делают интересное предположение: чередование трех конформационных состояний каждого каталитического участка вызвано вращением субъединиц αβ вокруг центральной части белка CF₁, образованной субъединицами γδε (Boyer, Kohlbrenner, 1981). Механизм такого вращения, согласующийся с механизмом чередования мест связывания, описан по аналогии с движением жгутиковых «моторов» бактерий (Cox et al., 1984; Mitchell, 1985).

ЛИТЕРАТУРА

- Alt J., Westhoff P., Sears B. B., Nelson N., Hurt E., Hauska G., Herrmann R. G. (1983). EMBO J 2, 979—986.
- Amesz J., Knaff D. (1985). In: «Environmental Microbiology of Anaerobes». (A-J. B. Zehnder, ed.). John Wiley and Sons, New York, in the press.
- Amesz J., Vasmel H. (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz, J., and Fork, D. C., Eds.). Academic Press, Orlando, in press.
- Anderson J. M. (1982). Photobiochem. Photobiophys. 3, 225—241.
- Andersson B., Haehnel W. (1982). FEBS Lett. 146, 13—17.
- Arntzen C. J. (1978). In: «Current Topics in Bioenergetics». (L. Vernon and R. Sanadi, eds.). Vol. 8, pp. 111—160. Academic Press, New York.
- Arntzen C. J., Dilley R. A., Crane F. (1969). J. Cell Biol. 43, 16—31.
- Babcock G. T., Ghanotakis D. V., Ke, B., Diner B. A. (1983). Biochim. Biophys. Acta 723, 276—286.
- Baianu I. C., Critchley C., Gutowsky H. S., Govindjee (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 3713—3717.
- Baccarini-Melandri A., Zannoni D. (1978). J. Bioenergetics Biomembranes, 10, 109—138.
- Barber J. (1972). Biochim. Biophys. Acta, 275, 105—116.
- Barber J. (1980). Biochim. Biophys. Acta, 594, 253—308.
- Barber J. (1982a). Ann. Rev. Plant Physiol., 33, 261—295.
- Barber J. (1982b). (Editor) Electron Transport and Photophosphorylation. Elsevier-Biomedical Press, Amsterdam.
- Barber J., Mills J., Love A. (1977). FEBS Lett., 74, 174—181.

- Bar-Nun, S., Schantz, R., Ohad I.* (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **459**, 451—467.
- Bendall D. S.* (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **683**, 119—151.
- Berg S. P., Luszczakoski D. M., Morse II, P. D.* (1979). *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 138—148.
- Blankenship R. E.* (1985). *Photosyn. Res.*, **6**, 317—333.
- Boska M., Sauer, K., Buttner W., Babcock G. T.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 327—330.
- Bouges-Bocquet B.* (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, **635**, 327—340.
- Boyer P. D.* (1975). *FEBS Lett.*, **50**, 91—94.
- Boyer P. D.* (1977). *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 957—966.
- Boyer P. D., Kohlbrenner W. E.* (1981). In: «Energy Coupling in Photosynthesis». (Selman, B. F., and Selman-Reimer, S., eds.). pp. 231—240. Elsevier/North-Holland.
- Brangeon J., Mustardy L. A.* (1979). *Biol. Cellulaire*, **36**, 71—80.
- Briantais J. M., Vernotte C., Krause G. J., Weiss C.* (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Ames, J., and Fork, D. C., Eds.). Academic Press, Orlando, in press.
- Brown M. R., Miljanich G. P., Dratz E. A.* (1977). *Biochemistry*, **16**, 2640—2648.
- Bruce D., Hanzlik C. A., Hancock L. E., Biggins J., Knox R. S.* (1986). In: «Excitation and Electron Transfer in Photosynthesis». (Govindjee, Ed.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Den Haag, in press.
- Butler W. L., Magde D., Berens S. J.* (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7510—7514.
- Camm E. L., Green B. R.* (1980). *Plant Physiol.* **66**, 428—432.
- Chain R. K.* (1982). *FEBS Lett.*, **143**, 273—278.
- Chapman D., Gomez-Fernandez J. C., Goni F. M.* (1979). *FEBS Lett.*, **98**, 211—223.
- Chua N.-H., Blomberg F.* (1979). *J. Biol. Chem.*, **254**, 215—223.
- Chua N.-H., Matlin K., Bennoun P.* (1975). *J. Cell Biol.*, **67**, 361—377.
- Clayton R. K.* (1977). *Light and Living Matter*. Vol. 1: The Physical Part. Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York.
- Clayton R. K.* (1980). *Photosynthesis: Physical mechanisms and chemical patterns*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Colman P. M., Freeman H. C., Guss J. M., Murata M., Norris V. A., Ramshaw, J. A. M., Venkatappa M. P.* (1978). *Nature*, **272**, 319—324.
- Coruzzi G., Broglie R., Cashmore A. R., Chua N.-H.* (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 1399—1402.
- Cox R. P., Andersson B.* (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1336—1342.
- Cox G. B., Jans D. A., Fimmel A. L., Gibson F., Hatch L.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 201—208.
- Critchley C.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **724**, 1—5.
- Critchley C.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta Reviews*, **811**, 33—46.
- Critchley C., Baianu I. C., Govindjee, Gutowsky H. S.* (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 436—445.
- Crofts A. R., Wraight C. A.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 149—183.
- Crowther D., Hind G.* (1980). *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 568—577.
- Deisenhofer J., Michel H., Huber R.* (1985a). *TIBS* **10**, 243—248.
- Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel R.* (1985b). *Nature*, **318**, 618—624.
- Dismukes G. C.* (1986). *Photochem. Photobiol.*, **43**, 99—115.
- Dismukes G. C., Siderer Y.* (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 274—278.
- Dubacq J. P., Trémolières A.* (1983). *Physiol. Veg.*, **21**, 293—312.
- Duniec J. T., Israelachvili J. N., Ninham B. W., Pashley R. M., Thorne, S. W.* (1981). *FEBS Lett.*, **129**, 193—196.

- Eaton-Rye J., Blubaugh D. J., Govindjee* (1985). In: «Ion Interactions in Energy Transport Systems». (Barker J., Papa S. and Papageorgiou G., Eds.). The Plenum Press, New York, in press.
- Evans M. C. W.* (1982). In: «Iron-sulfur proteins». (Spiro, T. G., Ed.), Vol. 4, pp. 249—284. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Fajer J., Davies M. S., Forman A., Klimov V. V., Dolan, E., Ke B.* (1980). *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7143—7145.
- Fato R., Bertoli E., Castelli G. P., Lenaz, G.* (1984). *FEBS Lett.*, **172**, 6—10.
- Fenton J. M., Pellin M. J., Govindjee, Kaufmann K. J.* (1979). *FEBS Lett.*, **100**, 1—4.
- Ferguson S. J.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 47—95.
- Flores S., Ort D. R.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta* **766**, 289—302.
- Flores S., Graan T., Ort D. R.* (1983). *Photobiochem. Photobiophys.*, **6**, 293—304.
- Fork D. C., Mohanty P.* (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz J., and Fork D. C., Eds.). Academic Press, Orlando, in press.
- Fork D. A., Satoh K.* (1986). *Ann. Rev. Plant Physiol.*, in press.
- Forti G., Cappelletti A., Nobili R. L., Garlaschi F. M., Gerola P. D., Jennings R. C.* (1983). *Arch. Biochem. Biophys.*, **221**, 507—513.
- Fox G. E., Stackebrandt E., Hespell R. B., Gibson J., Maniloff J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magnum, L. J., Zablen, L. B., Blake-more R., Gupta R., Bonen L., Lewis B. J., Stahl D. A., Leuhrsen K. R., Chen K. N., Woese, C. R.* (1980). *Science*, **209**, 457—463.
- Frasch W., Deluca C. R., Kulzick M. J., Selman B. R.* (1980). *FEBS Lett.* **122**, 125—128.
- Gaffron J., Wohl, K.* (1936a). *Naturwiss*, **24**, 81—90.
- Gaffron J., Wohl, K.* (1936b). *Naturwiss*, **24**, 103—107.
- Geacintov N. E., Breton J., Knox R. S.* (1986). In: «Excitation and Electron Transfer in Photosynthesis». (Govindjee, Ed.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Den Haag, in press.
- Ghanotakis D. F., Yocum C. F.* (1985). *Photosyn. Res.*, **7**, 97—114.
- Ghanotakis D. F., Topper J. N., Babcock G. T., Yocum, C. F.* (1984). *FEBS Lett.*, **170**, 169—173.
- Ghanotakis D. F., Babcock G. T., Yocum, C. F.* (1985). *FEBS Lett.*, **192**, 1—3.
- Girvin M. E., Cramer W. A.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 29—39.
- Gounaris K., Barber J.* (1983). *Trends in Biochem. Sci.*, **8**, 378—381.
- Gounaris K., Sundby C., Andersson B., Barger J.* (1983). *FEBS Lett.*, **156**, 170—174.
- Govindjee, Eaton-Rye J.* (1986). In: «Excitation and Electron Transfer in Photosynthesis». (Govindjee, Ed.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Den Haag, in press.
- Govindjee, Govindjee R.* (1975). In: «Bioenergetics of Photosynthesis». (Govindjee, ed.) pp. 1—50. Academic Press, New York.
- Govindjee, Satoh K.* (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz, J., and Fork, D. C., Eds.). Academic Press, Orlando, in the press.
- Govindjee, Baianu I. C., Critchley C., Gutowsky H. S.* (1983). In: «The Oxygen Evolving System of Photosynthesis». (Inoue, Y., Crofts, A. R., Govindjee, Murata, N., Renger, G., and Satoh, K., Eds.). pp. 303—315. Academic Press, Tokyo.
- Govindjee, Kambara T., Coleman W.* (1985). *Photochem. Photobiol.* **42**, 187—210.
- Govindjee, Amesz T., Fork D. C.* (Eds.). (1986). *Light Emission by Plants and Bacteria*, Academic Press, Orlando, in press.
- Graan T., Ort D. R.* (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 2831—2836.
- Graan T., Ort D. R.* (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 14003—14010.

- energy
The
Vol. 4,
J. Am.
-10.
t., 100,
293—
acteria».
ido, in
rs R. C.
T. A.,
Blake-
K. R.,
tt. 122,
ron
V. Junk
S Lett.,
1—3.
—39.
, 170—
n Pho-
rs, Den
Govind-
acteria».
, in the
Oxygen
vindjee,
Press,
, 187—
nts and
- Graan T., Ort D. R.* (1986a). *Arch. Biochim. Biophys.*, Submitted.
Graan T., Ort D. R. (1986b). *Biochim. Biophys. Acta*, **852**, 320—330.
Gray M. W., Doolittle W. F. (1982). *Microbiol. Rev.*, **46**, 1—42.
Green B. R., Camm E. L. (1984). In: «Advances in Photosynthesis Research». (Sybesma, C., Ed.). Vol. II, pp. 95—98. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague.
Green B. R., Camm E. L., Van Houten J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **681**, 248—255.
Griddings Jr., T. H., Withers N. W., Staehelin L. A. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 352—356.
Gupte S., Wu E.-S., Hoehli L., Hoehli M., Jacobson K., Sowers A. E., Hackenbrock C. R. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2606—2610.
Hackenbrock C. R. (1981). *Trends in Biochem. Sci.*, **6**, 151—154.
Haehnel W. (1984b). In: «Advances in Photosynthesis Research». (Sybesma, C., Ed.), Vol. I, pp. 545—548. Nijhoff/Dr. W. Junk. The Hague.
Haehnel W., Hesse V., Pröpper A. (1980). *FEBS Lett.*, **111**, 79—82.
Hangarter R., Ort D. R. (1985). *European J. Biochem.*, **149**, 503—510.
Hangarter R., Ort D. R. (1986). *European J. Biochem.*, Submitted.
Hangarter R., Jones R., Ort D. R., Whitmarsh J. (1986). *Biochim. Biophys. Acta*, Submitted.
Hanzlik C. A., Hancock L. E., Knox R. S., Guard-Friar D., MacColl R. (1985). *J. of Luminescence*, **34**, 99—106.
Hauska G. (1986). In: «Encyclopedia of Plant Physiology: Photosynthetic Membranes». (Staehelin A., and Arntzen C. J., Eds.). Vol. 19, 496—507.
Haworth P., Watson J. L., Arntzen C. J. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **7244**, 151—158.
Heathcote P., Evans M. C. W. (1980). *FEBS Lett.* **111**, 381—385.
Heber U., Takahama U., Neimanis S., Shimizu-Takahama M. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 287—299.
Hill R., Bendall F. (1960). *Nature (London)*, **186**, 136—137.
Hind G., Nakatani H. Y., Izawa S. (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 277—289.
Hirschberg J., Bleecker A., Kyle D. J., McIntosh L., Arntzen C. J. (1984). *Z. Naturforsch.* **39c**, 412—420.
Hiyama T., Fork D. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.*, **199**, 488—496.
Hoff A. J. (1982). In: «Light Reaction Path of Photosynthesis». (Fong, F. K., Ed.). pp. 80—151. Springer, Verlag, Heidelberg.
Hongu A., Nakazato M., Hiyama T., Murata N. (1985). *FEBS Lett.*, **191**, 252—256.
Horner R. D., Moudrianakis E. N. (1983). *J. Biol. Chem.*, **258**, 11643—11647.
Inoue Y., Ono T.-A. (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **723**, 191—201.
Inoue Y., Crofts A. R., Govindjee, Murata N., Renger G. and Satoh K. (Eds.). (1983). *The Oxygen Evolving System of Photosynthesis*, Academic Press, Tokyo.
Israelachvili J. N., Marcelja S., Horn R. G. (1980). *Q. Rev. Biophys.*, **13**, 121—200.
Izawa S., Good N. E. (1966). *Plant Physiol.*, **41**, 544—552.
Izawa S., Muallem A., Ramaswamy N. K. (1983). In: «The Oxygen Evolving System of Photosynthesis». (Inoue, Y., Crofts, A. R., Govindjee, Murata, N., Renger, G., and Satoh, K., Eds.). pp. 293—302. Academic Press, Tokyo.
Jagendorf A. T. (1975). In: «Bioenergetics of Photosynthesis». (Govindjee, Ed.). pp. 414—492. Academic Press, New York.
Jain M. K., Wagner R. C. (1980). *Introduction to Biological Membranes*. John Wiley and Sons, New York.
Jennings R. C., Garlaschi F. M., Gerola P. D., Forti G. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **546**, 207—219.
Joliot P., Delsome R. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **357**, 267—284.

- Joliot P., Kok B.* (1975). In: «Bioenergetics of Photosynthesis». (Govindjee, Ed.), pp. 388—412. Academic Press, New York.
- Joliot P., Joliot A.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **806**, 398—409.
- Kambara T., Govindjee* (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 6119—6123.
- Karukstis K. K., Sauer K.* (1983). *J. Cell Biochem.*, **23**, 131—158.
- Keegstra K., Cline K.* (1982). *Plant Physiol.*, **70**, 232—237.
- Kell D. B.* (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 55—99.
- Kelly P., Izawa S.* (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, **502**, 192—210.
- Kenyon C. N.* (1978). In: «The Photosynthetic Bacteria». (Clayton, R. K., and Sistrom, W. R., Eds.), pp. 281—313. Plenum Press, New York.
- Kirby J. A., Goodin D. B., Wydrzynski T., Robertson A. S., Klein M. P.* (1981). *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5537—5542.
- Klimov V.* (1984). *Advances in Photosynthesis Research*, **1**, 131—158.
- Климов В. В. и Красновский А. А.* (1982). *Биофизика*, **27**, 186—198.
- Кнох W.* (1975). In: «Bioenergetics of Photosynthesis». (Govindjee, Ed.), pp. 183—221, Academic Press, New York.
- Koike H., Inoue Y.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **807**, 64—73.
- Kok B., Forbush B. and McGloin M.* (1970). *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457—475.
- Kramer H. J. M., Westerhuis W. H. J., Amesz J.* (1985). *Physiol. Veg.*, in press.
- Kuwabara T., Miyao M., Murata T., Murata N.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **806**, 283—289.
- Kyle D. J.* (1985). *Photochem. Photobiol.*, **41**, 107—116.
- Lam E., Ortiz W., Malkin R.* (1984a). *FEBS Lett.*, **168**, 10—14.
- Lam E., Ortiz W., Mayfield S., Malkin R.* (1984b). *Plant Physiol.*, **74**, 650—655.
- Langworthy T. A.* (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 37—50.
- Ljungberg U., Akerlund H.-E., Larsson C., Andersson B.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 145—152.
- Low P. S., Ort D. R., Cramer W. A., Whitmarsh J., Martin B.* (1984). *Arch. Biochem. Biophys.*, **231**, 336—344.
- Malkin R.* (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz, J., and Fork, D. C., Eds.), Academic Press, Orlando, in the press.
- Malkin R.* (1982). *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 3355—479.
- Mauzerall D.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 11—16.
- McCarty R. E., Carmeli C.* (1982). In: *Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*. (Govindjee, Ed.). Vol. I, pp. 647—695. Academic Press, New York.
- McCarty R. E., Moroney J. V.* (1984). In: «The Enzymes of Biological Membranes». (Martonosi, A., Ed.). 2nd Edition, Vol. 4, pp. 383—413. Plenum Press, New York.
- Melis A., Anderson J. M.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **724**, 473—484.
- Merchant S., Selman B. R.* (1985). *Photosyn. Res.* **6**, 3—31.
- Metz J. G., Bricker T. M., Seibert M.* (1985). *FEBS Lett.*, **185**, 191—196.
- Miller K. R., Staehelin L. A.* (1976). *J. Cell Biol.* **68**, 30—47.
- Michel H., Deisenhofer J.* (1986). In: «Encyclopedia of Plant Physiology. New Series Photosynthesis 3. (Staehelin, L. A., and Arntzen, C. J., eds.). Springer-Verlag, 371—381.
- Mitchell P.* (1974). *FEBS Lett.*, **43**, 189—193.
- Mitchell P.* (1975). *FEBS Lett.*, **59**, 137—139.
- Mitchell P.* (1985). *FEBS Lett.*, **182**, 1—7.
- Moroney J. V., Lopresti L., McEwen B. F., McCarty R. E., Hammes G. G.* (1983). *FEBS Lett.*, **158**, 58—62.
- Mörschel E., Staehelin L. A.* (1983). *J. Cell Biol.*, **97**, 301—310.
- Moya I., Sebban P., Haehnel W.* (1986a). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz, J. and Fork, D. C., Eds.), Academic Press, Orlando, in press.

- Moya I., Hodges M., Briantais J.-M., Hervo G.* (1986b). In: «Excitation and Electron Transfer in Photosynthesis» (Govindjee, Ed.), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Den Haag, in press.
23. *Mullet J. E., Arntzen C. J.* (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 100—117.
- Murata N., Satoh K.* (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz, J., and Fork, D. C., Eds.), Academic Press, Orlando, in press.
- Murphy D. J.* (1982). *FEBS Lett.*, **150**, 19—26.
- Murphy D. J., Woodrow I. E.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **725**, 104—112.
- Mustárdy L. A., Jánossy A. G. S.* (1979). *Plant Sci. Lett.*, **16**, 281—284.
- 981). *Nakatani H. Y., Arntzen C. J., Inoue Y.* (1984). In: «Advances in Photosynthesis Research». (Sybesma, C., Ed.). Vol. II, pp. 99—102. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague.
- Ed.). *Nalecz M. J., Azzi A.* (1985). *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**, 921—931.
- Nalin C. M., McCarty R. E.* (1984). *J. Biol. Chem.*, **259**, 7275—7280.
- Nelson N.* (1982). In: «Electron Transport and Photophosphorylation». (Barber, J., Ed.). pp. 81—104. Elsevier, Amsterdam.
- 157— *Nir I., Pease D. C.* (1973). *J. Ultrastruct. Res.*, **42**, 534—550.
- press. *Norris J.* (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz, J., and Fork, D. C., eds.). Academic Press, Orlando, in press.
- Acta. *Nugent J. H. A., Diner B. A., Evans M. C. W.* (1981). *FEBS Lett.*, **124**, 241—244.
- Oldfield E., Gilmore R., Glaser M., Gutowski H. S., Hschung J. C., Kang S., Meadows M., Rice D.* (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4657—4660.
- 350— *O'Malley P. J., Babcock G. T.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta* **765**, 370—379.
- O'Malley P. G., Babcock G. T., Prince R. C.* (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, submitted.
- Bio- *Ort D. R., Dilley R. A., Good N. E.* (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 108—124.
- Bio- *Ort D. R., Ahrens W. H., Martin B., Stoller E. W.* (1983). *Plant Physiol.*, **72**, 925—930.
- idjee, *Ortiz W., Lam E., Ghirardi M., Malkin R.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 505—509.
- ess. *Paolillo D. J., Falk R. H.* (1966). *Amer. J. Bot.*, **53**, 173—180.
- Peters F. A. L. J., van Wielink J. E., Sang H. W. W. F., DeVries S., Kraayenhof F. R.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 460—470.
- in by *Petrouleas V., Diner B. A.* (1982). *FEBS Lett.*, **147**, 111—114.
- press, *Pfister, K., Arntzen, C. J.* (1979). *Z. Naturforsch.* **34c**, 996—1009.
- mbra- *Pick U., Gounaris K., Admon A., Barber J.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **765**, 12—20.
- press, *Pink D. A., Chapman D., Laidlaw D. J., Wiedmer T.* (1984). *Biochemistry*, **23**, 4051—4058.
184. *Quinn P. J., Williams W. P.* (1978). «Plant Lipids and Their Role in Membrane Function». Vol. 34, pp. 109—173. *Prog Biophys Molec Biol*, Pergamon Press Ltd, London.
3. *Rabinowitch E., Govindjee.* (1969). *Photosynthesis*. John Wiley and Sons, New York.
- New *Raison J. K., Wright L. C.* (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **731**, 69—78.
- inger- *Rathenow M., Rumberg B.* (1980). *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **84**, 1059—1062.
- G. G. *Rice D., Meadows M. D., Scheinman A. O., Goni F. M., Gomez-Fernandez J. C., Moscarello M. A., Chapman D., Oldfield E.* (1979). *Biochemistry*, **18**, 5893—5903.
- s and *Rich P. R.* (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 53—79.
- ss, *Rich P. R.* (1985). *Photosyn. Res.*, **6**, 335—348.
- Robinson H.* (1985). In: «Advanced Agricultural Instrumentation, Design and

- Usage». (Gensler, W. G., Ed.). Martinus Nijhoff, The Hague, in press.
- Rutherford A. W., Heathcote P. (1985). *Photosyn. Res.*, **6**, 295—316.
- Sabatini D. D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M. (1982). *J. Cell Biol.*, **92**, 1—22.
- Sauer K. (1975). In: «Bioenergetics of Photosynthesis». (Govindjee, Ed.), pp. 115—181. Academic Press, New York.
- Schatz G. H., Holzwarth A. R. (1986). In: «Excitation and Electron Transfer in Photosynthesis». (Govindjee, Ed.), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, Den Haag, in press.
- Sculley M. J., Duneic J. T., Thorne S. W., Chow W. S., Boardman N. K. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 339—346.
- Selak M. A., Whitmarsh J. (1982). *FEBS Lett.*, **150**, 286—292.
- Selak M. A., Whitmarsh, J. (1984). *Photochem. Photobiol.*, **39**, 485—489.
- Siefermann-Harms D., Ross J. W., Kaneshire K. H., Yamamoto H. Y. (1982). *FEBS Lett.*, **149**, 191—196.
- Slater E. C. (1953). *Nature*, **172**, 975—982.
- Slater E. C. (1977). *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 1015—1026.
- Slater E. C. (1981). In: «Chemiosmotic Proton Circuits and Biological Membranes». (Skulachev, V. P., and Hinkle, P. C., Eds.). pp. 69—104. Addison-Wesley, London.
- Sprague S. G., Camm E. L., Green B. R., Staehelin L. A. (1985). *J. Cell Biol.*, **100**, 552—557.
- Staehelin L. A., Arntzen C. J. (1983). *J. Cell Biol.*, **97**, 1327—1337.
- Staehelin L. A., Dewit M. (1984). *J. Cellular Biochem.*, **24**, 261—269.
- Staehelin L. A., Armond P. A., Miller K. R. (1977). *Brookhaven Symposia in Biology* **28**, 278—315.
- Stanier R. Y., Cohen-Bazire G. (1977). *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 225—274.
- Strotmann H., Hesse H., Edelman K. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 202—210.
- Strotmann H., Bickel-Sandkötter S., Shoshan, V. (1979). *FEBS Lett.*, **101**, 316—320.
- Süss K.-H., Schmidt O. (1982). *FEBS Lett.*, **144**, 213—218.
- Swarthoff T., Gast P., Amesz J., Buisman H. P. (1982). *FEBS Lett.*, **146**, 129—132.
- Takahashi M., Asada K. (1985). *Plant Cell Physiol.*, **26**, 1093—1100.
- Thomas J. B., Minnaert K., Elbers P. F. (1956). *Acta Bot. Neerl.*, **5**, 315—321.
- Tiedge H., Lünsdorf J., Schäfer G., Schairer H. A. (1985). *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 7874—7878.
- Trissl H. W., Kunze U. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **806**, 136—146.
- Vallon O., Wollman F. A., Olive, J. (1985). *FEBS Lett.*, **183**, 245—250.
- Vambutas V., Schechter S. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 442—448.
- van Gorkom H. J. (1985). *Photosyn. Res.*, **6**, 97—113.
- van Grondelle R. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 147—195.
- van Grondelle R., Amesz J. (1986). In: «Light Emission by Plants and Bacteria». (Govindjee, Amesz, J., and Fork, D. C., Eds.), Academic Press, Orlando, in press.
- Velthuys B. R. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 6031—6034.
- Velthuys B. R. (1982). In: «Function of Quinones in Energy Conserving Systems». (Trumpower, B. L., Ed.). pp. 401—408. Academic Press, New York.
- Velthuys B. R., Amesz J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 85—94.
- Vermaas W. F. J., Govindjee (1981). *Photochem. Photobiol.*, **34**, 775—793.
- Vermaas W. F. J., Govindjee (1982). *Proc. Indian Natl. Acad. Sci.*, **B47**, 581—605.
- Vermaas W. F. J., Dohnt G., Renger G. (1984a). *Biochim. Biophys. Acta*, **765**, 74—83.
- Vermaas W., Renger G., Dohnt G. (1984b). In: «Advances in Photosynthesis

- Research». (Sygesma, C., Ed.). Vol. IV, Pp. 13—16. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, The Hague.
- Vermaas W. F. J., Renger G., Dohnt G. (1984c). *Biochim. Biophys. Acta*, **764**, 194—202.
- Whatley J. M., John P., Whatley F. R. (1979). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **204**, 165—187.
- Whitmarsh J., Ort D. R. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.*, **231**, 378—389.
- Whitmarsh J., Bowyer, J. R., Crofts A. R. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 404—412.
- Widger W. R., Cramer W. A., Hermadson M., Meyer D., Gullifor M. (1984a). *J. Biol. Chem.*, **259**, 3870—3876.
- Widger W. R., Cramer W. A., Herrmann R. G., Trebst A. (1984b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 674—678.
- Willey D. L., Huttly A. K., Phillips A. L., Gray, J. C. (1983). *Mol. Gen. Genet.*, **189**, 85—89.
- Wollman F. A., Bennoun P. (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, **680**, 352—360.
- Wraight C. A. (1979). *Photochem. Photobiol.*, **30**, 767—776.
- Wraight C. A. (1982a). In: «Function of Quinones in Energy Conserving Systems». (Trumpower, B. L., Ed.), Vol. I, pp. 17—61. Academic Press, New York.
- Wraight, C. A. (1982b). In: «Function of Quinones in Energy Conserving Systems». (Trumpower B. L., Ed.), Vol. I, pp. 181—197. Academic Press, New York.
- Yamazaki I., Mimuro M., Murao T., Yamazaki T., Yoshihara K., Fujita Y. (1984). *Photochem. Photobiol.* **39**, 233—240.
- Yocum C. F., Yerkes C. T., Blankenship R. E., Sharp R. R., Babcock, G. T. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7507—7511.
- Zimmerman J. L., Rutherford A. W. (1984). *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 168—175.