



УДК 577.352.3

© 2007

О. В. Поліщук, В. В. Подорванов, С. К. Ситник

Вплив іонів цинку на перенесення протонів в ізольованих хлоропластах шпинату

(Представлено академіком НАН України К. М. Ситником)

It is shown that the light-dependent proton uptake by a suspension of isolated chloroplasts is completely inhibited in the presence of 100–200 μM Zn^{2+} ions at the 5 $\text{Zn}^{2+}/\text{Chl}$ ratio. At the same time, in the presence of 30–200 μM ZnSO_4 , the rate of photosynthetic oxygen uptake reduced no more than by 20–30% from control and up to 50% Δ pH control value remained. The results allow us to suppose that, in the presence of zinc ions, 1) electron transport in PS2 is inhibited at the level of secondary quinone acceptor, Q_B , photoreduction of which is accompanied by proton uptake from external medium; 2) an alternative pathway of electron transfer to terminal acceptor is activated providing the water photooxidation and the transmembrane proton gradient formation.

Фотосинтетичний електронний транспорт спряжений з перенесенням протона із зовнішньої водної фази всередину тилакоїду — процесом, який, разом з фоторозкладанням води, забезпечує закислення внутрішньотилакоїдного простору (люмена) і формування протонного градієнта [1]. Трансмембранне перенесення протонів здійснюється через двоелектронне, двопротонне відновлення зв'язаного хінону (вторинного хінонового акцептора) до хінолу $Q_B\text{H}_2$ [2] і є двостадійним процесом, в якому швидке протонування передує лімітуючому швидкості електронному транспорту [3]. Структура протонотранслюючих шляхів в області локалізації Q_B у фотосистемі 2 (ФС2) вищих рослин невідома. Проте є обширна інформація про організацію перенесення протонів із зовнішньої фази до вторинного хінону в бактерійних реакційних центрах (РЦ) *Rhodobacter sphaeroides*, отримана методами диференціальної спектроскопії, сайт-спрямованого мутагенезу, рентгеноструктурним аналізом та ін. [4–6]. Зокрема, показано, що в результаті стехіометричного зв'язування іона Zn^{2+} з бактерійним РЦ швидкість протонного перенесення до відновленого Q_B^- знижується в 100 разів. Це дозволило припустити, що перенесення обох протонів за нормальних умов здійснюється за єдиним шляхом, який інгібується цинком [3]. Вплив цинку на реакції протонного транспорту у фотосинтезуючих мембранах вищих рослин до теперішнього часу не вивчався. У роботі [7] було встановлено, що ZnSO_4 в концентрації 2 мМ не впливає на

активність ФС1, але інгібує фотохімічні реакції ФС2 — фотовідновлення дихлорфеноліндофенолу, виділення O_2 і флуоресценцію хлорофілу *a*.

Метою проведеного нами дослідження було вивчення ефектів Zn^{2+} на реакції протонного обміну в ізольованих хлоропластах гороху.

Хлоропласти класу “В” ізолювали з листя 15-добових проростків гороху як описано раніше [8], а потім суспендували в середовищі, що містило 200 мМ сорбітолу, 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ $NaCl$, 10 мМ KCl , 10 мМ трицин- $NaOH$ (рН 8,0). Концентрацію хлорофілу в суспензії ізольованих хлоропластів визначали спектрофотометрично за методикою Арнона [9], швидкість перенесення електронів від води до метилвіологену (0,1 мМ) — амперометрично за поглинанням кисню за допомогою закритого платинового електрода типу Кларка. Реакційне середовище для вивчення світлоіндукованого поглинання протонів (ΔH^+ , мкмоль H^+ /мг хл.) містило 200 мМ сорбітолу, 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ $NaCl$, 10 мМ KCl , 0,5 мМ трицину- $NaOH$, 1 мМ MES і 0,5 мМ HEPES, 0,1 мМ метилвіологену (МВ) і хлоропласти (0,1 мг хл./мл). Суспензію освітлювали білим світлом галогенової лампи КГМ-250 насичуючої інтенсивності протягом 2 хв. Кількість протонів, які поглинулися в реакції, розраховували за світлоіндукованою зміною рН і буферною ємністю реакційного середовища. Буферну ємність визначали, титруючи суспензію невеликими (0,5 мкмоль) кількостями 10 мМ їдкового натру.

Величину трансмембранного ΔpH у хлоропластах визначали флуоресцентним методом [10] на флуориметрі ХЕ-РАМ (“Walz”, Німеччина) за допомогою ліпофільної рН-залежної флуоресцентної мітки 9-аміноакридину (9-АА). Величину трансмембранного світлоіндукованого ΔpH визначали за ступенем гасіння флуоресценції 9-АА в освітленій суспензії хлоропластів. Концентрація 9-АА становила 2 мкМ. Величину ΔpH розраховували, виходячи з того, що внутрішній об’єм тилакоїдів не змінюється за умов наших експериментів і становить 11 мкл/моль [10].

Результати оброблено статистично і представлено у вигляді $M \pm m$.

Світлозалежний транспорт електронів у фотосинтетичному електрон-транспортному ланцюзі хлоропластів супроводжується трансмембранним перенесенням протонів і призводить до формування різниці електрохімічних потенціалів іонів водню [11] на мембранах тилакоїдів. Із зовнішньої сторони тилакоїдної мембрани протони поглинаються в реакції відновлення вторинного хінонового акцептора Q_B , а всередині тилакоїду утворюються при фотоокисленні води і окисленні пластогідрокінону комплексом цитохромів b_6/f . Усередині тилакоїду протони зв’язуються мембранними буферними групами, концентрація яких (внутрішньотилакоїдна буферна ємність) визначає величину світлоіндукованого поглинання протонів (ΔH^+) [11]. Величину ΔH^+ визначають за світлозалежним залуженням слабкозабуференої суспензії хлоропластів [12, рис. 1]. При ввімкненні світла рН реакційного середовища зростає до деякого стаціонарного рівня, при якому поглинання протонів хлоропластами зрівноважене їх витоком назовні. Після вимкнення світла протони виходять назовні в ході деенергізації мембран, і рН зовнішнього середовища знижується до початкового значення. Величина ΔH^+ залежить від ступеня цілісності органел. Реагенти та інші чинники, що збільшують протонну проникність мембран, також як і інгібітори електронного транспорту, пригнічують світлозалежне поглинання протонів.

Результати дослідження впливу іонів цинку на світлоіндуковане залуження суспензії тилакоїдів (рис. 1) показали, що в присутності 100 мкМ $ZnSO_4$ формування ΔH^+ пригнічувалося майже повністю. Світлоіндуковане поглинання протонів разом з фоторозкладанням води забезпечує формування трансмембранного градієнта протонів (ΔpH). Можливий

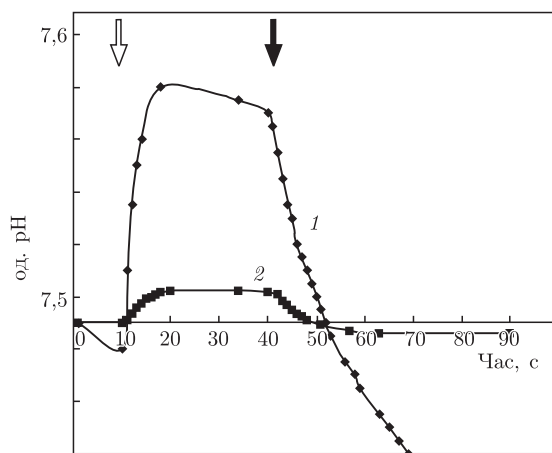


Рис. 1. Світлоіндуковане поглинання протонів: 1 — контроль; 2 — у присутності 100 мкМ $ZnSO_4$. Стрілками вказано моменти ввімкнення і вимкнення світла. Умови експерименту та склад розчинів описано в тексті

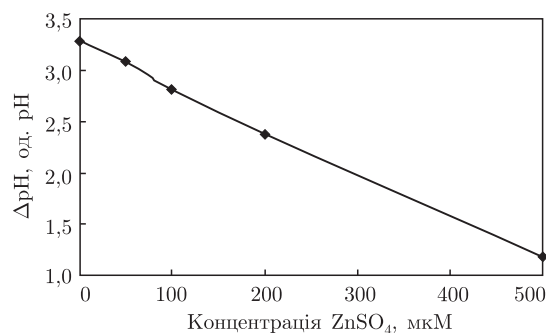


Рис. 2. Вплив іонів цинку на величину світлоіндукованого трансмембранного протонного градієнта. Умови експерименту та склад розчинів описано в тексті

вплив іонів цинку на величину ΔpH оцінювався за світлозалежним гасінням флуоресценції ліпофільної мітки 9-АА в суспензії хлоропластів (рис. 2). Виявлено, що, хоча додавання Zn^{2+} призводило до деякого зниження величини ΔpH , у присутності 100–500 мкМ $ZnSO_4$ в тилакоїдах зберігалася значна різниця концентрацій іонів водню між зовнішньою і внутрішньою фазами. Оскільки поглинання протонів із зовнішньої фази було повністю пригнічено іонами цинку, градієнт концентрацій протонів підтримувався, імовірно, за рахунок реакції фотоокислення води, в процесі якої протони вивільняються в люмен тилакоїдів. Тому можна припустити, що функція фотоокислення води зберігається в тилакоїдах у присутності іонів цинку в концентраціях, що викликають інгібування ΔH^+ . Згідно з даними роботи [7], електронний транспорт у тилакоїдах інгібувався, якщо в середовищі були присутні іони Zn^{2+} в концентрації 2 мМ, тоді як у наших експериментах протонне перенесення пригнічувалося за значно менших концентрацій. Крім того, необхідно згадати, що Тріпаси і Моханті [7] визначали фотохімічну активність хлоропластів у присутності роз'єднувача (2 мМ NH_4Cl), тобто в умовах, що пригнічують світлоіндуковане протонне перенесення. Ми провели дослідження впливу зростаючих концентрацій Zn^{2+} на фотопоглинання кисню в реакції $H_2O - MB$ як в контрольних, так і в роз'єднаних тилакоїдних мембранах, використовуючи як роз'єднувач 0,5 мкМ грамідин. Повноту роз'єднання контролювали за усуненням світлозалежного гасіння флуоресценції 9-АА в суспензії хлоропластів (дані не наведено).

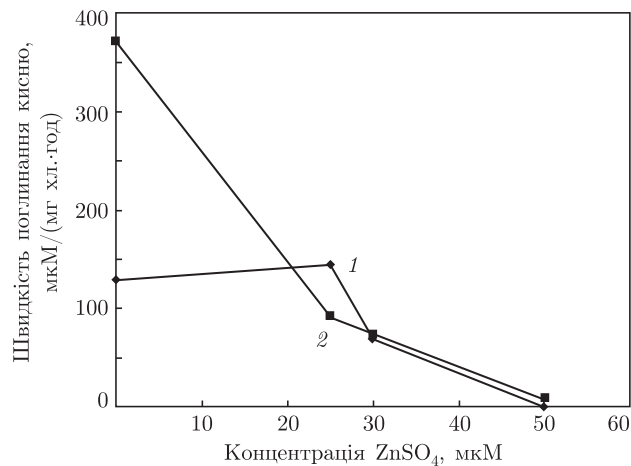


Рис. 3. Вплив іонів цинку на світлоіндуковане поглинання кисню в реакції $H_2O - MB$: 1 — контроль; 2 — у присутності 1 мкМ грамцидину. Умови експерименту та склад розчинів описано в тексті

Виявлено, що в нероз'єднаних тилакоїдах іони цинку в концентрації 50 мкМ інгібували цю фотохімічну реакцію майже повністю (рис. 3). У присутності роз'єднувача швидкість перенесення електронів у хлоропластах значно зростала. За цих умов дія роз'єднувача повністю нівелювалася вже за концентрації $ZnSO_4$ 30 мкМ.

Таким чином, результати роботи показують, що при співвідношенні Zn/Chl 5 іони цинку пригнічують світлозалежне поглинання протонів ізольованими хлоропластами. Якщо припускати, що центр зв'язування іонів цинку у ФС2 розташований поблизу вторинного хінонового акцептора електронів, Q_B , як і в бактерійному РЦ, можна вважати, що поглинання протонів із зовнішньої фази тилакоїдів інгібується саме на цій ділянці.

Оскільки на тилакоїдних мембранах у присутності 10–200 мкМ Zn^{2+} зберігалася до 70% первинної величини трансмембранного протонного градієнта, можна вважати, що реакція фоторозкладання води, за рахунок якої протони поступають всередину тилакоїду, за цих умов не пригнічена.

Результати роботи показали також, що в присутності роз'єднувачів інгібуюча дія іонів цинку на фотосинтетичний електронний транспорт (поглинання кисню хлоропластами) значно зростала. З попередніх робіт нашої групи [13, 14] можна зробити висновок, що за рН 8 у контрольних (нероз'єднаних) хлоропластах перенесення електронів на МВ значною мірою відбувається з одного з відновлених компонентів ФС2. Ця реакція контролюється рівнем ΔpH : що вище ΔpH , то нижче рН в люмені і більший внесок цього процесу в загальну швидкість відновлення акцептора. Якщо сайт дії іонів цинку знаходиться після акцепторного сайту ФС2, тоді певна частина електронного транспорту не повинна інгібуватися, доки зберігається значна величина ΔpH (див. рис. 2). За цих самих умов у роз'єднаних хлоропластах ($\Delta pH \approx 0$) відновлення екзогенного акцептора відбувається виключно у ФС1 [13] і має повністю блокуватися іонами цинку. Це може пояснити більш виражену дію іонів цинку на електронний транспорт у роз'єднаних хлоропластах.

Крім того, в нероз'єднаних хлоропластах швидкість електронного транспорту лімітована повільним окисненням пластохінолу. У цьому випадку для того, щоб проявилась інгібуюча дія іонів цинку, потрібно, щоб реакція на тій ділянці, яку вони інгібують, стала ще більш повільною і, отже, лімітуючою. Для цього потрібна вища концентрація іонів цинку.

З іншого боку, висока чутливість реакції поглинання кисню до іонів цинку в наших експериментах звертає на себе увагу і потребує подальшого обговорення.

Слід зазначити, що в літературі формування трансмембранного протонного градієнта на тилакоїдних мембранах звичайно пов'язують з перенесенням протонів із зовнішньої фази в люмен тилакоїдів [15]. У даній роботі вперше показано можливість збереження ΔpH за умов пригнічення протонного поглинання із зовнішньої фази хлоропластів. Таким чином, внесок кожного з двох фотохімічних процесів, відповідальних за формування трансмембранного протонного градієнта, у присутності іонів цинку може бути вичленувано і вивчено в модельних експериментах. Ситуація, коли існує значний рівень ΔpH , а формування ΔH повністю заблоковано, може підтверджувати припущення про існування сайту альтернативного відновлення МВ у ФС2. За цих умов відбувається фотоокислення води, але не відновлюється пластохінон. Оскільки в присутності 500 мкМ Zn^{2+} у перші моменти освітлення ΔpH був ще відсутній ($pH_i \approx 8,0$), а альтернативний транспорт електронів вже відбувався, то очевидно, що такий шлях електронного транспорту в даному випадку індукується не зниженим значенням рН, як показано в [13], а зв'язуванням металу у ФС2. Слід зазначити, що ці міркування щодо альтернативного електронного транспорту можуть мати сенс лише в тому разі, якщо зниження величини ΔH^+ справді викликане інгібуванням реакції відновлення вторинного хінону Q_B .

Особливості протонного транспорту у ФС2 вищих рослин, на відміну від бактерійних фотосистем, не відомі. При вивченні протонного транспорту в ізольованих РЦ *Rb. sphaeroides*, *Rb. capsulatus* і *Rps. viridis* було показано, що лімітуючою швидкістю стадією у присутності Zn^{2+} або деяких інших двовалентних іонів є перенесення протонів з водної фази до вторинного хінону Q_B , в якому беруть участь амінокислотні залишки, що належать різним субодинаціям РЦ [4]. Передбачається, що ці залишки через ряд можливих протонопровідних шляхів зв'язують внутрішній кластер карбоксильних груп із зовнішньою поверхнею, а іони Zn^{2+} або інші іони індують переорієнтацію бічних ланцюгів, що розповсюджується за принципом "доміно" уздовж шляху протонного транспорту [3]. Результати даної роботи свідчать про інгібуючу дію іонів цинку на процес протонного поглинання ізольованими хлоропластами і дозволяють припускати, що механізм цієї дії подібний для ФС2 і бактерійного реакційного центру.

1. Merchant S. The Light Reactions: A Guide to Recent Acquisitions for the Picture Gallery // Eur. J. Biochem. – 1972. – **25**, No 1. – P. 64–70.
2. Feher G., Allen J. P., Okamura M. Y., Rees D. C. Structure and function of bacterial photosynthetic reaction centres // Nature. – 1989. – **339**. – P. 111–116.
3. Paddock M. L., Graige M. S., Feher G., Okamura M. Y. Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: Inhibition of proton transfer by binding of Zn^{2+} or Cd^{2+} // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1999. – **96**, No 11. – P. 6183–6188.
4. Ådelroth P., Paddock M. L., Sagle L. B. et al. Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: both protons associated with reduction of Q_B to Q_BH_2 share a common entry point // Ibid. – 2000. – **97**. – P. 13086–13091.
5. Baciou L., Michel H. Interruption of the water chain in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* reduces the rates of the proton uptake and of the second electron transfer to Q_B // Biochemistry. – 1995. – **34**. – P. 7967–7972.
6. Takahashi E., Wraight C. A. Potentiation of proton transfer function by electrostatic interactions in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*: First results from site-directed mutation of the H subunit // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**. – P. 2640–2645.
7. Tripathy B. C., Mohanty P. Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts // Plant Physiol. – 1980. – **66**. – P. 1174–1178.

8. Золотарева Е. К., Терещенко А. Ф., Довбыш Е. Ф., Онойко Е. Б. Влияние спиртов на ингибирование N,N'-дициклогексилкарбодимидом фотофосфорилирования и электронного транспорта в хлоропластах гороха // Биохимия. – 1997. – **62**. – С. 631–635.
9. Arnon D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in Beta vulgaris // Plant Physiol. – 1949. – **24**, No 1. – P. 1–15.
10. Mills J. D. Photophosphorylation // Photosynthesis: energy transduction a plastical approach / Eds. M. Hipkins, N. Bares. – Oxford, Washington: IRL Pres, 1986. – Vol. 6. – P. 156–167.
11. 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.
12. Ho Y.-K., Liu C. J., Saunders D. R., Wang J. H. Light dependence of the decay of the proton gradient in broken chloroplasts // Biochim. et biophys. acta. – 1979. – **547**, No 1. – P. 149–160.
13. Поліщук О. В., Подорванов В. В., Золотарьова О. К. рН-залежна регуляція фотосинтетичного виділення кисню ізольованими хлоропластами шпинату // Доп. НАН України. – 2006. – № 3. – С. 167–172.
14. Zolotareva E. K., Onoiko E. B., Podorvanov V. V. Effects of adenine nucleotides on the accessibility of the acceptor site of Photosystem II Photosynthesis: Mechanisms and Effects // Ed. J. Garab. – London: Kluwer Acad. Publishers, 1998. – Vol. 3. – P. 1747–1750.
15. 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 // Биол. мембраны. – 1985. – **2**, № 6. – С. 776–785.

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ
Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 20.12.2006