

УДК 577.39.5

ПРОТОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ

Е.К. ЗОЛОТАРЕВА

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины
01601 Киев, ул. Терещенковская, 2*

Трансмембранный протонный градиент, формирующийся в тилакоидах вследствие фотосинтетического переноса протонов, является не только энергетическим интермедиатом, но и выполняет важную регуляторную и сигнальную роль. Светозависимые изменения рН в компартментах хлоропласта оказывают влияние на скорость переноса электронов по фотосинтетической электронтранспортной цепи, нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла, обратимую редокс-трансформацию ксантофиллов (так называемый виолаксантиновый цикл), функциональное состояние АТФ-синтазы, активность ферментов темновой фазы фотосинтеза. В обзоре приведены данные о величине и природе протонной буферной емкости тилакоидов, рассмотрены вопросы ограниченной роли диффузии в переносе протонов в клетке, организации специфических путей транспорта протонов от центров высвобождения H^+ к АТФ-синтазе.

Ключевые слова: фотосинтез, хлоропласт, сопряжение, трансмембранный протонный градиент, транспорт электронов, фотофосфорилирование.

В ходе фотосинтетического транспорта электронов и протонов в тилакоидах формируется трансмембранная разность электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$) — основной энергетический интермедиат живой клетки [38]. Генерируется $\Delta\mu_{H^+}$ редокс- или светозависимыми протонными насосами, а используется энергопотребляющими ферментами, в первую очередь АТФ-синтазой (рисунок).

Автор хемиосмотической теории Митчелл (цит. по [3]) ввел понятие протондвижущей силы (ПДС), определяемой как

$$\text{ПДС} = \Delta\mu_{H^+}/F = \Delta\psi - 0,06 \Delta\text{pH}, \quad (1)$$

где $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов; ΔpH — разность рН с двух сторон мембраны.

В результате окисления воды и пластогидрохинона (PQH_2) в люмен тилакоида высвобождаются протоны и формируется трансмембранная ПДС. Затем в ходе транспорта противоионов [58] ПДС конвертируется преимущественно в осмотическую форму (ΔpH). Перенос H^+ из люмена в строму через АТФ-синтазу приводит к образованию АТФ. Скорость транспорта электронов от PQH_2 через комплекс цитохромов b_6f подавляется при возрастании ПДС. Возбуждение антенны ФС II регулируется энергозависимым тушением (q_E) флуоресценции хлорофилла, вследствие чего избыток лучистой энергии трансформируется в тепло. Параметр q_E связан с протонированием белка PsbS и рН-зависимой активацией вио-

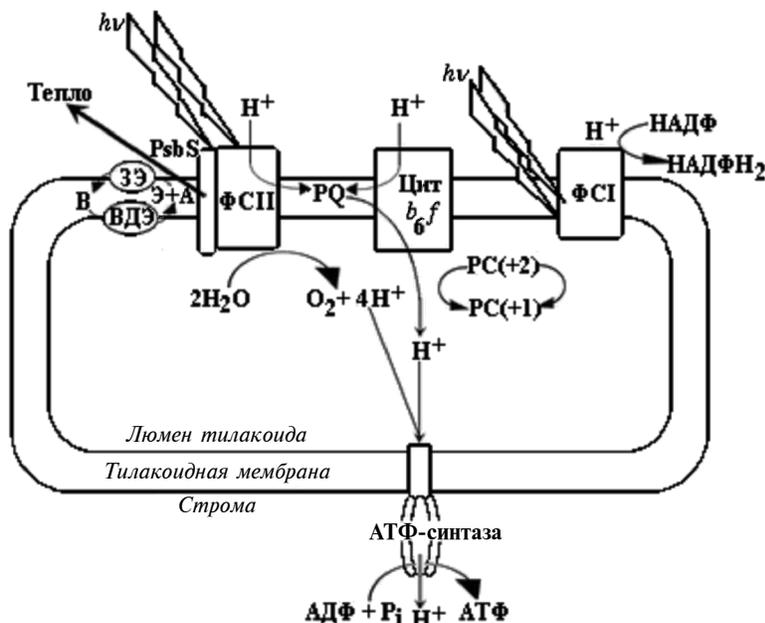


Схема путей светозависимого переноса протонов в тилакоидах:

В — виолаксантин; З — зеаксантин; А — антераксантин; ВДЭ — виолаксантиндеэпоксидаза; PsbS — субъединица ФС II; PQ — пластохинон; Цит — комплекс цитохромов; PC — пластоцианин

лаксантиндеэпоксидазы (ВДЭ) [48], которая катализирует восстановление виолаксантина (В) до антераксантина (А) и зеаксантина (З). Таким образом, диссипация возбуждения через q_E зависит от концентрации H^+ в люмене [40].

Обе компоненты ПДС — и ΔpH , и $\Delta\psi$ эквивалентны в обеспечении синтеза АТФ энергетически и, по-видимому, кинетически. В равновесных условиях в хлоропластах в отличие от митохондрий ПДС существует преимущественно в форме осмотической составляющей (ΔpH), а вклад электрической составляющей (разности потенциалов) невелик [69].

Из-за низкой электрической емкости тилакоидных мембран и относительно высокой протонной буферной емкости люмена и стромального компартмента хлоропластов $\Delta\mu_{H^+}$ первоначально запасается почти исключительно в форме $\Delta\psi$ [39, 56]. Возникшее электрическое поле индуцирует перенос противоионов — наиболее вероятно Cl^- , K^+ и Mg^{2+} [66], что наряду с фотосинтетическим переносом протонов компенсирует возникший $\Delta\psi$, и в течение нескольких секунд после начала освещения большая часть $\Delta\psi$ распадается, а $\Delta\mu_{H^+}$ конвертируется в форму ΔpH .

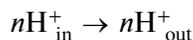
Согласно имеющимся данным, рН стромы интактных хлоропластов в темноте составляет около 7, а на свету возрастает до 7,5–8,0 [17, 26, 72, 75]. Такие же значения рН характерны и для интактных растений [24]. Этот диапазон рН оптимален для активности стромальных ферментов, из которых по крайней мере 4 фермента восстановительного пентозофосфатного цикла активируются при рН существенно более высоких, чем рН стромы хлоропластов в темноте. Так, оптимальный рН для работы фруктозо-бис-фосфатазы составляет 8,5–8,8; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы — 8,0, седогептулезно-бис-фосфатазы — 8,5, фосфорибулокиназы — 7,9 [74]. Поэтому увеличение рН стромы при освещении хлоропластов *in vivo* играет важную роль в активации ферментов цикла

Кальвина и в регуляции метаболизма клетки в целом [30, 49]. При освещении изолированные тилакоиды аккумулируют на свету до 1 мкмоль H^+ /мг хлорофилла [29].

В результате этих процессов внутритилакоидное пространство подкисляется до рН 4,7—5,0. При насыщающей интенсивности света количество поглощенных из межтилакоидного пространства протонов составляет 1 H^+ на одну молекулу хлорофилла при рН 6,0 и менее 0,2 H^+ при рН 8,0. При этом соотношение H^+/e^- в нативных условиях равно 3 [8].

Обычно величина ΔpH в хлоропластах *in vitro* оценивается в 3,1—3,9 единиц рН [9, 57], и, соответственно, значения рН внутритилакоидного пространства при насыщающем освещении — 3—4. Крамер в цикле работ, посвященных измерению величины ПДС *in vivo* при изменении условий существования растений [6, 11, 31, 36, 38, 64, 72], установил, что величина внутритилакоидного рН не падает ниже 5,8. Согласно его же оценкам, при освещении интактных растений в равновесных условиях величина $\Delta\psi$ составляет от 10 до 40 мВ. Этот диапазон $\Delta\psi$ соответствует 2—22 % $\Delta\mu_{H^+}$ при ΔpH 3 единицы и 8—33 % при ΔpH 2 единицы. Таким образом, измерения, выполненные *in vivo* с использованием неинвазивных спектральных методов [55], показали, что хотя $\Delta\psi$ составляет только часть общего $\Delta\mu_{H^+}$, она может сильно изменить энергетический баланс растения. Сохранение части энергии в форме $\Delta\psi$ позволяет избежать чрезмерного закисления люмена и, таким образом, ингибирования рН-зависимых процессов, негативно влияющего на фотосинтез [65].

Связь между ΔpH и $\Delta\mu_{H^+}$ в хлоропластах. Один из подходов к оценке люменального рН состоит в определении величины $\Delta\mu_{H^+}$, необходимой для энергетического обеспечения реакции синтеза или гидролиза АТФ:



При рН 8 фактор $t \approx 1$, а фактор n численно равен количеству протонов, перенесенных изнутри тилакоидов наружу при синтезе (гидролизе) одной молекулы АТФ. Зависимость движущей силы фотофосфорилирования (или гидролиза АТФ) от $\Delta\mu_{H^+}$ описывается уравнением

$$\Delta G = \Delta G_p - n\Delta\mu_{H^+} \quad (n = H^+/ATP), \quad (2)$$

где ΔG_p — фосфатный потенциал.

Синтез АТФ возможен, если $\Delta G < 0$; в случае $\Delta G > 0$ образовавшийся ранее АТФ гидролизуется [3]. Когда $\Delta G = 0$, скорости обоих процессов равны нулю, и можно определить параметр n . Чем выше n , тем больше величина ΔG_{ATP} для данного $\Delta\mu_{H^+}$. От величины n зависит уровень ΔG_{ATP} , при котором начинается обратная регуляция через ΔpH . Измерение величины n для CF_1CF_0 проводилось на протяжении последних лет, в ранних работах ее значение определяли как 2 [51], позднее — 3 [5] и 4 [34, 35, 62].

Предположив, что электрохимический градиент в хлоропластах представлен только формой трансмембранного протонного градиента ΔpH , $\Delta G_{ATP} = 40$ —50 кДж/моль, рН стромы 7,8, а реакция синтеза АТФ близка к равновесию, значения внутритилакоидного рН, рассчитанные по уравнениям (1) и (2), варьируют от 2 до 4 в зависимости от значения параметра n . Если $n = 4$ или более, ΔpH составляет 1,8—2,2 единиц рН,

тогда как при $n = 2$ ΔpH будет 3,5—4,4 [6, 39]. Следовательно, синтез АТФ возможен при относительно небольших значениях трансмембранного протонного градиента, а значение рН в люменальном пространстве тилакоидов при освещении не падает ниже 5,6. От концентрации свободных ионов водорода зависят как активность ферментов темновой фазы фотосинтеза, локализованных в строме, так и функциональное состояние переносчиков электронов и некоторых рН-чувствительных белковых компонентов, обращенных в люмен. Кроме того, закисление люмена, сопровождающее формирование ΔpH , является центральным компонентом обратной связи в регуляторных системах фотосинтеза [38].

Связь между $\Delta\mu_{H^+}$ и активностью H^+ -АТФазы. Транстилакоидный $\Delta\mu_{H^+}$ необходим не только для обеспечения синтеза АТФ, но и для активации АТФ-синтазы. Синтез АТФ осуществляется в ходе равновесного фотосинтеза, так что нижний предел транстилакоидного ΔpH можно оценить, исходя из порогового уровня, который активизирует АТФ-синтазу. Хангартер [23] заключил, что АТФ-синтаза, регуляторная γ -субъединица которой находится в восстановленном или светоадаптированном состоянии, становится активной при $\Delta G_{ATP} \approx 45$ кДж/моль. Отметим, что в пределах ошибки эксперимента, по крайней мере, частичная активация имеет место при 38—45 кДж/моль. Эксперименты по рН-скачку в изолированных тилакоидах показали, что ΔpH около 2 единиц необходимо для активации γ -субъединицы восстановленной АТФ-синтазы [28]. В интактных растениях γ -субъединица восстановленной АТФ-синтазы хлоропластов может быть активирована одной полунасыщающей вспышкой [37]. В общем оценки величины $\Delta\mu_{H^+}$, основанные на активации АТФ-синтазы, указывают на более низкий предел ΔpH (1,7—2,6 единиц) в зависимости от величины n — 4 или 3. Если $\Delta\mu_{H^+}$ существует только в форме ΔpH , верхняя граница рН люмена (при низкой освещенности, когда скорость фотосинтеза невелика) составляет от 5,2 до 6,1 (в предположении, что стромальный рН равен 7,8) [39]. Можно ожидать, что при насыщающих интенсивностях света рН люмена по крайней мере на единицу ниже этого порогового уровня.

В настоящее время выделяют следующие рН-зависимые процессы, протекающие в люмене тилакоидов (см. рисунок): 1) активность цитохромного b_6f -комплекса, являющегося «центральным» протонным насосом в электронтранспортной цепи, значительно уменьшается уже при рН < 6,5 из-за «обратного давления» ΔpH , поэтому формирование высоких ΔpH на мембране приводит к замедлению ключевых фотосинтетических реакций [7, 18]; 2) энергозависимое нефотохимическое тушение возбуждения хлорофилла (q_E) — процесс безопасной диссипации избытка световой энергии в тепло, активируется при закислении люмена [13, 53]; 3) протонирование остатков экспонированного в люмен пигмент-связывающего белка антенны ФС II PsbS [41, 27] обеспечивает условия для нефотохимического тушения флуоресценции; 4) активация виолаксантиндеэпоксидазы — фермента, локализованного в люмене, катализирующего превращение виолаксантина в антраксантин и зеаксантин [13, 44].

Два последних рН-индуцированных процесса, активируясь согласованно, вызывают такие изменения в ФС II, в результате которых хлорофилл может передавать избыток энергии возбуждения зеаксантину, который, возвращаясь в основное состояние, диссипирует «лишнюю» энергию в тепло [27].

Это особенно важно для понимания основ продуктивности растений, поскольку в стрессовых условиях избыток световой энергии может нарушать регуляторные процессы, вызывая фотоингибирование [36]. Само по себе закисление люмена, если оно не отрегулировано должным образом, может сенсibilизировать фотоингибирование РЦ. Эти связи необходимо охарактеризовать количественно, чтобы понять, как активность фотосинтетического аппарата соотносится со скоростью биохимических процессов в растении в процессе адаптации и акклиматизации к изменяющимся условиям выращивания.

Протонная буферная емкость хлоропластов. Изменение рН в биологических системах является мощным модулятором функциональной активности многих ферментов. Диапазон этих изменений зависит от буферной емкости, величина которой сильно отличается в различных компартментах клетки и определяется концентрацией подвижных буферных соединений (таких, как фосфат, аминокислоты, нуклеотиды и т.д.), иммобилизованными буферными группами мембранных белков и фосфолипидов.

Согласно Хелду и соавт. [26], величина буферной емкости (β) стромального пространства меньше, чем β внутритилакоидного объема изолированных интактных хлоропластов, а средние значения рК этих двух буферных систем составляют соответственно 5,5 и 6,8. Предполагается, что рН внутри тилакоида снижается при освещении с 8 до 5, внутритилакоидный объем составляет 2 мкм³, стромальный объем — 30 мкм³, внутритилакоидная буферная емкость в диапазоне рН между 6,5 и 8 — 30 нмоль Н⁺/(мкм³·ед. рН) при рН < 6,5 [66, 71].

Юнге [29] так же, как Аврон и соавт. [71], считал, что внутритилакоидная буферность обеспечивается в основном заряженными белковыми группами с рК около 5,2. Концентрация внутритилакоидных буферных групп при рН 7,2 составляет от 0,8 до 1 мМ [29]. Дилли [17] оценил вклад аминокислот лизина с аномальным рК в буферную емкость тилакоидов и показал [14], что величина протонной буферной емкости тилакоидных мембран при рН 7,8—8,2 составляет около 150 нмоль Н⁺/мг хлорофилла, из которой 30—40 нмоль принадлежит лизиновым остаткам с аномально низким рК_а (~7,5), а оставшаяся буферность скорее всего обеспечивается карбоксильными группами. Такой резервуар протонов может быть использован для аккумуляции Н⁺, необходимых для обеспечения регуляции и синтеза АТФ. При этом существуют возможности движения протонов через, вдоль или внутри мембраны путем смены их связывания определенными протонакцепторными группами [17].

Организация путей переноса протонов. Один из постулатов хемиосмотической теории состоит в том, что скорость диффузии протонов в воде очень высока [14], поэтому протоны с высокими скоростями переносятся через водную фазу в направлении АТФ-синтазы. Противоположная точка зрения состояла в предположении существования специфических, латеральных путей транслокации протонов [17]. Высказывались предположения относительно существования в тилакоидных мембранах так называемых «протонных доменов» [52] — участков с повышенной концентрацией протонакцепторных групп, не находящихся в равновесии с водной фазой [43, 67, 70]. Протоны, поступающие от светозависимых генерирующих помп, в конечном счете выносятся из тилакоида через протонпроводящий путь АТФ-синтазы. Вопрос, каким образом организована транслокация протонов между генерирующей и потребляющей

помпами, стал одним из наиболее дискуссионных при обосновании хемиосмотической теории электрохимического сопряжения [3]. Согласно Дилли [17], буферные группы тилакоидных мембран, участвующие в светозависимом поглощении протонов и формирующие специфический протонпроводящий путь, обеспечивают транслокацию протонов от H^+ -генерирующих центров к протонным каналам АТФ-синтаз. На протяжении почти 40 лет вопрос организации путей транслокации протонов между генерирующей и потребляющей протонными помпами принадлежал к наиболее обсуждаемым проблемам биоэнергетики [3, 73]. Сторонами дискуссии выступали приверженцы осмотического принципа распространения протонов через объем обводненного компартмента [3, 38] и сторонники теории «локального сопряжения» [33, 73], считавшие, что протоны транспортируются по выделенным путям в мембране или при-мембранных слоях.

В последние годы в связи с появлением новых экспериментальных данных проблеме организации переноса протонов между протонгенерирующими комплексами и протонными каналами, отстоящими от источника на значительном расстоянии, вновь уделяется большое внимание [2, 10, 17].

В первую очередь следует упомянуть работы, в которых оценивается скорость диффузии протонов в матриксах живой клетки [19, 30, 49]. Цитоплазма и матрикс, заключенный в объемах различных органелл, представляют собой довольно концентрированные белковые растворы, содержащие значительные концентрации фосфата, аминокислот и других соединений, имеющих буферные группы, способные к протонированию при физиологических значениях рН. Обычно их концентрация составляет от 10^{-3} до 10^{-2} М. Поэтому диффузия ионов и низкомолекулярных соединений внутри клеток происходит гораздо медленнее, чем в водных растворах [4]. Так, в миоцитах кажущийся коэффициент диффузии протонов составляет $D_{\text{каж}}^H = (8-12,5) \cdot 10^{-7}$ см²/с, что более чем в 200 раз меньше, чем $D_{\text{каж}}^H$ в воде. В некоторых случаях замедление диффузии происходит из-за связывания ионов или молекул с относительно неподвижными внутриклеточными компонентами, такими как мембрано-связанные органеллы или элементы цитоскелета. Если это связывание линейно и обратимо, то концентрация связанных молекул всегда пропорциональна концентрации свободных молекул с константой R . В этом случае кажущийся коэффициент диффузии равен $D/(1 + R)$, где D — коэффициент свободной диффузии в цитоплазме (значение которого должно быть меньшим, чем в водном растворе из-за физических факторов, таких как более высокая вязкость). Ионы и низкомолекулярные соединения могут также связываться с подвижными внутриклеточными компонентами, например с анионами фосфата или другими низкомолекулярными анионами. Этот тип связывания также влияет на значение кажущегося коэффициента диффузии. Выражение для кажущегося коэффициента диффузии протонов при наличии подвижных и иммобилизованных буферных групп, было выведено Юнге и МакЛаудином [30]:

$$D_{\text{каж}}^H = \frac{D_H + \frac{D_{\text{НМ}}[M_{\text{общ}}]}{K_M}}{1 + \frac{[M_{\text{общ}}]}{K_M} + \frac{[F_{\text{общ}}]}{K_F}}$$

где D_H — коэффициент диффузии свободных протонов в водной фазе; D_{HM} — коэффициент диффузии подвижных буферов; $[M_{\text{общ}}]$ — общая концентрация подвижных буферных групп; $[F_{\text{общ}}]$ — общая концентрация фиксированных буферных групп; K_M — константа ионизации подвижных буферных групп; K_F — константа ионизации фиксированных буферных групп.

Это выражение справедливо только при значениях pH, значительно превышающих рК буферных групп, и иллюстрирует три особенности диффузии протонов в буферных растворах: 1) кажущийся коэффициент диффузии протонов всегда меньше, чем коэффициент диффузии свободных протонов; 2) увеличение концентрации иммобилизованных буферных групп всегда уменьшает $D_{\text{каж}}^H$; 3) увеличение концентрации подвижных буферов может увеличивать $D_{\text{каж}}^H$ при наличии иммобилизованных буферных групп.

Теоретический анализ процесса диффузии протонов в растворах белков и многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют в пользу того, что свободная диффузия является довольно неэффективным механизмом транспорта протонов из-за того, в частности, что при физиологических значениях pH и в стационарных условиях градиенты концентрации ионов водорода в пределах компартмента не превышают 10^{-7} – 10^{-8} М [18]. Коэффициент диффузии свободных протонов в водных растворах при 25 °С составляет $9,3 \cdot 10^{-5}$ см²/с [4], в физиологических условиях концентрация буферных веществ — от 10^{-3} до 10^{-2} М. Такие различия в концентрации H^+ сопровождаются разницей в концентрации ионов водорода, связанных с буферными группами, по крайней мере от 10^{-3} до 10^{-2} М или более. Эта значительно более высокая разница концентраций связанных протонов компенсируется низкими значениями коэффициентов диффузии мобильных буферов: коэффициент диффузии такого подвижного буфера, как фосфат, имеет тот же порядок величины, что и HCO_3^- ($7,0 \cdot 10^{-6}$ см²/с). Как показали Гирс и Грос [19], облегченный диффузией фосфата перенос протонов более чем в 10 000 раз эффективнее, чем свободная диффузия H^+ . Высокоэффективным способом транспорта протонов является не только диффузия низкомолекулярных буферных веществ, но и диффузия белковых буферов [2]. С участием очень больших белковых молекул облегченный транспорт протонов происходит эффективно не только при поступательном, но и при вращательном движении белка. Показано также, что диффузия протонов является обязательной составной частью облегченной диффузии HCO_3^- и одновременной диффузии CO_2 [20].

При обсуждении возможности и кинетических преимуществ латерального переноса протонов по поверхности мембраны или по границе раздела фаз мембрана—вода высказывались предположения, что латеральный перенос происходит с более высокими скоростями, чем простая диффузия через объемную фазу [2, 10, 22, 25, 32, 33, 45, 47, 50].

Результаты ряда экспериментов показали, что кажущийся ток через единичный протонный канал возникает раньше, чем можно объяснить, исходя из максимальной теоретически возможной скорости простой диффузии протонов к каналу [12]. В незабуференных растворах доминирует поверхностная проводимость, тогда как в буферных преобладающий путь зависит от концентрации протонируемого буфера и эффективного размера протонсобирающей «антенны» [21, 54]. Понятие протонная «антенна» сформировалось при анализе переноса протонов вдоль по-

верхности, имеющей множественные отрицательно заряженные центры, которые могут «собирать» протоны и переносить их к протонному каналу. Скорость реакции протонирования обычно чрезвычайно высока и лимитируется только диффузией с типичной константой скорости $1,6 \cdot 10^{10}$ (моль \cdot с) $^{-1}$ [21, 54]. Одной из наиболее быстрых известных реакций рекомбинации является рекомбинация H^+ и OH^- (константа скорости $1,4 \cdot 10^{11}$ (моль \cdot с) $^{-1}$ [15]. Однако в биологических мембранах иногда наблюдаются еще более высокие скорости протонирования. Так, аномально высокая константа скорости протонирования зарегистрирована для Ca^{2+} -канала — $4 \cdot 10^{11}$ (моль \cdot с) $^{-1}$, что объясняется отрицательным зарядом сайта и сближением силовых линий электрического поля из-за локализации сайта в узком преддверии канала, вследствие чего электрическое притяжение усиливается [12]. Если две заряженные группы расположены достаточно близко относительно друг друга на поверхности мембраны, их кулоновские радиусы перекрываются и кажущаяся константа скорости второго порядка, характеризующая скорость переноса протона от одной группы к другой, может достигать значений 10^{12} — $6 \cdot 10^{12}$ (моль \cdot с) $^{-1}$ и более высоких [21, 54].

Вероятность того, что протон, связанный на границе раздела мембрана—вода с центром, имеющим заряд -1 , будет перенесен без выхода в водную фазу к соседнему сайту, также имеющему заряд -1 , рассчитывается по уравнению Дебая—Смолуховского и составляет почти 100 %, если расстояние между зарядами 1,2 нм и снижается до ~40 %, если расстояние между зарядами 6,0 нм [54]. Таким образом, имеющиеся данные подтверждают, что в плоскости мембраны возможен быстрый латеральный перенос протонов. Недавно Мулкиджанян и соавт. [2] обнаружили, что обмен протонами между поверхностью мембраны и объемной водной фазой происходит за время >1 мс из-за наличия кинетического барьера для ионов. В то же время диффузия протонов вдоль поверхности мембраны остается свободной и быстрой; обмен протонами между соседними ферментами происходит за микросекунды. Эти данные подтверждают гипотезу Келла [33], который рассматривал возможность быстрого «распространения выброшенных» протонов по поверхности мембраны в условиях затрудненного протонного уравнивания с внешней водной фазой. В этом случае даже в стационарном состоянии значение локального pH на поверхности мембраны (surface pH^S) может отличаться от pH водной фазы (bulk pH^B).

Таким образом, проблема организации переноса протонов в тилакоидной мембране требует дополнительного серьезного изучения в связи с открывшимися в последнее время новыми фактами. В частности, необходимо исследовать возможное участие CO_2 -бикарбонатной системы в облегчении переноса протонов от генерирующих протонных помп к протонным каналам АТФ-синтазы и роль множественных форм карбоангидразы (КА) в этом процессе.

Тилакоидные мембраны уже после их выделения из интактных хлоропластов содержат значительные количества связанного бикарбоната [61]. В последние годы появилась серия работ, выполненных с привлечением метода конфокальной микроскопии и показавших, что перенос протонов во внутреннем компартменте миоцитов значительно облегчается при наличии бикарбонатного буфера [60, 76]. При изучении роли CO_2/HCO_3^- во внутриклеточном переносе протонов показано, что CO_2 -бикарбонатный обмен, катализируемый внутренней КА, в несколько раз

ускоряет диффузию протонов и, что особенно важно, обеспечивает пространственную однородность pH в пределах компартмента [60, 76].

Исходя из того что буфер $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ есть во всех эукариотических клетках, его участие в облегчении подвижности внутриклеточных протонов H^+_{in} вероятно играет фундаментальную роль. Для реализации этой роли необходима активация КА [1, 46, 61], что связано с низкими скоростями некаталитической химической интерконверсии $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. Для достижения равновесия в реакции $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ требуется по крайней мере 30 с, а при наличии внутриклеточных буферов — значительно больше времени (5 мин) [63]. Доказательство участия внутриклеточной КА в регуляции внутриклеточной подвижности H^+ и, следовательно, в пространственном выравнивании внутриклеточного pH было получено методом конфокальной микроскопии при изучении пространственных неоднородностей pH_{in} , индуцированных мембранным транспортом углекислоты в эпителиальных дуоденальных энтероцитах и миоцитах сердечной мышцы различных организмов [60, 63, 76].

В последние годы показано, что хлоропласты высших растений содержат множественные формы карбоангидразы — растворимые и мембраносвязанные [1, 42]. Функциональная роль КА хлоропластов не вполне выяснена [46]. Совсем недавно установлено, что роль HCO_3^- и КА, локализованной вблизи ФС II, состоит в облегчении удаления протонов, образующихся при разложении воды [59]. Эти сведения дают основание предполагать, что бикарбонат вносит вклад в буферную емкость тилакоидов, а множественные формы КА участвуют в поддержании высокой внутритилакоидной концентрации бикарбоната и организации фотосинтетического транспорта протонов.

1. Игнатова Л.К., Руденко Н.Н., Христин М.С., Иванов Б.Н. Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран // Биохимия. — 2006. — **71**, № 2. — С. 651—659.
2. Мулкиджанян А.Я., Черепанов Д.А., Хеберле И., Юнге В. Динамика переноса протона на границе раздела фаз мембрана/вода и механизм биологического преобразования энергии // Там же. — 2005. — **70**, № 2. — С. 308—314.
3. Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран. — М.: Наука, 1989. — 564 с.
4. Al-Baldawi N.F., Abercrombie R.F. Cytoplasmic hydrogen ion diffusion coefficient // Biophys. J. — 1992. — **61**, N 6. — P. 1470—1479.
5. Avenson T.J., Cruz J.A., Kanazawa A., Kramer D.M. Regulating the proton budget of higher plant photosynthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2005. — **102**, N 27. — P. 9709—9713.
6. Baker N.R., Harbinson J., Kramer D.M. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves // Plant Cell Environ. — 2007. — **30**, N 9. — P. 1107—1125.
7. Barbagallo R.P., Breyton C., Finazzi G. Kinetic effects of the electrochemical proton gradient on plastoquinone reduction at the Q_i site of the cytochrome b_6/f complex // J. Biol. Chem. — 2000. — **275**, N 34. — P. 26121—26127.
8. Berry S., Rumberg B. Proton to electron stoichiometry in electron transport of spinach thylakoids // Biochim. Biophys. Acta. — 1999. — **1410**, N 2. — P. 246—261.
9. Bizouarn T., de Kouchkovsky Y., Haraux F. Photophosphorylation at variable ADP concentration but constant ΔpH in lettuce thylakoids: Effects of ΔpH and phosphate on the apparent affinity for ADP // Ibid. — 1989. — **974**, N 1. — P. 104—113.
10. Cherepanov D., Junge W., Mulkidjanian A.Y. Proton transfer dynamics at the membrane/water interface: dependence on the fixed and mobile pH buffers on the size and form of membrane particles and on the interfacial potential barrier // Biophys. J. — 2004. — **86**, N 2. — P. 665—680.
11. Cruz J.A., Sacksteder C.A., Kanazawa A., Kramer D.M. Contribution of electric field ($\Delta\psi$) to steady-state transthylakoid proton motive force (pmf) in vitro and in vivo. Control of pmf parsing into $\Delta\psi$ and ΔpH by ionic strength // Biochemistry. — 2001. — **40**, N 5. — P. 1226—1237.

12. *Decoursey T.E.* Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways // *Physiol. Rev.* — 2003. — **83**, N 2. — P. 475—579.
13. *Demmig-Adams B., Adams W.W. III, Ebbert V., Logan B.A.* Ecophysiology of the xanthophyll cycle // *The photochemistry of carotenoids* / H.A. Frank, A.J. Young, G. Britton, R.J. Cogdell (eds.) — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1999. — P. 245—269.
14. *Dilley R.A., Theg S.M., Beard W.A.* Membrane-proton interactions in chloroplast bioenergetics: Localized proton domains // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1987. — **38**. — P. 347—389.
15. *Eigen M.* Proton transfer, acid-base catalysis, and enzymatic hydrolysis // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 1964. — **3**, N 1. — P. 1—19.
16. *Enser U., Heber U.* Metabolic regulation by pH gradients. Inhibition of photosynthesis by indirect proton transfer across the chloroplast envelope // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1980. — **592**, N 4. — P. 577—591.
17. *Ewy R.G., Dilley R.A.* Distinguishing between luminal and localized proton buffering pools in thylakoid membranes // *Plant Physiol.* — 2000. — **122**, N 2. — P. 583—596.
18. *Finazzi G., Rappaport F., Furia A. et al.* Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* // *EMBO Rep.* — 2002. — **3**, N 3. — P. 280—285.
19. *Geers C., Gros G.* Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle // *Physiol. Rev.* — 2000. — **80**, N 2. — P. 681—715.
20. *Groth G., Junge W.* Proton slip of the chloroplast ATPase: Its nucleotide dependence, energetic threshold and relation to an alternating site mechanism of catalysis // *Biochemistry.* — 1993. — **32**, N 12. — P. 8103—8111.
21. *Gutman M., Nachliel E.* Time-resolved dynamics of proton transfer in proteinous systems // *Annu. Rev. Phys. Chem.* — 1997. — **48**. — P. 329—356.
22. *Haines T.H.* Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: a hypothesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1983. — **80**, N 1. — P. 160—164.
23. *Hangarter R.P., Grandoni P., Ort D.R.* The effects of chloroplast coupling factor reduction on the energetics of activation and on the energetics and efficiency of ATP formation // *J. Biol. Chem.* — 1987. — **262**, N 28. — P. 13513—13519.
24. *Hauser M., Eichelmann H., Heber U., Laisk A.* Chloroplast pH values and buffer capacities in darkened leaves as revealed by CO₂ solubilization in vivo // *Planta.* — 1995. — **196**, N 2. — P. 199—204.
25. *Heberle J., Riesle J., Thiedemann G. et al.* Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer // *Nature.* — 1994. — **370**, N 6488. — P. 379—382.
26. *Heldt H.W., Werdan K., Milovancev M., Gellen G.* Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1973. — **314**, N 2. — P. 224—241.
27. *Horton P., Ruban A.V.* Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: Photosynthesis and photoprotection // *J. Exp. Bot.* — 2005. — **56**, N 411. — P. 365—373.
28. *Junesch U., Graber P.* The rate of ATP synthesis as a function of ΔpH in normal and dithiothreitol-modified chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1985. — **809**, N 3. — P. 429—434.
29. *Junge W., Auslander W., McGeer A.J., Runge T.* The buffering capacity of the internal phase of thylakoids and the magnitude of the pH changes inside under flashing light // *Ibid.* — 1979. — **546**, N 1. — P. 121—141.
30. *Junge W., McLaughlin S.* The role of fixed and mobile buffers in the kinetics of proton movement // *Ibid.* — 1987. — **890**, N 1. — P. 1—5.
31. *Kanazawa A., Kramer D.M.* In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2002. — **99**, N 20. — P. 12789—12794.
32. *Kasianowicz J., Benz R., McLaughlin S.* How do protons cross the membrane-solution interface? Kinetic studies on bilayer membranes exposed to the protonophore S-13 (5-chloro-3-tert-butyl-2'-chloro-4'-nitrosalicylanilide) // *J. Membrane Biol.* — 1987. — **95**, N 1. — P. 73—89.
33. *Kell D.B.* On the functional proton current pathway of electron transport phosphorylation. An electrodic view // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1979. — **549**, N 1. — P. 55—99.
34. *Kobayashi Y., Heber U.* Rates of vectorial proton transport supported by cyclic electron flow during oxygen reduction by illuminated intact chloroplasts // *Photosynth. Res.* — 1994. — **41**, N 3. — P. 419—428.
35. *Kobayashi Y., Kaiser W., Heber U.* Bioenergetics of carbon assimilation in intact chloroplasts: Coupling of proton to electron transport at the ratio H⁺/e⁻ = 3 is incompatible with H⁺/ATP = 3 in ATP synthesis // *Plant Cell Physiol.* — 1995. — **36**, N 8. — P. 1629—1637.

36. *Kramer D.M., Avenson T.J., Edwards G.E.* Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions // *Trends Plant Sci.* — 2004. — **9**, N 7. — P. 349–357.
37. *Kramer D.M., Crofts A.R.* Activation of the chloroplast ATPase measured by the electrochromic change in leaves of intact plants // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1989. — **976**, N 1. — P. 28–41.
38. *Kramer D.M., Cruz J.A., Kanazawa A.* Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient // *Trends Plant Sci.* — 2003. — **8**, N 1. — P. 27–32.
39. *Kramer D.M., Sacksteder C.A., Cruz J.A.* How acidic is the lumen? // *Photosynth. Res.* — 1999. — **60**, N 2. — P. 151–163.
40. *Krieger A., Moya I., Weis E.* Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence. Effect of pH on stationary fluorescence and picosecond-relaxation kinetics in thylakoids membranes and photosystem II preparations // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1992. — **1102**, N 2. — P. 167–176.
41. *Li X.P., Gilmore A.M., Caffari S. et al.* Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**, N 22. — P. 22866–22874.
42. *Lu Y.K., Theg S.M., Stemler A.J.* Carbonic anhydrase activity of the photosystem II OEC33 protein from pea // *Plant Cell Physiol.* — 2005. — **46**, N 1. — P. 1–10.
43. *Lubbers K., Junge W.* Is the proton release due to water oxidation directly coupled to events in the manganese-centre? // *Current research in photosynthesis / M. Baltscheffsky (ed.).* — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1990. — **1**. — P. 877–880.
44. *Ma Y.Z., Holt N.E., Li X.P. et al.* Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* — 2003. — **100**, N 8. — P. 4377–4382.
45. *Morgan H., Taylor D.M., Oliveira O.N.* Proton transport at the monolayer water interface // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — **1062**, N 2. — P. 149–156.
46. *Moskvin O.V., Shutova T.V., Khristin M.S. et al.* Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids. A photosystem II core complex-associated carbonic anhydrase // *Photosynth. Res.* — 2004. — **79**, N 1. — P. 93–100.
47. *Nachliel E., Gurman M.* Kinetic analysis of proton transfer between reactants adsorbed to the same micelle. The effect of proximity on the rate constants // *Eur. J. Biochem.* — 1984. — **143**, N 1. — P. 83–88.
48. *Pfundel E.E., Renganathan M., Gilmore A.M. et al.* Intrathylakoid pH in isolated pea chloroplasts as probed by violaxanthin deepoxidation // *Plant Physiol.* — 1994. — **106**, N 4. — P. 1647–1658.
49. *Portis A., Chon C.J., Mosbach A., Heldt H.W.* Fructose and sedoheptulose-bisphosphatase. The site of possible control of CO₂ fixation by light-dependent changes of the stromal Mg²⁺ concentration // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1977. — **461**, N 2. — P. 313–323.
50. *Prats M., Tocanne J.-F., Teissie J.* Lateral proton conduction at a lipid/water interface. Effect of lipid nature and ionic content of the aqueous phase // *Eur. J. Biochem.* — 1987. — **162**, N 2. — P. 379–385.
51. *Reeves S.G., Hall D.O.* The stoichiometry (ATP/2e ratio) of noncyclic electron photophosphorylation in isolated chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1973. — **314**, N 1. — P. 66–78.
52. *Ro H.-A., Carson J.H.* pH microdomains in Oligodendrocytes // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**, N 35. — P. 37115–37123.
53. *Ruban A.V., Walters R.G., Horton P.* The molecular mechanism of the control of excitation energy dissipation in chloroplast membranes. Inhibition of ΔpH quenching of chlorophyll fluorescence by DCCD // *FEBS Lett.* — 1992. — **309**, N 1. — P. 175–179.
54. *Sacks V., Marantz Y., Aagaard A. et al.* The dynamic feature of the proton collecting antenna of a protein surface // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — **1365**, N 2. — P. 232–240.
55. *Sacksteder C.A., Jacoby M.E., Kramer D.M.* A portable, non-focusing optics spectrometer (NoFOSpec) for measurements of steady-state absorbance changes in intact plants // *Photosynth. Res.* — 2001. — **70**, N 3. — P. 231–240.
56. *Saxena A.M., Udgaonkar J.B., Krishnamoorthy G.* Protein dynamics control proton transfer from bulk solvent to protein interior: a case study with a green fluorescent protein // *Protein Sci.* — 2005. — **14**, N 7. — P. 1787–1799.
57. *Schonfeld M., Neumann J.* Proton conductance of the thylakoid membrane modulation by light // *FEBS Lett.* — 1977. — **73**, N 1. — P. 51–54.
58. *Segalla A., Szabo I., Costantini P., Giacometti G.M.* Study of the effect of ion channel modulators on photosynthetic oxygen evolution // *J. Chem. Inf. Model.* — 2005. — **45**, N 6. — P. 1691–1700.

59. *Shutova T., Kenneweg H., Buchta J. et al.* The photosystem II-associated *Cah3* in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal // *EMBO J.* — 2008. — **27**, N 5. — P. 782–791.
60. *Spitzer K.W., Skolnick R.L., Percy B.E. et al.* Facilitation of intracellular H⁺-ion mobility by CO₂/HCO₃⁻ in rabbit ventricular myocytes is regulated by carbonic anhydrase // *J. Physiol.* — 2002. — **541**, N 1. — P. 159–167.
61. *Stemler A.J.* The bicarbonate effect, oxygen evolution, and the shadow of Otto Warburg // *Photosynth. Res.* — 2002. — **73**, N 1–3. — P. 177–183.
62. *Strotmann H., Lohse D.* Determination of the H⁺/ATP ratio of the H⁺ transport-coupled reversible chloroplast ATPase reaction by equilibrium studies // *FEBS Lett.* — 1988. — **229**, N 2. — P. 308–312.
63. *Swietach P., Spitzer K.W., Vaughan-Jones R.D.* pH-Dependence of extrinsic and intrinsic H⁺-ion mobility in the rat ventricular myocyte, investigated using flash photolysis of a caged-H⁺ compound // *Biophys. J.* — 2007. — **92**, N 2. — P. 641–653.
64. *Takizawa K., Cruz J.A., Kanazawa A., Kramer D.M.* The thylakoid proton motive force in vivo. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2007. — **1767**, N 10. — P. 1233–1244.
65. *Takizawa K., Kanazawa A., Kramer D.M.* Depletion of stromal P(i) induces high 'energy-dependent' antenna exciton quenching (q(E)) by decreasing proton conductivity at CF₀-CF₁ ATP synthase // *Plant Cell Environ.* — 2008. — **31**, N 2. — P. 235–243.
66. *Tester M., Blatt M.R.* Direct measurement of K⁺ channels in thylakoid membranes by incorporation of vesicles into planar lipid bilayers // *Plant Physiol.* — 1989. — **91**, N 1. — P. 249–252.
67. *Theg S.M., Homann P.H.* Light-, pH-, and uncoupler-dependent association of chloride with chloroplast thylakoids // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1982. — **679**, N 2. — P. 221–234.
68. *Tiemann R., Witt H.T.* Salt dependence of electrical potential at the photosynthetic membrane in steady-state light and its structural consequence // *Ibid.* — 1982. — **681**, N 2. — P. 202–211.
69. *Van Kooten O., Snel J.F.H., Vredenberg W.J.* Photosynthetic free energy transduction related to the electric potential changes across the thylakoid membrane // *Photosynth. Res.* — 1986. — **9**, N 2. — P. 211–227.
70. *Wacker U., Haag E., Renger G.* Investigation of pH-change-patterns of photosystem-II membrane fragments from spinach // *Current research in photosynthesis / M. Baltscheffsky (ed.).* — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1990. — **1**. — P. 869–872.
71. *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**, N 3. — P. 403–444.
72. *Werdan K., Heldt H.W., Milovancev M.* The role of pH in the regulation of carbon fixation in the light and dark // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1975. — **396**, N 2. — P. 276–292.
73. *Williams R.J.P.* The multivarious couplings of energy transduction // *Ibid.* — 1978. — **505**, N 1. — P. 1–44.
74. *Woodrow G.E., Berry J.A.* Regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1988. — **39**. — P. 533–594.
75. *Wu W., Berkowitz G.A.* Stromal pH and photosynthesis are affected by electroneutral K⁺ and H⁺ exchange through chloroplast envelope ion channels // *Plant Physiol.* — 1992. — **98**, N 3. — P. 666–672.
76. *Zaniboni M., Swietach P., Rossini A. et al.* Intracellular proton mobility and buffering power in cardiac ventricular myocytes from rat, rabbit, and guinea pig // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2003. — **285**, N 3. — P. H1236–H1246.

Получено 25.05.2009

ПРОТОННА РЕГУЛЯЦІЯ ПРОЦЕСІВ ФОТОСИНТЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ЕНЕРГІЇ

О.К. Золотарьова

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України, Київ

Трансмембранний протонний градієнт, який формується у тилакоїдах унаслідок фотосинтетичного перенесення протонів, є не тільки енергетичним інтермедіатом, а й виконує

ПРОТОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

важливу регуляторну і сигнальну роль. Світлозалежні зміни рН в компартментах хлоропласту впливають на швидкість перенесення електронів по фотосинтетичному електронтранспортному ланцюгу, нефотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу, оборотну редокс-трансформацію ксантофілів (так званий віолаксантиновий цикл), функціональний стан АТФ-синтази, активність ферментів темної фази фотосинтезу. В огляді наведено дані про величину і природу протонної буферної ємності тилакоїдів, розглянуто питання обмеженої ролі дифузії в перенесенні протонів у клітині, організації специфічних шляхів транспорту протонів від центрів вивільнення H^+ до АТФ-синтази.

PROTONIC REGULATION OF THE PROCESS OF PHOTOSYNTHETIC ENERGY TRANSFORMATION

E.K. Zolotareva

N.G. Kholodny Botany Institute, National Academy of Sciences of Ukraine
2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01601, Ukraine

Transmembrane proton gradient formed in thylakoids in the process of photosynthetic proton transfer is not only energetic intermediate, but also plays important regulatory and signaling roles. Light-dependent pH-changes in chloroplast compartments are affected the rate of electron transfer in photosynthetic electron transport chain, nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence, reversible redox transformation of xanthophylls (so-called violaxanthin cycle), functional status of ATPsynthase, the activity of enzymes of dark phase of photosynthesis. The data concerning the value and nature of thylakoid proton buffer capacity, the limited contribution of free diffusion in the intracellular proton transport and specific pathways from the centers of H^+ release to ATPsynthase are presented in the review.

Key words: photosynthesis, chloroplast, coupling, transmembrane proton gradient, electron transfer, photophosphorylation.