

ДИНАМИКА ПЕРЕНОСА ПРОТОНА НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ МЕМБРАНА/ВОДА И МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ

Обзор

© 2005 г. А.Я. Мулкиджанян^{1,2*}, Д.А. Черепанов³, И. Хеберле⁴, В. Юнге¹

¹ Division of Biophysics, Department of Biology/Chemistry,
University of Osnabrueck, D-49069 Osnabrueck, Germany;
fax: +49-541-9692871, E-mail: mulkidjanian@biologie.uni-osnabrueck.de

² Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Ленинские горы

³ Институт электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
117071 Москва, Ленинский проспект, 31;

⁴ Research Center Juelich, IBI-2: Structural Biology,
D-52425 Juelich, Germany

Поступила в редакцию 30.09.04

Перенос протона между водой и интегральными мембранными белками играет ключевую роль в биоэнергетике. В обзоре рассматривается механизм этого переноса, основанный на данных о работе мембранных ферментов, захватывающих или выбрасывающих протоны в ответ на вспышку света. Изучение этих ферментов показало, что обмен протонами между мембранной поверхностью и объемной водной фазой происходит за время ≥ 1 мс из-за наличия кинетического барьера для ионов. Высота барьера для протонов, как это следует из анализа экспериментальных данных, составляет около 0,12 эВ, т.е. барьер достаточно высок, чтобы объяснить наблюдаемое замедление протонного обмена. Из-за этого барьера активность протонов на поверхности мембраны в стационарных условиях может отличаться от их активности в водной фазе; при этом протондвижущая сила для синтеза АТФ может быть выше, чем измеряемая между объемными водными фазами. Эта особенность важна для понимания биоэнергетики щелочелюбивых бактерий. В то же время диффузия протона вдоль мембранной поверхности является свободной и быстрой; обмен протонами между соседними ферментами может проходить за микросекунды. Подобная анизотропия протонной динамики на поверхности мембраны позволяет прокариотам снижать «непродуктивную» утечку протонов во внешний объем. Утечку дополнительно снижают впячивания внутренней мембраны, характерные для некоторых бактерий; при этом «выброшенные наружу» протоны поступают в замкнутое пространство таких округлых или плоских внутриклеточных мембранных «мешков». Тилакоиды хлоропластов и кристы митохондрий происходят из подобных внутриклеточных структур.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АТФ-синтаза, мембранный потенциал, хемиосмотическое сопряжение, щелочелюбивые бактерии, хлоропласты, митохондрии, бактериальные мембраны.

Ретроспективное рассмотрение исследованной динамики переноса протона на поверхности мембраны кажется нам уместным вкладом в специальный номер журнала «Биохимия», посвященный юбилею В.П. Скулачева, внесшего большой вклад в эту область биологии. Ниже рассматриваются экспериментальные данные о переносе протона как вдоль, так и поперек границы раздела фаз мембрана/вода, полученные при изучении мембранных ферментов, захватывающих или выбрасывающих протоны в ответ на вспышку света. Эти данные обсуждаются в

связи с механизмами преобразования энергии в живой клетке.

Известно, что трансмембранная разность электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) служит основным энергетическим интермедиатом в клетке [1–3]. $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ генерируется редокс- или светозависимыми протонными насосами, а используется энергопотребляющими ферментами, в первую очередь АТФ-синтазой, а также вторичными переносчиками. В некоторых бактериях $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ замещается/дополняется трансмембранной разностью электрохимических потенциалов ионов натрия ($\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$, см. обзор [4]). Большинство бактерий, а также хлоропла-

* Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

ты растений и митохондрии животных используют, однако, только $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Митчелл [2] ввел понятие протондвижущей силы (protonmotive force, pmf), определяемой как

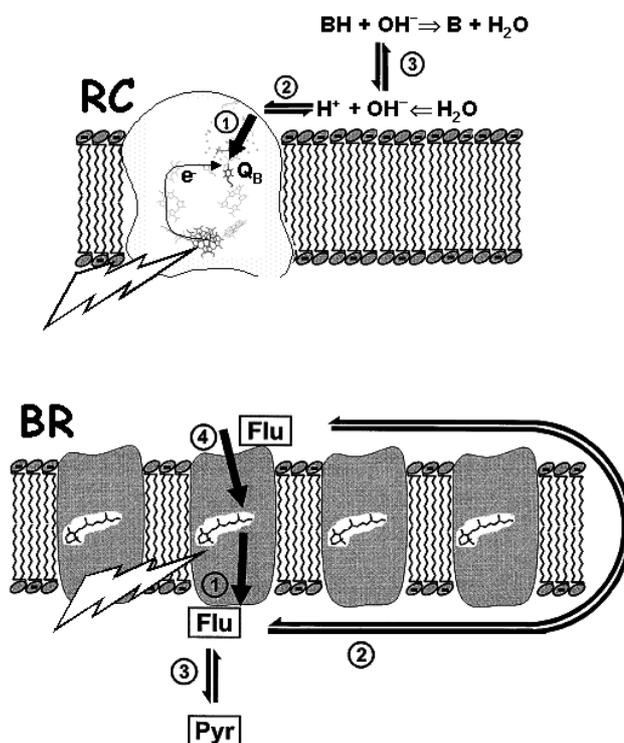
$$pmf = \Delta\tilde{\mu}_{H^+}/F = \Delta\psi - (2.3RT/F) \cdot \Delta pH, \quad (1)$$

где $\Delta\psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов, а ΔpH – разность рН между двумя сторонами мембраны, а именно положительно заряженной стороной p и отрицательно заряженной стороной n . Первоначально ΔpH рассматривалась Митчеллом как разность рН между двумя объемными фазами, разделенными мембраной [2]. Уильямс, однако, отметил, что у бактерий p -фаза соответствует внешний объем. Выброс протонов в этот «Тихий океан» должен приводить к их разбавлению и к потере энтропийного компонента pmf [5]. Это обстоятельство особенно важно для щелочелюбивых (алкалофильных) бактерий, таких как *Bacillus firmus*. У этих бактерий рН внутри может быть на 3 единицы более кислым, чем рН во внешней среде (см. обзор [6]). Поскольку величина $|\Delta\psi|$ при этом не превышает 200 мВ [7], применение уравнения (1) дает значение для pmf около 0. В связи с этой и подобными несообразностями некоторые авторы обсуждали возможность локального межповерхностного сопряжения (см. обзоры [8–10]). В частности, Келл рассматривал возможность быстрого «растекания» «выброшенных» протонов по поверхности мембраны при их одновременно затрудненном уравнивании с внешней водной фазой. В этом случае значение локального рН на поверхности мембраны (surface рН^S) может отличаться от рН водной фазы («bulk» рН, рН^B) даже в стационарном состоянии [11]. Михель и Остерхельг сделали аналогичное предположение, пытаясь объяснить слабую корреляцию между (i) выходом АТР, измеренным в целых клетках *Halobacteria*, и (ii) суммой измеренных $\Delta\psi$ и ΔpH^B [12]. Предположение о том, что в стационарном состоянии рН^S на внешней p -поверхности клетки может быть ниже, чем рН внешней среды, может приводить к разумным значениям pmf в случае алкалофильных бактерий (см. обзоры [8, 13, 14]).

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЕТО-ИНДУЦИРОВАННОГО ПЕРЕНОСА ПРОТОНА ПОПЕРЕК ГРАНИЦЫ РАЗДЕЛА ФАЗ МЕМБРАНА/ВОДА

Поскольку протоны очень быстро диффундируют в воде [15], то разница между активностью протона на поверхности мембраны и в

объемной водной фазе может возникнуть, только если свободный обмен протонов затруднен из-за кинетического барьера на границе раздела фаз. Первые свидетельства в пользу такого барьера были получены при изучении индуцированного вспышками света восстановления и протонирования вторичного хинона (Q_B) в различных фотосинтетических реакционных центрах (RC) (см. обзоры [16, 17] и верхнюю схему на рисунке). В частности, было показано, что исчезновение протона из объемной водной фазы, отслеживаемое с помощью гидрофильных рН-индикаторов, происходит медленнее, чем восстановление Q_B как в реакционных центрах пурпурных фототрофных бактерий [18–20], так и в фотосистеме II зеленых растений [21]. Эти эксперименты, однако, не позволили различить, запаздывают ли протоны (i) на пути из объемной вод-



Сравнительные схемы связывания протона фотосинтетическим реакционным центром (RC) *Rhodobacter sphaeroides* (верхняя) и перенос протона бактериородопсином (BR, нижняя; рисунок из работы [48] с изменениями). Цифры указывают на последовательность стадий переноса протона. Жирные стрелки – стадии переноса протона; тонкие стрелки – реакция переноса электрона в RC. Flu – флуоресцеин, Pyr – пиранин, BH/B – протонированные/депротонированные молекулы гидрофильного рН-буфера соответственно

ной фазы к поверхности мембраны или (ii) во время их проникновения через белок к молекуле Q_B . Ответ на этот вопрос был впервые получен Л.А. Драчевым, А.Д. Кауленом и В.П. Скулачевым, исследовавшими свето-индуцированный перенос протона в бляшках бактериородопсина (BR) ([22], см. также нижнюю схему на рисунке). В этих экспериментах отслеживались не только спектральные изменения как самого BR, так и рН-индикатора *p*-нитрофенола в растворе, но также, с помощью прямого электрометрического метода, прослеживалось движение протона поперек мембраны. Оказалось, что скорость переноса протона от погруженного в белок кофактора ретиналя к *p*-поверхности мембраны совпадает со скоростью образования интермедиата М в фотоцикле BR, в то время как протонирование водорастворимого рН-индикатора происходит значительно медленнее. Эти эксперименты свидетельствовали о локализации кинетического барьера для протона между мембранной поверхностью и объемной водной фазой. Ускорение протонирования *p*-нитрофенола после добавки гидрофильных рН-буферов также свидетельствовало о наличии кинетического барьера, проходящего через водную фазу [22].

Хеберле и Денхер исследовали светоиндуцированный выброс протона бактериородопсином с помощью двух рН-индикаторов: флуоресцеина, ковалентно связанного с поверхностью, и растворенного в воде пиранина (см. [23, 24], и рисунок, внизу). Флуоресцеин протонировался за ~0,1 мс, что было сопоставимо со временем образования интермедиата М, в то время как протонирование пиранина происходило намного медленнее (~0,8 мс) [23–25]. Задержка переноса протона с поверхности BR в объемную водную фазу была впоследствии подтверждена и в ряде других лабораторий [26–28].

Стадии переноса протона в противоположном направлении, а именно из водной фазы в белок, были прослежены в нативных мембранных везикулах фототрофных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodobacter capsulatus*. Следя за генерацией мембранного потенциала по электрохромным изменениям внутримембранных каротиноидов, удалось показать, что перенос протона от поверхности мембраны к убихинону Q_B совпадал по времени с его восстановлением (~0,1 мс), в то время как различные рН-индикаторы в растворе реагировали медленнее, за 0,5–1 мс ([29], см. рисунок, вверху). Из этих данных следовало, что кинетический барьер между поверхностью мембраны и объемной водной фазой присутствует также на *n*-стороне сопрягающей мембраны.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БАРЬЕР НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ: ЕГО СВОЙСТВА И РОЛЬ В ПРЕОБРАЗОВАНИИ ЭНЕРГИИ

Замедленное установление протонного равновесия между поверхностью биологических мембран и объемной водной фазой первоначально объяснялось влиянием «связанных» рН-буферов на поверхности, т.е. ионизуемых липидных и белковых групп (см. [30, 31]). На «макроскопическом» уровне, способность поверхностных буферов задерживать распространение протонного «пульса» рассматривалась как экспериментально [32, 33], так и теоретически [30, 31, 34, 35]. На «микроскопическом» уровне было показано, что замещение отдельных аминокислотных остатков на *n*-стороне BR мембраны влияло на кинетику работы фермента [36], что свидетельствовало о вкладе локализованных на поверхности мембраны аминокислотных остатков в эффективный захват протонов (см. также обзор [36a]). Надо учитывать, однако, что если бы только поверхностные буферные группы были ответственны за замедление протонного обмена, подвижные молекулы гидрофильных рН-буферов или рН-индикаторов должны были бы ускорять протонное равновесие, начиная с концентрации 1–5 мкМ, т.е. оказываясь в состоянии кинетически конкурировать со свободными протонами [29, 37]. Как правило, этого не наблюдалось. Только моноанионный *p*-нитрофенол ускорял протонную релаксацию уже при концентрации 25 мкМ [22]. Дианионы, такие как фосфат, бромкрезоловый пурпурный или MES, оказывались эффективными только при добавлении в концентрации >100 мкМ [16, 20, 28, 29, 38, 39]. Пиранин, несущий четыре отрицательных заряда, вообще не ускорял обмен протонов [28, 39]. Подобная зависимость от электрического заряда мобильных рН-буферов свидетельствует об электростатической природе кинетического барьера. Как было детально рассмотрено в работах [37, 40, 41], физическая структура межфазного барьера может быть довольно сложной. Барьер может быть связан как с диэлектрическим насыщением воды вблизи заряженной поверхности [40], так и с диэлектрической переэкранировкой [41].

Хотя строгое физическое описание барьера на границе раздела фаз до сих пор остается невозможным, его свойства могут быть определены из экспериментальных данных. В частности, перенос протона через потенциальный барьер на границе раздела фаз характеризуется слабой рН-зависимостью и высокой энергией активации порядка 30–50 кДж/моль [20, 29, 39, 42]. Как отмечено в работе [29], эти особенности

указывают на участие нейтральной воды как промежуточного переносчика протона. По-видимому, из-за потенциального барьера протоны/гидроксилы и/или молекулы рН-буфера не успевают продиффундировать из объемной водной фазы к достигающим поверхности «свежим» протонам/протонным вакансиям, прежде чем последние провзаимодействуют с молекулами нейтральной воды (как показано для RC на рисунке вверху). Нужно иметь в виду, что несмотря на обилие воды, активационный барьер для ее протонирования/депротонирования составляет 50 кДж/моль при нейтральном рН [29].

Для выявления свойств потенциального барьера на границе раздела фаз были проанализированы факторы, определяющие скорость протонной релаксации на поверхности сферических мембранных везикул при наличии потенциального барьера. С этой целью была решена система соответствующих диффузионных уравнений, и решение было сопоставлено с экспериментальными данными. Моделирование показало, что скорость протонного обмена между мембранной поверхностью и объемной водной фазой определяется буферной емкостью поверхности, высотой потенциального барьера и размером везикул [37]. Рассчитанная зависимость скорости протонного обмена от размера соответствовала экспериментальным данным. А именно, рядом авторов было показано [30, 43, 44], что гидрофильные рН-индикаторы отвечали на выброс протонов клетками и сферопластами пурпурных фототрофных бактерий *Rb. sphaeroides* и *Rb. capsulatus* за 30–70 мс, несмотря на то, что собственно появление протонов на р-поверхности происходило меньше чем за 5 мс (о чем можно было судить по кинетике электрохромного сдвига полос поглощения каротиноидов, коррелирующей с изменениями поглощения амфифильного рН-индикатора нейтрального красного, связывающегося на поверхности [45]). Разрушение сферопластов на небольшие везикулы ускоряло ответ гидрофильного рН-красителя [44]. Таким образом, замедление протонного обмена было более выраженным в целых клетках, чем в мембранных везикулах и бляшках BR (см. выше).

Моделирование выявило, что ускорение протонной релаксации мобильными буферами может наблюдаться только когда их концентрация превышает определенное «пороговое значение». Величина «порога» зависит от высоты барьера, но не зависит ни от размера везикул, ни от поверхностной буферной емкости. Это позволило оценить высоту потенциального барьера для различных ионов из экспериментальных данных [37]. Было обнаружено, что высота барь-

ера зависит почти линейно от электрического заряда и варьирует от 0,09 эВ для *p*-нитрофенола и MES (с зарядом –1) до >0,36 эВ для пиранина (с зарядом –4). Высота барьера для протонов была оценена как порядка 0,12 эВ [37].

Рассматривая стационарное состояние, удалось показать путем решения уравнения Смолуховского, описывающего распространение протонов от протонных «насосов» по поверхности, что при типичных значениях поверхностной плотности протонных насосов и их активности потенциальный барьер в 0,12 эВ может понижать стационарное значение поверхностного pH^s до 6,0. Важно, что эта величина pH^s не зависела от величины рН в объемной водной фазе [40]. Это свойство может объяснить биоэнергетику щелочелюбивых бактерий: величина рН на поверхности живых клеток может быть намного ниже, чем в окружающей среде. Следует отметить, что поверхностная буферная емкость не имеет значения в стационарном состоянии [32], и поэтому протонная активность на поверхности определяется только высотой потенциального барьера и размером объекта. Можно сказать, что благодаря потенциальному барьеру на границе раздела фаз и относительно большому размеру бактериальных клеток концентрация протонов на внешней поверхности дышащих бактерий выше, чем в окружающей среде.

В случае бактерий, протоны, которые выбрасываются протонными насосами на внешнюю *p*-поверхность, могут либо переноситься вдоль мембраны к близлежащему «потребителю» *pmf*, например, АТФ-синтазе, или ускользать через потенциальный барьер в объемную водную фазу. Скорость первой, «полезной» реакции определяется протонной проводимостью «потребителей» протонного потенциала. Скорость же «непродуктивной» утечки протонов пропорциональна концентрации протонов на поверхности. В простейшем случае постепенное поверхностное закисление приводило бы к относительному увеличению утечки протонов. Более выгодным кажется блокировать протонные помпы, прежде чем утечка протонов через барьер достигнет значительной величины. В этой связи следует подчеркнуть, что активность цитохромного bc_1 (*bc*) комплекса, который является «центральным» протонным насосом в абсолютном большинстве электрон-транспортных цепей, значительно уменьшается уже при $pH < 6,5$ из-за противодавления *pmf* (см. [46]). Из-за этой динамической обратной связи pH^s на *p*-поверхности не должен падать ниже 6,5, что в свою очередь должно предотвращать «непродуктивную» утечку протонов в объемную фазу.

ЛАТЕРАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ПРОТОНА

В конце 60-х годов В.П. Скулачев предположил, что $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ может использоваться клетками как транспортируемая форма энергии, передающаяся вдоль мембран (см. ссылки в [47]). В то время как способность $\Delta\psi$ быстро распространяться вдоль мембраны вызывает мало сомнений, скорость латерального переноса протона, которая в свою очередь определяет время латерального распространения ΔpH , долго оставалась спорной. Для получения количественных оценок оказались полезными эксперименты с BR-содержащими мембранами [25, 48]. Схема эксперимента показана на рисунке, внизу. рН-Индикатор флуоресцеин (Flu) был ковалентно связан либо с Lys-129 на внешклеточной (ЕС) поверхности пурпурной мембраны, либо с Cys-36 на ее цитоплазматической (СР) поверхности. После светового возбуждения бактериородопсина наблюдался выброс протона за ~ 100 мкс на ЕС-поверхность мембраны. Обежав через край пурпурной бляшки, протоны связывались с флуоресцеином на СР-поверхности за ~ 200 мкс, несмотря на то, что диаметр BR-бляшек составлял порядка 1 мкм [25]. В аналогичных экспериментах Алексиев и соавт. латеральный перенос протона происходил еще быстрее [49]. В работе Серову и др. [50] мембранные ферменты «имитировались» с помощью гидрофобных соединений, способных выбрасывать протоны в ответ на вспышку света. В этих экспериментах перенос протона вдоль поверхности происходил с коэффициентом диффузии $5,8 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, т.е. всего в 2 раза медленнее, чем в объемной водной фазе [50]. Быстрый перенос протона вдоль поверхности важен не только для гигантских митохондрий [47, 51] или цианобактериальных трихомов [52]. Изучение протон-транспортирующей H^+ -АТФ-синтазы *Rb. capsulatus* показало, что доставка протонов к этому ферменту не лимитирует скорость его оборотов даже при рН 10,0 и в условиях, когда фермент разобшен и время его оборота составляет менее 5 мс [53]. Кинетический анализ показал, что время доставки протона к F_0 , необходимое для обеспечения его оборачивания за миллисекунды, может быть оценено как ≤ 1 мкс [53, 54]. Как рассмотрено выше, перенос протона через потенциальный барьер на границе раздела фаз происходит на три порядка медленнее. Следовательно, путь вдоль поверхности мембраны должен преобладать при переносе протона между близлежащими «генераторами» и «потребителями» протонов.

Представленный выше обзор экспериментальных данных, более детально изложенных в ранее

вышедших работах [25, 29, 37, 40, 48], позволяет следующим образом описать механизм протонного сопряжения в биологических мембранах.

«Базовый» механизм, первоначально изобретенный природой и все еще действующий в большинстве бактерий, основывается на способности редокс- и светозависимых протонных насосов заряжать внутриклеточную мембрану, защелачивать *n*-поверхность и закислять внешнюю *p*-поверхность клетки. Из-за потенциального барьера на границе раздела фаз установление протонного равновесия между поверхностью мембраны и объемной водной фазой происходит медленнее, чем диффузия протонов вдоль поверхности. В результате (i) основная часть «выброшенных» протонов потребляются близлежащими АТФ-синтазами и (ii) активность протонов на поверхности мембраны может отличаться от активности протонов в водной фазе. Таким образом, *in vivo* движущая сила для синтеза АТФ определяется как

$$pmf = \Delta\psi - 2,3RT \cdot \Delta pH^S.$$

Таким образом, в энергетическом сопряжении участвуют сама бактериальная мембрана и два примыкающих к ней водных слоя толщиной ~ 1 нм каждый. Окружающая клетку водная фаза служит, в лучшем случае, «стоком» для «убежавших» протонов.

По-видимому, природа непрерывно стремилась уменьшить эту «непродуктивную» утечку протонов путем «втягивания» внутрь клетки сегментов бактериальной мембраны с тем, чтобы «выброшенные» протоны поступали в эти, по сути, внутриклеточные мембранные впячивания. Под давлением естественного отбора развитие таких внутриклеточных структур происходило в разных группах бактерий и, в частности, привело к формированию тилакоидов в цианобактериях и к образованию внутриклеточных везикулярных структур в пурпурных бактериях. Цианобактериальные тилакоиды сохранились в хлоропластах растений, в то время как внутриклеточные везикулы пурпурных бактерий из-за эволюционной близости последних к митохондриям [55] могли служить предшественниками митохондриальных крист. Кажется неслучайным, что отклонения pH^S от рН в объемной фазе были недавно показаны на дышащих митохондриях Ягужинским и соавт. [56, 57].

Описанный механизм сопряжения дает непротиворечивую картину электрохимического преобразования энергии. Он согласуется как с идеей Митчелла о $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, как движущей силе для синтеза АТФ, так и с наличием локализованных мембранных кислых доменов, предложенных

Уильямсом [5], и с экспериментально показанной анизотропией переноса протона на поверхности мембраны [11, 12, 25]. Отличаясь от первоначальной митчелловской концепции **делокализованного** сопряжения, этот механизм согласуется, однако, с более поздними, менее известными взглядами Питера Митчелла, писавшего в своем последнем обзоре, что поверхности сопрягающих мембран выполняют функцию «двух протон-проводящих зон *P* и *N*, в которых **локализована** основная часть протонного тока, протекающего между производящими и потребляющими модулями» [58].

Авторы признательны Л.А. Драчеву, М. Гутману, Л.И. Кришталику, Н. Денчеру, Д. Остерхельту, В.П. Скулачеву, Р. Уильямсу и Л.С. Ягужинскому за полезное обсуждение. А. Мулкиджанян и Д. Черепанов считают своим долгом выразить особую благодарность покойному А.Д. Каулену за плодотворные беседы и мудрые советы.

Работа была выполнена при финансовой поддержке фонда Александра фон Гумбольдта, фонда Фольксваген, INTAS (2001-736) и грантов Deutsche Forschungsgemeinschaft (Mu-1285/1, Ju-97/13, SFB 431-P15, 436-RUS-113/210).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mitchell, P. (1961) *Nature*, **191**, 144–148.
- Mitchell, P. (1966) *Physiol. Rev.*, **41**, 445–502.
- Skulachev, V.P. (1977) *FEBS Lett.*, **74**, 1–9.
- Skulachev, V.P. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **208**, 203–209.
- Williams, R.J.P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 1–44.
- Krulwich, T.A., Ito, M., Gilmour, R., Sturr, M.G., Guffanti, A.A., and Hicks, D.B. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 21–26.
- Guffanti, A.A., Mann, M., Sherman, T.L., and Krulwich, T.A. (1984) *J. Bacteriol.*, **159**, 448–452.
- Ferguson, S.J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 47–95.
- Cramer, W.A., and Knaff, D.B. (1991) *Energy transduction in biological membranes: a textbook of bioenergetics*, Springer, New York.
- Ferguson, S.J. (1995) *Curr. Biol.*, **5**, 25–27.
- Kell, D.B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 55–99.
- Michel, H., and Oesterhelt, D. (1980) *Biochemistry*, **19**, 4615–4619.
- Guffanti, A.A., and Krulwich, T.A. (1984) *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 411–412.
- Kell, D.B. (1986) *Methods Enzymol.*, **127**, 538–557.
- Eigen, M. (1963) *Angew. Chem.*, **75**, 489–588.
- Wraight, C.A., Cogdell, R.J., and Chance, B. (1978) in *The Photosynthetic Bacteria* (Clayton, R.K., and Sistrom, W.R., eds), Academic Press, New York, pp. 471–511.
- Junge, W., and Jackson, J.B. (1982) in *Photosynthesis, Volume 1* (Govindjee, ed.) Academic Press, New York, pp. 589–646.
- Chance, B., Crofts, A.R., Nishimura, M., and Price, B. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **13**, 364–374.
- Codgell, R.J., Jackson, J.B., and Crofts, A.R. (1972) *Bioenerg.*, **4**, 413–429.
- Petty, K.M., and Dutton, P.L. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 335–345.
- Auslander, W., and Junge, W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **357**, 285–298.
- Drachev, A.L., Kaulen, A.D., and Skulachev, V.P. (1984) *FEBS Lett.*, **178**, 331–336.
- Heberle, J., and Dencher, N.A. (1990) *FEBS Lett.*, **277**, 277–280.
- Heberle, J., and Dencher, N.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5996–6000.
- Heberle, J., Riesle, J., Thiedemann, G., Oesterhelt, D., and Dencher, N.A. (1994) *Nature*, **370**, 379–382.
- Scherrer, P., Alexiev, U., Marti, T., Khorana, H.G., and Heyn, M.P. (1994) *Biochemistry*, **33**, 13684–13692.
- Dioumaev, A.K., Richter, H.T., Brown, L.S., Tanio, M., Tuzi, S., Saito, H., Kimura, Y., Needleman, R., and Lanyi, J.K. (1998) *Biochemistry*, **37**, 2496–2506.
- Porschke, D. (2002) *J. Phys. Chem. B*, **106**, 10233–10241.
- Gopta, O.A., Cherepanov, D.A., Junge, W., and Mulikidjanian, A.Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13159–13164.
- Junge, W., and Polle, A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **848**, 265–273.
- Heberle, J., and Dencher, N. A. (1992) in *Structures and Functions of Retinal Proteins* (J.L. Rigaud, ed.) John Libbey Eurotext Ltd, pp. 221–224.
- Junge, W., and McLaughlin, S. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, **890**, 1–5.
- Jones, M.R., and Jackson, J.B. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 34–43.
- Nachliel, E., and Gutman, M. (1996) *FEBS Lett.*, **393**, 221–225.
- Georgievskii, Y., Medvedev, E.S., and Stuchebrukhov, A.A. (2002) *Biophys. J.*, **82**, 2833–2846.
- Riesle, J., Oesterhelt, D., Dencher, N.A., and Heberle, J. (1996) *Biochemistry*, **35**, 6635–6643.
- Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 102–115.
- Cherepanov, D.A., Junge, W., and Mulikidjanian, A.Y. (2004) *Biophys. J.*, **86**, 665–680.
- Grzesiek, S., and Dencher, N.A. (1986) *Biophys. J.*, **50**, 265–276.
- Heberle, J. (1991) *Zeitauflosende Untersuchung der Protonentranslokationsschritte von bakteriorhodopsin mittels chemisch-gekoppelter pH-Indikatoren*. PhD Thesis. Freien Universität Berlin.
- Cherepanov, D.A., Feniouk, B.A., Junge, W., and Mulikidjanian, A.Y. (2003) *Biophys. J.*, **85**, 1307–1316.
- Cherepanov, D.A. (2005) *Phys. Rev. Lett.*, in press.
- Maroti, P., and Wraight, C.A. (1997) *Biophys. J.*, **73**, 367–381.
- Arata, H., Takenaka, I., and Nishimura, M. (1987) *J. Biochem.*, **101**, 261–265.
- Jones, M.R., and Jackson, J.B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1019**, 51–58.
- Mulikidjanian, A.Y., and Junge, W. (1994) *FEBS Lett.*, **353**, 189–193.
- Kramer, D.M., Sacksteder, C.A., and Cruz, J.A. (1999) *Photosynth. Research*, **60**, 151–163.
- Skulachev, V.P. (2001) *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 23–29.

48. Heberle, J. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 135–147.
49. Alexiev, U., Mollaaghababa, R., Scherrer, P., Khorana, H.G., and Heyn, M.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 372–376.
50. Serowy, S., Saparov, S.M., Antonenko, Y.N., Kozlovsky, W., Hagen, V., and Pohl, P. (2003) *Biophys. J.*, **84**, 1031–1037.
51. Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 481–495.
52. Severina, I.I., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 497–501.
53. Feniouk, B.A., Kozlova, M.A., Knorre, D.A., Cherepanov, D.A., Mulkidjanian, A.Y., and Junge, W. (2004) *Biophys. J.*, **86**, 4094–4109.
54. Cherepanov, D.A., Mulkidjanian, A.Y., and Junge, W. (1999) *FEBS Lett.*, **449**, 1–6.
55. Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., and Kurland, C.G. (1998) *Nature*, **396**, 133–140.
56. Козлова М.В., Грамадский К.Б., Солодовникова И.М., Красинская И.П., Виноградов А.В., Ягужинский Л.С. (2003) *Биофизика*, **48**, 443–452.
57. Солодовникова И.М., Юрков В.И., Тоньшин А.А., Ягужинский Л.С. (2004) *Биофизика*, **49**, 47–56.
58. Mitchell, P. (1991) *Biosci. Rep.*, **11**, 297–344.

PROTON TRANSFER DYNAMICS AT THE MEMBRANE/WATER INTERFACE AND MECHANISM OF BIOLOGICAL ENERGY CONVERSION

A. Y. Mulkidjanian^{1,2}, D. A. Cherepanov³, J. Heberle⁴, W. Junge¹

¹ *Division of Biophysics, Department of Biology/Chemistry,
University of Osnabrueck, D-49069 Osnabrueck, Germany;
fax: +49-541-969271, E-mail: mulkidjanian@biologie.uni-osnabrueck.de*

² *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Moscow State University, Moscow, 119899, Russia;*

³ *Institute of Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskii prosp. 31, 117071 Moscow, Russia;*

⁴ *Research Center Juelich, IBI-2: Structural Biology,
D-52425 Juelich, Germany*

Received September 30, 2004

Proton transfer between water and the interior of membrane proteins plays a key role in bioenergetics. Here we survey the mechanism of this transfer as inferred from experiments with flash-triggered enzymes capturing or ejecting protons at the membrane surface. These experiments have revealed that proton exchange between the membrane surface and the bulk water phase proceeds at ≥ 1 ms because of a kinetic (potential) barrier for electrically charged species. From the data analysis the barrier height for protons could be estimated as about 0.12 eV, i.e. high enough to account for the observed retardation in proton exchange. Due to this retardation, the proton activity at the membrane surface might deviate, under steady turnover of proton pumps, from that measured in the adjoining water phase, so that the driving force for ATP synthesis might be higher than inferred from the bulk-to-bulk measurements. This is particularly relevant for alkaliphilic bacteria. Proton diffusion along the membrane surface, on the other hand, is unconstrained and fast, occurring between the neighboring enzymes at less than 1 μ s. The anisotropy of proton dynamics at the membrane surface helps prokaryotes to diminish the futile escape of pumped protons into the external volume. In some bacteria, the inner membrane is invaginated, so that the ejected protons get trapped in the closed space of such intracellular membrane sacks, which can be round or flat. The chloroplast thylakoids and the mitochondrial cristae have their origin in these intracellular structures.

Key words: ATP synthesis, membrane potential, chemiosmotic coupling, alkaliphilic bacteria, chloroplasts, mitochondria, bacterial membranes