

КОФАКТОРНА ТА СТРУКТУРНА РОЛЬ CO₂ У ХЛОРОПЛАСТАХ

Semenikhin A.V., Vodka M.V., Polishchuk O.V. **Cofactor and structural role of CO₂ in chloroplasts.** Ukr. Bot. J., 2016, 73(3): 290–397.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine
2, Tereshchenkivska Str., Kyiv, 01004, Ukraine

Abstract. The rate of photochemical reactions in chloroplasts of higher plants depends on the presence of inorganic carbon (C_i) – carbon dioxide and/or anions of carbonic acid in the medium. This relationship is known as the «bicarbonate effect» studied at the level of the intact leaf, isolated thylakoids, photosystems and reaction centers (RC) and is associated with the presence in the photosystem II (PSII) of tightly bound HCO₃⁻. The total amount of bound inorganic carbon is about 1 micromoles per mg of chlorophyll, but only one or two tightly bound to the RC molecules control PSII activity. The thylakoid membranes of chloroplasts also contain less tightly bound pool of bicarbonate (with a concentration close to the concentration of chlorophyll), which can be removed without significant consequences for the activity of PSII. The review summarizes data on the cofactor role of the tightly bound inorganic carbon, the removal of which completely inhibits the photochemical reactions in chloroplasts. It is assumed that weakly bound bicarbonate is involved in the proton transport and the regulation of phosphorylation. Interconversion of the C_i forms occurs in chloroplasts with participation of several carbonic anhydrases (CA). The suppression of their activity leads to a slowing of photochemical reactions and causes significant changes in the ultrastructural organization of the thylakoid membranes. These data indicate a structural role of C_i in the chloroplasts.

Key words: carbon dioxide, bicarbonate, chloroplast, thylakoid membrane, photosynthesis, ultrastructure, carbonic anhydrase

Вступ

Кисневий фотосинтез у ціанобактеріях, водоростях і вищих рослинах сприяє відновленню атмосферного CO₂ до рівня багатих на енергію вуглеводів. Необхідні для цього електрони утворюються в нециклічному, світло-залежному процесі під час окиснення води, яка розкладається на молекулярний кисень (O₂) і протони. Ця реакція каталізується у водоокислювальному комплексі (ВОК) фотосистеми II (ФСІІ) тетра-марганцево-кальцієвим кластером (Mn₄CaO₅), з'єднаним пента-μ-оксо-містками (Yano et al., 2006). Первинний акт фотосинтетичної фіксації атмосферного вуглецю та біосинтезу органічної речовини здійснюється в реакції карбоксилювання, що каталізується рибулозо-1,5-бісфосфат карбоксилазою (РБФК), єдиним субстратом якої тут виступає CO₂ (Kiriziy et al., 2014). Процес відбувається в так званій темновій фазі фотосинтезу, тобто не залежить від освітлення. Разом з тим рівень CO₂ контролює і «світлову» фазу фотосинтезу, беручи участь у регуляції фотосинтетичного електронного транспорту. Припускається, що зниження рН у люмені тилакоїдів на

світлі може відігравати ключову роль у зміщенні рівноваги HCO₃⁻ → CO₂ та забезпеченні РБФК субстратом карбоксилювання. Ці процеси залежать від активності карбоангідраз (КА), декілька форм яких знайдені в хлоропластах (Ignatova et al., 2006; Semenikhin, Zolotareva, 2015). Ще з праць Н.А. Проніної (Pronina, Semenenko, 1991) та Дж. Равена (Raven, 1997), активність тилакоїдних КА, задіяних у конвертації бікарбонату в CO₂ з використанням протонів, що утворюються під час фоторозкладу води, розглядається як механізм регуляторного зв'язку первинних процесів фотосинтезу й асиміляції вуглецю у циклі Кальвіна. Останніми роками отримано нові факти, які свідчать на користь цієї концепції (Shevela et al., 2014).

Низька концентрація вуглекислоти в атмосфері є одним із глобальних, постійно діючих факторів, що обмежують фотосинтетичну продуктивність рослин. Проте завдяки формуванню складних регуляторних механізмів рослини здатні адаптуватися до цього чинника та підвищувати ефективність утилізації CO₂ шляхом його концентрування в клітинах і центрах карбоксилювання. В цьому огляді наведено відомості щодо регуляторної ролі форм

неорганічного вуглецю у функціонуванні фотосинтетичного апарату рослини.

Мембранозв'язаний бікарбонат як кофактор фотосинтетичного електронного транспорту

Залежність швидкості перенесення електронів від наявності в середовищі вуглекислого газу – бікарбонатний ефект – виявлено ще в 1958 р. О. Варбургом і Г. Кріпалу (Warburg et al., 1958). Бікарбонатним ефектом називають інгібування активності ФСII у реакції фотоокиснення води в разі вилучення з реакційного середовища CO_2 і бікарбонату та відновлення швидкості фотосинтетичного виділення кисню після додавання бікарбонату. Цей ефект детально вивчений А. Стемлером і С. Говінджі (Stemler, Govindjee, 1973, 1974; Shevela et al., 2012) на рівні інтактних листків, ізольованих тилакоїдів, фотосистем і реакційних центрів. Навіть в ізольованих фрагментах фотосинтезуючих мембран, не здатних до фотосинтетичної асиміляції CO_2 , видалення C_n із середовища спричинює уповільнення електронного транспорту, який відновлюється з додаванням бікарбонату (Stemler, Govindjee, 1973; Blubaugh, Govindjee, 1988; Klimov et al., 1997; Stemler, 2002). Завдяки багатьом дослідженням (Van Rensen, 2002; Sedoud et al., 2011; Shevela et al., 2012) встановлено, що інгібування перенесення електронів у фотосистемі II з видаленням CO_2 із цілих клітин зелених рослин або з суспензії хлоропластів відбувається на ділянці між первинним і вторинним пластохіноновими акцепторами електрона (Q_A і Q_B) (рисунк). Вилучення бікарбонату з реакційного середовища досягалося тривалим продуванням суспензії хлоропластів інертним газом, повітрям, що не містить CO_2 , або ж інкубацією мембран за наявності формиату або інших іонів – антагоністів бікарбонату. Виявлений ефект подібний до дії відомих гербіцидів – інгібіторів перенесення електрона у фотосистемі 2 – діурону й атразину (Stemler, Govindjee, 1974). Відновлення електронного транспорту з додаванням бікарбонату до хлоропластів, звільнених від CO_2 , було високоспецифічним, тобто характерним тільки для бікарбонату: жодні інші аніони не зумовлювали подібного ефекту (Klimov, Baranov, 2001). Загальна кількість зв'язаного з тилакоїдною мембраною бікарбонату становить близько 1 мкмоль/ мг хл, і тільки одна (або дві) міцно зв'язані з реакційним центром молекули контролюють активність ФСII, тоді як пул слабше зв'язаного бікарбонату (з концентрацією,

близькою до концентрації хлорофілу) можна видалити без помітних наслідків для активності ФСII. Припускається, що функціональна роль пулу слабозв'язаного з тилакоїдами бікарбонату полягає у забезпеченні перенесення протонів від центрів їх утворення у ФСII до АТФ-синтази (Podorvanov et al., 2005; Onoyko et al., 2010; Zolotareva, 2010; Semenikhin, Zolotarova, 2014).

Центри міцного зв'язування бікарбонату: акцепторний бік ФСII

О. Варбург, на відміну від загальноприйнятої думки, вважав, що CO_2 , а не вода, є джерелом кисню у процесі фотосинтезу (Warburg et al., 1958). Тому на початковому етапі досліджень бікарбонатний ефект пов'язували з донорним боком ФСII. Згодом було охарактеризовано центри зв'язування бікарбонату на акцепторному боці ФСII і визначено їхню функціональну роль. Показано (Van Rensen, 2002), що після видалення CO_2 з суспензії тилакоїдів перша кінетична фаза кривої індукції флуоресценції хлорофілу пришвидшується, як і з додаванням гербіцидів, які блокують перенесення електронів на акцепторній стороні ФСII. Після додавання бікарбонату характеристики кривої флуоресценції відновлювалися. Висновок про те, що міцно зв'язаний бікарбонат контролює перенесення електронів на акцепторному боці ФСII, підтверджений у серії експериментів із використанням препаратів ФСII з модифікованими окремими амінокислотами, або ж ФСII, ізольованих з мутантних рослин, стійких до гербіцидів, які витісняють Q_B , (Van Rensen, 2002; Shevela et al., 2012). Вимірювання кінетики спаду флуоресценції Chl-a у субмілісекундному та мілісекундному часових діапазонах після активації електронного транспорту одиничним спалахом допомогло визначити місце зв'язування бікарбонату – на акцепторній ділянці ФСII між Q_A і Q_B (Shevela et al., 2012) (рис.1). На підставі того, що в тилакоїдах, позбавлених CO_2 , спад флуоресценції значно прискорювався після другого або третього спалаху, зроблено висновок, що за наявності формиату (і, отже, за відсутності бікарбонату) пригнічується приєднання протонів до аніона Q_B^{2-} , протонування якого відбувається після другого, а не першого спалаху (Van Rensen, 2002).

В. Вермаас і А. Резерфорд (Vermaas, Rutherford, 1984) показали: з додаванням формиату до тилакоїдів амплітуда ЕПР сигналу $g = 1,82$, що належить до залізо-семіхінонового комплексу $Q_A\text{-Fe}^{2+}$, збіль-

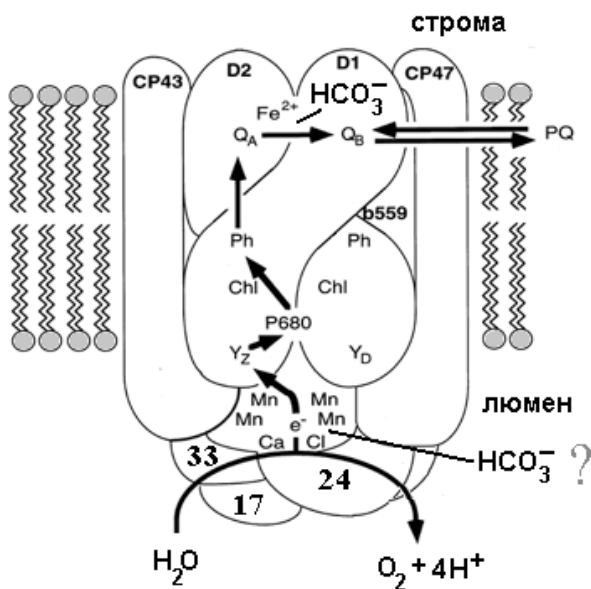


Схема будови фотосистеми II із зазначенням місць можливої локалізації зв'язаного бікарбонату. P680 – димер хлорофілу, первинний донор електронів; Ph – феофітин; Q_A – зв'язаний пластохінон, первинний хіноновий акцептор; Q_B – вторинний хіноновий акцептор; D1 і D2, b559 – білки реакційного центру; 33, 17 і 24 – зовнішні білки, що окиснюють воду Mn-вмісного комплексу з молекулярною масою 33, 17 і 24 кДа, відповідно; CP43, CP47 – антенні хлорофілвмісні білки ФСII молекулярною масою 43 і 47, відповідно.

Scheme of the structure of photosystem II indicating the possible location sites of linked bicarbonate. P680 – chlorophyll dimer, the primary electron donor; Ph – pheophytin; Q_A – bound plastoquinone, primary quinone acceptor; Q_B – secondary quinone acceptor; D1 and D2, b559 – reaction center proteins; 33, 17 and 24 – foreign proteins that oxidize water, Mn-containing complex with a molecular weight of 33, 17 and 24 kDa, respectively; CP43, CP47 – antenna proteins containing chlorophyll of FSII with molecular weights of 43 and 47, respectively.

шується вдсятеро. Ефект заміщення бікарбонату на форміат детально охарактеризовано за допомогою ЕПР-спектрів комплексу Q_A -Fe- Q_B з видаленням і додаванням бікарбонату (Bowden et al., 1991; Hermes et al., 2011). За наявності форміату істотно змінювалися параметри месбауерівських спектрів негемового Fe, які поверталися до первісного стану після додавання бікарбонату. Це підтверджує ключову роль Fe у зв'язуванні форміату, що заміщує бікарбонат (Semin et al., 1990). Методом інфрачервоної Фур'є-спектроскопії з використанням ^{13}C -міченого бікарбонату встановлено, що HCO_3^- є бідентантним лігандом негемового заліза (Shevela

et al., 2012). Визначаючи вплив низки карбоксилатних аніонів на характеристики ЕПР-сигналів, пов'язаних із негемовим залізом, В. Петролеас зі співавторами (Petrouleas et al., 1994) показали, що гліколат, гліоксилат й оксалат конкурують за зв'язування з залізом з NO, форміатом і бікарбонатом. Аніони різною мірою знижували швидкість перенесення електронів від Q_A до Q_B , яку оцінювали за швидкістю релаксації флуоресценції хлорофілу ізольованих хлоропластів у субмікромілісекундному та мілісекундному діапазонах після одиночного спалаху. Гліколат виявився найсильнішим інгібітором електронного транспорту у ФСII, гліоксалат – меншою мірою, а оксалат слабо інгібував перенесення електронів на цій ділянці. Таким чином, з'ясувалося, що багато аніонів здатні грати роль дисоціюючих лігандів негемового заліза на акцепторному боці ФСII.

Останнім часом також показано, що безпосереднім місцем зв'язування (лігандування) іонів у фотосистемі 2 можна вважати катіони двовалентного заліза, що функціонує між акцепторами електрона Q_A і Q_B (рис. 1). Іони Fe^{2+} пов'язані з реакційним центром фотосистеми 2, і їхня роль полягає у сприянні перенесення електрона від відновленого в результаті фотохімічної реакції Q_A до Q_B . Оскільки іони HCO_3^- , які зв'язуються Fe^{2+} , легко вступають у реакції обміну з іонами H^+ , необхідними для протонування двічі відновленого Q_B (Hermes et al., 2011; Müh et al., 2012), то передбачається, що їхня роль полягає в забезпеченні такого протонування.

Центри зв'язування бікарбонату: донорний бік ФСII

Сьогодні локалізація міцно зв'язаного бікарбонату та його функціонально важлива кофакторна роль на акцепторному боці ФСII не викликають сумніву. Предметом гострої дискусії залишається участь бікарбонату в реакціях, пов'язаних із системою фотоокиснення води, і його роль у забезпеченні перенесення електронів на донорних ділянках фотосистеми II. Низка фактів свідчить про залежність процесу фотосинтетичного розкладання води від рівня CO_2 . Водночас, на відміну від центрів міцного зв'язування HCO_3^- на акцепторній ділянці ФСII, зв'язування бікарбонату на донорному боці поблизу реакційних центрів водоокиснювального комплексу не може бути занадто міцним, оскільки, як вважають С. Коройдов і співавтори (Koroidov et al., 2014), це виключає можливість регулювання ак-

тивності комплексу в разі варіювання концентрації C_n .

Передбачувану роль бікарбонату як невід'ємного кофактора ВОК перевірено в дослідах щодо його впливу на кінетику та вихід світлоіндукованого формування функціонального марганцевого ядра у ВОК, звільненого від Mn^{2+} , Ca^{2+} і СГ. Знайдено два сайти зв'язування бікарбонату, які стимулювали фотоактивацію, прискорюючи формування та пригнічуючи розпад функціонального комплексу відповідно. Сайт із високою спорідненістю до бікарбонату ($K_D \leq 10$ мкМ) стимулював швидкість відновлення центрів виділення O_2^- і зменшував час, необхідний для формування першого інтермедіату ВОК. Ця стимуляція посилює зв'язування першого катіона Mn^{2+} і відбувається тільки за концентрації Mn^{2+} на рівні або нижче стехіометричних вимог до окиснення води (≤ 4 Мн/ФСІІ) та зникає в разі співвідношення Мн/ФСІІ, вищого за 4. Відсутність ефекту від доданого бікарбонату на кінетику фотоактивації за насичених концентрацій Mn^{2+} і Ca^{2+} може пояснюватися наявністю в атмосфері бікарбонату, розчиненого в середовищі (приблизно 4 мкМ, рН = 6,0), що достатньо для фотоактивації. Другий сайт бікарбонату також стимулює швидкість утворення ВОК, але має значно нижчу спорідненість ($K_D \approx 1$ мМ) і стає доступним для спостереження тільки за низьких концентрацій Ca^{2+} . Причиною стимулювання в цьому випадку, очевидно, є утворення комплексів із вільним Ca^{2+} , що знижує його активність у конкуренції з Mn^{2+} під час формування ВОК. Бікарбонат жодним чином не впливав на кальцієвий сайт, відповідальний за лімітувальну темнову стадію фотоактивації зв'язування Ca^{2+} з ВОК (Baranov et al., 2000).

Передбачається, що на донорному боці ФСІІ з участю бікарбонату існують спеціальні шляхи або канали для спрямування протонів до протонного каналу АТФ-синтази від розщеплення води у Mn_4CaO_5 кластері (Koroidov et al., 2014).

Роль слабозв'язаного бікарбонату в транспорті протонів у тилакоїдних мембранах

На відміну від міцнозв'язаного бікарбонату, функціональну роль пулу слабозв'язаного HCO_3^- вивчено недостатньо. За гіпотезою, запропонованою А. Віларео зі співавторами (Vilarejo et al., 2002), форми C_n взаємно конвертуються з участю тилакоїдної КА, при цьому іони бікарбонату акцептують протони, що вивільнюються під час фотоокиснен-

ня води. Якщо інтенсивність освітлення раптово зростає, швидкість вивільнення протонів також збільшується, що може призводити до значних локальних знижень рН і, як наслідок – ушкодження водоокиснювального комплексу та навіть деструкції марганцевого кластера з вивільненням Мп у водну фазу. Роль КА полягає у пришвидшенні видалення протонів від центрів фоторозкладу води на донорному боці ФСІІ, запобігаючи кислотній денатурації ВОК. CO_2 , який утворився внаслідок цієї реакції, може використовуватися в циклі Кальвіна.

Результати серії експериментів зі стимулювання світлозалежного протонного транспорту та фотофосфорилування екзогенним бікарбонатом свідчать на користь участі пулу слабозв'язаного C_n в енергізації тилакоїдних мембран і формуванні шляхів транслокації протонів від світлозалежних протонних pomp до АТФ-синтази (Podorvanov et al., 2005; Onoyko et al., 2010; Zolotareva et al., 2013; Koroidov et al., 2014). Важливо було з'ясувати, як змінилася функціональна активність тилакоїдів після тривалої інкубації в атмосфері інертного газу і за наявності інгібіторів КА. Виконані виміри показали, що швидкість перенесення електронів від води до метилвіологена, а також величина трансмембранного градієнта протонів у препаратах, інкубованих за наявності ЕА і АА в атмосфері азоту, практично не відрізнялися від таких у контрольних хлоропластів (Podorvanov et al., 2005). Однак пригнічення КА активності продуванням інертним газом негативно впливає на світлозалежне поглинання протонів. Тривала інкубація листків рослин *Arabidopsis* Heunh. в атмосфері інертного газу призводить, як показали досліди О. Цабарі та ін. (Tsabari et al., 2015), до значних ультраструктурних змін системи тилакоїдних мембран, пов'язаних із видаленням розчинених CO_2 і O_2 . Це узгоджується з результатами наших досліджень щодо впливу рівня КА активності на структуру тилакоїдів (Vodka et al., 2013a, b; Semenikhin et al., 2014). Оскільки розмір пулу мембранозв'язаного бікарбонату великий (Stamler, 1977; Baranov et al., 2000) і приблизно відповідає молярному вмісту хлорофілу, зміна кількості або співвідношення форм вугільної кислоти, наявної у зв'язаному стані в мембранах тилакоїдів, може спричинювати структурні зміни мембранної системи хлоропласта.

Внесок зв'язаного бікарбонату в протонну ємність тилакоїдів оцінювався за аналізом впливу інгібіторів карбоангідрази на криві кислотно-основ-

Коефіцієнт проникності для CO₂ в плоских ліпідних бішарах

The coefficient of permeability to CO₂ in flat lipid bilayers

| Модель | CO ₂ провідність см · с ⁻¹ | Посилання |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------|
| Планарний ліпідний бішар, що складається з 1:1 яєчний лецитин : холестерин, 22–24 °С | 3,5±0,4 · 10 ⁻³ | Gutknecht et al., 1977 |
| Планарний ліпідний бішар, що складається з (I) чистого дифітаноїл-фосфатидилхоліну, (II) холестерину: дифітаноїл-фосфатидилхоліну: яєчного сфінгомеліну у співвідношенні 3 : 2 : 1 та (III) суміші ліпідів | ≥3,2±1,6 · 10 ⁻² | Missner et al., 2008 |

Примітка. Потік C_n через плаский мембранний бішар вимірювався при відомій різниці концентрації CO₂ через мембрану (Gutknecht et al. 1997; Missner et al., 2008). З обох боків мембрани додавалася карбоангідраза для мінімізації градієнтів CO₂ у водному дифузійному шарі на примембранних межах з кожного боку.

ного титрування хлоропластів у діапазоні рН 4–9 (Podorvanov et al., 2005, 2006). Припускається, що вуглекислота в мембрані накопичується у формі CO₂, і це узгоджується з даними про підвищену розчинність у ліпідній фазі порівняно з водними розчинами (Raven, Beardall, 2015). За оцінками А. Місснера і співавторів (Missner et al., 2008), загальна розчинність CO₂ у гідрофобному середовищі перевищує розчинність інших газів (у 10 разів більше, ніж O₂, у 17, ніж N₂, і в 25, ніж H₂). Хоча поглинання CO₂ ліпідною фазою є доволі швидким, швидкість його виходу в повітря низька.

Завдяки кращій розчинності в ліпідному шарі негідратована молекула CO₂ легко переміщується в мембрані (таблиця). Карбоангідрази хлоропластів можуть сприяти швидшому досягненню рівноваги форм C_n у внутрішніх шарах мембран, які не перемішуються. Якщо концентрація CO₂ у ліпідному шарі мембрани вища, ніж у навколишньому водному середовищі, то, вочевидь, саме мембранний пул CO₂ може бути джерелом субстрату для активного центру КА. В цьому випадку участь вуглекислоти в процесах зв'язування та перенесення протонів може забезпечуватися існуванням множинних форм КА, локалізованих як поблизу H⁺-генераторів і H⁺-транслокаторів, так і вздовж усього шляху перенесення протонів.

Можна також припустити, що вуглекислота в мембрані частково представлена формою електронейтральної вугільної кислоти, яка у водних розчинах, як відомо, не існує і розпадається відразу в момент утворення. Чи існують молекули H₂CO₃ у гідрофобній фазі біологічних мембран, невідомо. Однак H₂CO₃ стабільна у вакуумі, її поліморфні форми виявлені в разі заморожування CO₂ і H₂O за криогенних температур (Loerting et al., 2000).

Під час обробки листків та ізольованих хлоропластів іонами важких металів, що супроводжува-

лося пригніченням карбоангідразної активності (Semenikhin et al., 2014) без суттєвого впливу на фотохімічну активність (Vodka et al., 2013a, b), спостерігалось порушення структури тилакоїдних мембран. За наявності йонів міді та цинку достовірно зареєстроване розширення тилакоїдів і міжтилакоїдних проміжків. Зміна розмірів тилакоїдів гран в оброблених Me²⁺ листках за незначної варіації їхнього фізіологічного стану (з вимірів індукції флуоресценції хлорофілу) може пояснюватися втратою мембранозв'язаного бікарбонату та накопиченням його в люменальному просторі тилакоїдів. Раніше висловлювалося припущення, що КА тилакоїдів і пул зв'язаного бікарбонату задіяні в акумуляції протонів і перенесенні їх від протонгенеруючих помп до АТФ-синтази (Onouko et al., 2010). Очевидно, що у зв'язуванні та перенесенні протонів можуть брати участь лише аніонні форми вугільної кислоти (HCO₃⁻, CO₃²⁻), швидкість утворення яких залежить від активності КА (Zolotareva, 2010). Інгібування КА, як показали результати наших робіт (Vodka et al., 2013a, b), спричинює зниження вмісту мембранозв'язаного бікарбонату та структурні зміни мембранної системи хлоропласта.

Іншим доказом участі мембранозв'язаного C_n у підтриманні ультраструктури тилакоїдів можна вважати результати наших дослідів щодо впливу кислотних дощів на листки гороху (Polishchuk et al., 2016). Після двох діб обробки імітованим кислотним дощем (ІКД) з рН 2,5 активність карбоангідрази тилакоїдів, ізольованих з оброблених ІКД листків, значно знижувалася. Методом трансмісійної електронної мікроскопії зареєстровано зміни в будові гран, неоднорідність упаковки тилакоїдів у гранах, збільшення поперечних розмірів тилакоїдів і розширення внутрішньотилакоїдного простору порівняно з контролем. Усе це дає підстави для припущення, що хлоропластна карбоангідраза

бере участь у підтриманні гранальної структури тилакоїдів. Можливим наслідком її інактивзації, що призводить до порушення бікарбонат-вуглекисотної рівноваги під впливом ІКД, є структурні порушення мембранної системи фотосинтетичного апарату та інгібування фотохімічної активності хлоропластів.

Таким чином, сукупність накопичених експериментальних даних свідчить про структурну роль CO_2 у хлоропластах. Функціональне значення структурних перебудов мембранної системи тилакоїдів, залежно від вмісту та співвідношення форм вугільної кислоти, поки що невідоме, але є підстави вважати, що ці параметри пов'язані із транспортуванням протонів і забезпеченням функціонального зв'язку процесів фотосинтетичної трансформації енергії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- 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**(29): 6060–6065.
- Blubaugh D.J., Govindjee S. The molecular mechanism of the bicarbonate effect at the plastoquinone reductase site of photosynthesis, *Photosynth. Res.*, 1988, **19**(1–2): 85–128.
- Bowden S.J., Hallahan B.J., Ruffle S.V., Evans M.C.W., Nugent J.H.A. Preparation and characterization of Photosystem II core particles with and without bound bicarbonate, *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, **1060**(1): 89–96.
- Fabre N., Reiter I.M., Becuwe-Linka N., Genty B., Rumeau D. Characterization and expression analysis of genes encoding alpha and beta carbonic anhydrases in Arabidopsis, *Plant Cell Environ.*, 2007, **30**: 617–629.
- Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.B., Rudella A., Sun Q., van Wijk K.J. In depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database, *Plant Cell.*, 2004, **16**: 478–499.
- Gutknecht J., Bisson M.A., Tosteson F.C. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers, *J. Gen. Physiol.*, 1977, **69**(6): 779–794.
- Hermes S., Bremm O., Garczarek F., Derrien V., Liebisch P., Loja P., Sebban P., Gerwert K., Haumann M. A time-resolved iron-specific X-ray absorption experiment yields no evidence for an $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ transition during $\text{Q}_A \rightarrow \text{Q}_B$ electron transfer in the photosynthetic reaction center, *Biochemistry*, 2006, **45**: 353–359.
- Hienerwadel R., Berthomieu C. Bicarbonate binding to the non-heme iron of Photosystem II investigated by Fourier transform infrared difference spectroscopy and ^{13}C -labeled bicarbonate, *Biochemistry*, 1995, **34**(50): 16288–16297.
- Kiriziy D.A., Stasik O.O., Pryadkina G.A., Shadchina T.M. *Assimilyatsiya CO_2 i mekhanizmy ee regulyatsii*, Kyiv: Logos, 2014, vol. 2, 478 pp. [Киризи́й Д.А., Стасик О.О., Прядкина Г.А., Шадчина Т.М. *Ассимиляция CO_2 и механизмы ее регуляции*. – К.: Логос, 2014, Т. 2. – 478 с.].
- Klimov V.V., Hulsebosch R.J., Allakhverdiev S.I., Wincencjusz H., van Gorkom H.J., Hoff A.J. Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of Photosystem II, *Biochemistry*, 1997, **36**(57): 16277–16281.
- Klimov V.V., Baranov S.V. Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1508**(2): 187–196.
- Koroidov S., Shevela D., Shutova T., Samuelsson G., Messenger J. Mobile hydrogen carbonate acts as proton acceptor in photosynthetic water oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, **111**(17): 6299–6304.
- Loerting T., Tautermann C.S., Kroemer R.T., Kohl I., Hallbrucker A., Mayer E., Liedl K.R. On the surprising kinetic stability of carbonic acid (H_2CO_3), *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**(5): 891–894.
- Müh F., Glockner C., Hellmich J., Zouni A. Light-induced quinone reduction in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1817**: 44–65.
- Missner A., Kügler P., Saparov S.M., Sommer K., Mathai J.C., Zeidel M.L. Carbon dioxide transport through membranes, *J. Biol. Chem.*, 2008, **282**: 25340–25347.
- Onoyko E.B., Zolotareva E.K., Polishchuk A.V. *Dop. NAN Ukrainy*, 2010, **10**: 160–165. [Онойко Е.Б., Золотарева Е.К., Полищук А.В. Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы // *Доп. НАН України*. – 2010. – **10**. – С. 160–165].
- Petrouleas V., Deligiannakis Y., Diner B.A. Binding of carboxylate anions at the non-heme Fe(II) of PSII. Competition with bicarbonate and effects on the Q_A/Q_B electron transfer rate, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **1188**(3): 271–277.
- Podorvanov V.V., Chernoshtan A.A., Zolotareva E.K. *Fiziologiya, Biokhimiya kulturnykh rasteniy*, 2005, **37**(4): 326–332. [Подорванов В.В., Черноштан А.А., Золотарева Е.К. Роль бикарбоната в светозависимом поглощении протонов изолированными хлоропластами // *Физиол., Биохим. культур. растений*. – 2005. – **37**(4). – С. 326–332].
- Podorvanov V.V., Chomoshtan A.A., Konovalyuk V.D. *Dop. NAN Ukrainy*, 2006, **9**: 186–191. [Подорванов В.В., Черноштан А.А., Коновалюк В.Д. Буферная емкость изолированных тилакоидов хлоропластов гороха // *Доп. НАН України*. – 2006. – **9**. – С. 186–191].
- Polishchuk A.V., Vodka M.V., Belyavskaya N.A., Khomochkin A.P., Zolotareva E.K. *Tsitologiya*, 2016, **58**(1): 52–59. [Полищук А.В., Водка М.В., Белявская Н.А., Хомочкин А.П., Золотарева Е.К. Влияние кислотных дождей на ультраструктуру и функциональные характеристики фотосинтетического аппарата листьев гороха // *Цитология*. – 2016. – **58**(1). – С. 52–59].

- Pronina N.A., Semenenko V.E. *Algologia*, 1991, **1**: 80–92. [Пронина Н.А., Семененко В.Е. Молекулярная и клеточная организация CO₂-концентрирующих механизмов в фотоавтотрофных клетках микроводорослей // *Альгология*. – 1991. – **1**. – С. 80–92].
- Raven J.A. CO₂-Concentrating Mechanism: A Direct Role for Thylakoid Lumen Acidification?, *Plant Cell Environ.*, 1997, **20**(2): 147–154.
- Raven J.A., Beardall J. The ins and outs of CO₂, *J. Exp. Bot.*, 2015, **67**(1): 1–13
- Sedoud A., Kastner L., Cox N., El-Alaoui S., Kirilovsky D., Rutherford A.W. Effects of formate binding on the quinone-iron electron acceptor complex of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1807**: 216–226.
- Semenikhin A.V., Polishchuk A.V., Podorvanov V.V. *Visnik Kharkiv. natsion. ahrarn. un-tu*. Ser. Bioloziya, 2013, **3**(30): 23–31. [Семенихин А.В., Полищук А.В., Подорванов В.В. Влияние ионов тяжелых металлов на активность карбоангидразы хлоропластов гороха // *Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту*. Сер. Біологія. – 2013. – **3**(30). – С. 23–31].
- Semenikhin, A.V., Zolotarova, O.K. *Dop. NAN Ukrainy*, 2014, **6**: 151–155. [Семеніхін А.В., Золотарьова О.К. Ідентифікація карбоангідразної активності, асоційованої з білковими комплексами фотосинтетичних мембран хлоропластів шпинату // *Доп. НАН України*. – 2014. – **6**. – С. 151–155].
- Semenikhin A.V., Zolotareva E.K. Carbonic anhydrase activity of integral-functional complexes of thylakoid membranes of spinach chloroplasts, *Ukr. Biochem. J.*, 2015, **87**(3): 47–56.
- Semin B.K., Loviagina E.R., Aleksandrov A.Y., Kurov Y.N., Novakova A.A. Effect of formate on Mössbauer parameters of the non-heme iron of PSII particles of cyanobacteria, *FEBS Lett.*, 1990, **400**(2): 184–186.
- Shevela D., Eaton-Rye J.J., Shen J.R., Govindjee Photosystem II and the unique role of bicarbonate: a historical perspective, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, **1817**(8): 1134–1151.
- Shutova T., Kenneweg H., Buchta J., Nikitina J., Terentyev V., Chernyshov S., Andersson B., Allakhverdiev S.I., Klimov V.V., Dau H., Junge W., Samuelsson G. The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal, *EMBO J*, 2008, **27**(5): 782–791.
- Stemler A., Govindjee S. Bicarbonate ion as a critical factor in photosynthetic oxygen evolution, *Plant Physiol.*, 1973, **52**(1): 119–123.
- Stemler A., Govindjee S. Bicarbonate stimulation of oxygen evolution, ferricyanide reduction and photoinactivation using isolated chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, 1974, **15**(2): 533–544.
- Stemler A.J. The bicarbonate effect, oxygen evolution, and the shadow of Otto Warburg, *Photosynth. Res.*, 2002, **73**(1–3): 177–183.
- Stemler A. The binding of bicarbonate ions to washed chloroplast grana, *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **460**(3): 511–522.
- Ulas G., Olack G., Brudvig G.W. Evidence against Bicarbonate Bound in the O₂-Evolving Complex of Photosystem II, *Biochemistry*, 2008, **47**(10): 3073–3075.
- Van Rensen J.J.S. Role of bicarbonate in Photosystem II, *Photosynth. Res.*, 2002, **73**(2): 185–192.
- Van Rensen J.J., Tonk W.J.M., Bruijn S.M. Involvement of bicarbonate in the protonation of the secondary quinone electron acceptor of photosystem II via the non-haem iron of the quinone iron acceptor complex, *FEBS Lett.*, 1988, **226**(2): 347–351.
- Vermaas W.F.J., Rutherford A.W. EPR measurements on the effect of bicarbonate and triazine resistance on the acceptor side of Photosystem II, *FEBS Lett.*, 1984, **175**(3): 243–248.
- Vilarejo A., Shutova T., Moskvina O., Forssun M., Klimov V.V., Samuelsson G. Photosystem II – Associated Carbonic Anhydrase Regulates the Efficiency of Photo-synthetic Oxygen Evolution, *EMBO J*, 2002, **21**(4): 1930–1938.
- Vodka M.V., Polishchuk A.V., Belyavskaya N.A., Zolotareva E.K. *Visn. Kharkiv. natsion. agrarn. un-tu*. Ser. Biologiya, 2013, **3**(30): 46–55. [Водка М.В., Полищук А.В., Белявская Н.А., Золотарева Е.К. Воздействие тяжелых металлов, ингибиторов карбоангидразы, на мембранную систему хлоропластов листьев гороха // *Вісник Харків. нац. аграрн. ун-ту*. Сер. Біологія. – 2013. – **3**(30). – С. 46–55].
- Vodka M.V., Polishchuk O.V., Bilyavska N.O., Zolotarova O.K. *Dop. NAN Ukrainy*, 2013, **10**: 152–158. [Водка М.В., Полищук О.В., Білявська Н.О., Золотарьова О.К. Реакція фотосинтетичного апарату шпинату на дію важких металів, інгібіторів карбоангідрازی // *Доп. НАН України*. – 2013. – **10**. – С. 152–158].
- Warburg O.W., Krippahl G.Z. Hill-Reaktionen, *Z. Naturforsch.*, 1958, **13b**(8): 509–514.
- Yano J., Kern J., Sauer K., Latimer M.J., Pushkar Y., Biesiadka J., Loll B., Saenger W, Messinger J., Zouni A., Yachandra V.K. Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn4Ca cluster, *Science*, 2006, **314**(5800): 821–825.
- Yruela I., Allakhverdiev S.I., Ibarra J.V., Klimov V.V. Bicarbonate binding to the water-oxidizing complex in the photosystem II. A Fourier transform infrared spectroscopy study, *FEBS Lett.*, 1998, **425**(3): 396–400.
- Zharmukhamedov S.K., Shirshikova G.N., Maevskaya Z.V., Antropova T.M., Klimov V.V. *Fiziol. rast.*, 2007, **54**(3): 342–349. [Жармухамедов С.К., Ширшикова Г.Н., Маевская З.В., Антропова Т.М., Климов В.В. Бикарбонат защищает водоокисляющий комплекс фотосистемы II от термоинактивации в интактных клетках *Chlamydomonas reinhardtii* // *Физиол. раст.* – 2007. – **54**(3). – С. 342–349].
- Zolotareva E.K. *Fiziologiya, Biokhimiya kulturnykh rasteniy*, 2010, **42**(1): 37–50. [Золотарева Е.К. Протонная регуляция процессов фотосинтетической трансформации энергии // *Физиол., Биохим. культур. растений*. – 2010. – **42**(1). – С. 37–50].
- Zolotareva E.K., Polishchuk O.V., Semenikhin A.V., Onoiko E.B. The Contribution of Light-Dependent Bicarbonate Uptake in Thylakoid Membrane Energization. In: *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future*, Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 197–201.

Рекомендує до друку
О.К. Золотарьова

Надійшла 28.12.2015

Семеніхін А.В., Водка М.В., Поліщук О. В. **Кофакторна та структурна роль CO_2 у хлоропластах.** — Укр. ботан. журн. — 2016. — 73(3): 290—297.

Институт ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, м. Київ, 01004, Україна

Швидкість фотохімічних реакцій у хлоропластах вищих рослин залежить від наявності в середовищі неорганічного вуглецю — вуглекислого газу та/або аніонів вугільної кислоти. Ця залежність, відома як «бікарбонатний ефект», досліджена на рівні інтактних листків, ізольованих тилакоїдів, фотосистем і реакційних центрів і пов'язана з наявністю у фотосистемі II міцно зв'язаного HCO_3^- . Загальна кількість зв'язаного бікарбонату становить близько 1 мкмоль на мг хлорофілу, але тільки одна—дві міцно зв'язані з реакційним центром молекули контролюють активність ФСII. У тилакоїдних мембранах хлоропластів є також пул слабше зв'язаного бікарбонату (з концентрацією, близькою до концентрації хлорофілу), який можна видалити без помітних наслідків для активності ФСII. Узагальнено відомості про кофакторну роль міцнозв'язаного бікарбонату, вилучення якого цілковито інгібує фотохімічні реакції у хлоропластах. Передбачається, що слабозв'язаний бікарбонат бере участь у протонному транспорті та регуляції фотофосфорилування. Взаємна трансформація форм C_n відбувається в хлоропласті з участю кількох карбоангідраз. Пригнічення їхньої активності призводить до сповільнення фотохімічних реакцій і зумовлює помітні зміни ультраструктурної організації системи тилакоїдних мембран. Наведені дані свідчать про структурну роль C_n у хлоропластах.

Ключові слова: діоксид вуглецю, бікарбонат, хлоропласти, тилакоїдні мембрани, фотосинтез, ультраструктура, карбоангідраза.

Семенихин А.В., Водка М.В., Полищук А.В.
Кофакторная и структурная роль CO_2 в хлоропластах. — Укр. ботан. журн. — 2016. — 73(3): 290—297.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины
ул. Терещенковская, 2, г. Киев, 01004, Украина

Скорость фотохимических реакций в хлоропластах высших растений зависит от наличия в среде неорганического углерода — углекислого газа и/или анионов угольной кислоты. Эта зависимость, известная как «бикарбонатный эффект», исследована на уровне интактных листьев, изолированных тилакоидов, фотосистем и реакционных центров и связана с присутствием в фотосистеме II прочно связанного HCO_3^- . Общее количество связанного бикарбоната составляет около 1 мкмоль на мг хлорофилла, но только одна—две прочно связанные с реакционным центром молекулы контролируют активность ФСII. В тилакоидных мембранах хлоропластов присутствует также пул менее прочно связанного бикарбоната (с концентрацией, близкой к концентрации хлорофилла), который может быть удален без заметных последствий для активности ФСII. Обобщены сведения о кофакторной роли прочно связанного бикарбоната, удаление которого полностью ингибирует фотохимические реакции в хлоропластах. Предполагается, что слабосвязанный бикарбонат участвует в протонном транспорте и регуляции фотофосфорилирования. Взаимная трансформация форм C_n происходит в хлоропластах с участием нескольких карбоангидраз. Подавление их активности приводит к замедлению фотохимических реакций и вызывает заметные изменения ультраструктурной организации системы тилакоидных мембран. Приведенные данные свидетельствуют о структурной роли C_n в хлоропластах.

Ключевые слова: диоксид углерода, бикарбонат, хлоропласт, тилакоидные мембраны, фотосинтез, ультраструктура, карбоангидраза.