

УДК 577.352.5

РОЛЬ ГИДРОКАРБОНАТА В СВЕТОЗАВИСИМОМ ПОГЛОЩЕНИИ ПРОТОНОВ ИЗОЛИРОВАННЫМИ ХЛОРОПЛАСТАМИ

В.В. ПОДОРВАНОВ, Е.К. ЗОЛОТАРЕВА, А.А. ЧЕРНОШТАН

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

Изучено влияние гидрокарбоната и ингибиторов карбоангидразы (КА) — ацетазоламида (АЗ) и этоксизоламида (ЭЗ) — на светоиндуцированное поглощение протонов (ΔH^+) хлоропластами гороха в диапазоне рН 5,5—8,5, а также на величину трансмембранного протонного градиента (ΔpH). Показано, что оба ингибитора подавляют ΔH^+ и снижают стимулирующий эффект гидрокарбоната натрия, причем водорастворимый ацетазоламид более эффективно устранял HCO_3^- -зависимую стимуляцию ΔH^+ . В то же время величина ΔpH не зависела ни от концентрации гидрокарбоната, ни от наличия ингибиторов карбоангидразы. Сделан вывод, что прочно связанный гидрокарбонат является компонентом буферной системы тилакоидов, принимает участие в процессах энергозависимого связывания протонов и его содержание в мембране контролируется активностью КА.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., фотосинтез, хлоропласт, гидрокарбонат, трансмембранный протонный градиент, карбоангидраза.

Фотосинтетическая ассимиляция неорганического углерода (C_i) осуществляется в специализированных органеллах растительной клетки — хлоропластах за счет энергии АТФ и НАДФ · H_2 , образующихся при освещении тилакоидов. К настоящему времени установлено, что хотя неорганический углерод в зависимости от рН среды содержится в клетке в различных формах (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-}), в процесс фотосинтеза вовлекается лишь CO_2 . Имеются многочисленные доказательства, что другая форма C_i (HCO_3^-) — гидрокарбонат играет важную кофакторную роль в регуляции фотохимических процессов в тилакоидных мембранах. Так, показано, что удаление C_i из хлоропластов или целых клеток приводит к блокированию электронного транспорта, который восстанавливается после добавления гидрокарбоната (так называемый «гидрокарбонатный эффект»). В фотосистеме II (ФС II) гидрокарбонат связывается: 1) между системой окисления воды и акцептором электронов $\text{Q}_\text{А}$; 2) с ионами двухвалентного железа, функционирующими между акцепторами $\text{Q}_\text{А}$ и $\text{Q}_\text{В}$; 3) на донорном участке ФС II [8]. Помимо прочно связанного гидрокарбоната тилакоидные мембраны содержат до 1 мкмоль $\text{HCO}_3^-/\text{мг хл}$ [14], который может быть удален без потери функциональной активности ФС II. Роль этого пула гидрокарбоната в фотохимических процессах хлоропластов неясна.

В последние годы в хлоропластах и в препаратах ФС II обнаружены мембранно-связанные формы карбоангидразы (КА, карбонатгидролазы, КФ 4.2.1.1.) [10, 11] — фермента, осуществляющего гидратацию и дегидратацию углекислого газа. Целью настоящей работы было изуче-

ние возможного участия гидрокарбоната в светозависимом поглощении протонов и влияния на этот процесс ингибиторов КА.

Методика

Хлоропласты класса «В» изолировали из листьев 15-суточных проростков гороха (*P. sativum* L.), выращенного на среде Кнопа, как описано ранее [1], а затем суспендировали в среде, содержащей, mM: 200 сорбитола, 2,5 MgCl₂, 10 NaCl, 10 KCl, 10 трицина-NaOH (pH 8,0). Концентрацию хлорофилла определяли по Арнону [5]. Реакционная среда для изучения светоиндуцированного поглощения протонов (ΔH^+ , мкмоль H⁺/мг хл) [4] содержала, mM: 200 сорбитола, 2,5 MgCl₂, 10 NaCl, 10 KCl, 0,5 трицина-NaOH, 1 MES и 0,5 HEPES, а также 50 мкМ ФМС и хлоропласты (0,2 мг хл/мл). Суспензию освещали белым светом насыщающей интенсивности. Количество поглощенных протонов рассчитывали по светоиндуцированному изменению pH (δpH) и буферной емкости реакционной среды. Буферную емкость определяли титрованием суспензии небольшими (0,5 мкмоль) количествами 10 mM NaOH. Концентрация ингибиторов карбоангидразы ацетазоламида (АЗ) (N-[5-сульфамойл-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид) и этоксизоламида (ЭЗ) (6-этокси-2-бензотиазол-сульфонамид) составляла 1 mM. Величину трансмембранного ΔpH в хлоропластах определяли флуоресцентным методом [13] на флуориметре ХЕ-РАМ («Walz», Германия) с помощью липофильной pH-зависимой флуоресцентной метки 9-аминоакридина. Концентрация 9-аминоакридина в реакционной среде составляла 1 мкМ. Состав реакционной среды был таким же, как при измерении величины (ΔH^+), за исключением того, что вместо ФМС использовали 0,1 mM метилвиологена (МВ), а концентрация трицина-KOH (pH 8,0), составляла 20 mM.

Результаты обработаны статистически и представлены как $M \pm m$.

Все реактивы отечественного производства марок ч.д.а. и х.ч. перекристаллизовывали из спирта, ацетон перегоняли; 9-аминоакридин приобретен у фирмы «Fluka» (Германия), АЗ, ЭЗ, метилвиологен, ФМС и трицин — у фирмы «Sigma» (США).

Результаты и обсуждение

Фотоиндуцированный перенос электронов в тилакоидных мембранах хлоропластов сопровождается трансмембранным транспортом протонов и формированием разности электрохимических потенциалов ионов водорода. На внешней стороне тилакоида протоны поглощаются в реакциях восстановления конечных акцепторов фотосистемы I и II, а внутри тилакоида — образуются при фотоокислении воды и окислении пластогидрохинона цитохромным комплексом b₆f. В результате световой активации этих фотохимических процессов среда суспендирования изолированных хлоропластов подщелачивается [4].

Показано, что включение и выключение света индуцирует изменения pH в слабобуферной суспензии хлоропластов (рис. 1). После включения света pH реакционной среды возрастает до некоторого стационарного уровня, при котором поглощение протонов хлоропластами компенсируется их утечкой наружу. После выключения света pH внешней среды снижается до исходного уровня, что связано с выходом протонов наружу после дезэнергизации мембран. Величина светоиндуциро-

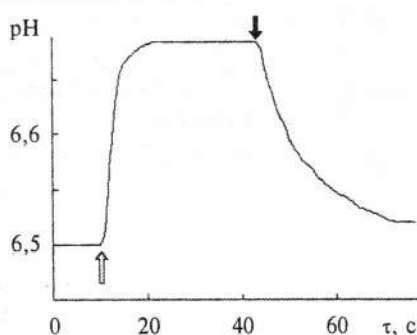


Рис. 1. Светозависимое изменение рН в суспензии хлоропластов. Момент включения света обозначен светлой стрелкой, момент выключения — темной. Концентрация хлорофилла 0,1 мг/мл, ФМС — 0,05 мМ

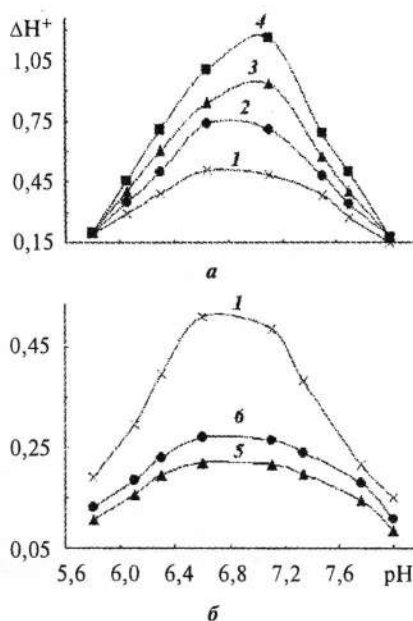


Рис. 2. Влияние гидрокарбоната и ингибиторов карбоангидразы на величину светозависимого поглощения протонов (ΔH^+) хлоропластами:

a — стимуляция ΔH^+ гидрокарбонатом, *б* — подавление ΔH^+ ингибиторами КА; 1 — контроль, 2—4 — соответственно 0,5, 1 и 2 мМ гидрокарбоната, 5 — 1,0 мМ ацетазоламида, 6 — 1,0 мМ этоксизоламида

ванного поглощения протонов (ΔH^+) зависит от степени нативности мембран, величины изменения рН реакционной среды при освещении хлоропластов (ΔpH), буферной емкости и рН среды, а также ее осмотической силы. Разобшители, так же, как и ингибиторы электронного транспорта, подавляют ΔH^+ . Зависимость ΔH^+ от рН реакционной среды показана на рис. 2, *a*. Максимальные величины ΔH^+ , которые обычно составляют 0,60—0,70 мкмоль H^+ /мг хл, регистрируются при рН внешней среды 6,5—6,7. С повышением рН (так же, как и при его снижении) величина ΔH^+ уменьшается и при рН 8 составляет 0,10—0,15 мкмоль H^+ /мг хл. На рис. 2, *a* показано также влияние экзогенного гидрокарбоната на величину светозависимого ΔH^+ . Введение в среду суспендирования хлоропластов 0,5—2 мМ гидрокарбоната приводит к стимуляции светозависимого поглощения протонов, причем в наибольшей степени этот эффект проявляется в области, близкой к pK_a гидрокарбоната (6,4—6,6). Если же в среду суспендирования добавляли ингибиторы карбоангидразы, стимуляция ΔH^+ экзогенным гидрокарбонатом подавлялась (табл. 1). В некоторых случаях величина ΔH^+ была заметно ниже контрольных значений, полученных в отсутствие экзогенного гидрокарбоната. Следует отметить также, что АЗ ингибировал ΔH^+ в большей степени (табл. 2), чем ЭЗ — гидрофобный сульфаниламид более эффективный при подавлении активности мембранно-связанной, ассоциированной с ФС II КА [12].

В отличие от стимуляции светозависимого поглощения протонов экзогенным гидрокарбонатом (см. рис.

2, *a*), продувка газового объема над реакционной средой азотом вызывала противоположный эффект — подавление ΔH^+ . Как видно из данных табл. 2, в условиях продувки азотом величина ΔH^+ постепенно снижалась как в контроле, так и при наличии ингибиторов карбоангидразы.

Данные по влиянию гидрокарбоната на величину светозависимого поглощения протонов хлоропластами после 6 ч инкубации с ингибиторами КА при 4 °С приведены в табл. 1. Из них видно, что: 1) в контроль-

РОЛЬ ГИДРОКАРБОНАТА В СВЕТОЗАВИСИМОМ ПОГЛОЩЕНИИ ПРОТОНОВ

ТАБЛИЦА 1. Влияние продолжительности инкубации хлоропластов при наличии ингибиторов карбоангидразы на величину светозависимого поглощения протонов (ΔH^+) при pH 6,5

Длительность инкубации, ч	ΔH^+ , мкмоль H^+ /мг хл					
	Контроль		+ 1мМ АЗ		+ 1мМ ЭЗ	
	без гидрокарбоната	+1 мМ HCO_3^-	без гидрокарбоната	+ 1 мМ HCO_3^-	без гидрокарбоната	+ 1 мМ HCO_3^-
0	0,68 ± 0,07	0,83 ± 0,08	0,50 ± 0,05	0,50 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,63 ± 0,02
3	0,67 ± 0,07	0,83 ± 0,08	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,40 ± 0,02
6	0,66 ± 0,07	0,83 ± 0,08	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,31 ± 0,02

Примечание. Здесь и в табл. 2: хл — хлорофилл, АЗ — ацетазоламид, ЭЗ — этоксизоламид.

ТАБЛИЦА 2. Влияние продувки газового объема над суспензией хлоропластов на величину ΔH^+ в контроле и при наличии ингибиторов КА

Длительность продувки азотом, мин	ΔH^+ , мкмоль H^+ /мг хл		
	Контроль	+ 1 мМ АЗ	+ 1 мМ ЭЗ
0	0,53 ± 0,05	0,50 ± 0,05	0,44 ± 0,05
5	0,50 ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,36 ± 0,04
10	0,28 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,33 ± 0,03
20	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,26 ± 0,03

ных препаратах величина ΔH^+ не изменялась в течение 6 ч после выделения; 2) если в среде содержались ингибиторы КА, то к шестому часу инкубации величина ΔH^+ существенно снижалась; 3) светозависимое поглощение протонов при добавлении гидрокарбоната возрастало в контрольных препаратах и в препаратах, инкубированных с ЭЗ, тогда как в хлоропластах, инкубированных при наличии 1 мМ АЗ, гидрокарбонат не влиял на величину ΔH^+ .

Кривые, демонстрирующие изменение величины флуоресценции 9-аминоакридина при световой энергизации хлоропластов при наличии в среде изучаемых эффекторов, приведены на рис. 3. При освещении хлоропластов светом насыщающей интенсивности флуоресценция метки снижалась, а при выключении света возрастала до первоначального уровня. Как внесение в среду гидрокарбоната до концентрации 5 мМ, так и удаление S_i из среды в результате продувки ячейки инертным газом или добавления ингибиторов КА практически не влияли на степень тушения метки. Полученные данные позволяют заключить, что в изоосмотической среде величина светоин-

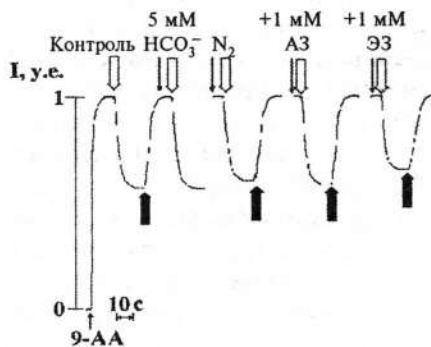


Рис. 3. Влияние гидрокарбоната и ингибиторов карбоангидразы на светозависимое тушение флуоресценции (I — интенсивность флуоресценции в условных единицах) 9-аминоакридина (9-АА). Узкими стрелками обозначено внесение гидрокарбоната, ингибиторов карбоангидразы, а также продувка азотом, широкими — моменты включения и выключения света (см. подпись к рис. 1)

дуцированного градиента протонов в тилакоидах не зависит ни от активности КА, ни от концентрации в среде гидрокарбоната.

Известно, что некоторые слабые кислоты способны в протонированной форме растворяться в мембране тилакоидов и, облегчая обмен протонов между внешней средой и внутритилакоидным пространством (люменом), снижать трансмембранный протонный градиент и разобщать процессы энерготрансформации [2]. Другим известным эффектом, который рассматривается как неспецифический, связанный с формированием трансмембранного ΔpH , является стимуляция светозависимого поглощения протонов в хлоропластах в присутствии проникающих буферов, в частности гидрокарбоната [4]. Поскольку максимальная стимуляция регистрируется при рН вблизи рК слабых кислот, предполагается, что анионы, протонируясь при освещении, накапливаются в люмене, повышая внутритилакоидную буферную емкость, что и является непосредственной причиной возрастания ΔH^+ [2, 4, 15]. Наши данные показывают, что по крайней мере в случае гидрокарбоната, можно говорить о специфической, связанной с активностью КА стимуляции поглощения протонов хлоропластами при освещении.

Известны по крайней мере два типа КА в хлоропластах: растворимая стромальная β -КА и мембранная форма фермента, связанная с тилакоидами [10, 12]. Последняя чувствительна к действию липофильного ингибитора ЭЗ, тогда как водорастворимый АЗ не оказывает на нее заметного действия [12]. Тот факт, что в наших экспериментах АЗ в большей степени, чем липофильный ЭЗ подавлял ΔH^+ и его HCO_3^- -зависимую стимуляцию (см. рис. 2, б и табл. 1), свидетельствует об участии в этом процессе стромальной, водорастворимой формы КА, катализирующей, по-видимому, поступление экзогенного гидрокарбоната в тилакоиды. Продолжительная инкубация хлоропластов с ацетазоламидом приводила к многократному снижению величины светозависимого поглощения протонов (см. табл. 1), что указывает на вклад КА в поддержание буферных систем тилакоидов, ответственных за формирование ΔH^+ . Ранее высказывались предположения, что эти системы формируются ионогенными группами белков и фосфолипидов [3, 16]: COOH -группами аспарагиновой или глутаминовой кислот [9]; аминогруппами лизина с аномально низкими рК [6] или имидазольными группами гистидина [3]. Однако следует отметить, что функциональные группы липидов не могут вносить заметного вклада в буферную емкость тилакоидов и ее светозависимые изменения в диапазоне рН 5,5–8,5, поскольку: 1) содержание фосфолипидов в тилакоидных мембранах не превышает 8 % [7]; 2) рК фосфолипидных остатков составляет 2,3–3,2. Что же касается ионогенных групп белков с рК в диапазоне 6–8, входящих в состав тилакоидов, то их количество невелико, и для объяснения регистрируемых в этом интервале светозависимых эффектов приходилось постулировать существование amino- или карбоксильных групп с аномально низким или аномально высоким рК и утверждать, что все ионогенные группы доступны титрованию.

Тилакоидная мембрана содержит значительное количество связанного гидрокарбоната (до 1 мкмоль/мг хл) [14], который, очевидно, также следует рассматривать как одну из буферных систем, участвующих в светозависимом протонировании и энергизации тилакоидов. Этот пул находится в равновесии с гидрокарбонатом, растворенным во внешнем (стромальном) объеме хлоропластов и контролируется активностью кар-

боангидразы, возрастающей, как показали Москвин и соавт. [11], при освещении.

Полученные данные дают основания полагать, что КА способствует энергизации мембраны, участвуя в светозависимом протонировании мембранно-связанного гидрокарбоната и обеспечивая стимуляцию светоиндуцированного поглощения протонов при наличии экзогенного HCO_3^- . Мембранно-связанный гидрокарбонат является, таким образом, компонентом буферной системы тилакоидов и участвует в процессах энергозависимого связывания протонов. В то же время, поскольку величина трансмембранного градиента протонов не зависела ни от активности КА, ни от концентрации экзогенного гидрокарбоната (см. рис. 3), можно предположить, что выход гидрокарбоната из мембраны в люмен тилакоидов ограничен.

1. Золотарева Е.К., Довбыш Е.Ф., Онойко Е.Б. Сравнительное исследование ингибирования $\text{N,N}'$ -дциклогексилкарбодимидом фотофосфорилирования и активируемого светом гидролиза АТФ в хлоропластах гороха // Укр. біохім. журн. — 2001. — 73, № 5. — С. 61—68.
2. Тихонов А.Н., Шевякова А.В. Электронный транспорт, перенос протонов и их связь с фотофосфорилированием в хлоропластах. III. Влияние метаболического состояния на процессы протонного транспорта в хлоропластах // Биологич. мембраны. — 1985. — 2, № 6. — С. 776—785.
3. Шутова Т.В., Опанасенко В.К., Ананьев Г.М., Климов В.В. Светоиндуцированные изменения протонной емкости субхлоропластных препаратов фотосистемы 2 шпината // Там же. — 1991. — 8, № 6. — С. 601—605.
4. Abbott M.S., Dilley R.A. Light-dependent proton efflux from chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. — 1983. — 222, № 1. — P. 95—104.
5. Arnon D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // Plant Physiol. — 1949. — 24, № 1. — P. 1—154.
6. Ewy R.G., Dilley R.A. Distinguishing between luminal and localized proton buffering pools in thylakoid membranes // Ibid. — 2000. — 122. — P. 583—595.
7. Joyard J., Marechal E., Miede C. et al. Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts // Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics / Eds P.-A. Siegenthaler, N. Murata. — Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 1998. — P. 21—52.
8. Klimov V.V., Allakhverdiev S.I., Feyzjev Ya.M., Baranov S.V. Bicarbonate requirement for the donor side of photosystem II // FEBS Lett. — 1995. — 363. — P. 251—255.
9. Laszlo J.A., Millner P.A., Dilley R.A. Light-dependent chemical modification of membrane proteins with carboxyl-directed reagents // Arch. Biochem. Biophys. — 1982. — 215. — P. 571—581.
10. Lu Y.-K., Stemler A. J. Extrinsic photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts // Plant Physiol. — 2002. — 128. — P. 643—649.
11. Moskvin 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. — P. 375—377.
12. Moskvin O.V., Shutova T.V., Khrustin M.S. et al. Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids // Photosynth. Res. — 2004. — 79. — P. 93—100.
13. Schuldiner S., Rottenberg H., Avron M. Determination of ΔpH in chloroplasts. 2. Fluorescent amines as a probe for determination of ΔpH in chloroplasts // Eur. J. Biochem. — 1972. — 25, № 1. — P. 64—70.
14. Stemler A. The binding of bicarbonate ions to washed chloroplast grana // Biochim. biophys. acta. — 1977. — 460, № 3. — P.511—522.
15. 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, № 2. — P. 202—211.
16. 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. — P. 403—407.

Получено 06.07.2004