



УДК 577.344

© 2010

Е. Б. Онойко, А. В. Полищук, Е. К. Золотарева

Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы

(Представлено академиком НАН Украины К. М. Сытником)

*Вивчено вплив екзогенного бикарбонату та інгібіторів карбоангидрази — водорозчинного ацетазоламиду і ліпофільного етоксизоламиду — на швидкість циклічного та нециклічного фотофосфорилування в ізольованих хлоропластах шпинату (*Spinacia oleracea* L.) у діапазоні рН 6,8–8,2. Показано, що бикарбонат, доданий екзогенно до концентрації 3–6 мМ, ефективно стимулює фотофосфорилування. Максимальна стимуляція спостерігалася при рН середовища близько 7,0. При підвищенні рН до 7,6–8,2 стимулюючий ефект HCO_3^- різко знижувався. Інгібітори карбоангидрази після нетривалої інкубації з хлоропластами усували стимулюючий вплив бикарбонату на швидкість фотофосфорилування. Зроблено висновок, що швидкість фотофосфорилування залежить не тільки від концентрації бикарбонату, а й від активності карбоангидрази, яка забезпечує швидку трансформацію форм вугільної кислоти і тим самим полегшує видалення протонів із центрів їх звільнення.*

Скорость фотохимических реакций в хлоропластах высших растений зависит от наличия в среде углекислого газа и/или анионов угольной кислоты [1, 2]. Эта зависимость, получившая название “бикарбонатного эффекта”, исследована на уровне интактных листьев, изолированных тилакоидов, фотосистем и реакционных центров, и связана с присутствием в фотосистеме II (ФСII) прочносвязанного HCO_3^- , выполняющего кофакторную функцию [3, 4]. Удаление CO_2 и бикарбоната из реакционной среды в результате длительной продувки суспензии хлоропластов инертным газом или же при инкубации мембран в присутствии формиата или других ионов — антагонистов бикарбоната, приводит к подавлению фотохимической активности ФСII, которая высокоспецифично восстанавливается после внесения в реакционную среду бикарбоната, причем другие анионы не активируют электронный транспорт в хлоропластах, освобожденных от $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ [4]. Фотофосфорилирование также зависит от содержания бикарбоната в среде и ускоряется при возрастании его концентрации в суспензии [5]. Показано также [6], что светозависимый протонный

обмен в хлоропластах зависит от концентрации форм угольной кислоты и контролируется активностью карбоангидразы — фермента, катализирующего гидратацию углекислого газа и дегидратацию бикарбоната. Можно предполагать, что фотофосфорилирование стимулируется вследствие активации электронного и протонного транспорта анионами HCO_3^- , однако до настоящего времени взаимосвязь этих процессов в условиях вариации концентрации $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ не проанализирована. В данной работе приведены результаты изучения рН-зависимости влияния бикарбоната и ингибиторов карбоангидразы на скорость фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината.

Хлоропласты класса “В” изолировали из листьев 40-дневных растений шпината (*Spinacia oleracea* L.) как описано ранее [7], а затем суспендировали в среде, содержащей 400 мМ сорбитола, 2,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ NaCl , 10 мМ KCl , 10 мМ трицин- NaOH (рН 8,0). Скорость фотофосфорилирования оценивали потенциометрически. Реакционная среда содержала 200 мМ сорбитола, 2,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ NaCl , 10 мМ KCl , 0,5 мМ трицин- NaOH , 1 мМ MES и 0,5 мМ NEPES, 0,5 мМ АДФ, 5 мМ KH_2PO_4 , 0,1 мМ метилвиологена (МВ) или 0,05 мМ феназинметасульфата (ФМС) и хлоропласты в количестве, эквивалентном 15 мкг хлорофилла в мл.

Суспензию освещали белым светом насыщающей интенсивности в течение 1 мин. Количество протонов, поглотившихся в реакции, рассчитывали по светоиндуцированному изменению рН в ходе реакции и буферной емкости реакционной среды. Буферную емкость определяли, титруя суспензию небольшими (0,5 мкмоль) количествами 10 мМ HCl . Концентрацию хлорофилла определяли по методу Арнона [8].

Скорость фотофосфорилирования в присутствии NaHCO_3 определяли гексокиназным методом. К 2,3 мл реакционной среды, содержащей 3,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ глюкозы, 50 мМ трис- HCl (рН 7,8), добавляли 2,5 ед. гексокиназы (0,1 мл суспензии с исходной концентрацией 2 мг/мл), 0,5 ед. глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Г-6-ФДГ) (0,08 мл суспензии с исходной концентрацией 0,1 мг/мл) и НАДФ до концентрации 0,066 мМ (0,02 мл суспензии с исходной концентрацией 0,01 М). Все реактивы смешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 0,5 мл образца, содержащего АТФ, и термостатировали 5 мин при 30 °С.

Содержание АТФ в пробе рассчитывали, исходя из результатов измерений флуоресценции НАДФН на флуориметре ХЕ-РАМ (“Walz”, Германия) и данных калибровочной кривой, построенной для растворов с известными концентрациями АТФ.

Концентрация ингибиторов карбоангидразы ацетазоламида (АА) (N-[5-сульфамил-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид) и этоксизоламида (ЭА) (6-этокси-2-бензотиазол-сульфонамид) составляла 0,5 мМ.

Результаты приведены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение. Количество аналитических повторностей в опыте — не менее трех.

Все реактивы отечественного производства марки чда и хч перекристаллизовывали из спирта, ацетон перегоняли, АДФ, АТФ, МВ, ФМС, АА, ЭА, NEPES, MES, трис, трицин, гексокиназа (Н 5000, 37 ед./мг) приобретены у фирмы “Sigma” (США), НАДФ и Г-6-ФДГ (катал. № 49275, 174 ед./мг) — у фирмы “Fluka” (Германия).

Данные по влиянию 6 мМ NaHCO_3 на скорость нециклического фотофосфорилирования в присутствии МВ в качестве акцептора электронов при различных значениях рН среды представлены на рис. 1. В контрольных условиях нециклический синтез АТФ регистрировался при рН > 7,0, а максимальная скорость синтеза АТФ наблюдалась при рН 8,3–8,4, что согласуется с литературными данными [9, 10]. Зависимость фотофосфорилирования от

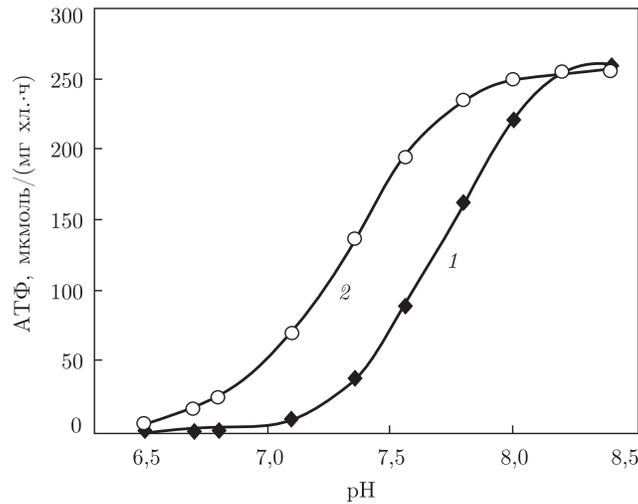


Рис. 1. pH-зависимость влияния бикарбоната на скорость нециклического фотофосфорилирования: 1 — контроль; 2 — в присутствии 6 мМ NaHCO₃.

Состав реакционной смеси: 200 мМ сорбитола, 2,5 мМ MgCl₂, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 0,5 мМ трицин-NaOH, 1 мМ MES и 0,5 мМ NEPEP, 0,5 мМ АДФ, 5 мМ KН₂PO₄, 0,1 мМ МВ и хлоропласты в количестве, эквивалентном 15 мкг хлорофилла в мл

pH существенно изменялась, если к реакционной среде добавляли бикарбонат. При этом максимальная скорость синтеза АТФ не отличалась от контрольной и регистрировалась при тех же значениях pH, что и в контроле. В присутствии 6 мМ NaHCO₃ скорость фотофосфорилирования значительно превосходила контрольные значения в диапазоне pH 6,5–8,0, причем при pH среды < 7,7 — в несколько раз. Особенно заметно фотофосфорилирование стимулировалось при pH 7,0 и менее. Скорость синтеза АТФ при этих значениях pH очень низка в контрольных условиях и возрастает в 4–8 раз после добавления NaHCO₃ до концентрации 6 мМ (см. рис. 1). Стимулирующее влияние добавленного бикарбоната на скорость фотофосфорилирования снижалось по мере возрастания pH реакционной среды: при pH 7,6 добавление 6 мМ NaHCO₃ приводило к возрастанию скорости синтеза АТФ примерно в 2 раза, а при pH 7,8 — в 1,4–1,5 раза.

Влияние экзогенно добавленного бикарбоната на скорость циклического фотофосфорилирования исследовали, используя в качестве акцептора электронов ФМС. Данные табл. 1 показывают, что скорость светозависимого синтеза АТФ в этой реакции также стимулировалась в присутствии бикарбоната. Максимальный эффект регистрировался при pH среды < 7,5, а при значениях pH более 8,0 фотофосфорилирование практически не ускорялось при добавлении бикарбоната.

Стимуляция фотофосфорилирования экзогенно добавленным бикарбонатом эффективно устранялась после непродолжительной (в течение 3 мин) инкубации хлоропластов в при-

Таблица 1. Скорость циклического фотофосфорилирования (мкмоль АТФ/(мг хл. · ч)) в присутствии экзогенного бикарбоната натрия

pH	0 мМ NaHCO ₃	3 мМ NaHCO ₃	6 мМ NaHCO ₃
7,0	2	70 ± 3	105 ± 5
7,6	210 ± 10	285 ± 14	440 ± 22
8,2	590 ± 30	580 ± 29	560 ± 28

сутствии ингибиторов карбоангидразы — гидрофильного АА или липофильного ЭА. Данные, приведенные в табл. 2, показывают, что эффект ингибиторов карбоангидразы был наиболее заметен при рН 7,6. Видно, что в этих условиях скорость фотофосфорилирования, превышавшая в присутствии 6 мМ бикарбоната контрольную в 2,3 раза, после добавления АА или ЭА снижалась и составила 120 и 125% контрольного значения соответственно. Стимуляция фотофосфорилирования 3 мМ бикарбонатом была менее выраженной, чем эффект 6 мМ бикарбоната. Скорость фотофосфорилирования в присутствии 3 мМ бикарбоната составляла 130% и снижалась до 106 и 109% от контрольной при добавлении АА и ЭА соответственно. Таким образом, ингибиторы карбоангидразы в значительной степени устраняли стимуляцию фотофосфорилирования экзогенным бикарбонатом.

О возможной роли карбоангидразы в регуляции фотохимических процессов в хлоропластах неоднократно сообщалось ранее [1, 4, 6, 11, 12]. Подробно исследованы кофакторная роль прочносвязанного бикарбоната в фотосинтетическом электронном транспорте и зависимость функционирования ФСII от активности тилакоидной карбоангидразы [1–4]. Показано, что светозависимый протонный перенос также контролируется карбоангидразой тилакоидов [6, 12]. Шутова с соавт. [12] предположили, что тилакоидная карбоангидраза Саh3 участвует в протонном обмене на донорной стороне ФСII, облегчая удаление протонов из центров фотоокисления воды. С другой стороны, нами было показано, что светозависимое поглощение протонов изолированными хлоропластами, связанное с протонированием вторичного хинона на акцепторной стороне ФСII, стимулируется в присутствии бикарбоната и подавляется ингибиторами карбоангидразы — АА и ЭА [6]. Как известно, светозависимый протонный обмен энергетически обеспечивает фотофосфорилирование, формируя трансмембранный протонный градиент (ΔpH), который в стационарных условиях в процессе фотосинтетического фосфорилирования конвертируется в химическую энергию АТФ. Нам удалось показать, что скорость фотофосфорилирования, стимулирующаяся в присутствии экзогенного бикарбоната, зависит от активности карбоангидразы. Можно предполагать, что ускорение фотофосфорилирования в присутствии бикарбоната связано с его участием в протонном переносе от H^+ -генерирующих протонных помп к АТФ-синтазе.

Роль карбоангидразы тилакоидов, снимающей кинетические ограничения, связанные с взаимопревращениями форм угольной кислоты, состоит в этом случае в сохранении достаточно высокой концентрации свободного бикарбоната, акцептирующего протоны в центрах их освобождения. Очевидно, что связывание и перенос протонов парой $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ наиболее эффективны вблизи константы ионизации угольной кислоты ($\text{pK} \sim 6,36$). Таким образом, если значение рН сильно отличается от рК, протонный перенос с участием бикарбоната перестает быть эффективным. С этим, по-видимому, связана наблюдаемая нами рН-зависимость стимулирующего действия бикарбоната на фотофосфорилирование. Как отмечалось выше, скорость синтеза АТФ возрастает в несколько раз при значениях рН,

Таблица 2. Влияние ингибиторов карбоангидразы на скорость нециклического фотофосфорилирования (мкмоль АТФ/(мг хл. · ч)) в присутствии экзогенного бикарбоната натрия

рН	0 мМ NaHCO ₃			3 мМ NaHCO ₃			6 мМ NaHCO ₃		
	Без ингибитора	ЭА	АА	Без ингибитора	ЭА	АА	Без ингибитора	ЭА	АА
7,0	10 ± 1	12 ± 1	11 ± 1	16 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	48 ± 3	20 ± 1	16 ± 1
7,6	90 ± 5	95 ± 5	89 ± 4	116 ± 6	98 ± 5	95 ± 5	210 ± 10	113 ± 6	108 ± 5
8,2	230 ± 11	235 ± 12	230 ± 11	250 ± 13	245 ± 12	240 ± 12	255 ± 12	228 ± 11	220 ± 11

близких к рК угольной кислоты, а по мере повышения рН реакционной среды до 7,6–8,2 стимулирующий эффект HCO_3^- резко снижается.

В более ранних работах ускорение светозависимого синтеза АТФ при добавлении экзогенного бикарбоната к изолированным хлоропластам связывали с конформационными изменениями АТФ-синтазы, индуцированными взаимодействием с анионами [5, 13]. В результате таких взаимодействий аффинность одного или нескольких регуляторных нуклеотидсвязывающих центров АТФ-синтазы изменяется [14], что приводит к вытеснению прочносвязанного АДФ из центров прочного связывания фермента и стимуляции каталитической активности.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что скорость фотофосфорилирования зависит не только от концентрации бикарбоната, но и от активности карбоангидразы, обеспечивающей быструю трансформацию форм угольной кислоты и облегчающую тем самым удаление протонов из центров их освобождения.

1. *Stemler A. J.* The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase // *Physiol. Plant.* – 1997. – **99**, No 2. – P. 348–353.
2. *van Rensen J. J. S., Xu C., Govindjee.* Role of bicarbonate in Photosystem II // *Ibid.* – 1999. – **105**, No 2. – P. 585–592.
3. *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**, No 51. – P. 16277–16281.
4. *Klimov V. V., Baranov S. V.* Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II // *Biochim. et biophys. acta.* – 2001. – **1503**, No 1–2. – P. 187–196.
5. *Cohen W. S., MacPeck W. A.* A proposed mechanism for the stimulatory effect of bicarbonate ions on ATP synthesis in isolated chloroplasts // *Plant Physiol.* – 1980. – **66**, No 2. – P. 242–245.
6. *Подорванов В. В., Золотарева Е. К., Черноштан А. А.* Роль гидрокарбоната в светозависимом поглощении протонов изолированными хлоропластами // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2005. – **37**, № 4. – С. 326–332.
7. *Золотарева Е. К., Добыши Е. Ф., Онойко Е. Б.* Сравнительное исследование ингибирования N, N-дигидроциклогексилкарбодиимидом фотофосфорилирования и активируемого освещением гидролиза АТФ в хлоропластах гороха // *Укр. біохімі. журн.* – 2002. – **73**, № 5. – С. 61–68.
8. *Arnon D. I.* Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // *Plant Physiol.* – 1949. – **24**, No 1. – P. 1–154.
9. *Underwood C., Gould M. J.* Modulation of proton efflux from chloroplasts in the light by external pH // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1980. – **204**, No 1. – P. 241–246.
10. *Avron M.* Energy transduction in chloroplasts // *Annu. Rev. Biochem.* – 1977. – **46**, No 1. – P. 143–155.
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**, No 3. – P. 375–377.
12. *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**, No 5. – P. 782–791.
13. *Punnett T., Iyer R. V.* The enhancement of photophosphorylation and the Hill reaction by carbon dioxide // *J. Biol. Chem.* – 1964. – **239**, No 7. – P. 2335–2339.
14. *Malyan A. N.* Interaction of oxyanions with thioredoxin-activated chloroplast coupling factor 1 // *Biochim. et biophys. acta.* – 2003. – **1607**, No 2–3. – P. 161–166.

The stimulation of photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts by exogenous bicarbonate: the role of carbonic anhydrase

*The effect of exogenous bicarbonate and inhibitors of carbonic anhydrase, water-soluble acetazolamide and lipophylic ethoxylamide, on the rate of cyclic and non-cyclic photophosphorylation has been examined in the suspension of isolated spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplasts in the pH range 6.8–8.2. It is shown that exogenous bicarbonate (3–6 mM) effectively stimulates the photophosphorylation in isolated chloroplasts. The bicarbonate-induced enhancement of photophosphorylation showed a marked pH dependence, with the greatest response occurring at pH near 7.0. Both inhibitors of carbonic anhydrase reduce the stimulating effect of HCO_3^- on the rate of photophosphorylation. It is concluded that light-induced ATP synthesis depends not only on exogenous bicarbonate, but also on the activity of carbonic anhydrase that rapidly converts the forms of carbonic acid thereby facilitating the removal of protons from sites of their release.*