

FOSFORYLACJA FOTOSYNTETYCZNA - FAKTY I KONCEPCJE\*

Wacław Hendrich

Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, 50-137

Wrocław, ul. Tamka 2

Doświadczenia nad syntezą ATP w izolowanych chloroplastach [2] oraz w bakteryjnych chromatoforach [25] dowiodły, że funkcja tych organelli jest podobna do funkcji mitochondriów i polega na magazynowaniu energii w formie tzw. wysokoenergetycznych wiązań grup fosforanowych. Źródłem energii jest promieniowanie elektromagnetyczne, absorbowane przez zespoły barwników fotosyntetycznych. Mechanizm fosforylacji fotosyntetycznej i powiązania między tym procesem a innymi zjawiskami indukowanymi światłem w aparacie fotosyntetycznym są natomiast przedmiotem badań, dyskusji i hipotez. W niniejszym artykule podjęto próbę przedstawienia aktualnego stanu badań i poglądów na mechanizm fosforylacji fotosyntetycznej.

Proces ten, jak już wspomniano, przebiega zarówno w chromatoforach bakteryjnych, jak i w chloroplastach roślin wyższych. Mimo różnic budowy tych organelli można sądzić, że mechanizm fosforylacji jest w obu przypadkach jednakowy, dlatego w dalszym ciągu rozważania nad fosforylacją będą ilustrowane tylko strukturą i funkcją chloroplastów. Fosforylacja związana jest z fotosyntetycznym transportem elektronów a prawdopodobnie również z fotoindukowanym transportem protonów i powstawaniem potencjału membranowego oraz ze zmianami konformacyjnymi tylakoidu.

---

\*Pracę wykonano w ramach Międzyresortowego Problemu Badawczego MR-II-15, gr. tem. 03.05.

## FOTOSYNTETYCZNY TRANSPORT ELEKTRONÓW

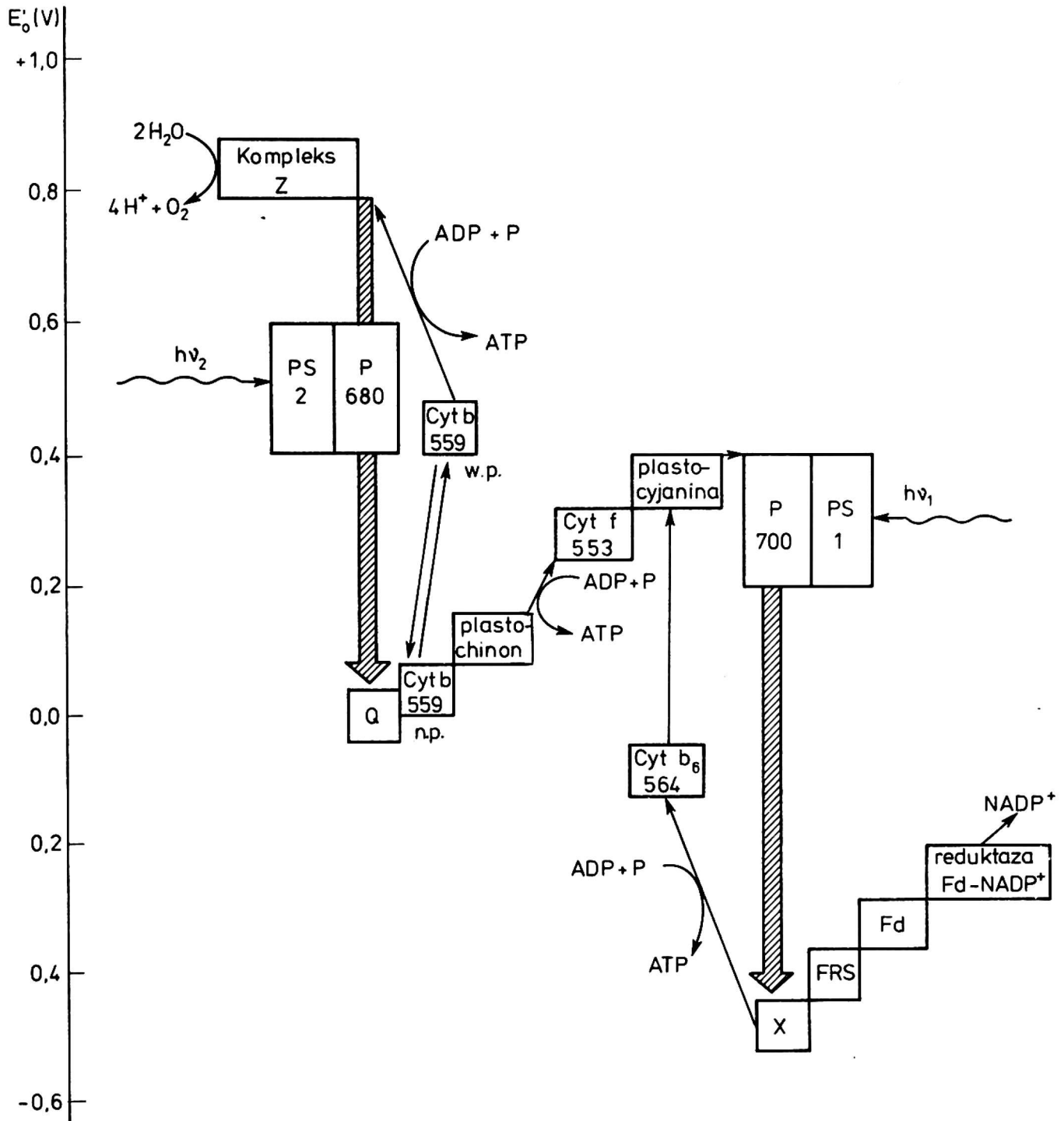
Jednym ze zjawisk indukowanych światłem w chloroplastach jest utlenienie wody z wydzieleniem tlenu i redukcja  $\text{NADP}^+$  do  $\text{NADPH}$ , a więc przeniesienie elektronów od wody do  $\text{NADP}^+$ . O ścisłym związku transportu elektronów z fosforylacją świadczy tzw. stopień kontroli (control ratio, photosynthetic control), tzn. stosunek szybkości transportu elektronów w obecności  $\text{ADP} + \text{P}_i$  do szybkości tego procesu, mierzonej w tych samych warunkach lecz przy braku  $\text{ADP} + \text{P}_i$ . W izolowanych, całych chloroplastach klasy A [35], stopień kontroli przyjmuje wartości 4-6 [78]; uszkodzenie chloroplastów prowadzi do obniżenia stopnia kontroli do wartości poniżej 3. Można więc sądzić, że oba te procesy - transport elektronów i fosforylacja w warunkach *in vivo* są ze sobą ściśle sprzężone.

Schemat łańcucha transportu elektronów, zaproponowany w pierwotnej postaci przez Hilla i Bendalla [43] a zwany schematem Z, przedstawiono na rysunku 1. O ile dokładne omówienie fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów wykracza poza ramy obecnego artykułu (przegląd aktualnego stanu badań znajduje się m.in. w monografiach [3-5, 31, 100]), o tyle z punktu widzenia fosforylacji interesujące są następujące zagadnienia:

- struktura błony tylakoidowej i lokalizacja składników łańcucha transportu elektronów,
- zjawiska towarzyszące transportowi elektronów: transport protonów, powstawanie gradientu pH, powstawanie różnicy potencjału membranowego, zmiany konformacyjne błony tylakoidowej i jej składników,
- fosforylacja, jej rodzaje i miejsca sprzężenia z transportem elektronów.

## STRUKTURA BŁONY TYLAKOIDOWEJ I LOKALIZACJA SKŁADNIKÓW

Wewnątrzchloroplastowe struktury, tylokoidy, mają kształt dysków. Dzięki temu kształtowi błona tylakoidowa oddziela przestrzeń zewnętrzną (stromę, matriks) od przestrzeni wewnątrztylakoidowej. Grubość błony wynosi około 10 nm, w jej skład chemiczny wchodzi lipidy (ok. 50%), białka (ok. 50%) oraz niewielka ilość węglowodanów [107]. Frakcja lipidowa składa się z barwników (ok. 20%),



Rys. 1. Schemat transportu elektronów w fotosyntezie; grubymi strzałkami oznaczono reakcje fotochemiczne, pozostałe reakcje przebiegają w ciemności;  $E_0$  - standardowy potencjał redukcyjno-oksydacyjny w  $\text{pH} = 7,0$ , kompleks Z - zespół enzymatyczny rozkładający wodę, donor elektronów dla krótkofalowego zespołu barwnikowego PS 2,  $P_{680}$  - centrum reakcji zespołu PS 2, Q - pierwotny akceptor elektronów od PS 2, wygaszający fluorescencję chlorofilu z PS 2. cyt b 559 n.p. i w.p. - dwie formy cytochromu b (z maksimum absorpcji w widmie różnicowym przy 559 nm) o niskim potencjale (n.p) i wysokim potencjale (w.p.) redoks, uczestniczące w cyklicznym transporcie elektronów i fosforylacji cyklicznej, stymulowanej przez PS 2, PS 1 - długofalowy zespół barwnikowy,  $P_{700}$  - centrum reakcji zespołu PS1, X - pierwotny akceptor elektronów od zespołu PS 1. FRS - substancja redukująca ferredoksynę. X, cyt.  $b_6$  564 i plastocyjanina uczestniczą w cyklicznym transporcie elektronów i fosforylacji cyklicznej, stymulowanej przez PS 1

mono- i dwugalaktozodwuglicerydów (ok. 40%), fosfolipidów, chinonów i innych związków. Analiza frakcji białkowej [58,69] wykazała że składa się ona co najmniej z 15 różnych białek.

Do poznania struktury błony tylakoidowej i lokalizacji składników w tej błonie przyczyniło się szereg metod, głównie metody mikroskopii elektronowej (freeze-etching, freeze-fracture) oraz immunochemiczne z zastosowaniem przeciwciał. Metody te pozwoliły ustalić różnice w budowie generalnej błony zewnętrznej (end granal membrane, margin), podwójnej błony wewnątrz-granalnej (partition) oraz błony lamell stromy (stroma lamellae). Wszystkie (trzy) typy błony mają prawdopodobnie jednakową strukturę podstawową, składającą się z zewnętrznej warstwy białkowej i wewnętrznej - lipidowej. Stosunek grubości warstwy białkowej do lipidowej wynosi ok. 2,5:1. Na zewnętrznych powierzchniach tylakoidów (powierzchnie lamell stromy, powierzchnie brzegów i końców gran) stwierdzono występowanie ziarnistości, utworzonych przez cząsteczki czynnika sprzęgającego  $CF_1$ , reduktazy ferredoksyna-NADP<sup>+</sup> oraz karboksylazy rybulozo-dwufosforanu. Identyfikacji  $CF_1$  dokonano na podstawie porównania obrazów z mikroskopu elektronowego przed i po działaniu EDTA, które uwalnia  $CF_1$  z błony [72] oraz na podstawie badań serologicznych, w których wykazano [63], że przeciwciała przeciw różnym podjednostkom  $CF_1$  hamują fosforylację cykliczną i niecykliczną.

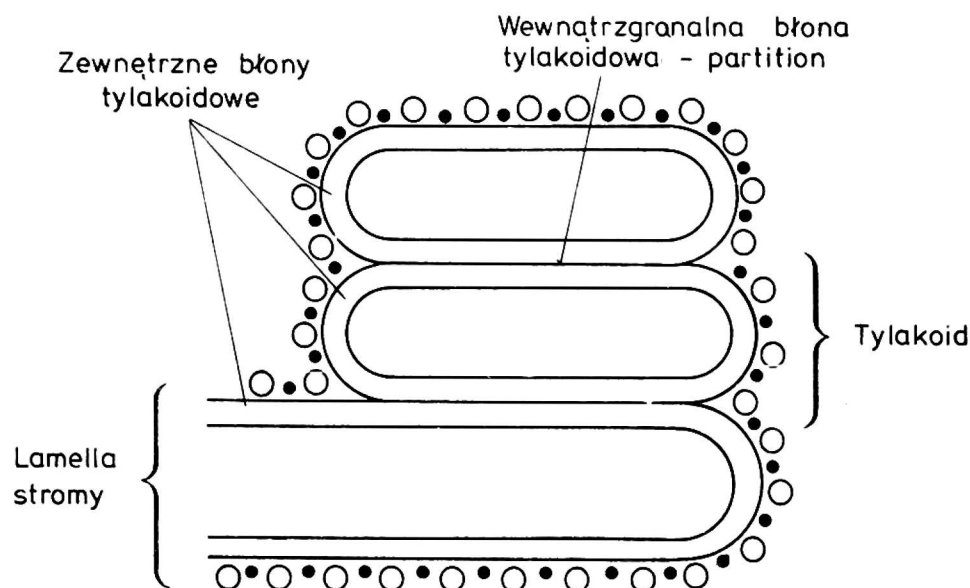
Obecność reduktazy ferredoksyna-NADP<sup>+</sup> wykazał techniką pośredniej aglutynacji Berzborn [8] oraz San Pietro [86], stwierdzając hamowanie redukcji NADP<sup>+</sup> przez przeciwciało przeciw reduktazie. Na powierzchni zewnętrznej tylakoidu znajduje się też łatwo uwalniane do roztworu białko peryferyjne ferredoksyna wykrywana również techniką immunologiczną [42] oraz niezupełnie poznany czynnik redukujący ferredoksyne - FRS.

W odróżnieniu od zewnętrznych powierzchni tylakoidów, wewnątrz-granalne powierzchnie (partition) nie zawierają ani czynnika sprzęgającego  $CF_1$ , ani reduktazy ferredoksyna-NADP<sup>+</sup>. Wynika to m.in. z pomiarów [86] stwierdzających występowanie silnego hamowania redukcji NADP<sup>+</sup> przez hydrofilne przeciwciało przeciw reduktazie, niezdolne do wnikania w hydrofobową strefę oraz z podobnych, serologicznych badań [58, 65] nad hamowaniem fosforylacji przez przeciwciała przeciw ATP-azie.

Oprócz składników białkowych, błony zewnętrzne i wewnętrzzgranalne różnią się też zawartością zespołów barwnikowych. Pierwszych dowodów na różnice w lokalizacji zespołów PS1 i PS2 dostarczyły badania fragmentów chloroplastów, otrzymanych działaniem detergentów lub metodami mechanicznymi i rozdzielonych wirowaniem różnicowym. Charakterystyka tych fragmentów, zarówno biochemiczna jak biofizyczna, opracowana przez Jacobiego [45] prowadzi do wniosku, że frakcja sedymentująca przy 1000-10 000 g pochodzi głównie z fragmentów wewnętrzzgranalnych i zawiera obydwie zespoły PS1 i PS2 natomiast frakcja sedymentująca przy 50 000-160 000 g pochodząca z fragmentów lamell stromy i prawdopodobnie błon brzegów i końców gran zawiera głównie, jeśli nie wyłącznie, zespół PS1. Wyniki te są zgodne z wnioskami z badań pod mikroskopem elektronowym [30,85], w których stwierdzono występowanie dwóch różnych typów ziarnistości, średnicy około 17,5 i 12 nm na powierzchniach wewnętrzzgranalnych, a tylko mniejszych ziarnistości na powierzchni styku warstwy białkowej i lipidowej w lamellach stromy. Rozmieszczenie zespołów PS1 i PS2 w błonach jest asymetryczne. Technika fotolizy błyskowej wykazano [106], że zarówno PS2 jak i PS1 są zwrócone częścią donorową (kompleks Z dla PS2, cytochrom f i plastocyjanina dla PS1) w stronę wewnętrzną tylakoidu, a częścią akceptorową (Q dla PS2, X dla PS1) w stronę zewnętrzną tylakoidu.

Lokalizację akceptorowych części obydwóch zespołów potwierdziły badania fotoredukcji sztucznych, hydrofilnych akceptorów: fotoredukcję silikomolibdenianu [28] i silikowolframianu [29] przez PS2 za pośrednictwem Q można tłumaczyć tylko łatwym dostępem akceptora do części akceptorowej PS2 od zewnętrznej, hydrofilnej strony; podobnym dowodem lokalizacji części akceptorowej PS1 jest wspomniane wyżej występowanie ferredoksyny i reduktazy ferredoksyna-NADP<sup>+</sup> na zewnętrznej powierzchni tylakoidu. Bardziej kontrowersyjne wyniki uzyskano przy ustalaniu lokalizacji donorowych części PS1 i PS2. Serologiczne badania nad lokalizacją plastocyjaniny wskazywały na jej miejsce przy wewnętrznej powierzchni tylakoidu [36], lub zewnętrznej powierzchni [89], jednak pierwszy wynik jest bardziej prawdopodobny ze względu na funkcję tego zespołu. Umieszczenie donorowej części PS2 przy zewnętrznej błonie tylakoidu wynika z badań immunologicznych [84], natomiast zarówno badania fotolizy błyskowej, jak i postulowany mechanizm działania zespołu PS2 pozwalają sądzić, że donorowa część PS2 wraz z zespo-

łem enzymatycznym rozkładającym wodę (kompleks Z) przylegającą do wewnętrznej powierzchni tylakoidu.



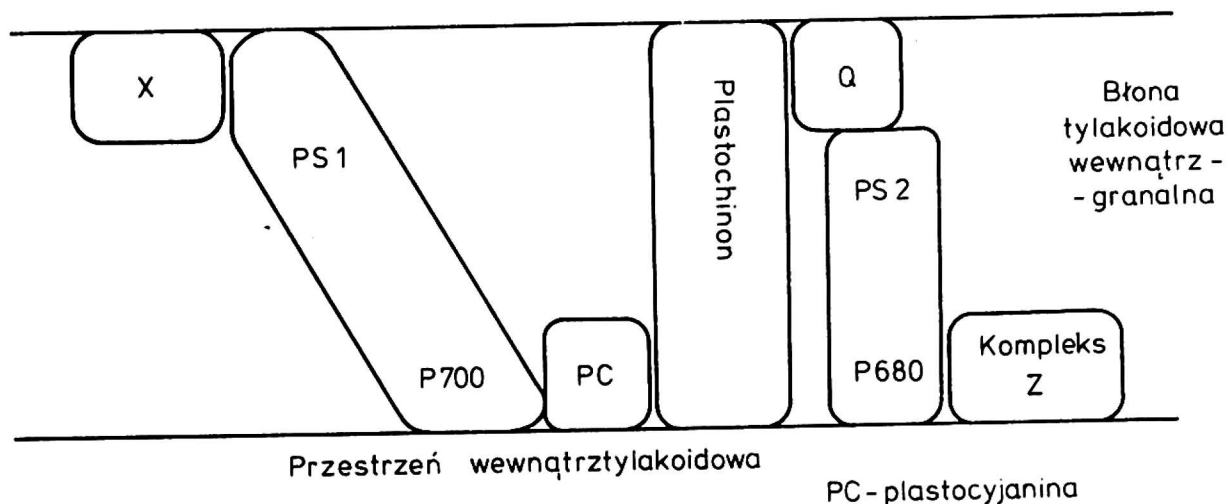
Rys. 2. Schemat lokalizacji cząsteczek ATP-azy i reduktazy ferredoksyna-NADP<sup>+</sup> na błonach tylakoidowych; o - ATP-aza; • - reduktaza ferredoksyna - NADP<sup>+</sup>

Przedstawione rozważania nad lokalizacją składników aparatu fotosyntetycznego prowadzą do następujących wniosków:

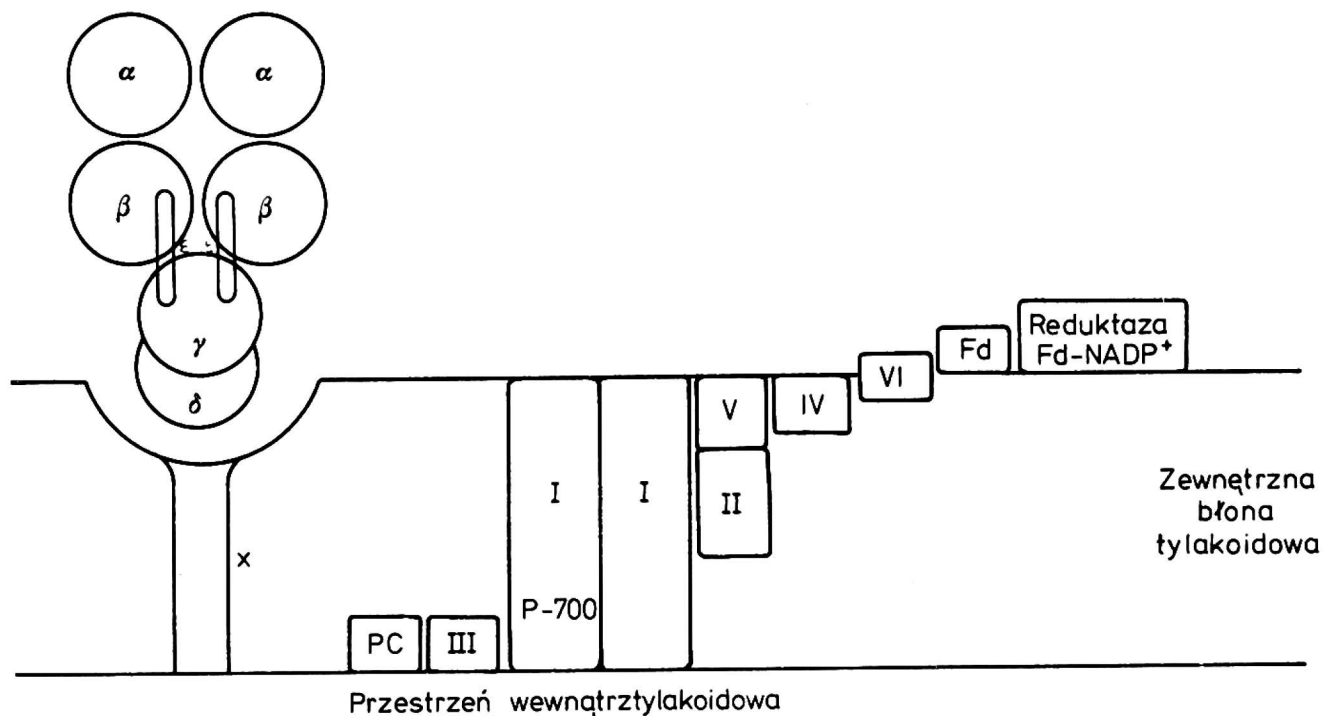
1) enzymy katalizujące redukcję NADP<sup>+</sup> (reduktaza ferredoksyna-NADP<sup>+</sup>) i syntezę ATP (ATP-aza) są zlokalizowane tylko na powierzchniach tylakoidów, stykających się ze stromą (rys.2); wydaje się to uzasadnione m.in. tym, że w stromie przebiegają reakcje cyklu Calvina, zużywające ATP i NADPH do syntezy węglowodanów;

2) w zewnętrznych błonach tylakoidowych znajduje się głównie zespół PS1, gdyż aktywność zespołu PS2 z lamell stromy jest około 5 razy mniejsza od aktywności tego zespołu z lamell gran [1], natomiast zespoły PS1 i PS2 są zlokalizowane w błonie wewnętrznej (rys. 2); transport elektronów od PS2 w błonach wewnętrznych do PS1 w błonach zewnętrznych lub od PS1 w błonach wewnętrznych do reduktazy ferredoksyna-NADP<sup>+</sup> w błonach zewnętrznych wymaga udziału ruchliwego nośnika elektronów; wg Sane i wsp. [84] dyfuzja niskocząsteczkowego nośnika na odległość 2-3 nm nie byłaby najwolniejszym stadium asymilacji CO<sub>2</sub>;

3) obydwie zespoły PS1 i PS2 oraz ATP-aza, a także inne składniki łańcucha transportu elektronów są rozmieszczone asymetrycznie w błonie tylakoidowej.



Rys. 3. Schemat lokalizacji składników wewnątrzgranalnej błony - partition

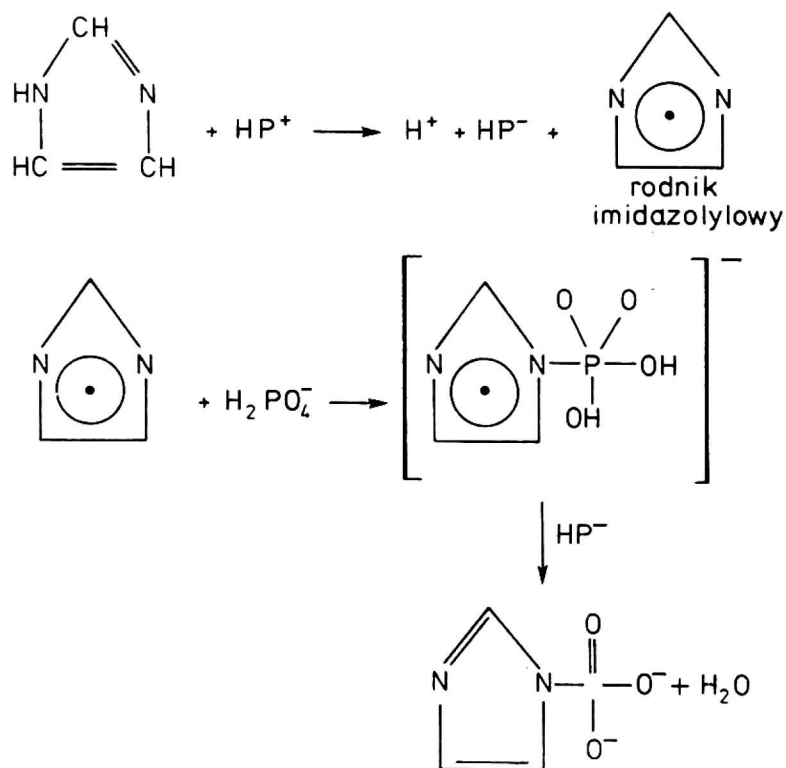


Rys. 4. Schemat lokalizacji składników zewnętrznej błony tylakoidowej; PC - plastocyjanina, Fd - ferredoksyna, I-VI - podjednostki zespołu PS1, X - integralne białko wchodzące w skład ATP-azy;  $\alpha$ - $\epsilon$ - podjednostki czynnika sprzęgającego  $CF_1$  wg [66]

Na rysunku 3 przedstawiono schematycznie lokalizację składników partition, natomiast na rysunku 4 - lokalizację składników błony zewnętrznej tylakoidu, przy czym uwzględniono tu hipotetyczną strukturę podjednostkową zespołu PS1 [65] oraz czynnika sprzęgającego  $CF_1$  [63].

## ZJAWISKA TOWARZYSZĄCE TRANSPORTOWI ELEKTRONÓW

Jeśli przyjąć schemat lokalizacji składników łańcucha transportu elektronów, podany na rysunkach 3 i 4, wtedy przeniesieniu jednego elektronu od  $H_2O$  do  $NADP^+$  winno towarzyszyć związanie dwóch protonów z fazy zewnętrznej ( $1 H^+$  na  $1/2$  zredukowanego plastochochinonu  $PQ_2^{2-}$  oraz  $1 H^+$  na  $1/2 NADP^+$ ) oraz uwolnienie dwóch protonów do fazy wewnętrznej tylakoidu ( $1 H^+$  z  $1/2 H_2O$  i  $1 H^+$  przy utlenieniu  $1/2 PQH_2$ ), czyli przeniesienie dwóch protonów z fazy zewnętrznej do wewnętrznej. Doświadczalnie stwierdzono [47], że naświetlanie chloroplastów w słabo zbuforowanym roztworze powoduje podwyższenie pH roztworu, a ponadto, że proces ten jest ściśle sprzężony z transportem elektronów [68].



Rys. 5. Schemat fotochemicznej reakcji hematoporfiryny (HP) z imidazolem i reakcji fosforylacji imidazolu

Istnieje duża rozbieżność danych literaturowych o stosunku ilościowym przeniesionych protonów do elektronów ( $H^+ / e^-$ ). Ze schematu wynika, że stosunek ten powinien być równy 2. Doświadczalnie natomiast, zależnie od metody i warunków pomiaru stwierdzano wartości od 1 do 6,7; wartość 1 uzyskano z zastosowaniem elektro-



dy szklanej i pomiarem stosunku szybkości wypływu protonów w ciemności do stacjonarnej szybkości ich transportu na świetle [96], wartość 2 [33] - z zastosowaniem techniki błyskowej i pomiarem początkowych szybkości transportu protonów [34] oraz wartość 6,7 - z zastosowaniem techniki barwnika - wskaźnika pH [87], którą uzyskał Heath [40] dla cyklicznego transportu elektronów, wzbudzanego promieniowaniem  $\geq 700$  nm, absorbowanym przez PS1.

Transport protonów przez błonę tylakoidową można scharakteryzować dwiema wielkościami, ilością przeniesionych protonów i gradientem pH ustalonym wskutek przeniesienia protonów. Obie te wielkości są funkcjami pH roztworu, w którym są zawieszane chloroplasty. Optymalną ilość przeniesionych protonów zaobserwowano w pH około 6,5, natomiast optymalny gradient pH powstaje w chloroplastach zawieszonych w środowisku o pH około 8,5. W tych warunkach  $\Delta \text{pH} = 3,5$  [82]. Optymalne warunki dla gradientu pH są równocześnie warunkami optymalnej szybkości fosforylacji, co świadczy o związku gradientu pH i szybkości fosforylacji. Portis i McCarty [73] wykazali, że logarytm szybkości fosforylacji jest liniową funkcją  $\Delta \text{pH}$ .

O związku między transportem protonów a fosforylacją świadczy też działanie niektórych inhibitorów fosforylacji i rozprzegaczy. Działanie takie wykazuje jonofor - nigerycyna, która może przenikać przez błonę w formie skompleksowanej z jonem metalu lub protonem. Wymienny transport protonów na zewnątrz i jonów  $\text{K}^+$  do wewnątrz tylakoidów wyrównuje pH po obu stronach błony tylakoidowej, równocześnie nigerycyna rozprzega fosforylację od transportu elektronowego [90]. Inny mechanizm działania, ale podobne skutki, tzn. hamowanie powstawania gradientu pH i rozprzeganie fosforylacji obserwuje się w przypadku amin, które przenikają przez błonę w formie niezdisocjowanej i wiążą jony  $\text{H}^+$  w wewnętrznej przestrzeni tylakoidu.

Lokalizacja składników łańcucha transportu elektronowego w błonie tylakoidowej i uporządkowany, wektorowy transport elektronów są źródłem innego, ważnego zjawiska towarzyszącego transportowi elektronów - powstawania gradientu potencjału membranowego i pola elektrycznego w poprzek błony. Endogennym wskaźnikiem powstającego pola jest jeden ze składników aparatu fotosyntetycznego - luteina, która wykazuje silny efekt elektrochromowy, tzn. zmianę widma absorpcyjnego pod wpływem pola elektrycznego. Maksymalne

zmiany widma obserwuje się w pasmie 515–518 nm. Stosując tę technikę Wolff i wsp. [108] stwierdzili, że różnica potencjałów w poprzek błony,  $\Delta \phi$  powstaje pod wpływem błysku laserowego w czasie  $\leq 20$  ns, jest więc bezpośrednio związana z fotoindukowanym przeniesieniem elektronów. Wykazano również [88], że pole elektryczne jest generowane przez obydwie zespoły PS1 i PS2, oraz, że w warunkach nasycenia światłem  $\Delta \phi$  jest równe około 100 mV (biegun + wewnątrz tylakoidu). W utrzymaniu tej różnicy potencjałów ważną rolę odgrywa wywołane transportem elektronów przeniesienie jonów. Omówionemu wyżej przeniesieniu protonów towarzyszy wpływ jonów  $K^+$  i  $Mg^{2+}$  z wnętrza tylakoidu do stromy [23] oraz skierowane równoległe do ruchu protonów przeniesienie jonów  $Cl^-$  [22]. Różnicę potencjałów  $\Delta \phi$  wynikającą z różnicy stężeń jonów po obu stronach błony tylakoidowej można zniwelować, działając na chloroplasty równocześnie jonoforem (np. nigerycyną, która niweluje gradient pH, wymieniając we wnętrzu tylakoidu jony  $H^+$  na  $K^+$ ) oraz antybiotykiem (np. walinomycyną, która przenosi jony  $K^+$  z wnętrza tylakoidu do stromy, do wyrównania stężenia jonów  $K^+$  po obydwóch stronach błony).

Grupa Witta [9] udowodniła bezpośredni związek między różnicą potencjału membranowego  $\Delta \phi$  a tworzeniem ATP [9]; przy stałym gradiencie pH = 2 wydajność tworzenia ATP jest liniową funkcją  $\Delta \phi$ . Jeśli przyjąć, że pojemność elektryczna błony tylakoidowej jest stała, wtedy  $\Delta \phi$  jest proporcjonalna do liczby ładunków przeniesionych przez błonę, co prowadzi do wniosku, że wydajność tworzenia ATP powinna być stechiometrycznie związana z liczbą protonów powodujących naładowanie błony. Rozumując w ten sposób, Gräber i Witt [32] doszli do wniosku, że maksymalne nachylenie prostej  $\Delta ATP = f(\Delta \phi)$ , występujące przy  $\Delta pH = 2,7$  odpowiada tworzeniu jednej cząsteczki ATP na cztery protony przeniesione przez błonę.

Rozważając zjawiska towarzyszące transportowi elektronów należy wymienić również zmiany konformacyjne błony tylakoidowej i jej składników, indukowane światłem. Stwierdzono, że naświetlenie powoduje odwracalne zmniejszenie grubości podwójnej warstwy błon wewnątrzgranalnych o 25%. Tej makroskopowej zmianie błony towarzyszy indukowana światłem zmiana stopnia odsłaniania różnych grup (głównie aminowych i karboksylowych) na powierzchni błony [26,27] oraz zmiany ustawienia względem powierzchni tylakoidu cząsteczek cytochromu f i cytochromu b-559 [44].

Najdokładniej poznano zmiany konformacyjne czynnika sprzęgającego  $CF_1$ . Ryrie i Jagendorf [83], mierząc wbudowanie trytu, wykryli indukowane światłem i wrażliwe na rozprzegacz zmiany konformacyjne tego białka; wymianie na tryt ulega na świetle 50-100 atomów wodoru na cząsteczkę  $CF_1$ . Badając ATP-azę z silnie związanymi nukleotydami wykazano [55,39], że indukowane światłem zmiany konformacyjne zachodzą głównie w centrum aktywnym enzymu. Z badań nad ATP-azę znakowaną fluoreskaminą Kraayenhof i Slater [51] wnoszą, że światło powoduje przesunięcie zewnętrznych grup aminowych do wnętrza białka; półokres tego procesu, wrażliwego na inhibitor przeniesienia energii Dio-9, wynosi około 45 ms. Harnischfeger [37] badał wpływ modyfikacji grup aminowych tylakoidu fluoreskaminą na pierwotne procesy fotosyntezy. Stwierdził, że modyfikacja ta nie ma istotnego wpływu na transport elektronów, tworzenie gradientu pH i różnicy potencjału membranowego, natomiast wpływa na aktywność ATP-azy i fosforylację. Autor sądzi, że wolne grupy aminowe uczestniczą w przemianie energii.

### FOSFORYLACJA

Jak już wspomniano na wstępie, doświadczalnie udowodniono, że istnieje ścisłe sprzężenie między fotosyntetycznym transportem elektronowym a fosforylacją. W odróżnieniu od oksydatywnej fosforylacji mitochondrialnej, fosforylacja fotosyntetyczna może być związana z dwoma różnymi procesami przeniesienia elektronów:

- niecyklicznym od wody do  $NADP^+$ ; w tym przypadku fosforylację (nazywaną fosforylacją niecykliczną) można opisać sumarycznym równaniem  $NADP^+ + H_2O + ADP + P_i \longrightarrow NADPH + 1/2 O_2 + ATP + H^+$  wg której fosforylacji niecyklicznej towarzyszy wydzielanie tlenu i redukcja  $NADP^+$ ,

- cyklicznym wokół jednego z zespołów barwnikowych PS1 lub PS2; w tym przypadku cykliczny przepływ elektronów nie prowadzi do trwałego utlenienia lub redukcji przenośników elektronów, dzięki czemu tzw. fosforylację cykliczną można opisać reakcją  $ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O$ .

Dla niecyklicznej fosforylacji stosunek liczby cząsteczek utworzonego ATP do liczby elektronów przeniesionych od  $H_2O$  do  $NADP^+$  określa liczbę miejsc sprzężenia fosforylacji z transportem elektronowym. Przyjmując (jak dla mitochondrialnej fosforylacji),

że przejście dwóch elektronów przez „miejsce” powoduje utworzenie 1 cząsteczki ATP, stosunek  $ATP/2e^- = 1,0$  oznaczałby istnienie jednego miejsca sprzężenia,  $ATP/2e^- = 2,0$  - dwóch takich miejsc.

Doświadczalnie, zależnie od warunków pomiaru i stanu izolowanych chloroplastów, otrzymuje się różne wartości stosunku  $ATP/2e^-$ . Dla chloroplastów klasy A lub B Reeves i Hall [80] otrzymali wartości 1,5-2,0. Istnienie dwóch miejsc sprzężenia potwierdzono działaniem specyficznych inhibitorów, donorów i akceptorów. Umożliwiło to zarazem lokalizację miejsc sprzężenia. Jedno z miejsc zostało zlokalizowane przez Böhme i Cramera [16,17] między PQ a cytochromem f; drugie miejsce zidentyfikowano dopiero po zastosowaniu dwubromotymochinonu, analogu plastochinonu, który nie przeszkadza redukcji PQ, ale uniemożliwia powrotne utlenienie  $PQH_2$ . W tych warunkach fosforylację, towarzyszącą przeniesieniu elektronów od wody do sztucznego akceptora - żelazicyjanku, można przypisać miejscu zlokalizowanemu przy PS2 [94,97]. Według Rosa i Halla [80] ten proces fosforylacji jest bezpośrednio związany z utlenieniem wody i uwolnieniem protonów.

Dalsze badania wykazały, że dla zwykłych, częściowo rozprężonych chloroplastów, dla każdego miejsca sprzężenia otrzymuje się stosunek  $ATP/2e^- = 0,3-0,6$ , czyli w sumie dla dwóch miejsc wartość około 1,0, natomiast dla ściśle sprzężonych chloroplastów każde miejsce wykazuje stosunek  $ATP/2e^- = 1,0$  [41]. Jeśli wziąć pod uwagę, że wektorialne przeniesienie jednego elektronu od  $H_2O$  do  $NAPD^+$  powoduje przeniesienie dwóch protonów w poprzek błony, to stosunek  $ATP/2e^- = 2,0$  dla całego łańcucha transportu elektronowego jest zgodny z wartością  $\Delta H^+ / \Delta ATP = 4$ , podaną przez Gräbera i Witta [32].

Badano również „miejsca” cyklicznej fosforylacji. O występowaniu tego procesu w warunkach in vivo świadczą doświadczenia Bedella i Govindjee [6], którzy stwierdzili, że w glonach i liściach roślin wyższych występuje indukowany światłem wzrost poziomu ATP, niewrażliwy na działanie inhibitorów transportu elektronów (np. dwuchlorofenylo-dwumetylomocznika, hamującego przepływ elektronów między Q i PQ). Doświadczenia te potwierdziły zarazem wcześniejsze obserwacje Böhme i Cramera [17] o zlokalizowaniu miejsca cyklicznej fosforylacji przy PS1; w tym cyklicznym przepływie elektronów, sprzężonym z fosforylacją uczestniczą PS1 (jako indukowana światłem pompa elektronów), ferredoksyna, PQ/ $PQH_2$  (jako nośnik

protonów od stromy do wnętrza tylakoidu), cytochrom f i plastocyjanina.

Drugie miejsce fosforylacji cyklicznej, związane z funkcją PS2, zidentyfikowali Yocum i wsp. [101-104]. Stwierdzili oni, że w chloroplastach, w obecności KCN (hamującego przepływ elektronów przez plastocyjaninę do PS1), hydroksylaminy (eliminującej donor elektronów - wodę) i p-fenylendwuaminy (kofaktor fosforylacji) obserwuje się indukowaną światłem syntezę ATP, hamowaną działaniem dwuchlorofenylodwumetylomocznika i dwubromotymochinonu.

### MECHANIZM FOSFORYLACJI FOTOSYNTETYCZNEJ

Przedstawione wyniki świadczą o złożoności procesów indukowanych światłem w błonie tylakoidowej. Nie jest więc dziwne, że trudno znaleźć odpowiedź na pytanie, jaki jest molekularny mechanizm przemiany energii elektronów, uwalnianej w łańcuchu reakcji redoks w energię wysokoenergetycznego wiązania ATP. Zagadnienie to jest przedmiotem wielu hipotez [11,14,105], z których najważniejsze będą omówione.

#### Hipoteza chemicznego sprzężenia transportu elektronów i fosforylacji

Według tej hipotezy, postulowanej przez Slatera [93] oraz Chance i Williamsa [18] przeniesienie energii następuje dzięki tworzeniu wiązań chemicznych między przenośnikami elektronów i enzymami lub substratami fosforylacji. Ilustracją tego mechanizmu jest dobrze poznany proces fosforylacji substratowej. W procesie tym  $\alpha$ -ketoglutaran reagując ze zredukowanym koenzymem A w obecności dehydrogenazy  $\alpha$ -ketoglutaranu i  $\text{NAD}^+$ , tworzy bursztynylo-koenzym A;  $\alpha$ -ketoglutaran +  $\text{NAD}^+$  + CoA-SH bursztynylo-CoA +  $\text{CO}_2$  +  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . W następnej złożonej reakcji, katalizowanej przez syntetazę bursztynylo-CoA następuje przeniesienie CoA na enzym, wymiana tej grupy na grupę fosforanową z utworzeniem w centrum aktywnym enzymu wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego 3-fosfohistydyny. W ostatnim stadium następuje przeniesienie grupy fosforanowej  $\text{P}_i$  na substrat GDP z uwolnieniem enzymu. Sumarycznie reakcje te można zapisać równaniem: bursztynylo-CoA +  $\text{P}_i$  + GDP  $\rightarrow$  bursztynian

+ GTP + CoA-SH. Proces fosforylacji substratowej prowadzi więc do zmagazynowania energii utlenienia  $\alpha$ -ketoglutaranu w formie wysokoenergetycznego wiązania GTP.

W modelowym układzie podobny proces przeprowadzili Shu-I Tu i Wang [92]. Stwierdzili oni, że hematoporfiryna naświetlana w obecności imidazolu i fosforanu przechodzi w formę wzbudzoną, która odrywa elektron i proton od cząsteczki imidazolu. Rodnik imidazolyłowy (wykrywany sygnałem EPR) reaguje z fosforanem tworząc nietrwały rodnik fosfoimidazolyłowy, który redukuje się do stabilnego fosfoimidazolu zredukowaną w pierwszym stadium reakcji cząsteczką hematoporfiryny (rys. 5). W ostatecznym wyniku zespół omówionych reakcji prowadzi do zmagazynowania energii wzbudzenia hematoporfiryny w wysokoenergetycznym wiązaniu 1-fosfoimidazolu. Autorzy sądzą, że podobny proces może przebiegać *in vivo* w mitochondriach i chloroplastach z udziałem reszty imidazolowej histydyny, brak jednak na to dowodów doświadczalnych.

Griffiths i wsp. [33] badali wpływ nienasyconych kwasów tłuszczowych na fosforylację oksydacyjną. Stwierdzili oni, że mitochondria izolowane z auktotrofu drożdży, rosnącego na pożywce w warunkach niedoboru kwasów tłuszczowych, nie są zdolne do syntezy ATP w obecności antymycyny (blokującej przeniesienie elektronów między cytochromem b i cytochromem  $c_1$ ), rotenonu (blokującego przeniesienie elektronów od flawoproteidu  $FP_1$  do ubichinonu CoQ) oraz kwasu dwuhydroliponowego (substrat). Tę aktywność przywraca dodatek kwasu olejowego lub olejo-CoA. Według autorów kwasy tłuszczowe, *cis* mono- lub dwuenowe, pełnią funkcję kofaktora fosforylacji a nie czynnika, wpływającego tylko na stan fizyczny błony.

Według Rackera [75,76] dalszych badań wymaga sprawdzenie możliwości udziału pośredników typu acylo-fosforanu w procesie fosforylacji. Na uwagę zasługują również doświadczenia Ramireza i Marecka [77] nad udziałem fosforanów cyklicznych en-dioli w tym procesie.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu, hipoteza najprostszego mechanizmu chemicznego sprzężenia transportu elektronów i fosforylacji znajduje częściowe potwierdzenie w doświadczeniach modelowych z udziałem różnych kofaktorów - pośredników. W układach naturalnych nie udowodniono jednak dotychczas przejściowego powstawania związków, przenoszących energię wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego.

### Chemiosmotyczna teoria Mitchella

Mitchell przyjął za podstawę swojej teorii chemiosmotycznego sprzężenia cztery następujące postulaty [59-62]:

1) syntetaza ATP jest ulokowaną w chemiosmotycznej błonie, odwracalną ATP-azą, posiadającą charakterystyczną stechiometrię przeniesionych protonów do wiązania fosforu nieorganicznego  $H^+/P$ ;

2) łańcuchy oddechowy i fotoredoksy są układami, ulokowanymi w chemiosmotycznej błonie, posiadającymi charakterystyczną stechiometrię  $H^+/2e$  i posiadającymi przy normalnej aktywności redoksowej zdolność przenoszenia protonów przez błonę w tym samym kierunku, w jakim przenosi je ATP-aza hydrolicyzując ATP;

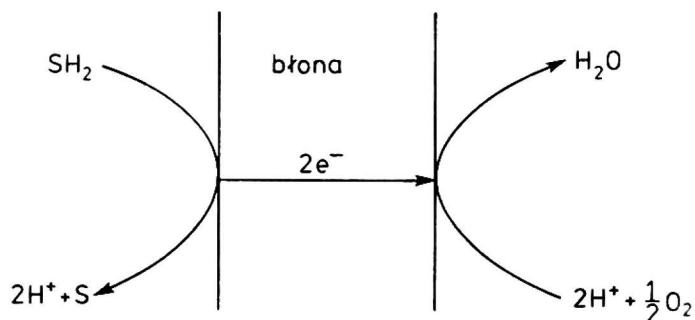
3) istnieją rozpuszczone w błonie układy przenośników, wiążące protony i zapewniające stabilizację osmotyczną i transport metabolitów;

4) układy syntetazy ATP i przenośników tworzą kanały poprzez topologicznie zamkniętą, izolującą błonę zwaną błoną sprzęgającą, która ma niewodną fazę tworzącą barierę osmotyczną o niskiej przepuszczalności dla substancji rozpuszczonych, szczególnie dla jonów  $H^+$  i  $OH^-$ .

Istotą procesu chemiosmotycznego jest wektorowo zorganizowane przeniesienie specyficznych grup chemicznych przez barierę osmotyczną. Różnicę między normalną reakcją chemiczną i procesem chemiosmotycznym można zilustrować czterema przykładami:

Reakcja chemiczna utlenienia związku  $SH_2$  tlenem przebiega wg równania:  $SH_2 +$

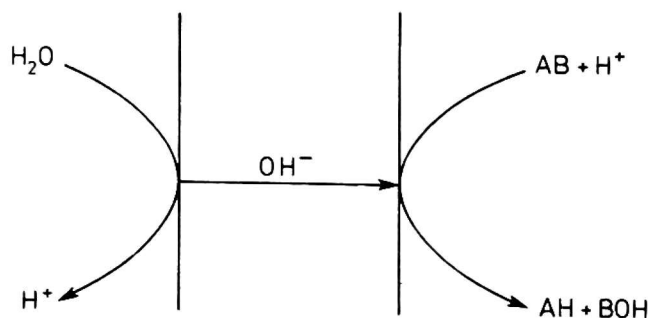
$1/2 O_2 \rightarrow S + H_2O$ . Jeśli reakcja ta będzie przebiegała w dwóch fazach wodnych (o tym samym potencjale chemicznym wody), oddzielonych błoną, tworzącą barierę osmotyczną i zawierającą przenośniki elektronów, wtedy odpowiadający omawianej reakcji chemicznej proces chemiosmotyczny będzie przebiegał wg schematu przedstawionego na rysunku 6. Proces ten chemicznie nie różni się od poprzedniego, lecz prowadzi do zmiany stężeń jonów wodorowych po obydwóch stro-



Rys. 6. Schemat procesu chemiosmotycznego  $SH_2 + 1/2 O_2 + 2 H^+ \rightarrow S + H_2O + 2 H^+$

nach błony tak, że energia swobodna przeniesionych elektronów jest zamieniana w potencjał osmotyczny związany z różnicą pH.

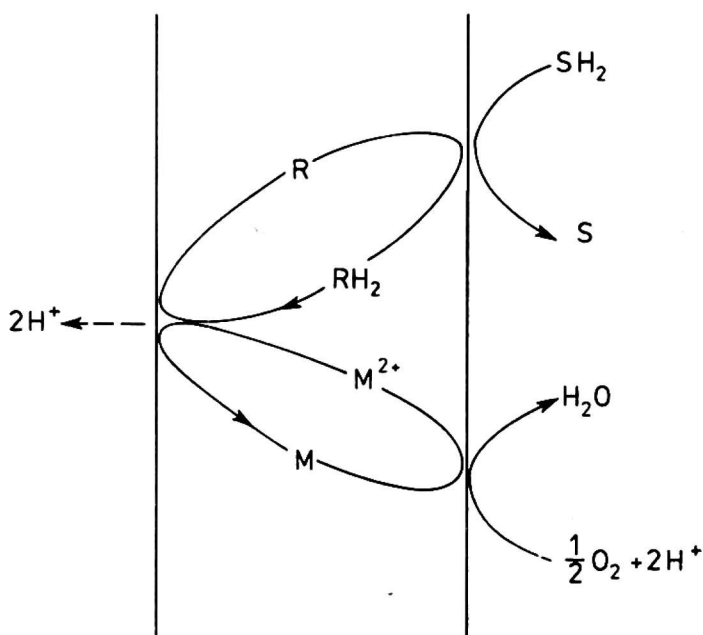
Do podobnych wniosków o magazynowaniu energii w formie różnicy pH i potencjału osmotycznego prowadzi porównanie chemicznej reakcji hydrolizy związku AB:  $AB + H_2O \rightarrow AH + BOH$  oraz odpowiadającego jej procesowi chemiosmotycznemu (rys. 7). Podane w schemacie przeniesienie jonów  $OH^-$  (z udziałem odpowiednich przenośników) z fazy L do P może być zastąpione przeniesieniem jonów  $H^+$  w stronę przeciwną.



Rys. 7. Schemat chemiosmotycznego procesu  $AB + H_2O + H^+ \rightarrow AH + BOH + H^+$

W chemiosmotycznej teorii Mitchella istotną rolę odgrywa pojęcie pętli, tzn. układu współdziałających ze sobą przenośników wodoru i elektronu. Dzięki pętli, złożonej z przenośników wodoru  $R/RH_2$  i przenośników elektronów  $M/M^{2+}$  obie częściowe procesy utlenienia  $SH_2$ , przebiegając z jednej strony błony, prowadzą nadal do powstania różnicy pH (rys. 8).

Zgodnie z postulatami teorii chemiosmotycznej syntetaza ATP jest odwracalną ATP-azą, zlokalizowaną w błonie i katalizującą proces wg schematu podanego na rysunku 9 (strzałki na schemacie odpowiadają reakcji hydrolizy ATP). Porównanie tego schematu procesu chemiosmotycznego z normalną, chemiczną reakcją hydrolizy ATP prowadzi do następujących wniosków: dla reakcji hydrolizy  $ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + POH$  stała równowagi jest określona równaniem:

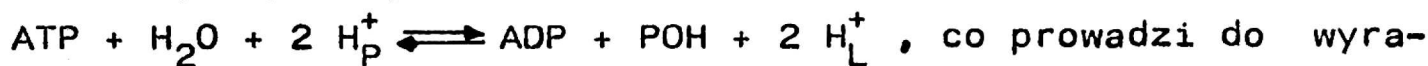


Rys. 8. Schemat działania pętli - układu współdziałających przenośników wodoru ( $R/RH_2$ ) i elektronów ( $M/M^{2+}$ )



$$K = K' \{H_2O\} = \frac{\{ADP\} \{POH\}}{\{ATP\}},$$

gdzie nawiasy oznaczają aktywności reagentów. Gdy natomiast proces przebiega jako chemiosmotyczny, należy uwzględnić stężenia jonów wodorowych po obydwóch stronach błony:

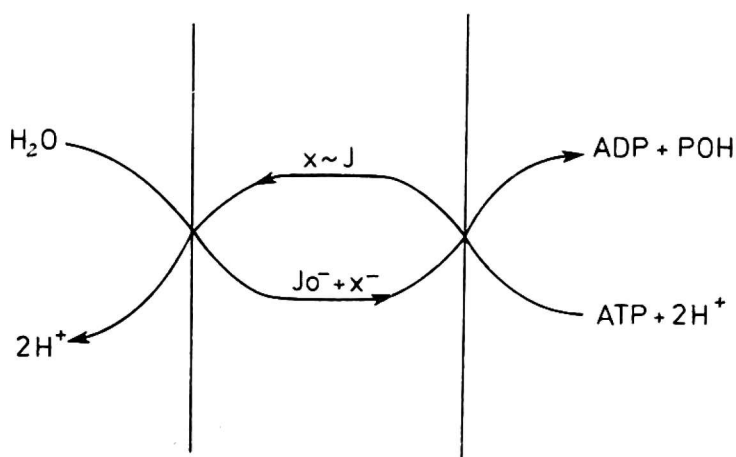


żenia:

$$\frac{\{ADP\} \{POH\}}{\{ATP\}} = K' \{H_2O\} \frac{\{H^+\}_P^2}{\{H^+\}_L^2},$$

przy założeniu, że ADP, ATP i POH znajdują się w tej samej fazie P.

Należy w tym miejscu podkreślić, że przeniesienie protonów ze strony prawej na lewą wywołuje równocześnie dwa skutki: powoduje wzrost stężenia jonów  $H^+$  (zakwaszenie) lewej fazy i nadaje tej fazie ładunek elektryczny dodatni względem fazy P. Uwzględniając różnicę potencjału membranowego  $\Delta\phi$  (mV) i definicję pH można określić równowagowe stężenia jonów  $H^+$  równaniem



Rys. 9. Schemat działania ATP-azy: X, I - przenośniki elektronów i jonów tlenu

$$\log \frac{\{H^+\}_L}{\{H^+\}_P} = pH_P - pH_L + \frac{\Delta\phi}{Z}, \quad \text{gdzie } Z = \frac{2,3 \cdot RT}{F}.$$

Podstawienie tego równania do wyjściowego prowadzi do wyrażenia

$$\log \frac{\{ATP\}}{\{ADP\} \{POH\}} = 2 \left( pH_P - pH_L + \frac{\Delta\phi}{Z} \right) - \log K' \{H_2O\}.$$

W temperaturze  $25^\circ C$   $Z = 60$  mV. Dla reakcji hydrolizy ATP  $\log K' \{H_2O\} = 5$ .

Zakładając, że aktywności są w przybliżeniu równe stężeniom, a stężenie fosforanu w warunkach *in vivo*  $[POH] = 0,01 \text{ M}$ , równanie powyższe można uprościć do postaci

$$\log \frac{[ATP]}{[ADP]} = \log [POH] + 2 \Delta pH + \frac{\Delta \phi}{30} - 5 = \frac{\Delta \phi}{30} + 2 \Delta pH - 7;$$

gdzie  $\Delta pH = pH_p - pH_L$ . Równanie to wynika z postulatów teorii chemiosmotycznej i prowadzi do wniosku, że dla otrzymania równowagowego stosunku stężeń  $[ATP] / [ADP] = 1 : 1$  w warunkach fizjologicznych potrzebna jest różnica potencjału „protonomotorycznego” ( $\Delta p = \Delta \phi + \Delta pH$ )

$$\Delta p = \Delta \phi + 60 \Delta pH = 210 \text{ mV.}$$

Dyskusję zależności różnicy potencjału protonomotorycznego od entalpii swobodnej tworzenia ATP  $\Delta G'$ , która w zależności od warunków może zmieniać się w granicach od  $-7,3$  do  $-13,5$  kcal/mol ( $-30,5$  do  $-56,5$  kJ/mol) podał Jagendorf [46] dochodząc do wniosku, że  $\Delta p$  może przyjmować różne wartości: od 118 mV przy założeniu  $\Delta G' = -8,1$  kcal/mol i  $H^+/ATP = 3$  do 336 mV dla  $\Delta G' = 15,5$  kcal/mol i  $H^+/ATP = 2$  ( $\Delta G' = -33,9$  oraz  $64,8$  kJ/mol).

Postulaty teorii Mitchella i możliwość syntezy ATP wg mechanizmu chemiosmotycznego poddawano wielokrotnie weryfikacji doświadczalnej. Zgodnie z założeniami Mitchella stwierdzono, że błonę tylakoidową cechuje niskie przewodnictwo dla jonów  $H^+$  i  $OH^-$  [20,52,74]; wykazano też, że sprzężenie transportu elektronowego i fosforylacji zależy od osmotycznych własności układu [72, 65].

Poważne rozbieżności wynikają przy doświadczalnym ustaleniu rzeczywistego stosunku przeniesionych jonów  $H^+$  do liczby elektronów przepływających przez miejsce sprzężenia. Z teorii Mitchella wynika, że stosunek ten winien wynosić  $H^+/2e^- = 2$ . Doświadczalnie stwierdzono (jak już podano) wartości zawarte w granicach 1 do 6,7 dla stosunku  $H^+/e^-$  dla całego łańcucha transportu elektronowego, więc na dwa miejsca. Rozbieżności te mogą wynikać z różnego stanu błony i stopnia sprzężenia, należy jednak podkreślić, że wartości wyższe od 2 są niezgodne z teorią Mitchella.

Przeniesienie transmembranowe protonów wymaga wg teorii Mitchella istnienia pętli, tzn. właściwie w błonie zorientowanych

układów przenośników elektronów i jonów wodoru. Przenośniki takie zidentyfikowano we wszystkich błonach sprzęgających, ale ich lokalizacja jest ciągle przedmiotem badań. Według de Pierre i Ernster [22] dotychczasowe wyniki badań nad topologią składników błony mitochondrialnej są sprzeczne z topologią przewidywaną na podstawie teorii Mitchella.

W chwili obecnej trudno ocenić, czy wymienione tu rozbieżności wynikają z niewłaściwych warunków pomiaru (np. zmiany strukturalne błony w czasie badań topologii, czy częściowego rozprężenia i nieprawidłowe założenia przy uwzględnianiu poprawek na elektronowy transport podstawowy i na warunki stacjonarne przy obliczaniu stosunku  $H^+/2e^-$ ), czy świadczą one rzeczywiście przeciwko teorii Mitchella. Teoria ta umożliwiła przewidywanie wyników szeregu doświadczeń, logicznie tłumaczy obserwacje, spośród których, oprócz wymienionych na uwagę zasługują następujące: Jagendorf i Uribe [48] wykazali, że chloroplasty w ciemności mogą syntetyzować ATP kosztem sztucznie wytworzonego gradientu pH ( $\Delta pH = 4$ ) wpoprzek błony tylakoidowej.

Boeck i Witt [9] stwierdzili, że gramicydyna D, zastosowana w stosunku gramicydyna: chlorofil =  $1:1,10^5$  (co odpowiada w przybliżeniu 1 cząsteczce gramicydyny D na 1 tylakoid) powoduje przy wzrastających stężeniach równoległe obniżanie czasu zanikania pola elektrycznego wywołanego  $\Delta p$  i wydajności tworzenia ATP. Dane te przemawiają za ścisłym związkiem między syntezą ATP a gradientem pH i różnicą potencjału membranowego, a więc za słusznością założeń Mitchella. Obszerną analizę znaczenia pola elektrycznego dla przemiany energii w błonie tylakoidowej opracował ostatnio Witt [107].

### Hipoteza konformacyjna

Z rozważań wynika, że wg postulatów teorii chemiosmotycznej w błonie sprzęgającej energia reakcji redoks lub hydrolizy ATP może być odwracalnie przetwarzana w pole elektryczne, gradient protonów lub innych jonów. Podstawą hipotezy konformacyjnej jest natomiast postulat, że w błonie sprzęgającej przetwarzanie energii można uzyskać przez konformacyjne zmiany białek. Autorem tej hipotezy jest Boyer [13], rozwinięto ją dalej w pracach Boyera [12] i Slatera [94,95].

Zagadnienie związanych z przeniesieniem energii zmian konformacyjnych opracował teoretycznie Lumry [53, 54], dochodząc do wniosku, że entalpie swobodne fosforylacji są małe i mogą być równoważne niewielkim zaburzeniom struktury białek, bez znaczących procesów rozładowania.

Według proponowanego, konformacyjnego mechanizmu sprzężenia energia, uwalniana w reakcjach redoks transportu elektronów, jest magazynowana w wysokoenergetycznych, naprężonych stanach konformacyjnych białka, uczestniczącego w przeniesieniu elektronów. Następnym etapem, wymagającym oddziaływań bliskiego zasięgu między sąsiednimi cząsteczkami jest przeniesienie energii (drogą odwracalnej wymiany energii między cząsteczkami w stanie wysokoenergetycznym i podstawowym) do sąsiednich cząsteczek i ostatecznie do ATP-azy.

Oddziaływanie między sąsiednimi cząsteczkami białek ma, przynajmniej częściowo, charakter elektrostatyczny. Koncepcję przejść elektronowo-konformacyjnych opracowali Czernawska i Czernawski [21]. Wyszli oni z założenia, że przeniesieniu elektronu do polaryzowanego ośrodka (cząsteczki) może towarzyszyć utworzenie tzw. nieliniowego polaronu, tzn. układu elektron - otoczenie, w którym obecność elektronu wywołuje deformację otoczenia, związaną z polaryzowalnością a przekraczającą granice sprężystości ośrodka. Proces ten przebiega bez rozpraszania energii i prowadzi, kosztem obniżenia energii elektronu, do utworzenia stanu energetycznego z lokalnym minimum energii, a więc do zmagazynowania energii w formie trwałej deformacji otoczenia (cząsteczki). Ta trwale zdeformowana cząsteczka z ładunkiem elektronu może oddziaływać elektrostatycznie na sąsiednie cząsteczki powodując ich zmiany konformacyjne; końcowym akceptorem energii i związanych z jej przeniesieniem zmian konformacyjnych jest cząsteczka ATP-azy.

Opisanym tutaj przejściem elektronowo-konformacyjnym może towarzyszyć tzw. „membranowy efekt Bohra” [19]. Jeśli w bezpośrednim otoczeniu jonu Fe (w cytochromach), lub innej czynnej w procesie redoks grupy znajdują się grupy aminowe lub karboksylowe, zmiana stanu redukcyjno-oksydacyjnego grupy czynnej, tzn. związanie lub uwolnienie ładunku elektronu może wpłynąć na zmianę pK grup  $-NH_2$  i  $-COOH$ . Powoduje to związane z reakcją redoks uwalnianie lub wiązanie protonów [73]. Według Boyera [13] proces ten może być odpowiedzialny za przeniesienie protonów (ze stałą stechiometrią

$H^+/e^-$ , niezależną od pH, jeśli grupy  $-NH_2$  lub  $-COOH$  są dostępne z jednej strony błony tylko w stanie sprotonowanym, a z drugiej strony błony - tylko w stanie niesprotonowanym.

Uwaga wielu laboratoriów koncentruje się obecnie na procesie wiązania substratów i produktów fosforylacji w centrum aktywnym ATP-azy. Harris i wsp. [38] stwierdzili, że nukleotydy mogą silnie wiązać się z błoną sprzęgającą lub izolowaną  $CF_1$ -ATP-azą (i mitochondrialną  $F_1$ -ATP-azą). Światło indukuje wymianę tych nukleotydów z nukleotydami z roztworu, co świadczy o odsłonięciu miejsc ich wiązania na świetle [39]. Badania kinetyki fosforylacji [92] dowiodły jednak, że szybkość fosforylacji ADP związanego jest znacznie mniejsza od szybkości reakcji wolnego ADP, co pozwala sądzić, że związany ADP nie występuje w formie aktywnego kompleksu  $ADP-CF_1$ , zdolnego do reakcji z  $P_i$ . Wnioski te są zgodne z wynikami Rosinga i wsp. [81], którzy stwierdzili, że do wiązania  $P_i$  w sposób właściwy dla syntezy ATP potrzebna jest energia. Zaobserwowali oni również, że odwracalna hydroliza związanego ATP do związanego ADP i  $P_i$  jest niewrażliwa na działanie rozprzegaczy, co oznacza, że gradient pH nie jest bezpośrednio wykorzystywany przy syntezie ATP.

Ilościowe pomiary pozwalają przypuszczać, że w syntezie ATP na ATP-azie uczestniczą dwa miejsca aktywne. Stało się to podstawą modelu zaproponowanego przez Kayalara i wsp. [49] oraz Boyera [14] uwzględniającego dwa symetryczne miejsca katalityczne, działające przemiennie wskutek zmian konformacyjnych ATP-azy. Formą trwałą enzymu jest białko z jednym miejscem aktywnym, zajęтым przez związany ATP. Drugie miejsce może przyjąć cząsteczki substratów  $P_i$  i ADP, ale ich wiązanie następuje dopiero przy zmianie konformacyjnej białka, zależnej od dostarczenia energii. Zmiana konformacji prowadzi do równoczesnego uwolnienia (z możliwością dyfuzji do medium) cząsteczki ATP na pierwszym miejscu aktywnym. Reakcja  $P_i + ADP = ATP$  na drugim miejscu aktywnym przywraca wyjściową, trwałą formę enzymu. W postulowanym mechanizmie działania ATP-azy autorzy nie wnikają w istotę sprzężenia gradientu pH ze zmianami konformacyjnymi, natomiast uwzględniają blokujące działanie czynników, modyfikujących tyrozyne [24] i argininę [56].

## UWAGI KOŃCOWE

Przedstawiony przegląd literatury obejmuje tylko najważniejsze wyniki badań nad mechanizmem fotofosforylacji, umożliwiające ocenę aktualnych koncepcji na temat tego procesu. Zdaniem autora niniejszego artykułu, dwie główne, obecnie rozpatrywane koncepcje, chemiosmotyczna i konformacyjna, nie dają możliwości pełnego wytłumaczenia obserwowanych doświadczalnie faktów. Krytykę teorii chemiosmotycznej można oprzeć m.in. na następujących doświadczeniach:

1) wspomniany poprzednio stosunek przeniesionych protonów do elektronów,  $H^+/e^- = 6,7$  [40], zaobserwowany dla cyklicznej fosforylacji jest sprzeczny z teorią chemiosmotyczną,

2) według dotychczasowych badań [23] topologia składników błony mitochondrialnej znacznie różni się od lokalizacji składników, przewidywanej przez teorię chemiosmotyczną i zapewniającej wydajne działanie pętli przenoszącej protony i elektrony przez błonę,

3) Komai i wsp. [50] stwierdzili, że syntezę ATP można przeprowadzić na bezpęcherzykowym preparacie z mitochondriów w warunkach, w których nie jest możliwe powstawanie gradientu pH i potencjału membranowego,

4) stwierdzono [70] brak korelacji kinetyki syntezy ATP i kinetyki ustalania gradientu pH i potencjału membranowego.

Hipoteza konformacyjna zawiera jeszcze wiele elementów niewyjaśnionych. Na uwagę zasługują co najmniej dwa. Jeśli przeniesienie energii, zmagazynowanej w formie trwałych zmian konformacyjnych cząsteczki białka, uczestniczącej w transporcie elektronowym, następuje drogą oddziaływań bliskiego zasięgu między sąsiadującymi cząsteczkami, wtedy wynika problem topologii składników błony tylakoidowej, zapewniającej wydajne przeniesienie energii do ATP-azy od składników uczestniczących w transporcie elektronowym, niecyklicznym (fosforylacja niecykliczna) względnie cyklicznym związanym z funkcją zespołu PS1 lub PS2. Jeśli ATP-aza jest zlokalizowana w zewnętrznych błonach tylakoidowych a zespół PS2 głównie w partition, wtedy w fosforylacji cyklicznej stymulowanej przez PS2 przeniesienie energii drogą oddziaływań bliskiego zasięgu jest niemożliwe.

Na razie brak jest danych doświadczalnych o pierwotnym akceptorze grupy fosforanowej  $P_i$ , wiążącym tę grupę w centrum aktywnym

ATP-azy w sposób właściwy dla fosforylacji. Zagadnienia tu wspomniane pozwalają przypuszczać, że w rzeczywistym procesie fosforylacji uczestniczą wszystkie (trzy) rozpatrywane mechanizmy, chemiczny (utworzenie wysokoenergetycznego wiązania  $P_i$  w centrum aktywnym ATP-azy) oraz chemiosmotyczny i konformacyjny, współdziałające przy przeniesieniu energii uwalnianej w reakcjach redoks transportu elektronów do centrum aktywnego ATP-azy.

Pewnych informacji o mechanizmie fosforylacji mogą dostarczyć dalsze badania nad zależnością fosforylacji od pH. Bornefeld [10] stwierdził, że fosforylacja indukowana przejściem ciemność - światło w sinicy *Anacystis nidulans* wykazuje dwa optima pH. Podobny efekt podwójnego optimum pH dla fosforylacji niecyklicznej ( $H_2O$  - metylowiologen) wykryto dla chloroplastów, izolowanych z liścieni i liści *Cucumis sativus* [7]. Dalsze badania winny wyjaśnić, czy efekt ten wiąże się z różnymi mechanizmami fosforylacji lub występowaniem dwóch form ATP-azy, różniących się optymalną wartością  $\Delta$  pH dla maksymalnej szybkości fosforylacji, albo optimum pH, w którym zmiany konformacyjne zapewniają maksymalną szybkość fosforylacji.

#### LITERATURA

1. Armond P.A., Arntzen C.J.: *Plant Physiol.* 59, 398-404, 1977
2. Arnon D.I., Whatley F.R., Allen M.B.: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 6324-6329, 1954
3. Barber J.: *Topics in photosynthesis. The intact chloroplast.* Elsevier, Amsterdam, 1, 1976
4. Barber J.: *Topics in photosynthesis, Primary processes of photosynthesis.* Elsevier, Amsterdam, 2, 1977
5. Barber J.: *Topics in photosynthesis. Photosynthesis in relation to model systems.* Elsevier, Amsterdam, 3, 1979
6. Bedell G.W., Govindjee: *Plant Cell Physiol.*, 14, 1081-1097, 1973
7. Bereza B., Kulig E., Hendrich W.: *III Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, Materiały*, 58, 1978
8. Berzborn R.J.: *Z. Naturforsch.*, 24B, 436-446, 1969
9. Boeck M., Witt H.T.: *Proc. 2nd Intern. Congr. Photosynthesis*, Junk N.V. Publishers, Hague, 2, 903-911, 1972
10. Bornefeld T.: *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 170, 333-344; 345-353, 1976
11. Boyer P.D.: *Oxidases and related redox systems* (T.E. King, H.S. Mason, M. Morison, Eds.) Willey, New York, 2, 994-1008, 1965
12. Boyer P.D.: *Dynamics of energy transducing membranes.* (L. Ernster, R.W. Estabrook, E.C. Slater, Eds.) Elsevier, Amsterdam, 289-301, 1974

13. Boyer P.D.: FEBS Lett., 58, 1-6, 1975
14. Boyer P.D.: Ann. Rev. Biochem., 46, 957-966, 1977
15. Boyer P.D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E.C.: Ann. Rev. Biochem., 46, 955-1026, 1977
16. Böhme H., Cramer W.A.: Biochim. Biophys. Acta 283, 302-311, 1972
17. Böhme H., Cramer W.A.: Biochemistry, 11, 1155-1160, 1972
18. Chance B., Williams G.R.: Advan. Enzymol., 17, 65-134, 1956
19. Chance B., Crofts A.R., Nishimura M., Price B.: Europ. J. Biochem., 13, 364-374, 1970
20. Cunarro J., Weiner M.W.: Biochim. Biophys. Acta, 387, 234-240, 1975
21. Czernawskaja N.M., Czernawski D.S.: Tunnelnyj transport elektronow w fotosintezie, Izd. Mosk. Uniwersiteta, 1977
22. De Pierre J.W., Ernster L.: Ann. Rev. Biochem., 46, 201-262, 1977
23. Dilley R.A., Vernon L.P.: Arch. Biochem. Biophys., 111, 365-374, 1965
24. Ferguson S.J., Lloyd W.J., Radda G.K.: Europ. J. Biochem., 54, 127-133, 1975
25. Frenkel A.: J. Am. Chem. Soc., 76, 5568-5569, 1954
26. Giaquinta R., Dilley R.A., Anderson B.J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 1410-1417, 1973
27. Giaquinta R., Dilley R.A., Anderson B.J., Horton P.: Bioenerget., 6, 167-177, 1974
28. Giaquinta R.T., Dilley R.A.: Biochim. Biophys. Acta, 387, 288-305, 1975
29. Girault G., Galmiche J.M.: Biochim. Biophys. Acta, 333, 314-319, 1974
30. Goodchild D.J., Park R.B.: Biochim. Biophys. Acta, 226, 393-399, 1971
31. Govindjee: Bioenergetics of photosynthesis, Acad. Press, New York, 1975
32. Gräber P., Witt H.T.: Biochim. Biophys. Acta, 423, 141-163, 1976
33. Griffiths D.E., Hyams R.L., Bertoli E., Carver M.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 75, 449-456, 1977
34. Grünhagen H.H., Witt H.T.: Z. Naturforsch., 25B, 373-380, 1970
35. Hall D.O.: The intact chloroplast. (J. Barber Ed.), Elsevier, Amsterdam, 135-170, 1976
36. Hauska G.A., Mc Carty R.E., Berzborn R.J., Racker E.: J. Biol. Chem., 246, 3524-3531, 1971
37. Harnischfeger G.: Biochim. Biophys. Acta, 503, 473-479, 1978
38. Harris D.A., Rosing J., Van de Stadt R.J., Slater E.C.: Biochim. Biophys. Acta 314, 149-153, 1973
39. Harris D.A., Slater E.C.: Biochim. Biophys. Acta 387, 335-348, 1975
40. Heath R.L.: Biochim. Biophys. Acta, 256, 645-656, 1972
41. Heathcote P., Hall D.O.: Proc. 3rd Intern. Congr. Photosynthesis, 463-471, 1975
42. Hiedemann - van Wyk. D., Kannangara C.G.: Z. Naturforsch., 26B, 46-50, 1971
43. Hill R., Bendall F.: Nature, 186, 136-137, 1960
44. Horton P., Cramer W.A.: Biochim. Biophys. Acta 368, 348-360, 1974
45. Jacobi G.: Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation (A. Trebst, M. Avron Eds.), Springer Verlag, Berlin, 543-562, 1977



46. Jagendorf A.T.: Bioenergetics of photosynthesis (Govindjee Eds.), Acad. Press, New York, 414-492, 1975
47. Jagendorf A.T., Hind G.: Nat. Acad. Sci., Nat. Council, 1145, 599-610, 1963
48. Jagendorf A.T., Uribe E.: Proc. Nat. Acad. Sci. US 55, 170-182, 1966
49. Kayalar C., Rosing J., Boyer P.D.: J. Biol. Chem., 252, 2486-2491, 1977
50. Komai H., Hunter D.R., Southard J.H., Haworth R.A., Green D. E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 695-704, 1976
51. Kraayenhof R., Slater E.C.: Proc. 3rd Intern. Congr. Photosynthesis, Elsevier, Amsterdam, 2, 985-996, 1975
52. Leung K.H., Hinkle P.C.: J. Biol. Chem., 250, 8467-8471, 1975
53. Lumry R.: Nat. Acad. Sci., Nat. Council 1145, 625-634, 1963
54. Lumry R.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 227, 46-75, 1974
55. Lutz H.U., Dahl J.S., Bachofen R.: Biochim. Biophys. Acta 347, 359-370, 1974
56. Marcus F., Schuster S.M., Lardy H.A.: J. Biol. Chem., 251, 1775-1780, 1976
57. Mc Carty R.E., Racker E.: Brookhaven Symp. Biol., 18, 202-214 1966
58. Menke W., Ruppel H.G.: Z. Naturforsch. 26B, 825-831, 1971
59. Mitchell P.: Biol. Rev., 41, 445-502, 1966
60. Mitchell P.: Biochem. Soc. Trans., 4, 399-430, 1976
61. Mitchell P.: Ann. Rev. Biochem., 46, 996-1004, 1977
62. Mitchell P.: TIBS, 3 (3), N 58, 1978
63. Nelson N.: Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation (A. Trebst, M. Avron, Eds.), Springer Verlag, Berlin, 393-404, 1977
64. Nelson N., Deters D.M., Nelson H., Racker R.: J. Biol. Chem., 248, 2049-2055, 1973
65. Nelson N., Bengis C.: Ber. Deutsch. Bot. Ges., 90, 477-484, 1977
66. Bengis C., Nelson N.: J. Biol. Chem., 252, 4564-4569, 1977
67. Nelson N., Eytan E., Julian C.: Proc. IVth Intern. Congr. Photosynthesis, 559-570, 1977
68. Neumann J., Jagendorf A.T.: Arch. Biochem. Biophys., 107, 109-119, 1964
69. Nolan W.G., Park R.B.: Biochim. Biophys. Acta, 375, 406-421, 1975
70. Ort D.R., Dilley R.A., Good N.E.: Biochim. Biophys. Acta, 449, 108-124, 1976
71. Papa S.: Biochim. Biophys. Acta, 456, 39-84, 1976
72. Park R.B., Pfeifhofer A.O.A.: Proc. Nat. Acad. Sci. US, 60, 337-343, 1968
73. Portis A.R.Jr., Mc Carty R.E.: J. Biol. Chem., 249, 6250-6254 1974
74. Racker E., Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation (E. Quagliariello, S. Papa, F. Palmieri, E.C. Slater, N. Siliprandi, Eds.), Elsevier, Amsterdam, 401-406, 1975
75. Racker E.: Biochem. Soc. Trans., 3, 785-802, 1975
76. Ragan C.I., Hinkle P.C.: J. Biol. Chem., 250, 8472-8476, 1975
77. Ramirez F., Marecek J.F.: Acc. Chem. Research, 11, 239-245, 1978
78. Reeves S.G., Hall D.O., Baltscheffsky H.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 359-366, 1971
79. Reeves S.G., Hall D.O.: Biochim. Biophys. Acta, 314, 66-78, 1973

80. Rosa L., Hall D.O.: *Biochim. Biophys. Acta*, 449, 23-36, 1976
81. Rosing J., Kayalar C., Boyer P.D.: *J. Biol. Chem.*, 252, 2478-2485, 1977
82. Rottenberg H., Grunwald T., Avron M.: *Europ. J. Biochem.*, 25, 54-63, 1972
83. Rytie I.J., Jagendorf A.T.: *J. Biol. Chem.*, 247, 4453-4459, 1972
84. Sane P.V.: *Photosynthesis I. Photosynthetic electron transport and photophosphorylation* (A. Trebst, M. Avron, Eds.), Springer Verlag, Berlin, 522-542, 1977
85. Sane P.V., Goodchild D.J., Park R.B.: *Biochim. Biophys. Acta* 218, 162-178, 1970
86. San Pietro A.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 103, 1093-1105, 1963
87. Saphon S., Crofts A.R.: *Z. Naturforsch.*, 32C, 810-816, 1977
88. Schliephake W., Junge W., Witt H.T.: *Z. Naturforsch.*, 23B, 1571-1578, 1968
89. Schmid G.H., Radunz A., Menke W.: *Z. Naturforsch.*, 30C, 201-212, 1975
90. Shavit N., Degami H., San Pietro A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 216, 208-217, 1970
91. Shavit N., Lien S., San Pietro A.: *FEBS Lett.*, 73, 55-58, 1977
92. Shu-I Tu, Wang J.H.: *Biochemistry* 9, 4505-4512, 1970
93. Slater E.C.: *Nature*, 172, 975-978, London 1953
94. Slater E.C.: *Quart. Rev. Biophys.*, 4, 35-71, 1971
95. Slater E.C.: *Dynamics of energy transducing membranes* (L. Ernster, R.W. Estabrook, E.C. Slater, Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1-20, 1974
96. Telfer A., Evans M.C.W.: *Biochim. Biophys. Acta*, 256, 625-634, 1972
97. Trebst A.: *Proc. 3rd Intern. Congr. Photosynthesis*, Elsevier Amsterdam, 1, 439-448, 1975
98. Trebst A., Reimer S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 305, 129-139, 1973
99. Trebst A., Reimer S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 325, 546-557, 1973
100. Trebst A., Avron M.: *Photosynthesis I. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation*, Springer Verlag, Berlin, 1977
101. Yocum C.F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, 828-835, 1976
102. Yocum C.F.: *Plant. Physiol.*, 60, 592-596, 1977
103. Yocum C.F.: *Plant Physiol.*, 60, 597-601, 1977
104. Yocum C.F., Guikema J.A.: *Plant Physiol.*, 59, 33-37, 1977
105. Williams R.J.P.: *FEBS Lett.*, 85, 9-19, 1978
106. Witt H.T.: *Bioenergetics of photosynthesis*, Govindjee (Ed.), Acad. Press, New York, 493-554, 1975
107. Witt H.T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 505, 355-427, 1979
108. Wolff C., Buchwald H.E., Ruppel H., Witt H.T.: *Z. Naturforsch.* 24B, 1038-1041, 1969
109. Wyk. van D.: *Z. Naturforsch.* 21B, 700-703, 1966

В. Хендрих

## ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ ФОСФОРИЛАЦИЯ - ФАКТЫ И КОНЦЕПЦИИ

### Р е з ю м е

Опираясь на литературу предмета, рассматриваются результаты исследований над структурой тилакоидной мембраны и локализаций компонентов фотосинтетической цепи транспорта электронов. Кроме того, обсуждаются явления, сопровождающие транспорт электронов: транспорт протонов, образование градиента рН и мембранного потенциала, конформационные изменения тилакоидной мембраны и ее компонентов. Рассматриваются три предлагаемых механизма связи транспорта электронов и фосфорилиции: химическая гипотеза, химиосмотическая теория и конформная гипотеза.

W. Hendrich

## PHOTOSYNTHETIC PHOSPHORYLATION - FACTS AND CONCEPTIONS

### S u m m a r y

Results of investigations in the structure of thylakoid membrane and location of photosynthetic electron transport chain components are discussed on the basis of current literature. Following phenomena associated with electron transport are also considered: proton transport, development of pH gradient and membrane potential gradient, conformational changes of thylakoid membrane and its components. Three postulated coupling devices of energy transduction are presented: chemical hypothesis, chemiosmotic theory and conformational hypothesis.