

Л.А. ДРАЧЕВ И ПРЯМОЙ ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Обзор

© 2023 В.В. Птушенко, А.Ю. Семенов*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 23.06.2023

После доработки 14.07.2023

Принята к публикации 17.07.2023

В работах в области биоэнергетики важное методическое место принадлежит прямому электрометрическому методу. Принцип этого метода заключается в измерении трансмембранной разности электрических потенциалов, создаваемой между двумя отсеками ячейки белками – генераторами электрического (электрохимического) потенциала, ассоциированными с разделяющей отсеки искусственной липидной мембраной. Само существование таких белков было одним из следствий хемиосмотической концепции Питера Митчелла; обнаружение белков – генераторов электрического тока – и исследование их работы послужило одним из аргументов для признания справедливости этой концепции и способствовало в итоге присуждению Митчеллу заслуженной Нобелевской премии. Одним из главных создателей прямого электрометрического метода был Л.А. Драчев (1926–2022). С его участием были выполнены ключевые работы по электрогенезу мембранных белков фотосинтетических и дыхательных электрон-транспортных цепей: бактериородопсина, зрительного родопсина, фотосинтетических бактериальных реакционных центров, цитохромоксидазы и др.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хемиосмотическая концепция Митчелла, трансмембранная разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$), методы измерения мембранного потенциала, белки-генераторы $\Delta\psi$, протеолипосомы, хроматофоры, бактериородопсин, фотосистема 1.

DOI: 10.31857/S0320972523100019, EDN: OSIXRA

ВВЕДЕНИЕ

Лель Александрович Драчев пришел на работу в Межфакультетскую научно-исследовательскую лабораторию молекулярной биологии и биоорганической химии (далее для краткости будем называть ее просто Межфакультетской лабораторией; сейчас – НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, НИИФХБ) МГУ в 1973 г. на должность заведующего вновь образованным отделом новых физических методов. Ставка была предоставлена ему незадолго до этого назначенным ректором МГУ и однокурсником Л.А. Драчева по физическому факультету МГУ Ремом Викторовичем Хохловым при посредничестве еще одного однокурсника и известного

биофизика Ефима Арсентьевича Либермана. Е.А. Либерман, за несколько лет до этого работавший методом синтетических проникающих ионов для измерения мембранного потенциала, в это время тесно сотрудничал с только что назначенным директором Межфакультетской лаборатории Владимиром Петровичем Скулачевым и его сотрудниками.

ГИПОТЕЗА МИТЧЕЛЛА И ПОИСК АДЕКВАТНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Возникновение и развитие прямого электрометрического метода связано с появлением представлений о трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$), возникающей

Принятые сокращения: БР – бактериородопсин; ИЛМ – искусственная липидная мембрана; РЦ – бактериальный реакционный центр; ФС 1 и ФС 2 – фотосистемы 1 и 2; $\Delta\psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов; $\Delta\mu_{H^+}$ – трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов водорода.

* Адресат для корреспонденции.

на внутриклеточных, так называемых сопрягающих, мембранах митохондрий и хлоропластов, а также на внутренних мембранах бактерий. Эти представления вытекали из выдвинутой будущим нобелевским лауреатом П. Митчеллом хемиосмотической концепции сопряжения дыхательного и фотосинтетического переноса электронов и фосфорилирования, рассматривавшей трансмембранную разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) в качестве промежуточной формы энергии при окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании. Реальное существование $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ на сопрягающих мембранах оказалось одним из экспериментально проверяемых следствий концепции Митчелла, и на его доказательство были направлены усилия исследователей, которые одними из первых приняли хемиосмотическую гипотезу — групп В.П. Скулачева и Е.А. Либермана. Заметим, что, как стало ясно много позже, $\Delta\psi$ не всегда является основной составляющей $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$; так, в хлоропластах $F\Delta\psi$ (где F — число Фарадея) значительно ниже, чем концентрационное слагаемое $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, — $RT\Delta pH$ [1, 2]. В последующие годы также была открыта «натриевая энергетика», в которой роль мембранной формы энергии играет трансмембранный электрохимический потенциал ионов натрия, что позволило обобщить представления, сформулированные Митчеллом [3]. Здесь мы также опускаем обсуждение дискуссии между Митчеллом и Р. Вильямсом о роли протонов в энергизации мембран, которая подробно описана в литературе (см. например, статью Weber и Prebble [4]).

Ключевым для адекватного измерения $\Delta\psi$ был выбор метода. Характерно, что в это время почти одновременно начинается разработка самых разнообразных методов измерения трансмембранного потенциала — по-видимому, именно дискуссии вокруг гипотезы Митчелла породили всплеск активности исследователей именно в этом направлении. В 1968 г. Junge и Witt [5] используют электрохромный сдвиг в спектре поглощения хлорофилла b (хотя они его еще так не называют) для изучения фотоиндуцированной генерации трансмембранного потенциала и ионного транспорта при фотосинтезе в изолированных хлоропластах шпината. Чуть позже Булычев и соавт. [6–8] разработали микроэлектродный метод измерения $\Delta\psi$, который был применен при исследованиях гигантских хлоропластов (размером до 15–25 мкм) высшего растения *Peperomia metallica*, как изолированных, так и *in vivo*. Еще чуть позже был предложен метод

измерения электрического потенциала в световом градиенте [9, 10]. В этом методе использовались макроскопические изменения $\Delta\psi$ (и, следовательно, макроэлектродная техника) в оптически плотной суспензии тилакоидов хлоропластов, возникающие благодаря суммированию дипольных моментов отдельных везикул. Чтобы не возвращаться к обсуждению этих методов, которые впоследствии широко использовались и принесли много ценных данных о протекании световых реакций фотосинтеза, сразу скажем об их ограничениях, которые будут важны в контексте дальнейшего изложения. Метод регистрации трансмембранного потенциала, основанный на измерении электрохромного сдвига фотосинтетических пигментов (преимущественно, каротиноидов), широко применяется при изучении хлоропластов растений и хроматофоров пурпурных бактерий, но оказался неэффективным для цианобактерий и изолированных пигмент-белковых комплексов в модельных системах. Кроме того, этот метод обеспечивал относительно низкое отношение сигнала к шуму, что было в значительной мере преодолено лишь полтора десятилетия спустя в работах Joliot и Joliot [11].

Методы, основанные на микроэлектродной технике, позволили получить важную информацию о светозависимых токах, возникающих на мембранах хлоропластов, но их не удалось расширить на более мелкие объекты (к которым относились протеолипосомы и хроматофоры пурпурных бактерий). Неизбежно высокое активное сопротивление микроэлектродов также приводило к ограничениям временного разрешения метода (порядка 1 мс). С помощью метода светового градиента оказалось возможным регистрировать кинетику образования мембранного потенциала во временном диапазоне от 20 пс до 50 нс, однако регистрация более медленных процессов была ограничена диссипацией образующегося градиента электрического потенциала за счет ионной проводимости буферного раствора, в котором суспендированы мембранные везикулы.

Дальнейшее развитие метода измерения в световом градиенте, связанное с использованием многослойных электрически ориентированных фрагментов белково-липидных мембран последовало лишь полтора десятилетия спустя [12]. Переход к гелям и снижение ионной проводимости позволили поднять верхнюю границу временного окна измерений [13]. Заметим, что описанный ниже метод, разработанный Е.А. Либерманом и В.П. Скулачевым, равно как и выросший из него прямой

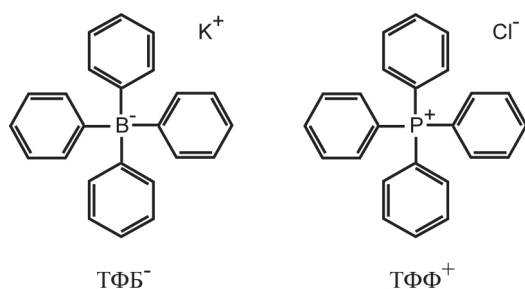


Рис. 1. Липофильные ионы тетрафенилбор (ТФБ⁻) и тетрафенилфосфоний (ТФФ⁺)

электрометрический метод, в своих первоначальных вариантах также были ограничены по многим из перечисленных параметров.

Е.А. Либерман и В.П. Скулачев для решения этой задачи применили остроумную идею, основанную на использовании синтетических проникающих ионов. «Проникающие (через мембрану) ионы» представлялись в то время как оксюморон, поскольку наличие у частицы заряда, очевидно, делало ее гидрофильной и создавало энергетический барьер для погружения в гидрофобную среду мембраны. Однако, по предположению Е.А. Либермана, этот барьер мог бы быть существенно снижен, если бы заряд был распределен по большому объему частицы или окружен относительно гидрофобными молекулярными группами. Поиск таких «липофильных ионов» среди запасов коллег-химиков увенчался успехом и подтвердил первоначальную идею: некоторые из найденных соединений, в частности, анионы фенилдикарбаундекаборана (ФКБ⁻) и тетрафенилбора (ТФБ⁻), а также катион тетрафенилфосфония (ТФФ⁺) оказались способны достаточно легко проникать через мембрану (рис. 1). При этом их распределение по разные стороны мембраны определялось, в соответствии с уравнением Нернста, электрохимическим градиентом $\Delta\tilde{\mu}_H^+$: положительно заряженные ионы накапливались внутри митохондрий, на внутренней мембране которых в ходе окислительного фосфорилирования образовывалась $\Delta\psi$ (со знаком минус внутри в случае митохондрий и знаком плюс — в случае субмитохондриальных частиц).

В результате концентрация этих ионов снаружи, в суспензии, убывала, что, в свою очередь, уже можно было зарегистрировать потенциометрически [14]. С помощью этого подхода впервые было показано, что в процессе дыхания на мембранах митохондрий и субмитохондриальных частиц происходит образование $\Delta\psi$, подавляемое в присутствии ингибиторов дыхания или разобщителей окисления и фосфорилирования [15].

СИНТЕЗ ДВУХ ПОДХОДОВ

В 1971 г. Oesterhelt и Stoeckenius [16] опубликовали в журнале *Nature New Biology* статью, описывающую родопсиноподобный белок из пурпурных мембран галобактерии *Halobacterium halobium*. По инициативе В.П. Скулачева штамм *H. halobium* был привезен в Москву, из его пурпурных мембран был выделен белок бактериородопсин (БР), способный к светозависимому трансмембранному переносу протонов. Исследование этого мембранного белка в отделе биоэнергетики, а затем в отделе новых физических методов Межфакультетской лаборатории МГУ стало первым этапом на пути разработки прямого электрометрического метода.

Летом 1973 г. в Межфакультетской лаборатории появился Л.А. Драчев, перешедший из Всесоюзного института научно-технической информации (ВИНИТИ). Вместе с пришедшим на диплом биохимиком А.Д. Кауленом он проводил непосредственные измерения электрического потенциала, генерируемого между двумя отсеками тefлоновой ячейки бактериородопсином, встроенным в разделяющую ячейки плоскую искусственную липидную мембрану (ИЛМ). БР встраивался в мембрану непосредственно из раствора фосфолипидов в н-декане, в который его добавляли в солюбилизированном виде в присутствии детергента [17]. В отличие от косвенного метода измерений с использованием проникающих ионов, этот подход позволял непосредственно измерять генерацию $\Delta\psi$ белком. Однако этот метод характеризовался значительным разбросом величин и даже направлений фотоиндуцированного сигнала от эксперимента к эксперименту. Позже стало ясно, что этот разброс связан со случайной ориентацией БР в мембране: примерно одинаковое количество белков встраивалось в мембрану с «плюс»- и «минус»-ориентацией, и даже небольшой разброс в их соотношении приводил к значительным изменениям разностного сигнала и вариациям знака $\Delta\psi$.

Осенью 1973 г. в эти работы включился один из авторов этой статьи (АЮС), только что окончивший кафедру молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Предметом изучения были протеолипосомы, содержащие БР, незадолго до того введенные в практику биоэнергетиками Kagawa и Racker [18]. Белок, встроенный в протеолипосомы, образовывал трансмембранный потенциал в ответ на освещение [19]. Измерительная система представляла собой ячейку, состоящую из двух отсеков, заполненных раствором электролита

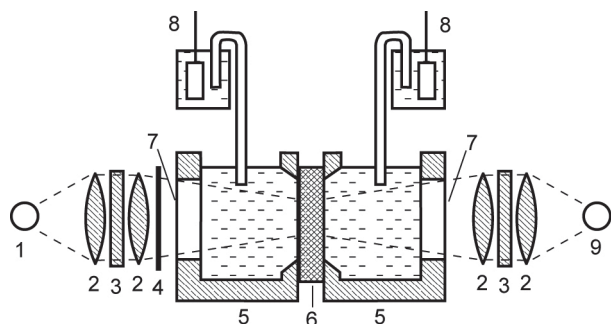


Рис. 2. Схема измерительной системы. 1 — Источник постоянного освещения (галогеновая лампа), 2 — линза, 3 — светофильтр, 4 — затвор, 5 — тefлоновая кювета, 6 — искусственная липидная мембрана на основе мембранного пористого фильтра, 7 — стеклянное окно, 8 — хлорсеребряный электрод, 9 — импульсный лазер

и разделенных плоской ИЛМ, нанесенной на отверстие в разделяющей их перегородке. В оба отсека ячейки были погружены хлорсеребряные электроды, соединенные с электрометрическим вольтметром, и в ходе экспериментов измерялось изменение разности потенциалов между отсеками ячейки (рис. 2). В обе ячейки добавляли проникающие анионы (ФКБ^-), а в одну из них — также БР-протеолипосомы. При освещении этой ячейки ионы ФКБ^- поглощались протеолипосомами вследствие генерации трансмембранного потенциала, и в результате возникала разность потенциалов между отсеками ячейки — небольшая по амплитуде ($\sim 0,01 \text{ В}$), но вполне достаточная для надежного измерения.

Как известно из истории науки, открытию каких-либо новых явлений часто помогает случайность. Беккерель хранил соли урана вместе с фотопластинками, Пастер слишком долго хранил кристаллы винной кислоты, Флеминг не уберег чашки Петри от грибного заражения. В данном случае в процессе длительного эксперимента ИЛМ оказалась недостаточно стабильной и в результате электрических или механических флуктуаций периодически теряла сопротивление. В результате фотоэлектрический сигнал исчезал, и приходилось впрыскивать каплю раствора фосфолипидов в отверстие в тefлоновой ячейке для повторного образования ИЛМ. Еще одним обстоятельством, способствовавшим обнаружению этого ключевого для последующего развития метода эффекта, была высокая концентрация ионов аммония в среде. Поскольку электрохимический потенциал на мембране липосом мог содержать как электрическую, так и концентрационную (рН-зависимую) компоненты, то чтобы максимально увеличить измеряемый электрический сигнал, было решено снизить

«конкурирующий» с ним трансмембранный градиент рН. Именно с этой целью соли аммония были добавлены в среду в значительной концентрации (0,1 М) в качестве проникающего внутрь протеолипосом рН-буфера. В этих условиях при повторном образовании ИЛМ фотоэлектрический сигнал возрастал во времени, что трудно было объяснить в рамках представлений о механизме действия проникающих ионов. То, что эффект наблюдался при высокой концентрации соли, вызвало подозрение, что он может быть связан с изменением поверхностных зарядов. Замена однозарядных ионов в фоновом электролите на меньшую концентрацию (10–20 мМ) двухзарядных (Ca^{2+} и Mg^{2+}) привела к тому, что возрастание сигнала стало происходить гораздо быстрее. Это указывало на вероятную роль экранирования фиксированных отрицательных зарядов фосфолипидов катионами фонового электролита, в котором двухзарядные катионы значительно эффективнее, чем однозарядные. Экранирование поверхностных зарядов мембран протеолипосом и ИЛМ должно было ускорить их агрегацию и адсорбцию на ИЛМ, разделявшей отсеки ячейки. Это означало, что возрастание фотоиндуцированной $\Delta\psi$ могло происходить за счет БР в мембранах протеолипосом, ассоциированных с ИЛМ, за счет слипания с нею протеолипосом. Чтобы убедиться в этом, Е.А. Либерман предложил провести такой же эксперимент в отсутствие проникающих ионов. И действительно, даже без добавления в среду ФКБ^- , при инкубации суспензии протеолипосом в течение 30 минут в присутствии 20 мМ CaCl_2 наблюдалось постепенное увеличение амплитуды фотоиндуцированной $\Delta\psi$ вплоть до $\sim 250 \text{ мВ}$.

В отличие от метода смешивания суспензии БР в детергенте с раствором фосфолипидов в н-декане для образования ИЛМ, первоначально используемого Л.А. Драчевым и А.Д. Кауленом, при встраивании БР в мембраны липосом в этих экспериментах наблюдалась высокая степень асимметрии — более 95% молекул белка оказывались ориентированными «плюсом» внутрь (это было доказано позже с использованием ионов лантана, ингибирующих работу БР при связывании во «входном» протонном канале на его протон-донорной стороне). В результате светозависимое образование $\Delta\psi$ всегда имело один и тот же знак и относительно небольшой разброс величины, определяемый преимущественно точностью, с которой было возможно задавать суммарный внутренний объем протеолипосом. Очевидно, что такая асимметрия встраивания белка была

обусловлена, в частности, асимметрией мембраны, имеющей ненулевую кривизну в случае замкнутой сферической везикулы. В случае же плоской ИЛМ кривизна, которая могла бы обеспечить асимметрию встраивания, очевидно, отсутствовала.

Таким образом, как у метода синтетических проникающих ионов, так и у метода смешивания БР с раствором фосфолипидов имелись свои достоинства и недостатки. Обнаружение адсорбции протеолипосом на поверхности ИЛМ позволило «гибридизировать» эти два метода, объединив их достоинства: высокую степень асимметрии встраивания белка в мембраны протеолипосом (а, следовательно, и большую величину сигнала), характерную для косвенного метода синтетических проникающих ионов, и непосредственное измерение генерируемого белком потенциала, обеспечиваемое прямым электрометрическим методом. Дальнейшее развитие этого гибридного метода было связано с работами Л.А. Драчева и его сотрудников — А.Д. Каулена и А.Ю. Семенова. В литературе за ним закрепилось название «прямого электрометрического метода» или «метода Драчева».

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ЭКВИВАЛЕНТНОЙ СХЕМЫ И ПОДБОР ИСКУССТВЕННОЙ МЕМБРАНЫ

«Гибридизация» двух методических подходов обеспечивала новые экспериментальные возможности, однако одновременно ставила новые вопросы. Выше мы говорили об ассоциации протеолипосом с поверхностью плоской ИЛМ. Однако эквивалентна ли такая белково-липидная система той, которая образуется при непосредственном встраивании белков в присутствии детергента в ИЛМ (кроме различий в асимметрии встраивания)? От этого зависела правильная количественная интерпретация результатов измерений. Эквивалентность могла бы обеспечиваться, если бы мембрана протеолипосомы, адсорбирующейся на плоскую ИЛМ, претерпевала разрыв и фосфолипиды мембран протеолипосом «растекались» по ИЛМ, а белки оказывались бы встроены в ИЛМ. Однако возможен и альтернативный сценарий, при котором мембраны протеолипосом не претерпевают топологических изменений и остаются замкнутыми везикулами, ассоциированными с поверхностью ИЛМ. В этом случае внутри протеолипосом сохранялась бы водная фаза (рис. 3, а).

При этом гипотетически возможны разные варианты распределения белков: они могли бы переходить из мембран протеолипосом в ИЛМ либо же оставаться в пределах мембран протеолипосом. Подобный же вопрос впоследствии возник при работе с природными замкнутыми везикулами — хроматофорами фотосинтезирующих бактерий для распределенных в мембранах хроматофоров молекул пула убихинона-10. Однако если гидрофобный убихинон свободно перераспределялся между мембранами хроматофоров и ИЛМ, то для молекул белка такой обмен не происходил. Доказательство того, что внутри везикул сохраняется водная фаза (получившая в литературе жаргонное название «третья вода»), а все белки локализованы на внешних поверхностях пузырьков, было основано на измерениях потенциалов, генерируемых в присутствии разобщителей-протонофоров различного типа. Так, грамицидин А, образующий каналы в мембране, существенно снижал потенциал, генерируемый БР на свету, однако практически не влиял на общее электрическое сопротивление мембраны. В то же время протонофоры «челночного типа» (например, карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразон) снижали и светозависимый потенциал, и сопротивление мембраны [20]. Такое различие, очевидно, могло возникать только из-за наличия в системе двух типов мембран. Грамицидин создавал каналы в той же бислойной мембране, в которой были локализованы генераторы $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ (БР). Однако в относительно толстой плоской ИЛМ, разделяющей ячейки и определяющей сопротивление измеряемой системы, грамицидин не мог образовать сквозные каналы, в то время как для «челночных» протонофоров она оставалась проницаемой (рис. 3, б).

Как в экспериментах Драчева и Каулена с непосредственным встраиванием молекул белка в плоскую мембрану, так и в опытах Семенова на протеолипосомах использовали толстые (толщиной порядка 100 мкм) фосфолипидные мембраны, разделяющие два отсека тefлоновой экспериментальной ячейки. Несмотря на то что белок не мог пронизать такую мембрану насквозь и перенести через нее протон, тем не менее при встраивании в нее он превращал ее в аналог H^+ -селективного электрода, что позволяло регистрировать электрический сигнал. Однако такая мембрана обладала одним существенным недостатком: при большом липидном объеме мембрана обладала низкой электрической емкостью, что приводило к значительному увеличению времени электрического отклика системы. В итоге

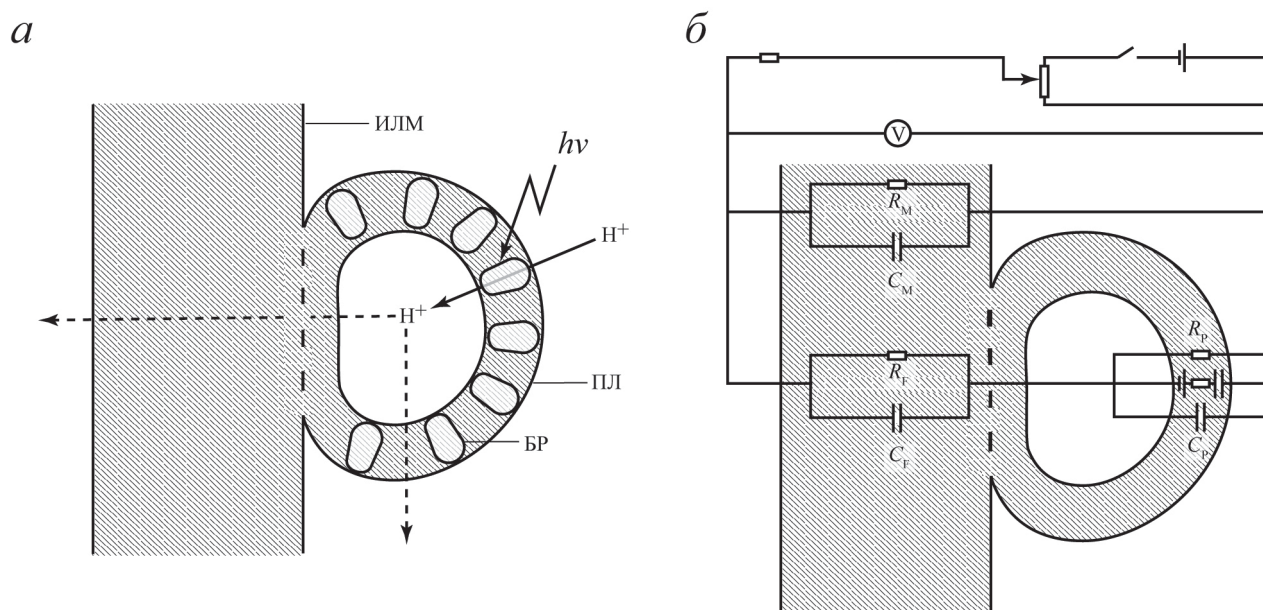


Рис. 3. Схема взаимодействия протеолипосомы, содержащей бактериородопсин, с плоской фосфолипидной ИЛМ (а) и эквивалентная электрическая схема (б). ПЛ — протеолипосома, БР — молекула бактериородопсина. Ориентация молекул БР в мембране ПЛ асимметрична (~95%-ное преобладание ориентации, при которой протоны закачиваются внутрь ПЛ). Экспериментальные данные показывают, что в области слияния мембран БР практически отсутствует. V — электрометрический вольтметр с высоким входным сопротивлением; C_P , R_P , C_M , R_M , C_F , R_F — значения электрической емкости (C) и сопротивления (R) мембраны ПЛ, ИЛМ и области слияния мембран соответственно. Изображение дано не в масштабе (толщина ИЛМ превосходит толщину мембраны ПЛ на несколько порядков)

минимальное характерное время процесса генерации $\Delta\psi$, которое могло быть получено в такой системе, составляло около 10 мс. Это было значительно больше, чем характерные времена основных процессов переноса заряда в БР, и для экспериментов по изучению кинетики этого переноса требовалась значительно более тонкая мембрана. Аналог природной — бислойной фосфолипидной — мембраны, к сожалению, использовать не удавалось: несмотря на многие попытки получить бислойную мембрану (такая мембрана получила название «черной мембраны» вследствие пониженного оптического пропускания, возникающего из-за интерференции отраженного от двух поверхностей света, хорошо заметного под биноклем), она оставалась очень нестабильной. В «черную мембрану» не удавалось встроить белки — при попытках добавить белок в детергенте в электролит, омывающий мембрану, мембрана неизменно лопалась. Пришлось отказаться от попытки использования плоских бислойных мембран в электрометрическом методе и искать другие варианты.

Поиск других вариантов плоской ИЛМ оказался весьма длительным и непростым. Было очевидно, что для повышения прочности мембраны необходимо как-то «армировать» ее. В качестве каркаса, составляющего жесткую основу такой армированной мем-

браны, пробовали различные мембранные пористые фильтры, которые пропитывали раствором фосфолипидов. Несмотря на то что толщина самих фильтров была достаточно большой (как и для толстой фосфолипидной мембраны, порядка 0,1 мм), была надежда, что фосфолипидные пленки, которые затянут поры в материале фильтра, окажутся тоньше. При работе с фильтрами стало ясно, что не только материал фильтра и размер пор существенны для измерительной системы, но и исследуемые объекты. Так, для исследования протеолипосом с БР практически все изученные виды фильтров обеспечивали эффективные измерения. В то же время при работе с хроматофорами свойства фильтров начинали сказываться на результатах. Использование фильтров из химически инертного материала (флуоропор, тефлон) позволяло получить самые большие электрические ответы, независимо от диаметра пор, сравнимые с величиной потенциала на фосфолипидной мембране (до 0,25 В; [21, 22]). При работе с хроматофорами (но не протеолипосомами) и фильтрами на основе целлюлозы электрический отклик системы оказывался меньшим, причем для смеси ацетата и нитрата целлюлозы ниже, чем для чистого нитрата. В случае присутствия в материале фильтра ацетата целлюлозы начал играть роль и размер пор — более крупные

поры обеспечивали более высокие значения измеряемых потенциалов [21]. Однако при использовании любых фильтров оставалась та же непреодолимая временная граница разрешающей способности — порядка 10 мс.

Кроме фильтров, имевшихся тогда в продаже, для получения подходящих «каркасов» попытались использовать даже существовавшие на тот момент «высокие технологии». Вспоминается визит Л.А. Драчева и его молодых коллег в Дубну в руководимую Г.Н. Флеровым Лабораторию ядерных реакций Объединенного института ядерных исследований. Для различных технических задач в лаборатории изготавливали собственные фильтры: пластинки из различных полимеров помещали под пучок ускорителя, который превращал их в «решето». Диаметр и плотность расположения дыр в этом решете можно было варьировать за счет тех или иных параметров пучка. Однако ни один из таких фильтров не подошел — фосфолипидная мембрана его не пропитывала, отказываясь садиться на длинные узкие цилиндрические поры.

Последний вариант, найденный Драчевым и его сотрудниками и оказавшийся наилучшим для их исследований — нитроцеллюлозные коллодиевые пленки. Такие пленки активно использовались в качестве подложек для электронной микроскопии и потому были достаточно доступны. Пленка, состоящая из длинных целлюлозных нитей, образующих небольшое число слоев, имела сравнительно небольшую толщину (~200–300 нм). При пропитке раствором фосфолипидов она обеспечивала достаточную устойчивость мембраны и одновременно малое время электрического отклика (порядка 200 нс). Большая часть последующих работ лаборатории была выполнена именно на коллодиевых ИЛМ. Поиск этого ключевого компонента измерительной системы занял почти пять лет.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ ПРЯМОГО ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

С 1974 по 1980 г. в системах: толстая фосфолипидная мембрана — замкнутая везикула (протеолипосомы, содержащие различные мембранные белки или хромофоры) было продемонстрировано образование разности потенциалов БР, зрительным родопсином, митохондриальными цитохром *c* оксидазой, АТФазой и трансгидрогеназой, а также хромофорами фотосинтезирующих бактерий [23–27].

В 1979–1980 гг. аналогичные измерения были проведены на различных мембранных пористых фильтрах, пропитанных раствором фосфолипидов в *n*-декане. Типичный фотоэлектрический ответ на включение и выключение освещения в системе мембранный фильтр — БР протеолипосомы приведен на рис. 4. В этом случае при включении света наблюдалось быстрое образование $\Delta\psi$ со знаком плюс внутри протеолипосом, достигавшее амплитуды ~200 мВ. Фотоэлектрический сигнал оставался примерно на таком уровне по крайней мере 10 минут освещения и полностью спадал при выключении освещения. При хранении системы мембранный фильтр — БР протеолипосомы в темноте светозависимый потенциал с амплитудой > 150 мВ сохранялся в течение 72 часов, а затем спадал параллельно со спадом сопротивления ИЛМ.

В предыдущем разделе было указано, что при использовании «толстых» фосфолипидных ИЛМ и ИЛМ на основе мембранных фильтров наличие малой емкости C_M , сопоставимой с входной емкостью операционного усилителя (~5 пФ), приводило к искажению кинетики образования $\Delta\psi$ в ответ на лазерную вспышку. Поэтому для исследования быстрой кинетики была применена коллодиевая фосфолипидная ИЛМ толщиной ~200 нм, значение C_M которой составляло ~5000 пФ. Временное разрешение такой системы составляло 0,2 мкс. В этой системе была исследована индуцированная лазерными вспышками кинетика образования $\Delta\psi$ на протеолипосомах с БР и бактериальными реакционными центрами (РЦ), а также на хромофорах из различных фотосинтезирующих бактерий [28–30].

Как показано на рис. 4, *a*, лазерная вспышка в системе коллодиевая ИЛМ — протеолипосомы со встроенным фотосинтетическими РЦ из *Rhodobacter sphaeroides* в отсутствие донора

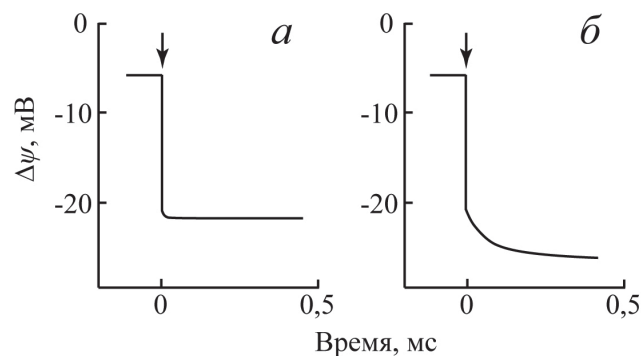


Рис. 4. Фотоэлектрический ответ протеолипосом, содержащих бактериальный фотосинтетический реакционный центр без добавок (*a*) и в присутствии 2 мМ аскорбата и 2 мкМ природного донора электрона цитохрома *c* (*б*)

электрона вызывает образование $\Delta\psi$ со знаком минус внутри амплитудой $\sim 15\text{--}20\text{ мВ}$. Этот потенциал обусловлен образованием ион-радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$, образующейся при переносе электрона от первичного донора РЦ *R. sphaeroides*, димера бактериохлорофилла P_{870} , к связанному в РЦ убихинону Q_A , выполняющему роль акцептора [31]. При добавлении 2 мМ аскорбата и 2 мкМ природного донора электрона цитохрома c_2 в кинетике нарастания фотоэлектрического ответа, помимо быстрой фазы, наблюдалась дополнительная более медленная компонента с характерным временем $\tau = 250\text{ мкс}$ (рис 4, б). Наблюдаемая фаза нарастания генерации $\Delta\psi$ была обусловлена электрогенным восстановлением P_{870}^+ от цитохрома c_2 . На препаратах хроматофоров из *R. sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*, *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, *Chromatium minutissimum* и *Blastochloris viridis*, помимо электрогенных реакций, обусловленных восстановлением окисленного первичного донора P^+ от различных цитохромов типа c , в ответ на четные вспышки света была обнаружена еще одна электрогенная компонента, связанная с протонированием из внешней водной фазы вторичного хинонного акцептора Q_B [32]. Кроме того, на хроматофорах *R. sphaeroides* были исследованы индуцированные лазерными вспышками электрогенные реакции, обусловленные переносом электронов и протонов в цитохромном bc_1 -комплексе [33].

Аналогичный подход был применен к исследованию электрогенных реакций на протеолипосомах, содержащих комплексы фотосистем (ФС) 1 и 2 из цианобактерий и высших растений [34, 35]. На рис. 5 приведены типичные фотоэлектрические ответы протеолипосом, содержащих комплексы ФС 1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803.

В отсутствие добавок (кривая 1) на этих препаратах наблюдается фотоэлектрический ответ со знаком минус внутри амплитудой $\sim 50\text{ мВ}$ и кинетикой спада с $\tau = 100\text{ мс}$. При добавлении 100 мМ сильного восстановителя — дитионита натрия, амплитуда $\Delta\psi$ несколько снижается, а спад ускоряется до нескольких миллисекунд (кривая 2). Этот эффект обусловлен восстановлением дитионитом терминальных $4Fe4S$ кластеров F_A/F_B , в результате чего спад $\Delta\psi$ происходит с предыдущего $4Fe4S$ кластера F_X . В то же время добавление 0,4 М природного донора электрона для ФС 1 — пластоцианина, вызывает появление дополнительной электрогенной компоненты с $\tau = 3\text{ мс}$ (кривая 3). Эта компонента обусловлена электрогенным восстановлением фотоокисленного первичного донора электрона ФС 1 — димера хлорофилла P_{700}^+ — от пластоцианина.

Одной из важных особенностей прямого электрометрического метода оказалась возможность оценивать с его помощью распределение диэлектрической проницаемости (ϵ) в мембранных гидрофобных белках, содержащих редокс-кофакторы. Перемещение заряда (электрона или протона) внутри белка от одной группы к другой вызывает изменение разности потенциалов между двумя сторонами мембраны. Это изменение зависит как от расстояния, на которое перемещается заряд в мембране (точнее, от нормальной по отношению к поверхности мембраны компоненты его перемещения), так и от значения ϵ той области белка, в которой это перемещение происходит. В области, где содержится больше полярных аминокислотных остатков, и, следовательно, выше ϵ , индуцируемая перемещением заряда разность потенциалов оказывается ниже, а в областях с гидрофобными остатками (низкое значение ϵ) — выше. С появлением

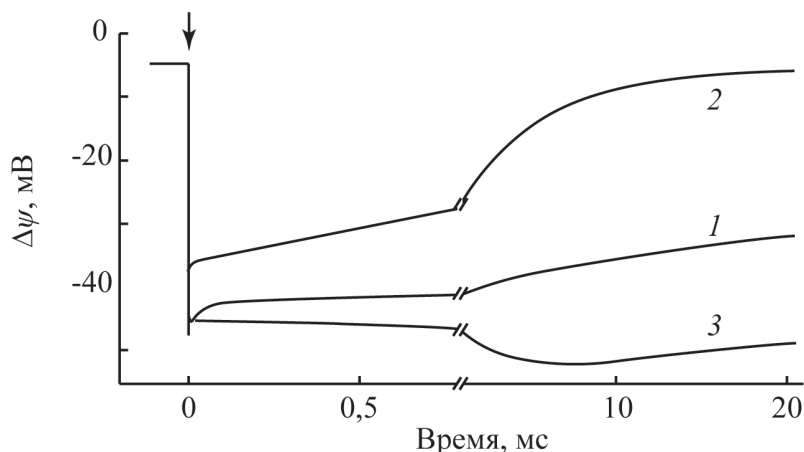


Рис. 5. Фотоэлектрический ответ протеолипосом, содержащих ФС 1: 1 — без добавок, 2 — в присутствии дитионита натрия, 3 — в присутствии 10 мМ аскорбата и 0,4 мМ природного восстановителя ФС 1 пластоцианина

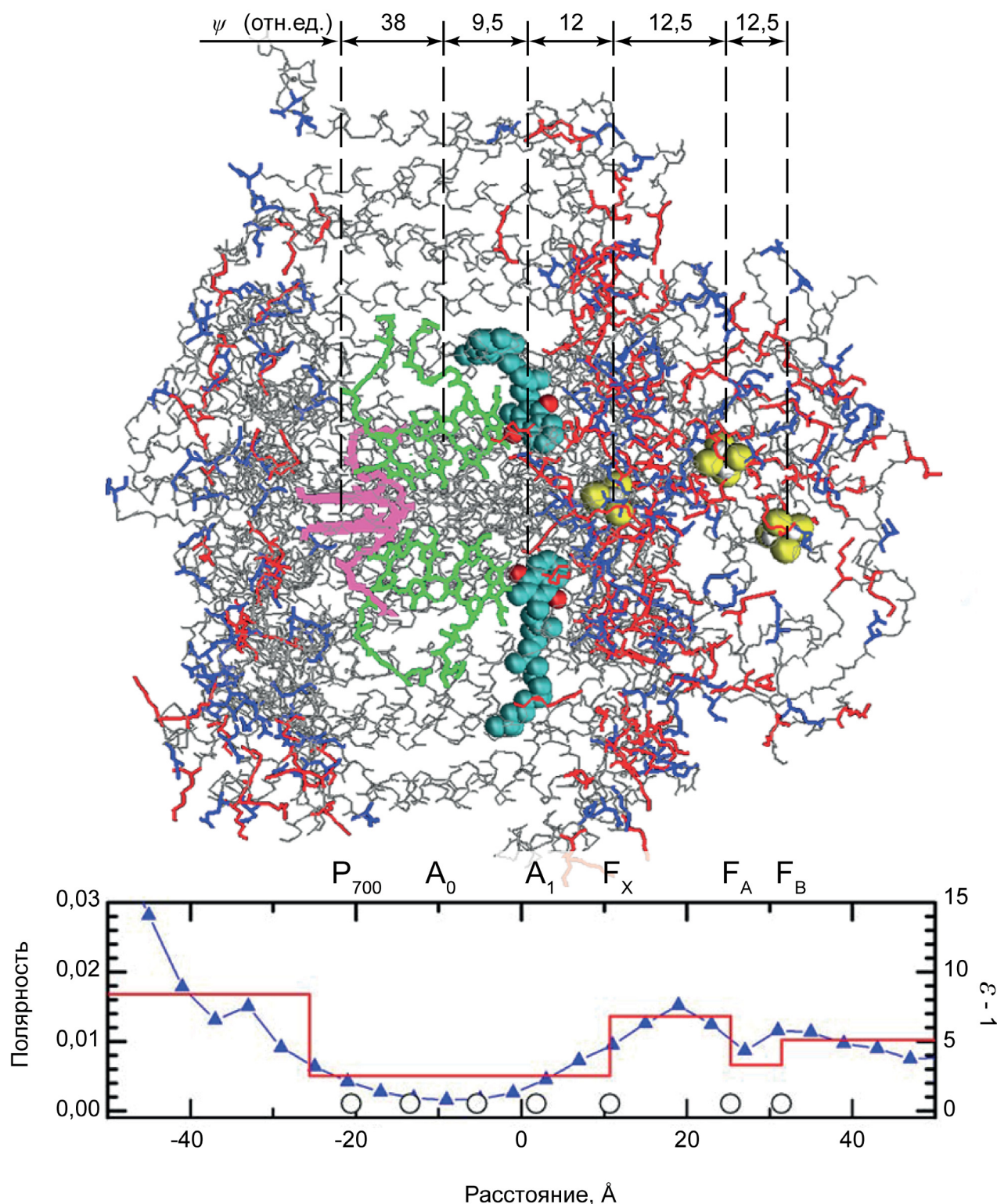


Рис. 6. Трехмерная структура ФС I (донорная сторона (экспонированная в люмен) — слева, акцепторная (экспонированная в стrome) — справа) и график распределения полярности и диэлектрической проницаемости белкового комплекса вдоль нормали к плоскости мембраны. Полярность рассчитана как доля атомов, несущих заметный частичный заряд (N, O, S боковых цепей аминокислотных остатков). Кругами у оси абсцисс обозначены координаты расположения редокс-кофакторов. Перенос электрона между первичным донором P_{700} (показан в структуре розовым цветом) и хинонными акцепторами A_1 (показаны бирюзовыми и красными сферами, обозначающими атомы углерода и кислорода соответственно, входящими в состав хинона) может происходить по двум различным ветвям A и B (на рисунке — верхняя и нижняя). В каждой из ветвей между P_{700} и A_1 расположена пара молекул хлорофилла (показаны зеленым), функционирующая как единый кофактор A_0 в силу электронного сопряжения между двумя параллельными друг другу порфириновыми кольцами. В структуре белков ФС I показаны только пептидные цепи (серым цветом) и боковые цепи анионо- и катионогенных аминокислотных остатков (синий и красный цвета соответственно)

независимых данных о расстояниях между кофакторами (на основе рентгеноструктурного анализа) стало возможным извлечь из данных, предоставляемых прямым электрометрическим методом, среднее значение ϵ в области белка между двумя кофакторами. Таким образом, группе Драчева удалось оценить распределение ϵ в бактериальном фотосинтетическом РЦ из *R. sphaeroides*, в ФС 1 из цианобактерий и ФС 2 из высших растений [36, 37]. Разумеется, подобные данные имеют лишь оценочный характер, поскольку полярность соседних областей белка также сказывается на величине генерируемого потенциала. Однако сопоставление полученных таким образом данных с распределением полярных и неполярных остатков в белке показывает хорошее соответствие между этими характеристиками белка. На рис. 6 приведен график распределения вдоль нормали к поверхности мембраны диэлектрической проницаемости ФС 1, оцененной с помощью прямого электрометрического метода [38]. Видно, что характер этого распределения хорошо соответствует распределению полярных групп в структуре белкового комплекса. Доля атомов, несущих заметный парциальный заряд и обуславливающих диэлектрический ответ атомной подсистемы белка, определенная на основе данных рентгеноструктурного анализа о трехмерной структуре ФС 1, приведена на том же графике. Сами полярные группы показаны в структуре ФС 1 синим (остатки Asp и Glu) и красным цветом (Lys, Arg, His). В структуре также отмечены редокс-кофакторы (первичный донор электрона, P_{700} , первичные и вторичные акцепторы в обеих ветвях редокс-кофакторов A и B, A_0 и A_1 , и $4Fe4S$ акцепторы F_X , F_A , F_B), а также показаны значения генерируемого потенциала, измеряемого электрометрическим методом, при переносе электрона на соответствующем участке.

Данные о распределении ϵ в ФС 1 послужили одной из основ для построения алгоритма расчета электростатических взаимодействий в белковом комплексе и в конечном счете определения окислительно-восстановительных характеристик кофакторов переносчиков электрона. Второй основой предложенного алгоритма стали идеи Л.И. Кришталлика о преодолении конфликта между парадигмой макроскопической электростатики и использованием в расчетах рентгеноструктурных данных о трехмерной структуре белка и, в частности, парциальных зарядов его атомов. Л.И. Кришталлик показал, что эти данные несут разный объем информации о различных компонентах

изменения свободной энергии кофактора при переносе его внутрь белка, которые, следовательно, должны быть рассчитаны с использованием разных подходов и учетом свойств белка через различные диэлектрические константы [39, 40]. В итоге впервые в рамках одного подхода удалось рассчитать редокс-потенциалы всех кофакторов ФС 1, начиная с первичного донора P_{700}/P_{700}^+ и заканчивая железосерными кластерами F_X , F_A , F_B [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из следствий хемиосмотической концепции Питера Митчелла являлось существование класса мембранных белков — генераторов $\Delta\psi$. С помощью прямого электрометрического метода было продемонстрировано существование таких белков, что послужило одним из доказательств справедливости этой концепции и способствовало в итоге присуждению Митчеллу заслуженной Нобелевской премии по химии.

Прямой электрометрический метод и его варианты применялись (и применяются) не только в отделе Драчева, а позже в отделах А.Д. Каулена (АДК) и А.Ю. Семенова (АЮС), но и в некоторых зарубежных лабораториях. В частности, этот метод был использован в лаборатории Дж. Фейера (Ла Хойя, США) для изучения электрогенных реакций в бактериальных РЦ [41], в лаборатории П. Бжезинского в Гетеборге (Швеция) для исследования электрогенных реакций в ФС 1 [42], в лаборатории В. Юнге в Оснабрюке (Германия) для исследования кинетики генерации $\Delta\psi$ при переходах между S-состояниями в комплексах ФС 2 [43], в лаборатории М. Викстрема в Хельсинки (Финляндия) для исследования электрогенных реакций при функционировании терминальных оксидаз митохондрий и бактерий (см. обзор Wikström и Verkhovsky [44]).

Разработка прямого электрометрического метода была оценена как одно из главных (среди примерно 40) экспериментальных исследований XX века в областях окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, наряду с работами Г. Эмбдена и О. Мейергофа, В.А. Энгельгардта, О. Варбурга, В.А. Белицера и Е.Т. Цыбаковой, А. Ленинджера, Д. Арнона, Б. Чанса, П. Бойера и других [45].

Хотелось бы остановиться на роли самого Л.А. Драчева в разработке и модификации прямого электрометрического метода. Л.А. был радиофизиком, специалистом по электронике и лазерной технике высочайшего

уровня. Когда он пришел на работу в Межфакультетскую лабораторию МГУ, то имел довольно поверхностное представление о белках и в целом биохимии и молекулярной биологии. Большую роль в привлечении его интереса к мембранным белкам сыграли Е.А. Либерман и В.П. Скулачев.

С 1973 по 1993 г. он постоянно работал с молодыми в то время биохимиками АДК и одним из авторов настоящей статьи АЮС. АДК и АЮС выполняли биохимическую работу, выделяя белки, получая различные протеолипосомы или хроматофоры, варьируя состав фосфолипидов протеолипосом и ИЛМ, а также подбирая различные мембранные фильтры в качестве каркаса для ИЛМ. Кроме того, они непосредственно занимались измерениями $\Delta\psi$, продуцируемой различными мембранными белками в ответ на включение освещения или добавку соответствующего субстрата; проводили рН- и редокс-титрование фотоэлектрических сигналов, исследовали кинетику образования $\Delta\psi$ в ответ на лазерные вспышки. Однако детальная разработка метода, включая систему регистрации образования мембранного потенциала, и доказательства эквивалентной электрической схемы были бы невозможны без кропотливой и высокопрофессиональной работы Л.А. Драчева. Кроме всего прочего, Л.А. был высококласс-

ным инженером, и любые проблемы с приборами он выявлял и устранял чрезвычайно эффективно.

Однажды сотрудники в каком-то контексте сказали ему: «...ведь Вы — наш научный руководитель!» На что Драчев в полушутку ответил: «Я не научный руководитель, а технический директор». Однако Л.А., конечно, существенно преуменьшил свою роль. В действительности, полученные результаты постоянно обсуждались Л.А. Драчевым и его сотрудниками, а при их интерпретации и планировании будущих экспериментов его мнение играло чрезвычайно важную роль.

Вклад авторов. В.В. Птушенко — написание части разделов рукописи, обсуждение текста, редактирование; А.Ю. Семенов — формулирование концепции статьи, написание части разделов рукописи, обсуждение текста, редактирование.

Финансирование. Настоящая работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00025).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тихонов А. Н. (2012) Энергетическая и регуляторная роль протонного потенциала в хлоропластах, *Биохимия*, **77**, 1155-1176, doi: 10.1134/S0006297912090027.
2. Johnson, M. P., and Ruban, A. V. (2014) Rethinking the existence of a steady-state $\Delta\psi$ component of the proton motive force across plant thylakoid membranes, *Photosynth. Res.*, **119**, 233-242, doi: 10.1007/s1120-013-9817-2.
3. Skulachev, V. P. (1984) Sodium bioenergetics, *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 483-485, doi: 10.1016/0968-0004(84)90317-7.
4. Weber, B. H., and Prebble, J. N. (2006) An issue of originality and priority: the correspondence and theories of oxidative phosphorylation of Peter Mitchell and Robert JP Williams, 1961-1980, *J. History Biol.*, **39**, 125-163, doi: 10.1007/s10739-005-3052-4.
5. Junge, W., and Witt, H. T. (1968) On the ion transport system of photosynthesis — Investigations on a molecular level, *Zeitschrift Für Naturforschung B*, **23**, 244-254, doi: 10.1515/znb-1968-0222.
6. Булычев А., Андрианов В., Курелла Г., Литвин Ф. (1971) Трансмембранный потенциал клетки и хлоропласта высшего наземного растения, *Физиол. Раст.*, **18**, 248-256.
7. Булычев А., Андрианов В., Курелла Г., Литвин Ф. (1971) Трансмембранный потенциал хлоропласта и его фотоиндуцированные изменения, *Доклады АН СССР*, **197**, 473-477.
8. Bulychev, A. A., Andrianov, V. K., Kurella, G. A., and Litvin, F. F. (1972) Micro-electrode measurements of the transmembrane potential of chloroplasts and its photoinduced changes, *Nature*, **236**, 175-177, doi: 10.1038/236175a0.
9. Witt, H. T., and Zickler, A. (1974) Vectorial electron flow across the thylakoid membrane. Further evidence by kinetic measurements with an electrochromic and electrical method, *FEBS Lett.*, **39**, 205-208, doi: 10.1016/0014-5793(74)80051-7.
10. Fowler, C. F., and Kok, B. (1974) Direct observation of a light-induced electric field in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **357**, 308-318, doi: 10.1016/0005-2728(74)90069-3.
11. Joliot, P., and Joliot, A. (1984) Electron transfer between the two photosystems. I. Flash excitation

- under oxidizing conditions, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **765**, 210-218, doi: 10.1016/0005-2728(84)90015-X.
12. Deprez, J., Trissl, H. W., and Breton, J. (1986) Excitation trapping and primary charge stabilization in *Rhodospseudomonas viridis* cells, measured electrically with picosecond resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1699-1703, doi: 10.1073/pnas.83.6.1699.
 13. Trissl, H.-W., Leibl, W., Deprez, J., Dobek, A., and Breton, J. (1987) Trapping and annihilation in the antenna system of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **893**, 320-332, doi: 10.1016/0005-2728(87)90053-3.
 14. Либерман Е., Мохова Е., Скулачев В., Топалы В. (1968) Действие разобщителей окислительного фосфорилирования на бимолекулярные фосфолипидные мембраны. *Биофизика*, **13**, 188-193.
 15. Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078, doi: 10.1038/2221076a0.
 16. Oesterhelt, D., and Stoekenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Nat. New Biol.*, **233**, 149-152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
 17. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Ostroumov, S. A., and Skulachev, V. P. (1974) Electrogenesis by bacteriorhodopsin incorporated in a planar phospholipid membrane, *FEBS Lett.*, **39**, 43-45, doi: 10.1016/0014-5793(74)80012-8.
 18. Kagawa, Y., and Racker, E. (1971) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing 32Pi-adenosine triphosphate exchange, *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477-5487, doi: 10.1016/S0021-9258(18)61930-1.
 19. Kayushin, L. P., and Skulachev, V. P. (1974) Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: Reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating $\Delta\psi$ and ΔpH , *FEBS Lett.*, **39**, 39-42, doi: 10.1016/0014-5793(74)80011-6.
 20. Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., Plakunova, V. G., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059-7065, doi: 10.1016/S0021-9258(17)32940-X.
 21. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Самуилов В. Д., Северина И. И., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Чекулаева Л. Н. (1979) Встраивание протеолипосом и хроматофоров в мембраны на основе фильтров, *Биофизика*, **24**, 1035-1042.
 22. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Semenov, A. Y., Severina, I. I., and Skulachev, V. P. (1979) Lipid-impregnated filters as a tool for studying the electric current-generating proteins, *Anal. Biochem.*, **96**, 250-262, doi: 10.1016/0003-2697(79)90580-3.
 23. Большаков В. И., Драчев А. Л., Каламкаров Г. Р., Каулен А. Д., Островский М. А., Скулачев В. П. (1979) Общность свойств бактериального и зрительного родопсинов: превращение энергии света в разность электрических потенциалов, *Доклады Академии Наук СССР*, **249**, 1462-1466.
 24. Drachev, L. A., Kalamkarov, G. R., Kaulen, A. D., Ostrovsky, M. A., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes: II. Visual rhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 471-481, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06362.x
 25. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324, doi: 10.1038/249321a0.
 26. Drachev, L. A., Kondrashin, A. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1980) Reconstitution of biological molecular generators of electric current: transhydrogenase, *Eur. J. Biochem.*, **113**, 213-217, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb06158.x.
 27. Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Samuilov, V. D., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1976) Generation of electric current by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* and reconstitution of electrogenic function in subchromatophore pigment-protein complexes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **440**, 637-660, doi: 10.1016/0005-2728(76)90048-7.
 28. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes: I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461-470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
 29. Drachev, L. A., Semenov, A. Y., Skulachev, V. P., Smirnova, I. A., Chamorovsky, S. K., Kononenko, A. A., Rubin, A. B., and Uspenskaya, N. Ya. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes: III. Bacterial photosynthetic redox system, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 483-489, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06363.x.
 30. Chamorovsky, S. K., Drachev, A. L., Drachev, L. A., Karagul'yan, A. K., Kononenko, A. A., Rubin, A. B., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1985) Fast phases of the generation of the transmembrane electric potential in chromatophores of the photosynthetic bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **808**, 201-208, doi: 10.1016/0005-2728(85)90044-1.
 31. Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Kotova, E. A., Mamedov, M. D., Samuilov, V. D., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1986) The effect of cytochrome *c*, hexammineruthenium and ubiquinone-10 on the kinetics of photoelectric responses of *Rhodospirillum rubrum* reaction centres,

- Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **848**, 137-146, doi: 10.1016/0005-2728(86)90169-6.
32. Kaminskaya, O. P., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1986) Electrogenic reduction of the secondary quinone acceptor in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*: rapid kinetics measurements, *FEBS Lett.*, **202**, 224-228, doi: 10.1016/0014-5793(86)80691-3.
 33. Drachev, L. A., Kaurov, B. S., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. Y., Semenov, A. Y., Shinkarev, V. P., Skulachev, V. P., and Verkhovsky, M. I. (1989) Flash-induced electrogenic events in the photosynthetic reaction center and *bc1* complexes of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **973**, 189-197, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80421-9.
 34. Mamedov, M. D., Mamedova, A. A., Chamorovsky, S. K., and Semenov, A. Y. (2001) Electrogenic reduction of the primary electron donor P700 by plastocyanin in photosystem I complexes, *FEBS Lett.*, **500**, 172-176, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02615-1.
 35. Mamedov, M. D., Gourovskaya, K. N., Vassiliev, I. R., Golbeck, J. H., and Sememov, A. Y. (1998) Electrogenicity accompanies photoreduction of the iron-sulfur clusters FA and FB in photosystem I, *FEBS Lett.*, **431**, 219-223, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00759-5.
 36. Чаморовский К., Чаморовский С., Семенов А. (2005) Диэлектрические и фотоэлектрические свойства фотосинтетических реакционных центров, *Биохимия*, **70**, 315-322.
 37. Semenov, A. Y., Mamedov, M. D., and Chamorovsky, S. K. (2006) Electrogenic reactions associated with electron transfer in photosystem I, *Photosystem I: The Light-driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, Springer, p. 319-338, doi: 10.1007/978-1-4020-4256-0_21.
 38. Ptushenko, V. V., Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I., and Semenov, A. Y. (2008) Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I, *Photosynth. Res.*, **97**, 55-74, doi: 10.1007/s11120-008-9309-y.
 39. Krishtalik, L. I. (1989) Dielectric constant in calculations of the electrostatics of biopolymers, *J. Theor. Biol.*, **139**, 143-154, doi: 10.1016/S0022-5193(89)80097-9.
 40. Krishtalik, L. I., Kuznetsov, A. M., and Mertz, E. L. (1997) Electrostatics of proteins: description in terms of two dielectric constants simultaneously, *Proteins Struct. Funct. Bioinformatics*, **28**, 174-182, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(199706)28:2<174::AID-PROT6>3.0.CO;2-F.
 41. Brzezinski, P., Okamura, M. Y., and Feher, G. (1992) Structural changes following the formation of D⁺ Q_A⁻ in bacterial reaction centers: measurement of light-induced electrogenic events in RCs incorporated in a phospholipid monolayer, *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center II: Structure, Spectroscopy and Dynamics*, pp. 321-330, doi: 10.1007/978-1-4615-3050-3_36.
 42. Sigfridsson, K., Hansson, O., and Brzezinski, P. (1995) Electrogenic light reactions in photosystem I: resolution of electron-transfer rates between the iron-sulfur centers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3458-3462, doi: 10.1073/pnas.92.8.3458.
 43. Haumann, M., Mulkidjanian, A., and Junge, W. (1997) Electrogenicity of electron and proton transfer at the oxidizing side of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 9304-9315, doi: 10.1021/bi963114p.
 44. Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2007) Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1767**, 1200-1214, doi: 10.1016/j.bbabo.2007.06.008.
 45. Beinert, H. (1992) Trails of inquiry and thought leading toward today's bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1101**, 125-133, doi: 10.1016/S0005-2728(05)80002-7.

LEL A. DRACHEV AND THE DIRECT ELECTROMETRIC METHOD

Review

V. V. Ptushenko and A. Y. Semenov*

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: semenov@belozersky.msu.ru*

In the bioenergetics studies, the direct electrometric method played an important role. This method is based on measuring the electrical potential difference ($\Delta\psi$) between two compartments of the experimental cell generated by some membrane proteins. These proteins are incorporated into closed lipid-protein membrane vesicles associated with an artificial lipid membrane that separates the compartments. The very existence of such proteins able to generate $\Delta\psi$ was one of the consequences of Peter Mitchell's chemiosmotic concept. The discovery and investigation of their functioning contributed to the recognition of this concept

and, eventually the well-deserved awarding of the Nobel Prize to P. Mitchell. Lel A. Drachev (1926-2022) was one of the main authors of the direct electrometrical method. With his participation, key studies were carried out on the electrogenesis of photosynthetic and respiratory membrane proteins, including bacteriorhodopsin, visual rhodopsin, photosynthetic bacterial reaction centers, cytochrome oxidase and others.

Keywords: Mitchell's chemiosmotic hypothesis, transmembrane electric potential difference ($\Delta\psi$), methods of membrane potential measurement, molecular electric generators, proteoliposomes, chromatophores, bacteriorhodopsin, photosystem I