

УДК 577.1

## УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ВЫСШИХ СЗ-РАСТЕНИЙ В АДАПТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

© 2024 г. Б.Н. Иванов\*,#, Н.Н. Руденко\*

\*Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФИЦ  
«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,  
Институтская ул., 2, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: ivboni@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Представлены данные о том, что при изменении условий вегетации растений изменяются уровни экспрессии генов, кодирующих карбоангидразы хлоропластов, а также карбоангидразная активность компартментов хлоропласта. Результаты экспериментов с мутантами по генам хлоропластных карбоангидраз свидетельствуют, что активность карбоангидраз хлоропластов определяет характер изменений реакций фотосинтеза в ответ на изменения условий внешней среды. Предложены возможные механизмы участия карбоангидраз в протекании светозависимых процессов в хлоропласте. На основании полученных результатов высказана гипотеза о взаимосвязанном функционировании карбоангидраз в хлоропластах.

*Ключевые слова:* фотосинтез, высшие растения, адаптация, хлоропласты, карбоангидразы.

DOI: 10.31857/S0006302924030055, EDN: OFYQAS

Взаимопревращение форм неорганического углерода – углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) и бикарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ) – играет важную роль при осуществлении очень многих биологических процессов как в животных, так и в растениях. В растениях скорость этого взаимодействия может ограничить фиксацию  $\text{CO}_2$  и включение его молекул в органические соединения, т.е. ограничить продуктивный фотосинтез, являющийся основой не только питания и жизни растений, но и важнейшим биосферным процессом. Реакции превращения углекислого газа в бикарбонат и бикарбоната в углекислый газ в живых организмах катализируют ферменты карбоангидразы (карбонат гидролазы, EC 4.2.1.1). Карбоангидразы (КА) способны значительно ускорить протекание реакций гидратации  $\text{CO}_2$  и дегидратации  $\text{HCO}_3^-$ :



*Сокращения:* КА – карбоангидраза, ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь, ФАР – фотосинтетически активная радиация, ФС1 – фотосистема 1, ФСII – фотосистема 2, НФХТ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*, Рубиско – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа.

где  $\text{CO}_2(\text{p})$  – растворенный углекислый газ.  $\text{H}_2\text{CO}_3$  – угольная кислота, нестойкое соединение, легко распадающееся на  $\text{CO}_2$  и воду, поэтому ее часто не включают в уравнения этих реакций;  $\text{H}_2\text{CO}_3$  в водных растворах диссоциирует в соответствии с  $pK_1$ , равным 6.35. КА значительно увеличивают константы скорости обеих реакций:  $k_{\text{cat}}$  может быть в тысячи раз выше, чем константа спонтанной, некатализируемой реакции, причем в большей степени увеличивается константа скорости реакции гидратации.

КА, обнаруженные к настоящему времени, ученые разделяют на восемь семейств, и считается, что они возникли в процессе эволюции живых организмов независимо друг от друга [1, 2]. Семейства обозначаются буквами греческого алфавита. КА девятого семейства,  $\epsilon$ -КА, обнаруженные у цианобактерий, в настоящее время признаны сильно модифицированными  $\beta$ -КА [3]. В высших растениях найдены представители трех семейств,  $\alpha$ ,  $\beta$ , и  $\gamma$  [1]. КА присутствуют во всех клеточных организмах на Земле и могут иметь разные первичную, третичную и четвертичную структуру, различаться организацией активного центра, но подавляющее большинство этих фер-

ментов катализирует одну и ту же реакцию, используя сходные механизмы [4]. Исключением являются некоторые представители КА, так называемого  $\iota$ -семейства, которые не содержат ионов металлов в активном центре и, как было предположено [5], депротонирование воды в активном центре опосредуют остатки аминокислот гидрофобного кармана активного центра. Кроме того, представители этого семейства, по-видимому, не катализируют реакцию обратимой дегидратации бикарбоната, так же как и представители  $\beta$ -КА бактериального типа [6] и некоторые  $\theta$ -КА [7, 8].

В листьях высших растений КА функционируют на всем пути неорганического углерода из воздушной среды к центрам карбоксилирования, т.е. к местам, где молекулы  $\text{CO}_2$  включаются в состав органических соединений. Они были обнаружены в плазмалемме, в цитоплазме, в оболочке и строме хлоропласта, а также в тилакоидах хлоропласта, в которых сосредоточены пигментный аппарат фотосинтеза и фотосинтетическая электрон-транспортная цепь (ФЭТЦ). На всех этапах этого пути КА обеспечивают или перевод молекул  $\text{CO}_2$  в молекулы  $\text{HCO}_3^-$ , диффундирующие в водной фазе, или молекул  $\text{HCO}_3^-$  в молекулы  $\text{CO}_2$ . В обоих случаях преобразование осуществляется в ту форму неорганического углерода, которая необходима в данном месте в данное время. По мнению авторов статьи, одна из важных функций КА – обеспечивать быстрое взаимопревращение форм неорганического углерода бикарбонатного буфера для создания необходимой в том или ином компартменте реакции среды (рН) для обеспечения оптимальной скорости протекающих там биохимических реакций, а также в подаче или отводе протонов, участвующих в этих реакциях.

В хлоропластах, органеллах клетки, в которых осуществляется фотосинтез, обнаружены КА, принадлежащие двум семействам,  $\alpha$  и  $\beta$ . Согласно литературным данным, в хлоропластах находится четыре КА  $\alpha$ -семейства:  $\alpha$ -КА1,  $\alpha$ -КА2,  $\alpha$ -КА4, и  $\alpha$ -КА5, три формы  $\beta$ -КА1:  $\beta$ -КА1.1,  $\beta$ -КА1.2 и  $\beta$ -КА1.3, а также  $\beta$ -КА5 [9, 10]. В работе будут, в основном, описаны результаты исследований, проведенных в лаборатории фотосинтетического электронного транспорта Института фундаментальных проблем биологии РАН, которые были представлены на X Съезде Российского фотобиологического общества. Многолетние исследования лаборатории привели к обнаружению, в частности, КА в люмене тилакоидов высших растений, гороха, шпината и арабидопсиса [11, 12] и установлению расположения ряда КА в компартментах хлоропласта [13–15]. Ниже будут описаны результаты, свидетельствующие о том,

что КА хлоропластов могут быть участниками адаптационных перестроек фотосинтетических реакций при изменении условий вегетации растений, а также представлены гипотезы о роли КА в процессах, протекающих в тилакоидных мембранах.

### РЕАКЦИИ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ

Участие КА хлоропластов в адаптационных изменениях фотосинтетических реакций могло, вероятно, отразиться в изменении их содержания при переносе растений в новые условия вегетации. Неоднозначные и противоречивые данные были получены в ходе многочисленных исследований по определению изменений КА-активности или интенсивности экспрессии генов  $\beta\text{ка}1$ ,  $\beta\text{ка}2$  и  $\beta\text{ка}4$ , в растениях различных видов, в зависимости от воздействия таких факторов, как засуха, засоление, холодовой стресс и других. Результаты этих исследований описаны в обзорах [16, 17].

Нами было проведено обширное исследование изменения интенсивности экспрессии генов КА в ответ на изменения освещенности растений в условиях различной длины светового дня [18]. Исследования проводили с растениями *Arabidopsis thaliana* вследствие возможности получения многочисленных мутантов этого растения по целевым генам, кодирующим белки интереса. Условия «длинного» дня, 16 ч день/8 ч ночь, близки к природным, а условия «короткого дня», 8 ч день/16 ч ночь, искусственно создаваемые в климатических камерах, обычно используются для изучения долговременной адаптации растений к тому или иному внешнему фактору, поскольку позволяют поддерживать арабидопсис в вегетативном состоянии в течение нескольких недель. Арабидопсис – тенелюбивое растение, и для него оптимальна интенсивность света около 70–150 мкмоль квантов ФАР  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$  (ФАР – фотосинтетически активная радиация) [19]; интенсивности света при выращивании, 80 мкмоль квантов ФАР  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$  и 400 мкмоль квантов ФАР  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ , обозначали как низкий свет и высокий свет соответственно.

В растениях и «короткого», и «длинного» дня увеличение освещенности приводит к интенсификации фотосинтеза листьев. При этом разная длительность протекания фотосинтеза в течение суток может предъявлять разные требования к организации фотосинтетического аппарата вследствие более длительного поступления световой энергии, более длительного функционирования систем синтеза и транспорта метаболитов в хлоропластах, большей продукции в них всех ак-

тивных форм кислорода, которые на свету именно в хлоропластах образуются с высокой скоростью. При переносе растений с низкого на высокий свет заметно изменялись морфологические и функциональные характеристики, соответствующие обнаруженным ранее акклимационным изменениям высших растений к повышенной освещенности [20, 21]. В течение 14 суток для растений «короткого» дня и 5 суток для растений «длинного» дня происходило заметное уменьшение содержания в листьях белков светособирающего комплекса фотосистемы II (ФСII) – Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6 [18]. Эффективный квантовый выход ФСII становился ниже в растениях на высоком свету, чем в растениях на низком свету, а нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (НФХТ) возрастало. Эта характеристика флуоресценции хлорофилла отражает процесс, который защищает фотосинтетический аппарат от фотоингибирования, т.е. уменьшения эффективности его работы при поступлении квантов света в количестве большем, чем может быть использовано в ФЭТЦ. Было обнаружено [18], что разница в НФХТ на свету разной интенсивности обусловлена теми процессами, которые характеризует быстро релаксирующий компонент НФХТ, зависящий от протонирования белка PsbS [22]. Этот компонент обусловлен релаксацией так называемого энергозависимого тушения флуоресценции, зависящего от накопления протонов в люмене тилакоидов, и отражает диссипацию энергии света, прежде всего, в тепло. В наших экспериментах в растениях «короткого» дня увеличение освещенности приводило к более значительному относительному увеличению этого компонента, чем в растениях «длинного» дня, что указывает на различия во влиянии интенсивности света на развитие НФХТ при разной продолжительности дня.

В описанных экспериментах адаптация растений к повышенной интенсивности света приводила к изменению уровней экспрессии генов КА хлоропластов, причем эти изменения для ряда генов зависели от длины фотопериода при выращивании. В растениях «короткого» дня уровень экспрессии большинства генов КА хлоропластов через 2 недели адаптации к высокому свету был выше, чем на низком свету [18]. Сравнение уровней экспрессии генов стромальных КА выявляло различия между этими КА в адаптации к высокой освещенности только в условиях «длинного» дня. Уровень экспрессии гена тилакоидной КА,  $\alpha$ -КА4, в условиях «короткого» дня после начального падения на высоком свету увеличивался и через 14 суток становился в 2 раза выше, чем на низком свету. В условиях «длинного» дня содержание транскриптов этого гена на высоком свету уже через 5 суток становилось в 16 раз выше, чем на низком свету. Такое поведение согласуется с

описанной ниже функцией этой КА в развитии энергозависимой части НФХТ, защищающей фотосинтетический аппарат от фотоингибирования, вероятность которого возрастает на высоком свету, о чем свидетельствует более высокий компонент НФХТ, характеризующий развитие фотоингибирования, на этом свету. Изменение уровня экспрессии гена другой тилакоидной КА,  $\alpha$ -КА2, в условиях «короткого» дня походило на изменение уровня экспрессии гена  $\alpha$ -КА4, но в случае  $\alpha$ -КА2 возрастание уровня экспрессии ее гена на высоком свету было существенно больше. Однако в условиях «длинного» дня не происходило возрастание уровня экспрессии гена  $\alpha$ -КА2 на высоком свету.

Содержание CO<sub>2</sub> в воздушной фазе также влияло на КА хлоропластов. Было обнаружено, что в зависимости от этого фактора среды изменялась КА-активность компартментов хлоропластов в листьях арабидопсиса [23]. КА-активности препаратов стромы и тилакоидов хлоропластов, а также уровни экспрессии генов, кодирующих  $\alpha$ -КА1,  $\alpha$ -КА2,  $\beta$ -КА1 и  $\beta$ -КА5 были измерены в листьях растений, акклиматизированных к различному содержанию CO<sub>2</sub> в воздухе: низкому (150 ppm), нормальному (450 ppm) и высокому (1200 ppm). Было обнаружено, что КА-активность стромы и тилакоидов, измеренная после двух недель акклиматизации, была тем выше, чем ниже концентрация CO<sub>2</sub> в воздухе. Этому предшествовало повышение уровней экспрессии генов, кодирующих хлоропластные (КА,  $\beta$ -КА5) и стромальные формы  $\beta$ -КА1 ( $\beta$ -КА1.1 и  $\beta$ -КА1.2) через одни-два суток после начала акклиматизации растений. Зависимость от содержания CO<sub>2</sub> в воздухе была наиболее заметна для КА-активности стромы – она была на два порядка выше в растениях, акклиматизированных к низкому содержанию CO<sub>2</sub>, чем в высокому. КА-активность тилакоидных мембран также была выше в растениях, акклиматизированных к низкому CO<sub>2</sub>, однако в этих растениях не наблюдали значительного повышения уровней экспрессии генов, кодирующих карбоангидразы  $\alpha$ -КА2 и  $\alpha$ -КА4, расположенные в тилакоидных мембранах.

Более значительные изменения уровней экспрессии генов КА хлоропластов были выявлены в более молодых растениях, возрастом 26 суток [23], чем в обычно исследуемых 50-60-суточных растениях. В молодых растениях уменьшенное содержание CO<sub>2</sub> в воздухе в течение двух недель приводило к небольшому возрастанию экспрессии гена КА  $\alpha$ -КА1, возрастанию в 1.5–2.0 раза экспрессии генов КА  $\alpha$ -КА2 и  $\beta$ -КА5, возрастанию в 9 раз экспрессии генов КА  $\beta$ -КА1.1 и  $\beta$ -КА1.2. Только уровень экспрессии гена, коди-

рующего  $\alpha$ -КА4, уменьшался почти в 2 раза при адаптации к низкому содержанию  $\text{CO}_2$  в воздухе.

Таким образом, изменение уровней экспрессии генов хлоропластных КА происходило различным образом при изменении условий вегетации, и это отражалось в изменении КА-активности компартментов хлоропласта. Эти результаты свидетельствуют о том, что активность КА в процессах, в которых они участвуют, зависит от условий окружающей среды.

### ВЛИЯНИЕ ОТСУТСТВИЯ ХЛОРОПЛАСТНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ НА ИЗМЕНЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ

Изменения уровней экспрессии генов хлоропластных КА в зависимости от условий среды, однако, еще не свидетельствуют об их возможном участии в адаптационных механизмах растений, поскольку такого рода изменения происходят для многих ферментов при изменении условий окружающей среды. Чтобы обнаружить возможное участие хлоропластных КА в адаптационных механизмах, было проведено сравнение изменений при изменении условий выращивания характеристик фотосинтеза в растениях дикого типа и в растениях с нокаутом хлоропластных КА. Было обнаружено, что выключение синтеза отдельных КА, а именно, тилакоидной  $\alpha$ -КА4, а также стромальных КА,  $\alpha$ -КА1 и  $\beta$ -КА1, приводило к тому, что изменения характеристик растений, связанных с протеканием фотосинтеза, а именно, изменения в пигментном аппарате фотосинтеза и функционировании ФЭТЦ, различались в растениях дикого типа и мутантах при переходе к новым условиям.

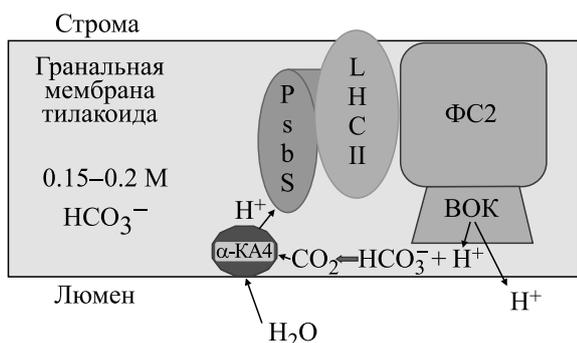
Одним из важных маркеров окислительного стресса в растениях, состояния, возникновению которого в последние годы уделяется повышенное внимание, служит накопление в растениях пероксида водорода,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Окислительный стресс часто возникает при увеличении освещенности растений. Его развитие, в значительной степени, связано с дисбалансом между повышенным образованием  $\text{H}_2\text{O}_2$  при увеличении скорости восстановления кислорода в ФЭТЦ и возможностью дезактивации этой активной формы кислорода в строме хлоропласта. Мы нашли, что на низком свете ( $50 \text{ мкмоль квантов ФАР м}^{-2}\text{с}^{-1}$ ) накопление  $\text{H}_2\text{O}_2$  в листьях растений арабидопсиса дикого типа и мутантов с нокаутом генов стромальных КА,  $\alpha$ -КА1 или  $\beta$ -КА1 было незначительно выше в мутантах по обеим КА. При высокой интенсивности света ( $400 \text{ мкмоль квантов ФАР м}^{-2}\text{с}^{-1}$ ) его содержание в растениях дикого

типа не изменялось, но в мутантах становилось в три раза меньше (данные не опубликованы). Таким образом, увеличение интенсивности света по-разному повлияло на накопление  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растениях дикого типа и в мутантах по этим КА.

Подробно были изучены различия в изменениях в пигментном аппарате фотосинтеза и в функционировании ФЭТЦ в растениях дикого типа и нокаутного мутанта по тилакоидной  $\alpha$ -КА4 при изменении освещенности [24, 25]. Оказалось, что НФХТ, которое было близким в растениях дикого типа и мутантах при низкой интенсивности света, при увеличении интенсивности света возрастало более значительно в растениях дикого типа, чем в растениях мутантов по  $\alpha$ -КА4. Было установлено, что это происходило вследствие большего возрастания в растениях дикого типа, чем в мутантах, компонента НФХТ, связанного со степенью протонирования белка PsbS [24, 26], особенно в растениях, выращенных при высокой освещенности [24]. При этом в листьях мутантов по  $\alpha$ -КА4 содержание белка PsbS на низком свете было выше на 20%, чем в растениях дикого типа, а на высоком свете становилось вдвое выше [25].

Параметр НФХТ, отражающий фотоингибирование, в растениях мутантов по  $\alpha$ -КА4 был, напротив, выше, чем в растениях дикого типа [24], что сопровождалось уменьшением содержания корового белка ФСII, D1 [25], который, как известно, характеризуется высокими скоростями светозависимого синтеза и деградации [27]. Кроме того, в растениях, нокаутированных по  $\alpha$ -КА4, при увеличении освещенности наблюдалось более значительное уменьшение содержания главных антенных белков, Lhcb1 и Lhcb2, чем в растениях дикого типа. Такое уменьшение общего количества белков Lhcb1 и Lhcb2 приводило и к снижению в этих мутантах содержания их фосфорилированных форм, образующихся вследствие активации киназы STN7, расположенной в тилакоидах. Именно фосфорилированные формы этих белков участвуют в перемещении части светособирающей антенны от ФСII к фотосистеме 1 (ФСI), т.е. участвуют в одной из фаз, так называемых изменений состояния (state transitions), еще одного механизма, приводящего к увеличению НФХТ [28, 29]. В мутантах по  $\alpha$ -КА4, выращенных как на низком, так и на высоком свете, данная фаза была меньше, чем в растениях дикого типа [25], несмотря на существенное, двукратное увеличение содержания киназы STN7 в этих мутантах, по сравнению с диким типом.

Описанное снижение НФХТ компенсировалось также увеличением в мутантах по  $\alpha$ -КА4, по сравнению с диким типом, параметра НФХТ, отражающего степень дезоксидации пигментов виолаксантинового цикла; это отличие было наи-



**Рис. 1.** Гипотетическая модель функционирования карбоангидразы  $\alpha$ -КА4 в тилакоидах. PsbS – белок, связанный с фотосистемой II, регулирующий величину нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, LHCII – антенный светособирающий комплекс фотосистемы II, ФС II – фотосистема II, ВОК – водоокисляющий комплекс.

более выраженным в условиях высокого света [24]. При этом в таких мутантах, выращенных на высоком свете, содержание соответствующих пигментов и степень их деэпоксидации были на 20–30% больше, чем в растениях дикого типа в тех же условиях [25].

Таким образом, описанное влияние нокаута гена тилакоидной КА,  $\alpha$ -КА4, и нокаутов генов стромальных КА на изменение характеристик фотосинтеза свидетельствует, что в присутствии этих хлоропластных КА пути адаптации к новым условиям функционируют в растениях иначе, чем в их отсутствие.

### ФУНКЦИИ ТИЛАКОИДНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ

Очевидно, что влиять на приспособление тех или иных фотосинтетических реакций к протеканию в измененных условиях среды КА могут в том случае, если катализ реакций взаимопревращения  $\text{CO}_2$  и бикарбоната существенен для протекания этих реакций. С использованием нокаутных мутантов по отдельным КА нами были выявлены характеристики фотосинтеза, которые зависят от наличия этих КА. Также исследования с этими мутантами позволили предположить, в каких процессах, важных для протекания фотосинтеза и защиты его аппарата, они участвуют.

**$\alpha$ -КА4.** Учитывая, что в мутантах, создаваемых с помощью Т-ДНК инсерционного мутагенеза, возможно возникновение функциональных изменений, не связанных с нокаутом целевого гена, нами был создан нокаутный мутант по гену, кодирующему  $\alpha$ -КА4, методом геномного редактирования CRISPR/Cas9 [30]. Исследование этого мутанта подтвердило обнаруженные в наших предыдущих работах с инсерционными мутанта-

ми изменения характеристик фотосинтетического аппарата растений арабидопсиса, вызываемые отсутствием этой КА. Помимо указанных выше изменений в НФХТ и квантовом выходе ФСII, было подтверждено, что в этих мутантах уровень синтеза крахмала в световой период, а также уровень деградации крахмала в темновой период значительно выше, чем в растениях дикого типа.

Также было подтверждено и различие в характере изменения экспрессии генов, кодирующих все белки светособирающих антенн ФСII. Особенно важно, что в мутантах, как полученных с использованием CRISPR/Cas9, так и в инсерционных, происходит значительно большее, чем в растениях дикого типа, увеличение экспрессии гена, кодирующего белок PsbS, что коррелирует с описанным выше увеличением содержания белка PsbS [25]. Этот белок, расположенный в контакте с антенной ФСII, в высших растениях играет ключевую роль в иницировании и развитии энергозависимого НФХТ [22]. Такое «замещающее» увеличение потенциальной продукции этого белка в отсутствие  $\alpha$ -КА4, когда уменьшается энергозависимое НФХТ [24], указывает на наличие *in vivo* прямой связи функционирования  $\alpha$ -КА4 с функцией белка PsbS. Можно предположить, что  $\alpha$ -КА4 участвует в этом процессе как поставщик протонов, освобождающихся при гидратации  $\text{CO}_2$  в катализируемой ею реакции. Используя целый ряд экспериментальных подходов, мы показали, что  $\alpha$ -КА4 расположена в гранальных тилакоидных мембранах на люменальной стороне этих мембран вблизи ФСII [13]. С учетом такого расположения этой КА и наблюдаемых эффектов ее отсутствия нами предложена модель ее функционирования в тилакоидах хлоропластов (рис. 1). При включении света протоны воды, освобождающиеся при ее окислении на донорной стороне ФСII, вступают в реакцию с бикарбонатом, связанным с тилакоидной мембраной (где его концентрация в расчете на объем мембраны составляет 0.15–0.20 М [31]), что приводит к резкому увеличению концентрации  $\text{CO}_2$ . Такое увеличение стимулирует гидратазную реакцию с участием карбоангидразы  $\alpha$ -КА4, и протоны, получающиеся в результате этой реакции, поступают от КА к белку PsbS, претерпевающему в результате этого конформационные изменения [22], передающиеся светособирающей антенне, в которой усиливается диссипация энергии в тепло, что отражается в увеличении НФХТ. Поскольку НФХТ развивается в светособирающей антенне, становится понятным, почему в мутанте происходят изменения в экспрессии генов и содержании белков светособирающей антенны (см. выше).

При сравнении растений дикого типа и мутантов по  $\alpha$ -КА4 был также исследован важный ас-

пект проблемы приспособления растений к новым условиям среды, а именно, влияние отсутствия этой КА на гормональный статус растений. Молекулы гормонов растений, абсцизовой, жасмоновой и салициловой кислот, активируют каскады реакций, приводящих, в том числе, к изменению интенсивности транскрипции так называемых «маркерных» генов, участвующих в передаче сигналов о стрессе и в развитии приобретаемой системной резистентности к новым условиям [32]. Нокаут  $\alpha$ -КА4 повлиял не только на уровень экспрессии генов, кодирующих все белки светособирающей антенны ФСII, но и генов белков, активируемых иммунными сигналами растений: генов, индуцируемых салициловой кислотой (*At1g64280 (npr1)* и *At1g74710 (ics1)*), и генов, индуцируемых жасмоновой кислотой (*At1g17420 (lox3)* и *At5g42650 (aos)*) [30]. Возможно, сигналом к указанному изменению интенсивности экспрессии генов, кодирующих белки ФСII, являются именно изменения уровня молекул, участвующих во внутриклеточной и межклеточной передаче сигналов. Оказалось, что в обычных условиях вегетации арабидопсиса, т.е. при коротком дне и невысокой освещенности, уровни экспрессии генов, зависящие от содержания салициловой кислоты, были ниже в мутантах, тогда как уровень экспрессии генов, зависящих от содержания жасмоновой кислоты, был выше в этих мутантах, чем в растениях дикого типа [30]. Похоже, что в мутантах путь системной приобретенной резистентности, индуцируемый жасмоновой кислотой, активируется, в то время как путь, индуцируемый салициловой кислотой, который является антагонистом первого, подавляется. Обнаруженное влияние отсутствия  $\alpha$ -КА4 на гормональный статус растений, очевидно, должно заметно сказываться в различиях, возникающих при адаптации таких мутантов и растений дикого типа к новым условиям среды.

**$\alpha$ -КА2.** Исследование мутантных растений арабидопсиса, в которых была подавлена экспрессия гена, кодирующего  $\alpha$ -КА2 [15, 26], показало, что эффективные квантовые выходы как ФСII, так и ФСI были в них выше, а степень восстановления пула пластохинона ниже, чем в растениях дикого типа, при том что содержание реакционных центров обеих фотосистем было одинаковым. Измерения электрохромного сдвига поглощения каротиноидов показали, что светозависимый градиент pH через тилакоидную мембрану ( $\Delta$ pH) был ниже в листьях растений мутантов. Содержание крахмала в листьях, как интегральный показатель фотосинтеза, в мутантах было ниже, чем в растениях дикого типа.

Величина НФХТ в мутантах была ниже, чем в растениях дикого типа в начале освещения, но становилась слегка выше при достижении стационарного состояния [15]. Указанные выше свой-

ства нокаутного мутанта по  $\alpha$ -КА2, в частности, более низкая величина  $\Delta$ pH и более высокий квантовый выход ФСII, чем в растениях дикого типа, и изменения НФХТ в зависимости от времени освещения оказались очень похожи на свойства растений арабидопсиса с увеличенной продукцией мутированного трансмембранного  $K^+/H^+$  антипортера, KEA3, имеющего точечную мутацию в трансмембранном домене, DPGRoх, которая приводила к увеличенной протонной проводимости тилакоидной мембраны в данном мутанте [33]. На основании выявленных в мутанте по  $\alpha$ -КА2 изменений процессов, протекающих в ФЭТЦ и тилакоидной мембране, и с учетом указанного сходства свойств этого мутанта со свойствами мутанта DPGRoх было высказано предположение о [15] структурно-функциональной связи  $\alpha$ -КА2 с каналом, регулирующим утечку протонов через тилакоидную мембрану. Предположение о связи КА с ионным каналом не необычно, так как показано, что в животных тканях КА участвуют в передаче протонов и/или бикарбоната ион-транспортным системам в клеточных мембранах [34]. Для объяснения полученных результатов важно то, что бикарбонат, субстрат КА, является преобладающей формой неорганического углерода в строме на свету. При освещении растений величина pH в строме повышается от 7.0 до 7.7–8.0, и при величине pH 8.0 в равновесии с воздухом, содержащим 400 ppm (0.04%)  $CO_2$ , концентрация этого газа в водной фазе равна 15.5 мкМ, а концентрация  $HCO_3^-$  – примерно 700 мкМ. В случае тесной ассоциации  $\alpha$ -КА2 с ионным каналом эта КА, катализирующая дегидратацию бикарбоната в реакции с протонами, может использовать протоны, поступающие из люмена через ионный канал, действуя как своего рода регулируемый клапан, причем предварительные результаты предполагают, что  $\alpha$ -КА2 расположена на стромальной стороне тилакоидных мембран (рис. 2). В отсутствие  $\alpha$ -КА2 нормальное функционирование ионного канала нарушено, и поток протонов становится неконтролируемым, и, судя по полученным данным, возрастает. Именно более низкая величина  $\Delta$ pH объясняет и большие величины квантовых выходов фотосистем, и более низкую степень восстановления пула пластохинона.

Таким образом, функционирование  $\alpha$ -КА2 непосредственно связано с биоэнергетикой хлоропластов, в которых энерготрансформирующими (сопрягающими) мембранами служат мембраны тилакоидов. Можно указать еще на одно следствие из предложенной модели функционирования  $\alpha$ -КА2, а именно, увеличение в ее присутствии скорости трансформации бикарбоната в  $CO_2$  в строме вследствие того, что скорость реакции дегидратации бикарбоната с участием КА на

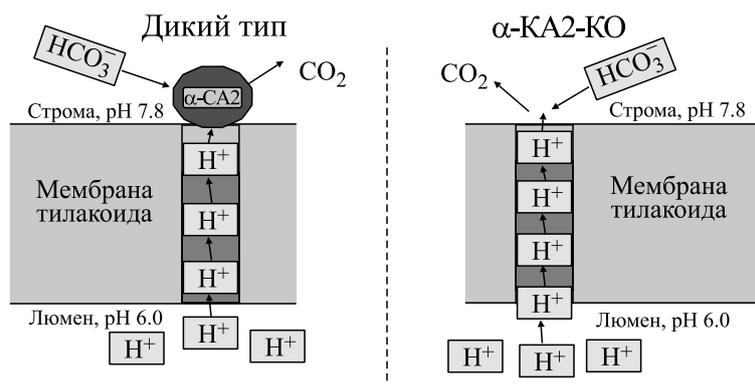


Рис. 2. Гипотетическая модель функционирования карбоангидразы  $\alpha$ -КА2 в тилакоидах. ДТ – дикий тип,  $\alpha$ -КА2-КО – мутант с нокаутированным геном карбоангидразы  $\alpha$ -КА2.

много порядков выше скорости спонтанной реакции, которая может происходить при выходе протонов из люмена в строму, не контролируемом КА.  $\text{CO}_2$  служит субстратом рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксылазы/оксигеназы (Рубиско), ключевого фермента фотосинтеза, расположенного в строме хлоропласта и катализирующего соединение молекул  $\text{CO}_2$  с молекулой рибулозобисфосфата, т.е. реакции включения неорганического углерода в органическое соединение. Нами было найдено, что в мутантах по  $\alpha$ -КА2 скорость фиксации  $\text{CO}_2$  ниже, чем в растениях дикого типа (данные не опубликованы).

**$\alpha$ -КА5.** Роль  $\alpha$ -КА5 в хлоропластах выявлялась постепенно. Сначала нами была обнаружена КА-активность в стромальных тилакоидных мембранах, выделенных как из листьев гороха [35], так и из листьев арабидопсиса [36]. Свойства этой активности отличались от свойств КА-активности гранальных тилакоидных мембран. Позднее мы установили, что известный еще с начала 60-х годов прошлого века эффект увеличения скорости фотофосфорилирования при добавке бикарбоната в суспензию изолированных тилакоидов, который наблюдали в тилакоидах шпината [37], овса [38] и гороха [39], зависит от функциональной активности некой КА [39]. При этом добавки анионов других слабых кислот (ацетата, фумарата или сульфита) не стимулировали фотофосфорилирование. Было показано, что мафенид, водорастворимый ингибитор карбоангидраз, подавлял стимуляцию при добавке бикарбоната; в отсутствие бикарбоната мафенид практически не влиял на скорость фотофосфорилирования. Было обнаружено также заметное подавление сопряженного электронного транспорта в условиях, когда бикарбонат стимулировал фотофосфорилирование. Мафенид заметно ингибировал КА-активность тилакоидов, хотя и не полностью, что могло свидетельствовать о том, что не все КА, находящиеся в тилакоидах, ответственны за эту стимуляцию.

В тилакоидах, изолированных из листьев арабидопсиса дикого типа, так же как и в тилакоидах гороха, наблюдали увеличение скорости фотофосфорилирования при введении бикарбоната в суспензию [14]. Мафенид также не подавлял фотофосфорилирование в отсутствие бикарбоната, но полностью ликвидировал стимуляцию бикарбонатом. Бикарбонат не влиял на скорости базального и разобщенного транспортов электронов в опытах с метилвиологеном как акцептором электронов, но, как и в опытах с тилакоидами гороха, частично подавлял электронный транспорт в присутствии АДФ и неорганического фосфата, т.е. в условиях фосфорилирования. Поскольку стимуляция фотофосфорилирования, как правило, сопровождается увеличением скорости электронного транспорта, последние эффекты указывали на дополнительный процесс стимуляции фотофосфорилирования в присутствии бикарбоната, не связанный с электронным транспортом по ФЭТЦ.

В отличие от стимуляции при добавке бикарбоната к тилакоидам растений дикого типа, такая добавка не изменяла скорость фотофосфорилирования в тилакоидах, изолированных из листьев мутантов, в которых с помощью нокаутной мутации был заблокирован синтез  $\alpha$ -КА5, т.е. присутствие этой карбоангидразы было необходимо для осуществления указанной стимуляции [14].

С использованием масс-спектрометрического анализа, нами было установлено [14], что  $\alpha$ -КА5 расположена в стромальных тилакоидных мембранах. Отметим, что практически все комплексы АТФ-синтазы в тилакоидах сосредоточены в стромальных мембранах. Учитывая свойства мафенида, прежде всего его гидрофильность, можно было заключить, что КА, ответственная за ускорение фотофосфорилирования в присутствии бикарбоната, вероятнее всего, расположена в тилакоидной мембране на ее стромальной поверхности, которая в выделенных тилакоидах

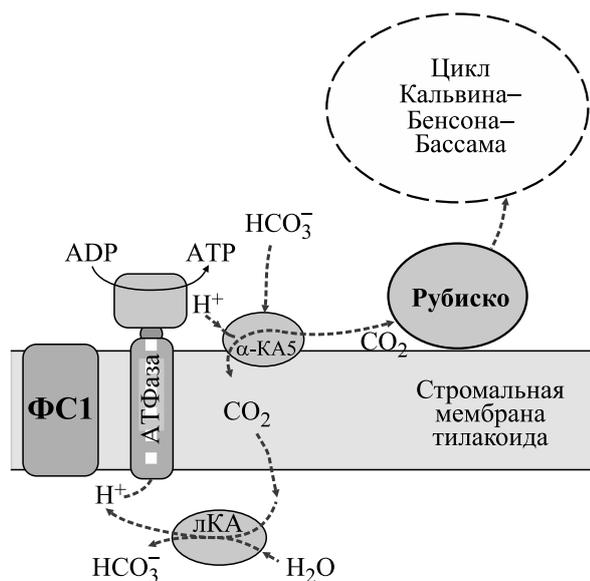


Рис. 3. Гипотетическая модель функционирования карбоангидразы  $\alpha$ -КА5 в тилакоидах. ФС I – фотосистема I, лКА – люменальная карбоангидраза.

обращена в среду [39]. Наличие так расположенной КА в тилакоидах следовало также из того, что КА-активность стромальных тилакоидов сходным образом ингибировалась хорошо проникающим в мембрану ингибитором КА этоксизоламидом и плохо проникающим в мембрану ацетазоламидом [35].

Чтобы объяснить роль КА в стимуляции фотофосфорилирования при введении бикарбоната в суспензию тилакоидов, мы предполагаем, что ускорение фотофосфорилирования может быть следствием возрастания скорости преобразования бикарбоната в  $\text{CO}_2$  в реакции дегидратации, катализируемой мембраносвязанной  $\alpha$ -КА5. Основной барьер для  $\text{CO}_2$  молекул при пересечении липидных мембран – это неперемешиваемые примембранные слои, тогда как сами мембраны легко проницаемы [40]. Поэтому часть молекул  $\text{CO}_2$ , появившихся в приповерхностных слоях тилакоидной мембраны вследствие активности  $\alpha$ -КА5, может легко диффундировать в тилакоидный люмен. В люмене эти молекулы могут гидратироваться с участием люменальной КА с освобождением протона. Увеличение концентрации протонов в люмене в результате этого процесса может привести к увеличению  $\Delta\text{pH}$  и увеличению продукции АТФ (рис. 3). Стимулирование скорости синтеза АТФ при увеличении  $\Delta\text{pH}$  хорошо известно [41, 42].

Гидратация  $\text{CO}_2$  в люмене должна полностью происходить в фосфорилирующих условиях, поскольку концентрация протонов там уменьшена вследствие их выхода в среду через АТФ-синтазу –

$\text{pH}$  в люмене в этих условиях возрастает по сравнению с базальными условиями почти на 1 ед. [43], что соответствует уменьшению концентрации протонов в 10 раз. Таким образом, увеличение концентрации протонов при диффузии молекул  $\text{CO}_2$  в люмен обеспечивает и ускорение фотофосфорилирования, и именно в фосфорилирующих условиях становится причиной уменьшения скорости электронного транспорта, вследствие возрастания фотосинтетического контроля. В базальных условиях, когда  $\text{pH}$  люмена существенно ниже, чем в условиях фотофосфорилирования, поток  $\text{CO}_2$  и его гидратация затруднены, и скорость электронного транспорта не меняется при добавке бикарбоната к тилакоидам.

Важное следствие описанной ситуации – то, что, возможно, значительная часть молекул  $\text{CO}_2$ , образовавшихся при дегидратации бикарбоната на поверхности мембраны, направляются в строму хлоропластов, где они могут стать субстратом Рубиско, обеспечивая увеличение скорости образования органических соединений. Учитывая значительное увеличение содержания бикарбоната в строме на свету, нельзя исключить участие  $\alpha$ -КА5 в подаче  $\text{CO}_2$  Рубиско *in vivo*.

#### ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КАРБОАНГИДРАЗ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ КООПЕРАТИВНО

В ходе исследования функций КА хлоропластов возникло представление, что КА этих оргanelл, и, вероятно, всей клетки, функционируют взаимосвязанно, действуя в кооперации. В некоторых случаях это прослеживается в явном виде, как в случае функционирования  $\alpha$ -КА2,  $\alpha$ -КА4 и  $\alpha$ -КА5. Согласно полученным экспериментальным результатам, эти КА расположены в тилакоидной мембране и, в соответствии с моделями, описывающими их функционирование (см. выше), регулируют такой ключевой параметр биоэнергетики хлоропласта, как концентрацию протонов в люмене тилакоидов. Величина этой концентрации,  $\text{pH}$  люмена, в свою очередь, определяет как возможность защиты фотосинтетического аппарата от фотоингибирования путем регулирования степени протонирования белка PsbS и активности виолаксантиндепоксидазы, так и скорость продукции молекул АТФ, необходимых для функционирования цикла Кальвина, обеспечивающего фиксацию  $\text{CO}_2$ . При этом первая функция, возможно, даже важнее, чем вторая.

Взаимосвязь между КА хлоропласта можно проиллюстрировать взаимозависимостью уровней экспрессии генов, кодирующих эти КА. Мы показали, что нокаут гена, кодирующего  $\alpha$ -КА2, оказывает значительное влияние на уровни экспрессии генов тилакоидных КА,  $\alpha$ -КА4 и  $\alpha$ -КА5,

а также генов стромальных КА,  $\alpha$ -КА1 и  $\beta$ -КА1 [15]. При этом, что может быть важно для понимания до сих пор неясных функций двух последних, уровень экспрессии гена, кодирующего  $\alpha$ -КА1, возрастал в два раза, а гена, кодирующего  $\beta$ -КА1, уменьшался тоже в два раза. Уровень экспрессии гена, кодирующего  $\alpha$ -КА2, возрастал в 3.5 раза, а гена, кодирующего  $\alpha$ -КА5, уменьшался почти в три раза.

Интересно, что, в свою очередь, при нокауте гена, кодирующего  $\alpha$ -КА4, уровень экспрессии гена, кодирующего  $\alpha$ -КА2, возрастал почти в восемь раз, а уровень экспрессии генов стромальных КА не изменялся [30]. Различие во влиянии нокаута генов, кодирующих  $\alpha$ -КА2 и  $\alpha$ -КА4, состояло также в том, что, если нокаут гена первой не влиял на уровень экспрессии генов цитоплазматических КА, нокаут гена, кодирующего  $\alpha$ -КА4, приводил к возрастанию этих уровней.

Выключение синтеза  $\alpha$ -КА5 в растениях, выращенных при атмосферной концентрации углекислого газа, не приводит к возрастанию уровня экспрессии гена самой обильной стромальной КА,  $\beta$ -КА1, но увеличивает экспрессию генов стромальных  $\alpha$ -КА1 и  $\beta$ -КА5 [44]. Возрастает также уровни экспрессии генов тилакоидных КА,  $\alpha$ -КА2 и  $\alpha$ -КА4, что сопровождается увеличением КА-активности тилакоидов.

Литературные данные также свидетельствуют в пользу того, что КА функционируют совместно. В высших растениях выключение синтеза большинства КА не приводит к существенному подавлению роста растений и не оказывает существенного влияния на параметры фотосинтеза [45–47]. Более глубокие физиологические эффекты наблюдаются при одновременном выключении синтеза двух и более КА. Авторы работы [48] в 2010 г. с использованием двойных мутантов с выключенным синтезом плазмалемной  $\beta$ -КА4.1 и стромальной  $\beta$ -КА1 показали, что оба эти фермента участвуют в регуляции устьичной проводимости листьев для углекислого газа. Существенное подавление роста мутантов с нокаутными генами двух цитоплазматических КА,  $\beta$ -КА4.2 и  $\beta$ -КА2 при выращивании растений в условиях низкого содержания углекислого газа в воздухе [49]. Единичные мутации по указанным КА не приводили к такому эффекту. Авторы предположили, что обе эти цитоплазматические  $\beta$ -КА необходимы для преобразования форм неорганического углерода в клетках листа для удовлетворения потребности растений в углероде. В растениях табака мутации в генах  $\beta$ -КА1 и  $\beta$ -КА5 не приводили к каким-либо изменениям, по сравнению с растениями дикого типа [50]. Только одновременный нокаут обоих генов  $\beta$ -КА1 и  $\beta$ -КА5 приводил к снижению скорости прораста-

ния семян, уменьшению их массы и задержке роста мутантных растений.

Кооперативное функционирование КА наблюдалось и в митохондриях арабидопсиса, где КА формируют домен, состоящий из трёх  $\gamma$ -КА и двух  $\gamma$ -КА-подобных белков в составе NADH дегидрогеназного комплекса I [51]. Мутации в, по крайней мере, двух из пяти генов этого домена, приводили к разрушению этих комплексов [52]. Такие мутанты, выращенные при атмосферной концентрации углекислого газа в воздухе, демонстрировали задержку роста, по сравнению с растениями дикого типа, что компенсировалось выращиванием мутантных растений при высоком содержании  $\text{CO}_2$  и указывало, по мнению авторов, на участие митохондриального домена КА в поддержании эффективного функционирования фотосинтеза.

Описанные результаты позволяют предположить, что КА являются звеньями кооперативных цепочек, хотя, очевидно, не заменяют друг друга. Выпадение из такой цепочки какой-либо КА приводит к нарушению конкретного процесса, в котором она участвует, и изменение экспрессии генов других КА, только частично может компенсировать нарушение этого процесса, что было видно по изменению адаптационных возможностей растения. Таким образом, функционирование каждой КА важно для растения в целом, и каждая жизненно необходима растению, хотя катализирует элементарную реакцию взаимопревращения двух неорганических соединений, которая повсеместно происходит и в неживой природе.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетние исследования КА высших С3-растений, проводимые различными исследовательскими группами по всему миру, пока не позволяют определенно ответить на вопрос о физиологической роли этих ферментов. Результаты экспериментальных исследований, описанные в статье, свидетельствуют о том, что КА хлоропластов реагируют на изменение условий вегетации растений, а именно, изменяются уровни экспрессии их генов и изменяются КА-активности компартментов хлоропласта. При этом в нокаутных мутантах в отсутствие стромальных КА,  $\alpha$ -КА1 или  $\beta$ -КА1, и в отсутствие каждой из тилакоидных КА,  $\alpha$ -КА4,  $\alpha$ -КА2 и  $\alpha$ -КА5 происходят изменения в реакциях, связанных с процессом фотосинтеза. В растениях, в которых были нокаутированы гены, кодирующие КА  $\alpha$ -КА1, или  $\beta$ -КА1, или  $\alpha$ -КА4, при перемещении в новые условия вегетации возникают существенные отличия в протекании таких реакций в растениях дикого типа, перемещенных в эти же условия. На основа-

нии различий между растениями дикого типа и мутантами по тилакоидным КА в характеристиках функциональной активности ФЭТЦ и в биоэнергетических реакциях, протекающих в тилакоидных мембранах, предложены гипотезы функционирования этих КА. Обнаружено, что нокаут гена одной из КА хлоропласта приводил к изменению экспрессии генов других хлоропластных КА, что может указывать на кооперативный характер функционирования КА в этой органелле.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственная научная программа, тема № 122041100186-2).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hewett-Emmett D. and Tashian R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **5** (1), 50–77 (1996). DOI: 10.1006/mpcv.1996.0006
- DiMario R. J., Machingura M. C., Waldrop G. L., and Moroney J. V. The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms. *Plant Sci.*, **268**, 11–17 (2018). DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.12.002
- Sawaya M. R., Cannon G. C., Heinhorst S., Tanaka Sh., Williams E. B., Yeates T. O., and Kerfeld Ch. A. The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *J. Biol. Chem.*, **281** (11), 7546–7555 (2006). DOI: org/10.1074/jbc.M510464200
- Supuran C. T. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochem. J.*, **473** (14), 2023–2032 (2016). DOI: 10.1042/BCJ20160115
- Hirakawa Y., Senda M., Fukuda K., Yu H. Y., Ishida M., Taira M., Kinbara K., and Senda T. Characterization of a novel type of carbonic anhydrase that acts without metal cofactors. *BMC Biol.*, **19** (1), 105 (2021). DOI: org/10.1186/s12915-021-01039-8
- Rowlett R. S. Structure and catalytic mechanism of  $\beta$ -carbonic anhydrases. In *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, Ed. by S. Frost and R. McKenna (Series “Subcellular Biochemistry”, vol. 75) (Springer, Dordrecht, 2014), pp. 53–76. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2\_4
- Kasili R. W., Rai A. K., and Moroney J. V. LCIB functions as a carbonic anhydrase: evidence from yeast and *Arabidopsis* carbonic anhydrase knockout mutants. *Photosynth. Res.*, **156** (2), 193–204 (2023). DOI: 10.1007/s11120-023-01005-1
- Kikutani S., Nakajima K., Nagasato C., Tsuji Y., Miyatake A., and Matsuda Y. Thylakoid luminal  $\theta$ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113** (35), 9828–9833 (2016). DOI: 10.1073/pnas.1603112113
- Руденко Н. Н. и Иванов Б. Н. Нерешенные проблемы функционирования карбоангидраз в фотосинтезирующих клетках высших  $C_3$  растений. *Биохимия*, **86** (10), 1464–1478 (2021). DOI: 10.1134/S0006297921100072
- Shen J., Li Z., Fu Y., and Liang J. Identification and molecular characterization of the alternative spliced variants of beta carbonic anhydrase 1 ( $\beta$ CA1) from *Arabidopsis thaliana*. *Peer J.*, **9**, e12673 (2021). DOI: 10.7717/peerj.12673
- Fedorchuk T., Rudenko N., Ignatova L., and Ivanov B. The presence of soluble carbonic anhydrase in the thylakoid lumen of chloroplasts from *Arabidopsis* leaves. *J. Plant Physiol.*, **171** (11), 903–906 (2014). DOI: 10.1016/j.jplph.2014.02.009
- Rudenko N. N., Ignatova L. K., and Ivanov B. N. Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms. *Photosynth. Res.*, **91** (1), 81–89 (2007). DOI: 10.1007/s11120-007-9148-2
- Ignatova L., Zhurikova E., and Ivanov B. The presence of the low molecular mass carbonic anhydrase in photosystem II of  $C_3$  higher plants. *J. Plant Physiol.*, **232**, 94–99 (2019). DOI: 10.1016/j.jplph.2018.11.017
- Fedorchuk T. P., Kireeva I. A., Opanasenko V. K., Terentyev V. V., Rudenko N. N., Borisova-Mubarakshina M. M., and Ivanov B. N. Alpha carbonic anhydrase 5 mediates stimulation of ATP synthesis by bicarbonate in isolated *Arabidopsis* thylakoids. *Front. Plant Sci.*, **12**, 662082 (2021). DOI: 10.3389/fpls.2021.662082
- Nadeeva E. M., Ignatova L. K., Rudenko N. N., Vetoshkina D. V., Naydov I. A., Kozuleva M. A., and Ivanov B. N. Features of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* plants with knocked out gene of alpha carbonic anhydrase 2. *Plants*, **12** (9), 1763 (2023). DOI: org/10.3390/plants12091763
- Rudenko N. N., Borisova-Mubarakshina M. M., Ignatova L. K., Fedorchuk T. P., Nadeeva-Zhurikova E. M., and Ivanov B. N. Role of plant carbonic anhydrases under stress conditions. In *Plant Stress Physiol.*, Ed. by A. Hossain (Intech, London), pp. 301–325. DOI: 10.5772/intechopen.91971
- Polishchuk O. V. Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases. *Planta*, **253** (2), 58 (2021). DOI: 10.1007/s00425-020-03553-5
- Руденко Н. Н., Ветошкина Д. В., Федорчук Т. П. и Иванов Б. Н. Влияние освещенности растений при разном фотопериоде на уровень экспрессии генов

- карбоангидраз  $\alpha$ -и  $\beta$ -семейств в листьях *Arabidopsis thaliana*. *Биохимия*, **82** (9), 1318–1329 (2017). DOI: 10.1134/S000629791709005X
19. Weigel D. and Glazebrook J. *Arabidopsis: A Laboratory Manual* (CSHL Press, NY, 2002).
  20. Demmig-Adams B. and Adams W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Biol. Plant Mol. Biol.*, **43**, 599–626 (1992). DOI: 18.1146/annurev.pp.43.060192.003123
  21. Bailey S., Walters R. G., Jansson S., and Horton P. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta*, **213** (5), 794–801 (2001). DOI: 10.1007/s004250100556
  22. Ruban A. V. Non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants against photodamage. *Plant Physiol.*, **170**, 1903–1916 (2016).
  23. Rudenko N. N., Ignatova L. K., Naydov I. A., Novichkova N. S., and Ivanov B. N. Effect of CO<sub>2</sub> content in air on the activity of carbonic anhydrases in cytoplasm, chloroplasts, and mitochondria and the expression level of carbonic anhydrase genes of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -families in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plants*, **11** (16), 2113 (2022). DOI: org/10.3390/plants11162113
  24. Rudenko N. N., Fedorchuk T. P., Vetoshkina D. V., Zhurikova E. M., Ignatova L. K., and Ivanov B. N. Influence of knockout of *At4g20990* gene encoding  $\alpha$ -CA4 on photosystem II light-harvesting antenna in plants grown under different light intensities and day lengths. *Protoplasma*, **255**, 69–78 (2018). DOI: 10.1007/s00709-017-1133-9
  25. Rudenko N. N., Fedorchuk T. P., Terentyev V. V., Dymova O. V., Naydov I. A., Golovko T. K., Borisova-Mubarakshina M. M., and Ivanov B. N. The role of carbonic anhydrase  $\alpha$ -CA4 in the adaptive reactions of photosynthetic apparatus: the study with  $\alpha$ -CA4 knockout plants. *Protoplasma*, **257**, 489–499 (2020). DOI: 10.1007/s00709-019-01456-1
  26. Журикова Е. М., Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Мудрик В. А., Ветошкина Д. В. и Иванов Б. Н. Участие двух карбоангидраз альфа семейства в фотосинтетических реакциях *Arabidopsis thaliana*. *Биохимия*, **81**, 1463–1470 (2016).
  27. Sundby C., McCaffery S., and Anderson J. M. Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. *J. Biol. Chem.*, **268** (34), 25476–25482 (1993).
  28. Rochaix J.-D., Lemeille S., Shapiguzov A., Samol I., Fucile G., Willig A., and Goldschmidt-Clermont M. Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **367** (1608), 3466–3474 (2012). DOI: 10.1098/rstb.2012.0064
  29. Allen J. F. State transitions – a question of balance. *Science*, **299** (5612), 1530–1532 (2003). DOI: 10.1126/science.1082833
  30. Rudenko N. N., Permyakova N. V., Ignatova L. K., Nadeeva E. M., Zagorskaya A. A., Deineko E. V., and Ivanov B. N. The role of carbonic anhydrase  $\alpha$ CA4 in photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana* studied, using the Cas9 and T-DNA induced mutations in its gene. *Plants*, **11** (23), 3303 (2022). DOI: org/10.3390/plants11233303
  31. Stemler A. J. The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase. *Physiol. Plant.*, **99** (2), 348–353 (1997). DOI: 10.1034/j.1399-3054.1997.990220.x
  32. Pieterse C. M. J., Van Der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., and Van Wees S. C. M. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 489–521 (2012). DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055
  33. Wang C. and Shikanai T. Modification of activity of the thylakoid H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> antiporter KEA3 disturbs  $\Delta$ pH-dependent regulation of photosynthesis. *Plant Physiol.*, **181** (2), 762–773 (2019). DOI: 10.1104/pp.19.00766
  34. Sterling D., Alvarez B. V., and Casey J. R. The extracellular component of a transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger binds carbonic anhydrase IV. *J. Biol. Chem.*, **277** (28), 25239–46 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M202562200
  35. Игнатова Л. К., Руденко Н.Н., Христин М.С. и Иванов Б.Н. Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран. *Биохимия*, **71** (5), 651–659 (2006).
  36. Ignatova L. K., Rudenko N. N., Mudrik V. A., Fedorchuk T. P., and Ivanov B. N. Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII. *Photosynth. Res.*, **110**, 89–98 (2011). DOI: 10.1007/s11120-011-9699-0
  37. Punnett T. and Iyer R. V. The enhancement of photophosphorylation and the hill reaction by carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2335–2339 (1964).
  38. Cohen W. S. and Jagendorf A. T. Inhibition of energy-linked reactions in chloroplasts by polygalacturonate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **150** (1), 235–243 (1972). DOI: 10.1016/0003-9861(72)90031-8
  39. Федорчук Т. П., Опанасенко В. К., Руденко Н. Н. и Иванов Б. Н. Исследование стимуляции фотофосфорилирования бикарбонатом в изолированных тилакоидах: эффекты ингибиторов карбоангидраз. *Биол. мембраны*, **35** (1), 34–41 (2018).
  40. Missner A., Kügler P., Saporov S. M., Sommer K., Mathai J. C., Zeidel M. L., and Pohl P. Carbon dioxide transport through membranes. *J. Biol. Chem.*, **283** (37), 25340–25347 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M800096200
  41. Schuldiner S., Rottenberg H., and Avron M. Membrane potential as a driving force for ATP synthesis in chloroplasts. *FEBS Lett.*, **28** (2), 173–176 (1972). DOI: 10.1016/0014-5793(72)80704-X
  42. Pick U., Rottenberg H., and Avron M. The dependence of photophosphorylation in chloroplasts on delta pH and external pH. *FEBS Lett.*, **48** (1), 32–36 (1974). DOI: 10.1016/0014-5793(74)81055-0
  43. Tikhonov A. N. pH-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth. Res.*, **116** (2-3), 511–534 (2013). DOI: 10.1007/s11120-013-9845-y
  44. Руденко Н., Игнатова Л., Федорчук Т., Надеева Е., Козулёва М., Вильянен Д. и Иванов Б. Участие хлоропластных карбоангидраз в регуляции функциональной активности фотосинтетического ап-

- парата. В сб. *От первичных процессов фотосинтеза до альтернативной энергетики* (Пушино, 2022), с. 48.
45. Price G. D., von Caemmerer S., Evans J. R., Yu J.-W., Lloyd J., Oja V., Kell P., Harrison K., Gallagher A., and Badger M. R. Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. *Planta*, **193**, 331–340 (1994). DOI: org/10.1007/BF00201810.
  46. Weerasooriya H. N., DiMario R. J., Rosati V. C., Rai A. K., LaPlace L. M., Filloon V. D., Longstreth D. J., and Moroney J. V. Arabidopsis plastid carbonic anhydrase  $\beta$ CA5 is important for normal plant growth. *Plant Physiol.*, **190** (4), 2173–2186 (2022). DOI:10.1093/plphys/kiac451
  47. Sharma N., Froehlich J. E., Rillema R., Raba D. A., Chambers T., Kerfeld C. A., Kramer D. M., Walker B., and Brandizzi F. Arabidopsis stromal carbonic anhydrases exhibit non-overlapping roles in photosynthetic efficiency and development. *Plant J.*, **15** (2), 386–397 (2023). DOI:10.1111/tbj.16231
  48. Hu H., Boisson-Dernier A., Israelsson-Nordström M., Böhmer M., Xue S., Ries A., Godoski A. J., Kuhn J. M., and Schroeder J. I. Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat. Cell Biol.*, **12** (1), 87–93 (2010). DOI:10.1038/ncb2009
  49. DiMario R. J., Quebedeaux J. C., Longstreth D. J., Dassanayake M., Hartman M. M., and Moroney J. V. The cytoplasmic carbonic anhydrases  $\beta$ CA2 and  $\beta$ CA4 are required for optimal plant growth at low CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol.*, **171** (1), 280–293 (2016). DOI: 10.1104/pp.15.01990
  50. Hines K. M., Chaudhari V., Edgeworth K. N., Owens T. G., and Hanson M. R. Absence of carbonic anhydrase in chloroplasts affects C3 plant development but not photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118** (33), e2107425118 (2021). DOI: 10.1073/pnas.2107425118
  51. Perales M., Parisi G., Fornasari M. S., Colaneri A., Villarreal F., Gonzalez-Schain N., Echave J., Gomez-Casati D., Braun H. P., Araya A., and Zabaleta E. Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I. *Plant Mol. Biol.*, **56** (6), 947–957 (2004). DOI: 10.1007/s11103-004-6324-z
  52. Soto D., Córdoba J. P., Villarreal F., Bartoli C., Schmitz J., Maurino V. G., Braun H. P., Pagnussat G. C., and Zabaleta E. Functional characterization of mutants affected in the carbonic anhydrase domain of the respiratory complex I in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **83** (5), 831–844 (2015). DOI: 10.1111/tbj.12930

## The Involvement of Carbonic Anhydrases in Chloroplasts of C3 Higher Plants in Adaptation Changes of Photosynthetic Reactions

B.N. Ivanov\* and N.N. Rudenko\*

\*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,  
Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The present research shows that changes in vegetation conditions have implications both for the expression levels of genes encoding chloroplast carbonic anhydrases and the carbonic anhydrase activity of chloroplast compartments. The results of experiments with mutants of the genes of the chloroplast carbonic anhydrases indicate that the activity of the chloroplast carbonic anhydrases determines the nature of changes in photosynthesis reactions in response to changes in environmental conditions. Possible mechanisms are proposed for participation of carbonic anhydrase in light-dependent processes in the chloroplast. Based on these findings, a hypothesis that carbonic anhydrases in chloroplasts function interdependently is developed.

*Keywords: photosynthesis, higher plants, adaptation, chloroplasts, carbonic anhydrases*