



УДК 577.352.3

© 2009

А. В. Полищук, В. В. Подорванов, А. В. Семенихин,
Е. К. Золотарева

Светозависимое поглощение CO_2 изолированными хлоропластами гороха

(Представлено академиком НАН Украины К. М. Сытником)

Методом інфрачервоного газового аналізу встановлено, що освітлення ізольованих хлоропластів класу "В" індукує поглинання до 320 нмоль CO_2 на 1 мг хлорофілу з газової фази над суспензією. Процес поглинання починається одразу ж після початку освітлення і розвивається протягом 15–20 с. Після вимкнення світла в газову фазу вивільняється кількість CO_2 , що дорівнює поглинутій на світлі. Виявлений ефект корелює з добре відомою реакцією світлозалежного поглинання протонів ізольованими хлоропластами. Показано, що величина світлоіндукованого поглинання CO_2 контролюється активністю карбоангідрази (КА) і пригнічується інгібіторами КА — ліофільним етоксизоламідом та гідрофільним ацетазоламідом. Висунуто припущення, що кількість мембранозв'язаного бікарбонату в тилакоїдах та їх фотохімічна активність контролюються активністю тилакоїдної КА, яка бере участь у формуванні енергізованого стану хлоропластів.

Тилакоидные мембраны содержат довольно большое количество (до 1 мкмоль на 1 мг хлорофилла) связанного с различной степенью прочности бикарбоната [1]. Прочно связанный бикарбонат абсолютно необходим для сохранения функциональной активности ФСII [2, 3], его удаление приводит к ингибированию реакций переноса электронов, как на донорной, так и на акцепторной стороне ФСII [2–4]. Местом локализации прочно связанного бикарбоната, согласно данным целого ряда работ [2, 3], является сайт ФСII между первичным и вторичным пластохиноновыми акцепторами Q_A и Q_B . Функциональная роль пула слабо связанного HCO_3^- не известна.

Наряду с мембраносвязанным бикарбонатом тилакоиды и частицы ФСII содержат карбоангідразу (КА, карбонат гідроліазу, ЕС 4.2.1.1.) — фермент, катализує реакцію гідратації CO_2 і зворотню їй реакцію дегідратації бикарбоната [4–6]. КА в десятки тисяч раз ускоряет установление равновесия между формами угольной кислоты, которое в растворе достигается весьма медленно [7].

В мембранах молекулы КА ассоциированы, по крайней мере, с четырьмя различными компонентами электрон-транспортной цепи тилакоидов [6]. На уровне ФСII, как предполагается, ионы бикарбоната акцептируют протоны, освобождающиеся при фотоокислении воды и поступающие во внутритилакоидное пространство [8]. При резком возрастании ин-

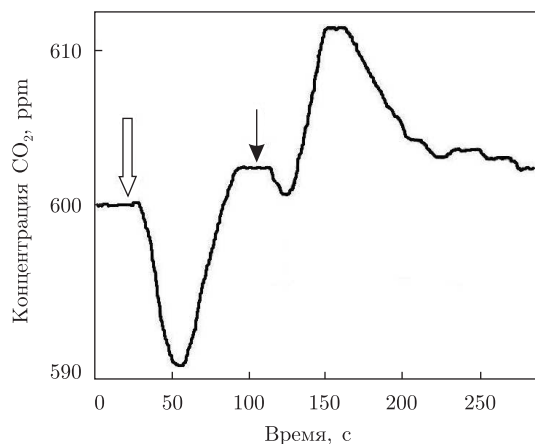


Рис. 1. Изменение скорости потока CO_2 в газовой среде над суспензией изолированных хлоропластов, индуцированное включением и выключением света. Состав реакционной среды: 200 мМ сорбитола, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ трицин-NaOH (pH 7,8), 0,1 мМ МВ и хлоропласты в количестве, эквивалентном 1 мг хлорофилла. Стрелками показаны моменты включения и выключения света

тенсивности освещения скорость освобождения протонов также возрастает, что может привести к увеличению локальной концентрации H^+ вблизи активных центров окисляющего воду комплекса и вызвать повреждение и даже деструкцию марганцевого кластера с высвобождением Mn в водную фазу [9]. КА, локализованная на донорной стороне ФСII, катализирует протонирование HCO_3^- и ускоряет удаление протонов от центров фоторазложения воды, способствуя, таким образом, предотвращению кислотной денатурации окисляющего воду комплекса [10]. В ряде работ высказывалось предположение, что CO_2 , образующийся в результате этой реакции, используется в цикле Кальвина, а роль тилакоидной КА состоит в обслуживании рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксидазы и обеспечении этого фермента субстратом [11]. В случае справедливости этого предположения освещение изолированных тилакоидных мембран будет приводить к освобождению CO_2 во внетилакоидное пространство. Цель проведенного исследования состояла в определении светоиндуцированных изменений концентрации CO_2 в газовой фазе над суспензией хлоропластов с использованием инфракрасного газового анализа.

Хлоропласты класса "В" изолировали из листьев двух верхних ярусов 12–14-дневных растений гороха по методике Уокера в нашей модификации [12]. Препараты суспендировали в среде хранения, содержащей 200 мМ сорбитол, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трицин-NaOH (pH 7,8) и 2,5 мМ MgCl_2 при концентрации хлорофилла 4 мг/мл.

Эксперименты по определению светоиндуцированных изменений концентрации CO_2 в газовом объеме над суспензией хлоропластов в изолированной от атмосферы ячейке выполняли при постоянной продувке этого объема воздухом с известной концентрацией CO_2 (600 ppm). Концентрацию CO_2 в газовой фазе определяли с помощью инфракрасного газового анализатора фирмы Qubit Systems (Канада).

На рис. 1 показано, как изменяется скорость потока CO_2 при освещении суспензии хлоропластов и после выключения света. Световое насыщение процесса достигалось за счет интенсивного перемешивания. Само по себе перемешивание в темноте не вызывало каких-либо изменений состава газовой фазы. Согласно полученным данным (табл. 1), как в присутствии акцептора электронов метилвиологена (МВ), катализирующего нецикличес-

кий перенос электронов, так и в присутствии феназинметасульфата (ФМС), медирующего циклический транспорт электронов вокруг первой фотосистемы, освещение вызывало поглощение CO_2 из окружающего газового объема. В отсутствие экзогенного акцептора электронов величина светоиндуцируемого поглощения CO_2 несколько ниже, чем в присутствии МВ или ФМС. После выключения света CO_2 в количествах, эквивалентных поглощенным на свету, освобождался в газовую фазу. Общее поглощение CO_2 в различных экспериментах составляло от 0,1 до 0,32 мкмоль/мг хл.

Возможная связь величины светоиндуцированного поглощения и степени энергизации тилакоидных мембран проверялась в серии экспериментов, результаты которых суммированы в табл. 2. В контрольных экспериментах поглощение CO_2 регистрировали в присутствии медиатора циклического электронного транспорта ФМС. Введение антибиотика грамицидина А, формирующего каналы в мембранах и разрушающего трансмембранный протонный градиент, подавляло также и поглощение CO_2 , индуцированное светом. Такие же результаты были получены и в опытах с использованием протонофорного разобщителя NH_4Cl . Полученные результаты позволяют сделать вывод, что целостность тилакоидной мембраны и сохранение высокого уровня трансмембранного протонного градиента являются необходимыми условиями наблюдаемого эффекта поглощения CO_2 при освещении хлоропластов.

Данные, приведенные в табл. 3, показывают, что величина светоиндуцированного поглощения CO_2 зависит также от активности КА. Ингибиторы КА лиофильный этоксизоламид (ЭЗ) и гидрофильный ацетазоламид (АА) ингибировали поглощение CO_2 , вызванное освещением суспензии хлоропластов. Степень подавления реакции зависела от продолжительности действия ингибиторов: внесение ингибитора в реакционную среду приводило к ча-

Таблица 1. Величина светоиндуцированного поглощения CO_2 изолированными хлоропластами класса "В"

Вариант	Светозависимое поглощение CO_2 , мкмоль/мг хл.
Без добавок	$0,2 \pm 0,04$
МВ, 0,1 мМ	$0,27 \pm 0,04$
ФМС, 0,05 мМ	$0,27 \pm 0,05$

Таблица 2. Влияние разобщителей электронного транспорта на величину светоиндуцированного поглощения протонов и CO_2 изолированными хлоропластами класса "В"

Вариант	Светозависимое поглощение CO_2 (ΔCO_2), нмоль CO_2 /мг хл.	Светозависимое поглощение H^+ (ΔH^+), нмоль H^+ /мг хл.
Без добавок	140 ± 20	120 ± 15
Грамицидин, 10^{-7} М	190 ± 22	80 ± 15
Грамицидин, 10^{-6} М	0	0
NH_4Cl , 10^{-6} М	50 ± 12	70 ± 12
NH_4Cl , 10^{-5} М	0	0

Таблица 3. Влияние ингибиторов карбоангидразы на величину светоиндуцированного поглощения CO_2 изолированными хлоропластами класса "В"

Вариант	Светозависимое поглощение CO_2 , мкмоль/мг хл.
Контроль	$0,19 \pm 0,03$
АА, $4 \cdot 10^{-7}$ М, без инкубации	$0,07 \pm 0,01$
ЭА, $4 \cdot 10^{-7}$ М, без инкубации	$0,07 \pm 0,01$
АА, 10^{-6} М, после 3 ч инкубации	0
ЭА, 10^{-6} М, после 3 ч инкубации	0

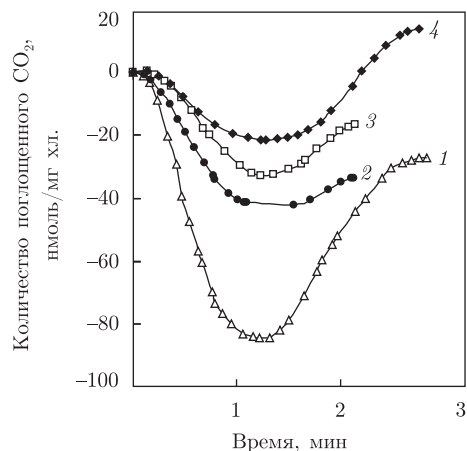


Рис. 2. Влияние разбавления суспензии на обратимое поглощение CO_2 суспензией тилакоидных мембран, индуцированное включением и выключением света:

1 — контроль, концентрация хлорофилла в суспензии составляла 3,3 мг/мл; 2 — суспензия разбавлена в 3 раза; 3 — суспензия разбавлена в 5 раз; 4 — суспензия разбавлена в 10 раз

стичному, а продолжительная (в течение 3 ч) преинкубация тилакоидов в присутствии АА или ЭА — к полному ингибированию светозависимого поглощения CO_2 хлоропластами.

Эффект поглощения CO_2 тилакоидами регистрировался только в концентрированных суспензиях, содержание хлорофилла в которых составляло 2,5 — 3,5 мг хл./мл. В более разбавленных суспензиях поглощение CO_2 при освещении не удалось обнаружить. Данные, приведенные на рис. 2, показывают, как уровень светозависимого поглощения CO_2 снижается по мере разбавления суспензии. Эти результаты могут быть объяснены тем, что углекислота поступает в суспензию в ходе простой диффузии, поскольку в соответствии с законом Фика диффузия из газовой фазы зависит от разности концентраций между раствором и окружающим газовым объемом. Очевидно, что в темноте при постоянном рН и температуре концентрации углекислоты в суспензии и в газовом объеме над суспензией уравновешены. Освещение вызывает поглощение бикарбоната из раствора, связанное, по-видимому, с формированием трансмембранного протонного градиента. Возникший градиент концентрации бикарбоната способствует ускорению диффузии CO_2 из газовой фазы в раствор. Естественно полагать, что хлоропласты при освещении поглощают одинаковое количество CO_2 независимо от концентрации суспензии, однако величина градиента концентраций углекислоты будет зависеть от концентрации суспензии: в плотных суспензиях относительное содержание водной фазы ниже, чем в разбавленных, поэтому поглощение одинакового количества углекислоты из водной фазы будет приводить к большему падению $[\text{HCO}_3^- + \text{CO}_2]$ в водной фракции концентрированной, чем в водной фазе разбавленной суспензии хлоропластов.

В интактных хлоропластах, способных к фотосинтетическому поглощению CO_2 , процесс фиксации углекислоты начинается после 5–7 мин освещения. Эта фаза процесса называется индукцией фотосинтеза [13]. В настоящей работе показано, что хлоропласты класса “В”, не способные к фиксации CO_2 из-за отсутствия внешних оболочек и потери необходимых растворимых компонентов, также поглощают некоторое количество CO_2 сразу после начала освещения. Реакция развивается в течение 30–40 с, а количество поглощенной тилакоидами углекислоты достигает 320 нмоль CO_2 /мг хл. Поглощенный пул CO_2 , по-видимому, оста-

ся связанным с мембранами в течение всего периода освещения и освобождается в газовую фазу после выключения света. Светозависимое поглощение CO_2 блокируется разобщителями, разрушающими трансмембранный протонный градиент. Зависимость уровня светоиндуцированного поглощения CO_2 от величины ΔpH подтверждается данными табл. 1, показывающими, что количество поглощенного CO_2 возрастает в присутствии искусственных акцепторов электронов. Известно, что экзогенные акцепторы электронов стимулируют реакцию Хилла, что приводит к возрастанию трансмембранного ΔpH . Это дает основание полагать, что поглощение CO_2 коррелирует с уровнем энергизации мембран.

Эффект светоиндуцированного поглощения протонов, развивающийся при освещении тилакоидных мембран в том же временном диапазоне, описан более 30 лет тому назад [14]. Это явление, называемое в литературе ΔH^+ , рассматривается как составная часть процесса световой энергизации тилакоидов. Полагают, что величина ΔH^+ зависит от буферной емкости тилакоидных мембран [15]. Сравнение двух процессов: светозависимых поглощения протонов и углекислого газа, позволяет выявить их сходство. Изолированные хлоропласты при освещении слабозабуференной суспензии поглощают 200–500 нмоль H^+ /мг хл. в зависимости от природы акцептора электронов [14]. Ранее неоднократно отмечалось, что количество буферных групп белков тилакоидов, способных связывать протоны в физиологическом диапазоне рН, невелико, значительно меньше наблюдаемой величины ΔH^+ [14]. В этой связи возможная роль светозависимого поглощения бикарбоната тилакоидами состоит в повышении буферной емкости системы, необходимом для стабилизации уровня трансмембранного протонного градиента в условиях активного электронного транспорта и освобождения внутри тилакоидов большого количества протонов. Приведенные в настоящей работе результаты показывают, что ΔH^+ и поглощение CO_2 при освещении являются связанными процессами. Однако необходимо отметить, что экспериментальная регистрация поглощения CO_2 , вызванная энергизацией хлоропластов, возможна только в очень плотных суспензиях в отличие от ΔH^+ , который фиксируется в растворах с низкой буферной емкостью и маскируется в растворах с высоким содержанием буферных соединений. Предполагая, что H^+ и CO_2 поглощаются одновременно в параллельных процессах, можно считать, что CO_2 диффундирует при этом из газовой фазы, компенсируя изменения концентрации растворимых форм углекислоты в суспензии. Действительно, согласно полученным данным, светоиндуцированное поглощение CO_2 обнаруживается только в условиях низкой “ CO_2 -емкости”. Процесс контролируется активностью КА. Таким образом, функциональная роль обнаруженного нами светозависимого поглощения CO_2 (бикарбоната) состоит в участии в формировании энергизованного состояния тилакоидных мембран и стабилизации уровня рН через увеличение мембранной буферной емкости. Этот вывод не согласуется с выдвинутым ранее в ряде работ [4, 11] предположением об участии КА тилакоидов в светозависимом пополнении фонда стромального CO_2 , обеспечивающего работу рибулозобисфосфат-карбоксилазы/оксидазы.

1. *Stemler A. J.* The binding of bicarbonate ions to washed chloroplast grana // *Biochim. et biophys. acta.* – 1977. – **460**, No 4. – P. 511–522.
2. *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**, No 7. – P. 6060–6065.
3. *Klimov V. V., Baranov S. V.* Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of Photosystem II // *Biochim. et biophys. acta.* – 2001. – **1503**, No 2. – P. 187–196.

4. *Moskvin O. V., Shutova T. V., Khristin M. S. et al.* Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids // *Photosynth. Res.* – 2004. – **79**, No 1. – P. 93–100.
5. *Lu Y.-K., Theg S. M., Stemler A. J.* Carbonic anhydrase activity of the photosystem II OEC33 protein from pea // *Plant and Cell Physiol.* – 2005. – **46**, No 7. – P. 1944. – 1953.
6. *Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Христин М. С., Иванов Б. Н.* Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран // *Биохимия.* – 2006. – **71**, № 6. – С. 651–659.
7. *Svenson E. R., Maren T. H.* A quantitative analysis of CO₂ transport at rest and during maximal exercise // *Respirat. et Physiol.* – 1978. – **35**, No 1. – P. 129–159.
8. *Villarejo A., Shutova T., Moskvin O. et al.* Photosystem II-Associated Carbonic Anhydrase Regulates the Efficiency of Photosynthetic Oxygen Evolution // *EMBO J.* – 2002. – **21**, No 4. – P. 1930. – 1938.
9. *Virgin I., Styring S., Andersson B.* Photosystem II disorganization and manganese release after photoinhibition of isolated spinach thylakoid membranes // *FEBS Lett.* – 1988. – **233**, No 3. – P. 408–412.
10. *Shutova T., Kenneweg H., Buchta J. et al.* The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal // *Ibid.* – 2008. – **27**, No 5. – P. 782–791.
11. *Raven J. A.* CO₂-Concentrating Mechanism: A Direct Role for Thylakoid Lumen Acidification? // *Plant and Cell Environ.* – 1997. – **20**, No 2. – P. 147–154.
12. *Walker D. A.* Preparation of higher plant chloroplasts // *Meth. Enzymol.* – 1980. – **69**. – P. 94–104.
13. *Эдвардс Дж., Уокер Д.* Фотосинтез С3- и С4-растений: механизмы и регуляция. – Москва, 1986. – 590 с.
14. *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**, No 3. – P. 403–407.
15. *Kramer D. M., Sacksteder C. A., Cruz J. A.* How acidic is the lumen? // *Photosynth. Res.* – 1999. – **60**, No 2. – P. 151–163.

*Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев
Нежинский государственный университет
им. Николая Гоголя*

Поступило в редакцию 27.01.2009

A.V. Polishchuk, V.V. Podorvanov, A.V. Seminikhin, E.K. Zolotareva

Light-dependent CO₂ uptake by isolated pea chloroplasts

Illumination of isolated pea chloroplasts induces the CO₂ uptake from air phase over suspension. The effect was registered by infrared gas analysis and corresponded to the uptake of up to 320 nmol CO₂/mg chlorophyll. The process started immediately after the onset of illumination, developed during 15–20 sec, and completely reversed for the same time after the switching light off. The effect correlates with the well-known light-induced proton uptake by isolated chloroplasts. The value of light-induced CO₂ uptake depends on the carbonic anhydrase (CA) activity and is inhibited by CA inhibitors – ethoxazolamide (EZ) and hydrophilic acetazolamide (AZ). The results suggest that the amount of bound bicarbonate in thylakoids and their photochemical activity are controlled by the activity of carbonic anhydrase which takes part in the formation of an energized state of membrane.