
В.В. ПОДОРВАНОВ, О.К. ЗОЛОТАРЬОВА, О.А. ЧОРНОШТАН

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ 01001
membrana@ukr.net

УЧАСТЬ БИКАРБОНАТУ В РЕГУЛЯЦІЇ ФОТОХІМІЧНИХ РЕАКЦІЙ В ХЛОРОПЛАСТАХ ШПИНАТУ

Ключові слова: бикарбонат, хлоропласти, карбоангідраза, ФС2

V.V. PODORVANOV, E.K. ZOLOTAREVA, A.A. CHORNOSHTAN

M.G. Kholodny Institute of botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

PARTICIPATION OF BICARBONATE IN REGULATION OF PHOTOCHEMICAL REACTIONS IN CHLOROPLASTS HIGHER PLANTS

It is known that bicarbonate stimulates photochemical reactions in chloroplasts. There is at least two pools of bound bicarbonate with different affinity of its binding to thylakoids, and evidently only the high-affinity one (1 HCO_3^- per 400—600 Chl molecules) controls photochemical reactions in PS2. Interpretations of the stimulating effect of bicarbonate on the activity of PS2 are contradictory, and the functional role the lower-affinity pool (close to Chl concentration) which can be removed without essential effect for PS2, remains unknown. The aim of the present work was investigation of relationship between the amount of the membrane-bound HCO_3^- ions and light-induced proton uptake (ΔH^+) by suspension of isolated spinach chloroplasts. The inhibitors of carboanhydrase hydrophylic acetazolamide and lipophyllic ethoxazolamide both reduced the amount of bound bicarbonate and suppressed ΔH^+ in 6,0—8,0 pH range. It is concluded that lower-affinity pool of bound bicarbonate controls light-dependent proton transport in chloroplasts.

Key words: bicarbonate, chloroplasts, carboanhydrase, PS2

В.В. ПОДОРВАНОВ, О.К. ЗОЛОТАРЬОВА, А.А. ЧОРНОШТАН

Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного НАН України, г. Київ

УЧАСТИЕ БИКАРБОНАТА В РЕГУЛЯЦИИ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В ХЛОРОПЛАСТАХ ШПИНАТА

Известно, что бикарбонат стимулирует фотохимические реакции в хлоропластах. В тилакоидах найдено по крайней мере два пула связанного бикарбоната: прочно связанный (1 HCO_3^- на 400-600 молекул хлорофилла) контролирующей фотохимическую активность ФС2 и слабо связанный (1 HCO_3^- на 1 молекулу хлорофилла), который может быть удален без существенного влияния на фотохимическую активность ФС2. Функциональная роль слабо связанного бикарбоната неизвестна. Целью настоящей работы было исследование взаимосвязи между количеством мембраносвязанных HCO_3^- ионов и светоиндуцированного протонного поглощения (ΔH^+) в суспензии изолированных хлоропластов шпината. Ингибиторы КА гидрофильный ацетозоламид и липофильный этоксизоламид снижали количество связанного бикарбоната и подавляли величину ΔH^+ в диапазоне pH 6,0-8,0. Сделан вывод, что пул слабосвязанного бикарбоната контролирует свето-зависимый протонный транспорт в хлоропластах.

© В.В. ПОДОРВАНОВ, О.К. ЗОЛОТАРЬОВА, О.А. ЧОРНОШТАН, 2006

ВСТУП

Залежність швидкості фотохімічних реакцій у хлоропластах від присутності в середовищі неорганічного вуглецю (Сн) виявлена більше 45 років тому [17]. Було відзначено, що навіть в ізольованих із фотосинтезуючих організмів структурах, не здатних до фотосинтетичної асиміляції CO_2 , його видалення із середовища уповільнює електронний транспорт, який відновлюється при додаванні в середовище бикарбонату, внаслідок чого цей ефект названо «бикарбонатним ефектом» [11, 12, 14]. Показано, зокрема, що в разі відсутності бикарбонату практично цілком пригнічується процес фотосинтетичного виділення кисню не лише у хлоропластах, але й у субхлоропластних фрагментах, що містять лише фотосистему 2, яка відповідає за процес окислення води і виділення кисню [5, 14]. У зв'язку з цим був зроблений висновок, що бикарбонат є кофактором реакцій, що призводять до ферментативного окиснення води. Є, принаймні, два пули бикарбонату з різною міцністю зв'язування з ФС2 і, очевидно, тільки одна міцно зв'язана молекула (1 HCO_3^- на 400-600 молекул хлорофілу, чи один реакційний центр ФС2) контролює активність ФС2, водночас пул слабше зв'язаного бикарбонату (з концентрацією, близькою до концентрації хлорофілу) може бути вилучений без суттєвих наслідків для активності ФС2 [11, 12]. В останні кілька років було показано, що безпосереднім місцем зв'язування (лігандування) іонів міцно зв'язаного бикарбонату у ФС2 можна вважати іони двовалентного заліза, що функціонує між акцепторами електронів Q_A і Q_B [14]. Іони Fe^{2+} зв'язані з реакційним центром ФС2. Їх роль полягає в полегшенні переносу електронів від відновленого в результаті фотохімічної реакції Q_A до Q_B . Оскільки іони бикарбонату, що зв'язуються з Fe^{2+} , легко вступають у реакції обміну з протонами, необхідними для протонування двічі відновленого Q_B , то передбачається, що роль бикарбонату полягає в забезпеченні цього протонування.

У ФС 2 знайдено ще одне місце зв'язування бикарбонату між системою окиснення води та акцептором електронів Q_A . Це ділянка переносу електрона між первинним акцептором феофітином і Q_A . Доведено, що іони бикарбонату необхідні також для функціонування донорної ділянки ФС2, а на донорній ділянці іони бикарбонату зв'язані слабше, ніж на акцепторній. [4, 5, 12]. Присутність бикарбонату особливо важлива для «зборки» марганцевого комплексу, що окиснює воду, а також для стійкості цього комплексу до дії високих температур та інших шкідливих факторів зовнішнього середовища. Відомо, що система фотоокиснення води — одна з найуразливіших ланок фотосинтетичного апарату рослин, можливо, тому, що бикарбонат відіграє у водоокисному комплексі лише структурну роль і захищає від розпадання марганцевий центр, який характеризується надзвичайно низькою стійкістю [6, 8]. Таким чином, новітні дослідження дозволили дійти висновку, що міцно зв'язаний бикарбонат є абсолютно необхідним елементом системи фотоокиснення води. Ра-

зом з тим, практично нічого не відомо про функціональну роль пулу зв'язаного бікарбонату в тилакоїдах. Як згадувалося вище, видалення більшої його частини не позначається на активності електронного транспорту в хлоропластах. Нашою метою було вивчення зв'язку між кількістю зв'язаного бікарбонату і світлоіндукованим поглинанням протонів хлоропластами шпинату. Кількість зв'язаного бікарбонату залежала від часу інкубації препаратів у присутності інгібіторів карбоангідрази — ферменту, що полегшує трансформацію CO_2 в бікарбонат і зворотну реакцію. Її оцінювали за кривими кислотно-основного титрування.

Методика досліджень

Хлоропласти класу «В» ізолювали з листків 40-добових листків шпинату (*Spinacea oleracea* L.) згідно з [16], а потім суспендували в середовищі, що містить 200 мМ сорбітолу, 2,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ NaCl , 10 мМ KCl , 10 мМ трицин- NaOH (рН 8,0). Концентрацію хлорофілу розраховували за Арноном [3]. Рівень світлоіндукованого поглинання протонів визначали в середовищі, що містить 200 мМ сорбітолу, 2,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ NaCl , 10 мМ KCl , 0,5 мМ трицин- NaOH , 1 мМ MES і 0,5 мМ HEPES, 50 мкМ ФМС і хлоропласти (0,2 мг хл/мл). Суспензію висвітлювали білим світлом насиченої інтенсивності. Кількість протонів, що звільнилися в реакції, визначали за світлоіндукованою зміною рН і буферною ємністю реакційного середовища [2]. Буферну ємність суміші визначали, титруючи суспензію невеликими (0,5 мкмоль) кількостями 10 мМ їдкого натру. Концентрація інгібіторів карбоангідрази ацетазоламиду (АзА) (N-[5-сульфамойл-1,3,4-тиадиазол-2-іл]ацетамід) і етоксизоламиду (ЕзА) (6-етокси-2-бензотіазол-сульфонамід) становила 1 мМ. Препарати хлоропластів титрували в скляній термостатованій ізольованій від атмосфери комірці в безперервному потоці азоту при постійному перемішуванні. Титранти (20 мМ HCl і 20 мМ KOH) подавали зі швидкістю близько 1 мкмоль на хвилину. Результати титрування записували і обробляли як у праці [1] за допомогою пакета програм Exel і OriginPro 6.1.

Результати досліджень та їх обговорення

На рис. 1 показано зміни значень рН у слабо забуференій суспензії хлоропластів, індуковані світлом. Після вмикання світла рН реакційного середовища збільшується до деякого стаціонарного рівня, на якому поглинання протонів хлоропластами компенсується їхнім витоком назовні. Після вимикання світла рН зовнішнього середовища знижується до вихідного, що пов'язане з виходом протонів назовні після деенергізації мембран. Величина світлоіндукованого поглинання протонів (ΔH^+) визначається ступенем нативності мембран, величиною зміни рН реакційного середовища при висвітленні хлоропластів (δpH), буферною ємністю і рН середовища. Роз'єднувачі, як і інгібітори електронного транспорту, пригнічують ΔH^+ . Залежність ΔH^+ від рН реакційного середовища показано на рис. 2. Максимальні величини ΔH^+ (звичайно це 0,65—0,75 мкмоль H^+ /мг хл), реєструються при рН зовнішнього середовища 6,5—

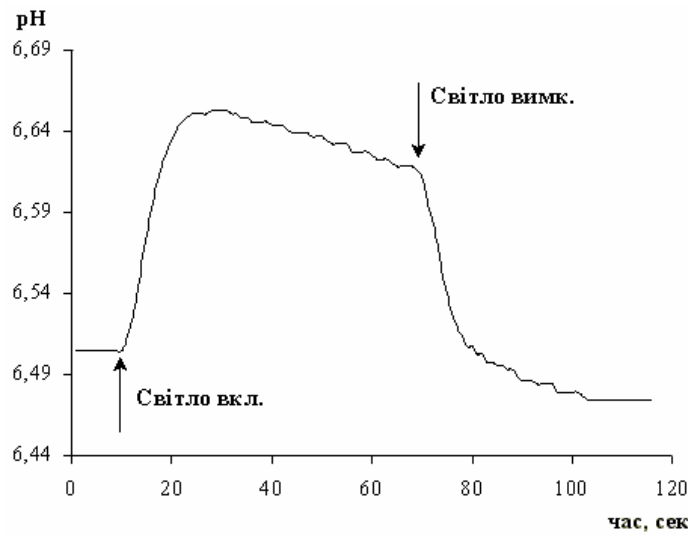


Рис. 1. Світлозалежні зміни значень рН у суспензії хлоропластів шпинату. Тут і на рис. 2: ФМС в середовищі — 0,05 мМ; концентрація хлоропластів відповідає 0,1 мг хлорофілу в 1 мл

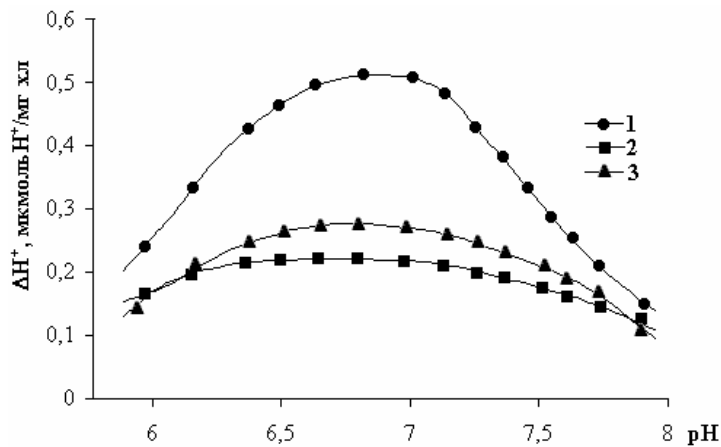


Рис. 2. Вплив інгібіторів карбоангідрази ацетазоламід і етоксизоламід на величину світлоіндукованого поглинання протонів суспензією ізольованих хлоропластів шпинату в діапазоні рН 5,8-8,0: 1 — хлоропласти, проінкубовані при 4°C протягом 6 год. (контроль); 2 — те ж, у присутності 1 мМ ЕзА; 3 — те ж, у присутності 1 мМ АзА

Вплив інгібіторів карбоангідрази на величину світлоіндукованого поглинання протонів ізольованими хлоропластами

Варіант	ΔH ⁺ Світлоіндукованого поглинання протонів, мкмоль/мг хл		
	Тривалість інкубації, год.		
	0	3	6
Контроль	0, 58 ± 0,06	0, 58 ± 0,06	0, 58 ± 0,06
1 мМ АзА	0, 53 ± 0,06	0, 33 ± 0,03	0, 22 ± 0,02
1 мМ ЕзА	0, 55 ± 0,05	0, 27 ± 0,03	0, 16 ± 0,02

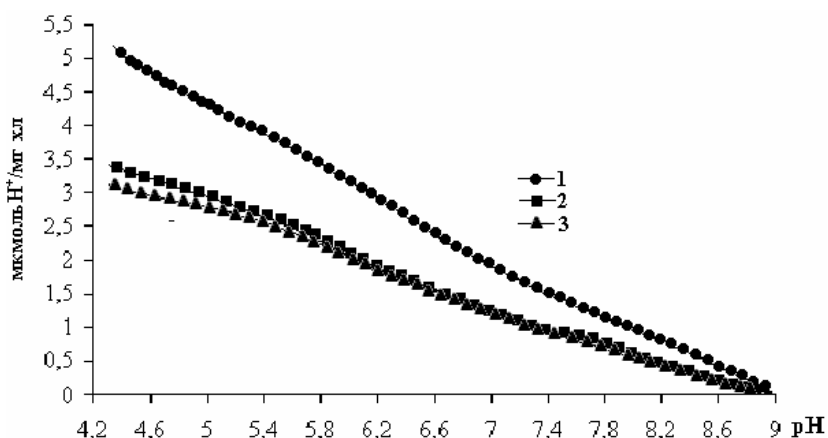


Рис. 3. Вплив інгібіторів карбоангідрази на криві титрування ізольованих хлоропластів: 1 — контроль, 0,1 мг хл/мл; 2 — хлоропласти, проінкубовані протягом 6 год. у присутності 1 мМ ЕзА; 3 — хлоропласти, проінкубовані протягом 6 год у присутності 1 мМ АзА

6,7. При збільшенні рН (як і при його зниженні) ΔH^+ зменшується і становить при рН 8—0,1—0,15 мкмоль H^+ /мг хл.

В результаті інкубації хлоропластів у присутності інгібіторів карбоангідрази ліпофільного ЕзА чи гідрофільного АзА величина ΔH^+ поступово знижувалася (таблиця) і після 6 годин інкубації становила близько 25% від контрольної (у разі інгібування ЕзА). У контрольних препаратах ця величина практично не змінювалася протягом 6—8 год. збереження при 4 °С.

На рис. 3 представлено криві титрування хлоропластів до і після інкубації з інгібіторами карбоангідрази. Після 6 годин інкубації з 1 мМ АзА або ЕзА кількість доступних титруванню груп у діапазоні рН 4-9 значно знижувалася порівняно з контрольними препаратами, крива титрування яких протягом інкубації не змінювалася.

Ці результати дозволяють припустити, що участь зв'язаного бікарбонату у буферній ємності тилакоїдних мембран у фізіологічному діапазоні рН є суттєвою. Крім того, протонування бікарбонатного пулу відбувається світлозалежно і, мабуть, пов'язане з формуванням трансмембранного протонного градієнта.

Вивчення зв'язування протонів акцепторними групами тилакоїдної мембрани і внутрішньотилакоїдного простору у контексті загальної проблеми трансформації енергії є важливим з кількох причин:

1) знання величини буферної ємності стромального і внутрішньотилакоїдного компартментів хлоропласту необхідне для створення будь-якої кількісної моделі протонного переносу крізь тилакоїдну мембрану;

2) ці параметри відповідно до хеміосмотичної теорії Мітчелла визначають ефективність енерготрансформації;

3) поверхневі буферні групи виступають як осмотики чи йонні «пастки», модулюючи тим самим спрямованість потоків води, розчинених речовин і катіонів;

4) рН-залежний контроль світлоіндукованих конформаційних змін тилакоїдної мембрани безпосередньо пов'язаний зі ступенем протонування поверхневих іоногенних груп.

Відомо, що велика частина протонів (>99%), які поглинаються хлоропластами за фізіологічних умов, зв'язується буферними групами мембрани, локалізованими усередині тилакоїда й експонованими на її поверхні [15]. Передбачається, що кількість протонів, що зв'язуються цими групами у стаціонарному стані при заданому рН, визначається лише числом цих груп, їхньою природою і доступністю для протонів.

Мембрана тилакоїдів складається з ліпідів і поліпептидних комплексів, що експонують аміно-, карбоксильні, гідроксильні і фосфатні групи. Принаймні деякі з них здатні депротонуватися при значеннях рН, близьких до фізіологічних, внаслідок чого поверхневий заряд мембран підвищується. Передбачається, що при висвітленні в умовах формування трансмембранного протонного градієнта рН усередині тилакоїда знижується і локалізовані на внутрішній поверхні іоногенні групи, якщо такі є, протонуються. Цим пояснюють явище світлоіндукованого поглинання протонів (ΔH^+) при світловій енергізації хлоропластів. Величина ΔH^+ у цьому випадку визначається концентрацією внутрішніх протонопоеднувальних груп. Таке розуміння підтверджено експериментами із застосуванням буферів, таких як проникаючі аміни чи аніони слабких кислот. У присутності цих реагентів ΔH^+ зростає. Природа буферних груп, які беруть участь у формуванні ΔH^+ , їхня конкретна локалізація в межах поліпептидних комплексів тилакоїдної мембрани дотепер залишаються нез'ясованими. Ми припускаємо, що іоногенними групами, які беруть участь у світлозалежному поглинанні протонів, і отже, у будівництві трансмембранного протонного градієнта, є іони зв'язаного бікарбонату. Крім того, проведені експерименти свідчать, що в збереженні цього пулу бере участь мембранозв'язана КА (рис. 2, таблиця).

Відомо, що бікарбонатний обмін у хлоропластах здійснюється за участю карбоангідрази (КА, карбонат-гідролаза, КФ 4.2.1.1) [9, 10] — ферменту, який каталізує гідратацію і дегідратацію вуглекислого газу. Хлоропласти містять принаймні дві форми КА, одна з яких бере участь у депонуванні бікарбонату з зовнішнього середовища в тилакоїдну мембрану чи внутрішньотилакоїдний простір, а інша, що інгібується ЕзА, контролює активність ФС2. У хлоропластах поряд з розчинними містяться і мембранозв'язані форми ферменту, зокрема вони виявлені у ФС2 кукурудзи (*Zea mays*) і гороху (*Pisum sativum*) [7, 13]. Показано, що антитіла до КА одноклітинної зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* взаємодіють тільки з 33-кДа поліпептидом тилакоїдів кукурудзи. Функція цієї КА, як передбачається, полягає у підвищенні концентрації HCO_3^- , що є кофактором фотохімічних реакцій ФС2. Установлено, що реакція дегідратації бікарбонату прискорюється при висвітленні суспензії тилакоїдів насичуючим світлом за рН 7,6—8,0 [15]. Цей ефект інгібується нігерицином чи ліпофільним інгібітором КА етоксизоламідом, але не гідрофільним інгібітором КА ацетазоламідом. Наявні дані дозволили припустити, що хлоропластна КА ви-

користовує світлоіндукований протонний градієнт на тилакоїдній мембрані для полегшення трансформації CO_2 у HCO_3^- , і що цей фермент закритий від стромального боку тилакоїдів ліпідним бар'єром.

Слід зазначити, що бікарбонат потрібен для функціонування як донорного, так і акцепторного боків ФС2, поряд із залученням CO_2 у цикл Кальвіна, може бути використаний для регулювання фотосинтезу в цілому. Інтенсивне споживання CO_2 у циклі Кальвіна за високої інтенсивності світла може призвести до зниження вмісту C_4 у хлоропласті. Це, в першу чергу, заважає переносу електронів від ФС2 до ФС1, що є надзвичайно важливим для збереження фотосинтетичного апарату. Дійсно, за відсутності CO_2 до циклу Кальвіна не надходять продукти світлової стадії фотосинтезу, що збільшить імовірність появи активних форм кисню, які спричинюють незворотне окиснення хлорофілу та інших компонентів фотосинтетичної мембрани. Участь карбоангідрази у збереженні пулу зв'язаного бікарбонату та регуляції процесів протонного переносу в тилакоїдах порушує питання щодо участі цих систем у сполученні електронного транспорту і синтезу АТФ. Розробка цих проблем є метою наступного етапу дослідження.

Висновки

1. Показано, що у формуванні трансмембранного протонного градієнта та у протонному транспорті в хлоропластах бере участь пул зв'язаного бікарбонату.

2. Кількість зв'язаного бікарбонату контролюється активністю карбоангідрази — ферменту, який каталізує гідратацію і дегідратацію вуглекислого газу.

3. Результати дослідження дозволяють припустити, що карбоангідраза і пул зв'язаного бікарбонату беруть участь у сполученні реакцій електронного транспорту і синтезу АТФ.

1. Опанасенко В.К., Казанцев А.П., Золотарева Е.К. Автоматизированная установка для определения буферной емкости // Приборы и лаб. оборуд. для науч. исслед. по новым направлениям биол. и биотехнол. — Пущино, 1986. — С. 62-68
2. Abbott M.S., Dilley R.A. Light-dependent proton efflux from chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. — 1983. — **222**, № 1. — P. 95—104.
3. Arnon D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // Plant Physiol. — 1949. — **24**, — № 1. — P. 1—154.
4. Baranov S.V., Ananyev G.M., Klimov V.V., Dismukes G.C. Bicarbonate accelerates assembly of the inorganic core of the water-oxidizing complex in manganese-depleted Photosystem II: a proposed biogeochemical role for atmospheric carbon dioxide in oxygenic photosynthesis // Biochemistry. — 2000, — **39**, № 29, — P. 6060—6065.
5. Klimov V.V., Baranov S.V. Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of Photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. — 2001. — **1503**, № 1. — P. 187—196.
6. Klimov V.V., Hulsebosch R.J., Allakhverdiev S.I. et al. Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of Photosystem II // Biochemistry. — 1997. — **36**, № 57. — P. 16277—16281.
7. Lu Y.K. and Stemler A.J. Extrinsic Photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts // Plant Physiol. — 2002. — **128**, № 2. — P. 643—649.

8. Metzner H., Fischer K. and Bazlen O. Isotope ratios in photosynthetic oxygen // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1979. — **548**, № 1. — P. 287—295.
9. Moskvina O.V., Shutova T.V., Khrystina M.S et al. Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids. A Photosystem II core complex-associated carbonic anhydrase // *Photosynthesis Research.* — 2004. — **79**, № 1. — P. 93—100.
10. Moskvina O.V., Ivanov B.N., Ignatova L.K., Kollmeier M.A. Light-induced stimulation of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids // *FEBS Lett.* — 2000. — **470**, № 1. — P. 375—377.
11. Stemler A. Govindjee. Bicarbonate stimulation of oxygen evolution, ferricyanide reduction and photoinactivation using isolated chloroplasts // *Plant Cell Physiol.* — 1974. — **15**, № 2. — P. 533—544.
12. Stemler A., Govindjee. Bicarbonate ion as a critical factor in photosynthetic oxygen evolution // *Plant Physiol.* — 1973. — **52**, № 1. — P. 119—123.
13. Villarejo A., Shutova T., Moskvina O. et al. Photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution // *EMBO J.* — 2002. — **21**, № 4. — P. 1930—1938.
14. Van Rensen J.J.S., Xu C. and Govindjee. Role of bicarbonate in Photosystem II // *Physiol. Plant.* — 1999. — **105**, № 2. — P. 585—592
15. Walz D., Goldstein L., Avron M. Determination and analysis of the buffer capacity of isolated chloroplasts in the light and in the dark // *Eur. J. Biochem.* — 1974. — **47**, № 1. P. 403—407.
16. Walker D.A. Preparation of higher plant chloroplasts // *Meth. Enzymol.* — 1980. — **69**. — P. 94—104.
17. Warburg O., Krippahl G.Z. Hill-Reaktionen // *Z. Naturforsch.* — 1958. — **13**. — P. 509—514.

