

Plant Carbonic Anhydrases, their Role in Stress Defense and Possible Practical Use

N.N. Rudenko, L.K. Ignatova, E.M. Zhurikova, N.S. Novichkova,
B.N. Ivanov*

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

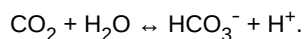
*E-Mail: ivboni@rambler.ru

Received March 7, 2018

The review presents data on the distribution of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms and their location in cellular compartments. The functions of carbonic anhydrases to provide a high photosynthesis rate as well as their participation in processes that are not directly related to photosynthesis, in particular in the transmission of signals to activate cascade of protective response genes are discussed. The results indicating the change in the activity and content of carbonic anhydrases in response to changes in the environmental conditions are given. Basing on own experimental studies, we propose the mechanisms of participation of the carbonic anhydrases of the higher plant chloroplast thylakoids in the protection of photosynthetic apparatus from excessive light. The possibilities of using the carbonic anhydrase mutants for practical purposes in agriculture, and as well of apply of carbonic anhydrases to bind the excessive CO₂ in the air are pointed out.

Key words: carbonic anhydrase, chloroplasts, thylakoids, photoinhibition

Карбоангидразы (КА) – это группа Zn-содержащих ферментов, биологических катализаторов, ускоряющих как реакцию гидратации двуокиси углерода, так и реакцию дегидратации бикарбоната:



В отсутствие КА указанные реакции протекают относительно медленно для обеспечения физиологических потребностей клетки. Не всегда учитываемым обстоятельством, но важным для клеточного метаболизма, является то, что в этих реакциях происходит как связывание, так и высвобождение протонов, участвующих во многих биохимических процессах. КА обнаружены в клетках всех живых организмов – прокариот, грибов, растений и животных. В соответствии с консервативными последовательностями нуклеотидов в генах их кодирующих, все КА были разделены на семь эволюционно независимых семейств (α , β , γ , δ , ζ , ϵ , η) (Hewett-Emmett, Tashian 1996, Liljas, Laurberg, 2000). Хотя эти ферменты обладают совершенно различными первичными, третичными и четвертичными структурами и различаются по организации активного центра, все они называются карбоангидразами, поскольку катализируют одну и ту же реакцию, используя аналогичные механизмы катализа.

Предполагается, что КА в растениях могут принимать участие в таких процессах как глюконеогенез, липогенез, поддержание баланса электролитов и pH в клетках и тканях, клеточная сигнализация, а также в реакциях, связанных с фотосинтезом, основным биосферным процессом включения неорганического углерода в органическое вещество. Ключевой этап фотосинтеза, фиксация углерода с образованием молекул первичных углеводов, происходит с участием фермента Рубиско, который для карбоксилирования рибулозо-1,5-бисфосфата использует CO_2 как субстрат. Во всех фотосинтезирующих организмах неорганический углерод из окружающей среды, чтобы достичь Рубиско, должен пересечь несколько клеточных мембран и водных фаз клеточных компартментов. Вопросы о роли КА в процессах

переноса неорганического углерода из атмосферы или водной среды к центрам карбоксилирования Рубиско, в частности, об участии этих ферментов в обратимой трансформации углекислого газа и бикарбоната в водных фазах и на мембранных границах остаются спорными. Однако можно полагать, что адаптация данных процессов к изменяющимся условиям среды, вызывающим стрессовый ответ растений, играет важную роль в предотвращении перехода стресса в дистресс.

Семейства карбоангидраз

Большинство α -КА являются мономерами с молекулярной массой около 30 кДа, сформированными преимущественно β -складчатыми структурами (Liljas *et al.*, 1972). Представители семейства α -КА были обнаружены в зубактериях, аскомицетах, водорослях, высших растениях и животных. Молекулярная масса β -КА выше, чем α -КА, и варьирует от 45 до 200 кДа. Структурные единицы β -КА - димеры (или псевдодимеры), которые могут объединяться с образованием тетрамеров и октамеров. Мономеры состоят, преимущественно, из α -спиралей с активным центром, содержащим один атом цинка. β -КА были обнаружены у бактерий, грибов, водорослей и высших растений.

Представители других семейств КА не имеют гомологии в аминокислотных последовательностях между собой, хотя их структуры имеют некоторые особенности, сходные с α - или β -КА. γ -КА присутствуют в бактериальных клетках (Alber, Ferry, 1994; Newman, 1994), в клетках диатомовых водорослей (Tachibana *et al.*, 2011), зеленых водорослей (Cardoll *et al.*, 2004) и в митохондриальном комплексе I *A. thaliana* (Perales *et al.*, 2005), где они образуют сферическую область, состоящую из пяти γ -КА. Функциональной единицей γ -КА является тример с тремя активными сайтами, образованными тремя остатками гистидина и H_2O , которые координируют атом Zn. ζ -КА были обнаружены в некоторых одноклеточных водорослях (Lane *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007), и δ -КА также впервые была обнаружена в клетках морской

диатомовой водоросли *Thalassiosira weissfloggi* (Cox et al., 2000), а позже присутствие КА этого семейства было показано в нескольких группах эукариотного фитопланктона: гаптофитов, празиофитов и динофлагеллят (McGinn, Morel, 2008). ϵ -КА была найдена в карбоксисомах бактерии *Thiobacillus neapolitanus* (Roberts et al., 1997). Функциональные КА ϵ -семейства были идентифицированы в цианобактериях *Prochlorococcus* sp. и *Synechococcus* sp (So et al., 2004). Основные гипотезы о роли δ -, ϵ - и ζ -КА предполагают их участие в механизме концентрирования CO_2 в прокариотах и одноклеточных водорослях (Lapointe et al., 2008; So et al., 2005).

Карбоангидразы в фотосинтезирующих организмах

В водных фотоавтотрофах, цианобактериях и водорослях, механизмы переноса неорганического углерода к местам карбоксилирования довольно хорошо изучены и установлено, что они включают КА и состоят из систем активного транспорта через плазматическую и/или хлоропластную мембрану и системы концентрирования CO_2 . Повышение содержания CO_2 вблизи Рубиско необходимо для обеспечения фотосинтеза, поскольку этот фермент цианобактерий и водорослей имеет низкое сродство к CO_2 . В цианобактериях, Рубиско вместе с КА располагается в структурах, известных как карбоксисомы. На свету карбоксисомы цианобактерий накапливают большое количество бикарбоната, и физиологическая роль КА карбоксисом, по-видимому, состоит в преобразовании накопленного HCO_3^- в CO_2 . В цианобактериях существуют также КА, которые ассоциированы с NADH-дегидрогеназным комплексом на плазматических мембранах, и их функционирование вовлечено в работу электрон-транспортной цепи этой мембраны (Maeda et al., 2002). Более подробную информацию о КА цианобактерий можно найти в обзоре (Kurpianova et al., 2013).

В водорослях, эукариотических фотосинтезирующих организмах, механизм концентри-

рования CO_2 более сложен, чем в прокариотических. В наиболее изученном модельном организме *Chlamydomonas reinhardtii* Рубиско находится в пиреноиде хлоропластов. В клетках этих водорослей присутствует, по меньшей мере, 12 изоформ КА, включая три α , шесть β и три γ или γ -подобных КА (Mogoney et al., 2011). В условиях низкого содержания CO_2 в воде клетки *Chlamydomonas* должны активно накапливать CO_2 . Поглощение неорганического углерода достигается за счет функционирования транспортных белков и КА. КА также участвуют в удержании в клетке неорганического углерода путем конверсии CO_2 , который поступает в клетку или генерируется клеткой во время дыхания, в бикарбонат, который в миллион раз хуже проникает через мембраны, чем углекислый газ (Mogoney et al., 2011).

В высших растениях разных видов имеется около двух десятков генов, кодирующих КА α -, β - и γ -семейств. Количество генов примерно одинаково у мха и двудольных покрытосеменных, меньше число генов у однодольных растений (DiMario et al., 2017). КА, как мембранные, так и растворимые, были обнаружены почти во всех клеточных компартментах, некоторые из которых содержат несколько изоформ КА. Шесть КА, принадлежащих β - и γ -семействам, были обнаружены в митохондриях, и есть данные о присутствии, по меньшей мере, шести КА в хлоропластах. На сегодняшний день пока мало работ, посвященных исследованию α -КА, тогда как КА β -семейства изучены гораздо лучше из-за существенно большего содержания транскриптов их генов, а также из-за большего содержания белка. Найдено, что содержание транскриптов большинства генов β -семейства в несколько раз превышает количество транскриптов α -КА как в различных органах *Sorghum bicolor* (Makita et al., 2015), так и в листьях *Arabidopsis thaliana* (Rudenko et al., 2017).

В высших растениях основной субстрат фотосинтеза, неорганический углерод, поглощается в форме газа через устьица в листьях. Увеличение последующего поглощения CO_2 клетками может достигаться за счет переноса H^+ из клеток в

периплазматическое пространство, что было показано для водных покрытосеменных (Price, 1985, Prins, Helder, 1985). Этот процесс в присутствии КА позволяет повысить внешнюю концентрацию CO_2 , что увеличивает его поток в клетку через плазмалемму. Впервые существование КА в плазматической мембране высших растений было показано на протопластах гороха (Ignatova, Romanova, 1992) и было подтверждено для нескольких видов растений с различными типами углеродного метаболизма (Utsunomia, Muto, 1993). В работе (Fabre *et al.*, 2007) было найдено, что плазмалемма содержит β -КА4. Схема участия плазмалеммной КА в транспорте неорганического углерода в цитоплазму представлена в работе (Ignatova *et al.*, 2001). Цитоплазма клеток листьев *A. thaliana* содержит несколько КА β -семейства: β -КА2, β -КА3 (Fabre *et al.*, 2007) и одну из форм β -КА4 (DiMario *et al.*, 2016). В хлоропластах *A. thaliana* обнаружены КА α - и β -семейств: α -КА1 (Villarejo *et al.*, 2005), α -КА2 (Zhurikova *et al.*, 2016) и α -КА4 (Friso *et al.*, 2004), β -КА1, β -КА5 (Fabre *et al.*, 2007).

Функции карбоангидраз стромы хлоропластов в стрессовых условиях

До сих пор нет ясного представления о функциях многочисленных КА высших растений. Например, считается, что высшие СЗ растения не обладают механизмом концентрирования CO_2 . Содержание углекислого газа в жидкой фазе листьев не очень высоко, примерно 11 мкМ при существующей в настоящее время концентрации CO_2 в атмосфере. Когда на свету значение рН стромы хлоропласта, где находится Рубиско в высших растениях, увеличивается до 7,7, содержание бикарбоната там достигает 230 мкМ при 25°C; с некоторым допущением этот факт можно рассматривать как концентрирование неорганического углерода. Скорость спонтанной реакции дегидратации бикарбоната для появления субстрата Рубиско, CO_2 , весьма низка, что подразумевает роль КА в ускорении подачи CO_2 к центрам карбоксилирования, однако, прямых данных о роли фермента в этом процессе пока не получено. Надо

отметить, что КА стромы хлоропласта является самой обильной КА листа, и по своему содержанию уступает только Рубиско. Стандартным подходом для изучения функций ферментов служит помещение растений, как дикого типа, так и мутантов, в измененные условия среды. Именно в таких условиях, когда растения испытывают стресс, и было в большинстве случаев выявлена роль ряда КА в метаболизме растения.

В некоторых работах не было найдено связи активности КА с фотосинтезом. Так, выращивание растений в условиях дефицита цинка показало, что при резком падении активности КА скорость фотосинтеза в этих растениях почти не изменялась (Edwards, Mohamed, 1973). В трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*, содержащих 10% или менее активности растворимой β -КА по сравнению с растениями дикого типа (ДТ), не наблюдалось существенных отличий в активности Рубиско, содержании хлорофилла, проводимости устьиц, сухой массы на единицу площади листа, а также не изменялось соотношение парциального давления внутриклеточного и внешнего CO_2 по сравнению с растениями дикого типа (Price *et al.*, 1994). Однако в таких мутантных растениях был изменен изотопный состав углерода сухого вещества листьев. В те же годы, другая группа исследователей обнаружила, что растения компенсировали снижение активности КА, увеличивая проницаемость устьиц, что приводило, однако, к более высокой скорости потери воды (Majeau *et al.*, 1994). Выращивание растений в условиях дефицита азота в почве приводило к существенному снижению активности растворимых КА в листьях растений сахарной свёклы, а при восстановлении азотного питания наблюдалось постепенное обратное повышение активности КА до 80% от исходных значений (Novichkova, *in preparation*).

В растениях *Phaseolus vulgaris*, выращенных при повышенном содержании CO_2 в воздухе, наблюдалось значительное снижение активности как КА, так и Рубиско (Porter, Grodzinski, 1984). Активность этих ферментов и содержание транскриптов генов, их кодирующих, были снижены в

растениях *Pisum sativum*, выращенных при 1000 ppm CO₂, по сравнению с растениями, выращенными при атмосферной концентрации углекислоты; перенос растений гороха, выращенных при концентрации углекислоты 1000 ppm, в условия нормального содержания CO₂ в атмосфере, приводил к быстрому увеличению уровня экспрессии генов КА и Рубиско, после чего происходило увеличение активности соответствующих ферментов в листьях (Majeau, Coleman, 1996). Позднее было обнаружено, что одна из изоформ КА в строме хлоропластов, связана с Рубиско на внешней стороне тилакоидной мембраны (Lazova, Stemler, 2008). Адаптация растений сахарной свёклы к высокой концентрации углекислоты, 1000 ppm, приводила к снижению как активности растворимых и мембраносвязанных КА, так и активности Рубиско (Ignatova et al., 2005).

Исследования, проведённые с использованием двойных мутантов, показали, что выключение синтеза нескольких КА оказывало влияние на фотосинтез. Растения с нокаутированными генами, кодирующими β-KA1 и β-KA4, которые расположены в строме и плазмалемме, соответственно, демонстрировали более высокую, по сравнению с растениями дикого типа, проводимость устьиц (Hu et al., 2010). Известно, что при высокой концентрации CO₂ в воздухе устьица закрыты, но до сих пор не были известны связывающие CO₂ специфические белки, которые регулируют открывание устьиц. Авторы показали, что β-KA4 и β-KA1 принимают участие в регуляции газообмена между атмосферой и листьями путем открывания/закрывания устьичной щели за счёт участия в передаче сигнала о содержании углекислого газа (Хуе et al., 2011). Эти факты свидетельствуют о том, что КА поддерживают эффективность фотосинтеза, а их активность, реагируя на внешние условия, обеспечивает необходимую растению скорость и направление метаболизма в новых условиях.

Существуют данные, что активность β-KA1 может быть важна не только для фотосинтетических процессов, но, например, для синтеза этилена при прорастании растений, процесса, также зависящего

от CO₂ (Kende, 1993). Семена мутанта *A. thaliana* с нокаутированным геном, кодирующим β-KA1, показали значительное снижение всхожести на стерильных искусственных средах при атмосферной концентрации CO₂ в воздухе. Способность к прорастанию у этих мутантов восстанавливалась до таковой ДТ при выращивании при высоком содержании CO₂ в атмосфере (1500 мкл/л) или после добавления в среду сахарозы (Ferreira et al., 2008).

Для понимания роли КА в растениях может оказаться важным, что КА β-семейства, расположенная в строме хлоропласта, не только проявляет КА активность, но также может связывать салициловую кислоту (СК) (Slaymaker et al., 2002). СК, как известно, играет роль в сигнальных каскадах, которые активируют синтез вовлечённых в защиту растений от окислительного стресса белков, как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, а также увеличивают активность этих белков. Было показано, что интенсивность экспрессии гена стромальной КА реагировала на сигналы, связанные с активацией систем защиты от биотического стресса: на заражение фитофторой растений картофеля (Restrepo et al., 2005), на обработку томатов микотоксином фузикокином (Frick, Schaller, 2002) и на обработку метилжасмонатом растений арабидопсиса (Schenk et al., 2000). Растения *Nicotiana benthamiana*, в которых был выключен синтез гена, кодирующего хлоропластную растворимую КА, проявляли большую восприимчивость к поражению фитофторой (Restrepo et al., 2005). Существует гипотеза о том, что роль стромальной β-KA в защите от стресса может быть связана с её участием в биосинтезе жирных кислот. Показано (Hoang, Chapman, 2002), что более низкое содержание стромальной β-KA приводит к подавлению синтеза жирных кислот и, как следствие, к более низкой экспрессии генов, которые регулируются жасмоновой кислотой (ЖАК), другой сигнальной молекулой, запускающей альтернативный каскад генов защитного ответа. Омега-6 жирные кислоты - промежуточные соединения биосинтеза ЖАК, синтезируются в

строме хлоропластов. Способность стромальной β -КА связывать СК может быть приводит к активации генов ЖАК-пути, поскольку ЖАК и СК являются антагонистами (Pieterse *et al.*, 2012). Низкое содержание КА в строме может приводить к ингибированию биосинтеза жирных кислот и, кроме того, к недостаточному связыванию СК, и оба эти механизма могут приводить к ингибированию ЖАК-пути (Rudenko *et al.*, 2015).

Среди белков хлоропластов была обнаружена α -КА1, и, используя иммуноблоттинг, было показано, что эта КА расположена в строме хлоропласта (Villarejo *et al.*, 2005). Данные об уменьшении фотосинтетической активности, а также способности накапливать крахмал в растениях с нокаутом гена, кодирующего α -КА1 (Buren, 2010) могут свидетельствовать о роли α -КА1 для фотосинтеза, и, вполне возможно, что эта КА участвует в поставке CO_2 Рубиско. Используя праймеры, сконструированные с учетом возможного альтернативного сплайсинга матричной РНК гена *At3g01500*, кодирующего β -КА1, было обнаружено, что обе формы присутствуют в листьях арабидопсиса (Rudenko *et al.*, 2017). Увеличение освещенности растений приводило к изменению содержания транскриптов большинства генов, кодирующих КА хлоропластов, и при этом наблюдалось существенное различие интенсивности экспрессии генов α -КА1 и двух форм β -КА1. Противоположный эффект увеличения интенсивности света на содержание транскриптов двух форм РНК гена, кодирующего β -КА1, возрастание содержания транскриптов одной формы и уменьшение - другой, может указывать на различные функции кодируемых ими белков. Увеличение экспрессии α -ка1 и одной из форм РНК гена β -ка1 с увеличением освещенности предполагает их кооперацию в поставке CO_2 Рубиско (Rudenko *et al.*, 2017). Сходный эффект уменьшения содержания транскриптов генов, кодирующих β -ка4, и другой формы РНК гена β -ка1 в условиях высокой освещенности предполагает, что в совместной работе с β -КА4 по контролю газообмена растения (Hu *et al.*, 2010) участвует именно эта

форма β -КА1. Вообще, можно предположить на основании ряда имеющихся данных, что КА растений, как правило, совместно контролируют тот или иной процесс метаболизма.

Роль КА тилакоидов в защите от избыточного освещения

Активность КА в тилакоидных мембранах высших растений была обнаружена в начале 80-х годов. Ряд свойств отличает КА активность тилакоидных мембран от активности растворимой стромальной КА. В частности, дегидратационная активность тилакоидной КА зависит от pH с максимумом при 6,8-7,0, а активность растворимой КА не зависит от pH (Ignatova *et al.*, 1998). Было показано также, что антитела против растворимой КА из шпината показали сильную перекрестную реакцию с растворимой КА из хлоропластов гороха, но не с тилакоидами, проявляющими сходную КА активность (Moskvin *et al.*, 2004). В наших работах была обнаружена растворимая КА, расположенная в люмене тилакоидов, принадлежащая β -семейству (Rudenko *et al.*, 2007, Fedorchuk *et al.*, 2014), и было высказано предположение, что это β -КА5, выявленная ранее в хлоропластах арабидопсиса (Fabre *et al.*, 2007). Уровень экспрессии гена *At4g33580*, кодирующего β -КА5, на 2-3 порядка ниже, чем, например, гена *At3g01500*, кодирующего стромальную β -КА1, в растениях, выращенных при атмосферной концентрации CO_2 в условиях низкой освещенности (Rudenko *et al.*, 2017). При этом β -КА5 - единственная КА, нокаут гена которой приводил к значительным изменениям фенотипа арабидопсиса в оптимальных условиях выращивания (J. Moroney, *personal communication*).

В 2004 г. среди белков тилакоидных мембран была выявлена α -КА4 (Friso *et al.*, 2004). Нами показано, что свежий вес листьев растений, нокаутированных по гену *α-ка4*, на 10% больше, содержание крахмала и H_2O_2 значительно выше, а скорость ассимиляции CO_2 листьями ниже по сравнению с растениями ДТ; при этом эффективный квантовый выход фотосинтетического электронного транспорта при насыщающих интенсивности света и

концентрации CO_2 выше, чем в ДТ, а нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* листьев (НФХТ) ниже (Zhurikova et al., 2015; Zhurikova et al., 2016; Rudenko et al., 2018). Содержание транскриптов гена *At4g20990*, кодирующего α -КА4, было в два раза выше при высокой (400 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), чем при низкой освещенности (80 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) при выращивании в условиях «короткого» светового дня (8 часов день/16 часов ночь) и в 16 раз выше в условиях «длинного дня» (16 часов день/8 часов ночь) (Rudenko et al., 2017). Таким образом, описанные выше эффекты нокаута гена, кодирующего α -КА4, *At4g20990*, согласуются со значительным повышением уровня экспрессии этого гена у растений при высокой освещенности, то есть, в условиях, при которых потребность в развитии НФХТ, защищающего ФС2 от фотоингибирования, увеличивается. Поскольку изменение в НФХТ были обусловлены изменением в величине, так называемого энергозависимого тушения (части НФХТ, связанной с накоплением протонов в люмене тилакоидов), в цитированных работах мы предположили, что α -КА4 участвует в протонировании либо белка PsbS, либо виолаксантиндеэпоксидазы. Роль α -КА4 в механизме НФХТ, развивающегося в антенне ФС2, подтверждалась тем фактом, что нокаут гена *At4g20990* затрагивал как содержание белков светособирающего комплекса ФС2, так и уровень экспрессии генов, кодирующих эти белки (Rudenko et al., 2018): содержание основных белков антенны ФС2, Lhcb1 и Lhcb2, было меньше в нокаутах по α -ка4, чем в растениях ДТ.

Нокаут α -КА2 показал противоположные изменения свойств растений по сравнению с возникающими в результате нокаута α -КА4. Свежий вес листьев, отношение содержания хлорофилла *a* к хлорофиллу *b*, содержание крахмала и H_2O_2 в листьях было ниже, чем в растениях ДТ, тогда как скорость ассимиляции CO_2 была выше (Zhurikova et al., 2015; Zhurikova et al., 2016; Rudenko et al., 2018). В нокаутах по α -ка2 эффективный квантовый выход фотосинтетического электронного транспорта был

ниже, чем в ДТ, тогда как НФХТ – выше, причем тоже за счет энергозависимого компонента. Совокупность физиологических эффектов, проявляющихся при выключении генов α -ка2 и α -ка4, позволяет предположить, что не только α -КА4, но и α -КА2 находится в хлоропластах, участвуя в функционировании противоположных «регуляторных путей», реагирующих на изменения внешних условий. Такой феномен регулирования метаболических состояний, когда имеются два фермента, противоположным образом влияющие на то или иное состояние, например, как киназа и фосфатаза на фосфорилирование белков, хорошо известен. Обнаружение этого явления при регулировании НФХТ весьма важно, т.к. показывает, что изменение НФХТ, участвующего в защите фотосинтетического аппарата от фотоингибирования, находится под оперативным контролем, позволяющим быстро увеличивать тепловую диссипацию солнечной энергии при ее избытке, и уменьшать эту диссипацию, когда она могла бы уменьшить использование необходимой для осуществления фотосинтеза энергии при ее дефиците на низком свете.

Поскольку регуляция энергозависимого компонента НФХТ с участием α -КА4 и α -КА2 основана на изменении концентрации протонов в люмене, то через зависящую от этой концентрации скорость окисления пластогидрохинона цитохромным комплексом в фотосинтетической электрон-транспортной цепи они могут регулировать и окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона. Это состояние, согласно ряду исследований (Allen 2002; Maciejewska et al., 2002; Frigerio et al., 2007), регулирует приспособительную реакцию растений в ответ на изменение условий среды. Кроме того, концентрация протонов важна для функциональной активности таких ферментов как тиоредоксины и киназы, активность которых определяется состоянием сульфгидрильных групп. Возможно, функционирование тилакоидных КА может влиять на окислительно-восстановительное состояние сульфгидрильных групп киназы STN7, направленных в тилакоидный люмен. Этот фермент фосфорилирует белки внешней антенны

светособирающего комплекса ФС2, иницируя одну из стадий state transitions, а именно, перемещение части этой антенны от ФС2 к ФС1, что является также одним из механизмов защиты от фотоингибирования.

Перспективы практического использования знаний о функциях карбоангидраз

Было найдено (Hu *et al.*, 2010), что мутанты, гиперэкспрессирующие β -КА4 и β -КА1, обладают более высокой эффективностью использования воды, чем растения ДТ. Эти данные демонстрируют возможность создания, путём манипулирования генами КА, новых улучшенных линий сельскохозяйственных культур с уменьшенной потерей воды за счет транспирации. Как было рассмотрено выше, есть много данных о том, что стромальная КА играет роль в защите растений от стресса, что также создает возможность создания линий сельскохозяйственных растений с гиперэкспрессией β -КА1, обладающих более высокой устойчивостью к стрессовым воздействиям.

Обнаруженные нами свойства мутантных растений, нокаутированных по гену, кодирующему α -КА4, способных к активному накоплению крахмала и, кроме того, обладающих на 10-15% большим весом, чем растения ДТ, также открывают перспективу применения мутантов по гену α -ка4 в сельском хозяйстве. Крахмал, один из основных натуральных углеводов, является главным запасаемым продуктом во многих важных сельскохозяйственных растениях, и одним из значимых источников энергии для человеческого организма. Кроме того, крахмал используется для производства более 500 продуктов в пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной, химической и фармацевтической промышленности, а также для получения полимеров и топлива. Описанные выше исследования функций α -КА4 арабидопсиса могут быть использованы для идентификации генов, кодирующих КА, которые выполняют те же функции в растениях, имеющих практическое значение, что позволит нокаутировать идентифицированные гены для получения линий растений с многократно увеличенным содержанием крахмала в листьях или запасующих органах.

В литературе имеются предположения об использовании термостабильных КА для снижения содержания углекислого газа в атмосфере (Wang *et al.*, 2011), существенно возросшего в течение последних десятилетий, что, как известно, ведёт к парниковому эффекту. Предполагается, что процесс извлечения CO_2 из воздуха должен включать катализируемую КА реакцию CO_2 с химическим растворителем с образованием промежуточного соединения, которое после термической обработки освобождает исходный растворитель и CO_2 . Чистый CO_2 сжижается для последующей транспортировки и хранения.

REFERENCES

- Alber B.E. and Ferry J.G. (1994) A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6909-6913.
- Allen J.F. (2002) Plastoquinone redox control of chloroplast thylakoid protein phosphorylation and distribution of excitation energy between photosystems: discovery, background, implications. *Photosynth. Res.*, **73**, 139-148.
- Buren S. (2010) *Targeting and function of CAH1- Characterisation of a novel protein pathway to the plant cell chloroplast*. PhD Thesis, Umea University, Sweden.
- Cardol P., Vanrobaeys F., Devreese B., Van Beeumen J., Matagne R.F. and Remacle C. (2004) Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*, **1658**, 212-224.
- Cox E.H., McLendon G.L., Morel F.M.M., Lane T.W., Prince R.C., Pickering I.J. and Graham N.G. (2000) The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase. *Biochemistry*, **39(40)**, 12128-12130.
- DiMario R.J., Clayton H., Mukherjee A., Ludwig M. and Moroney J.V. (2017) Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles. *Mol. Plant.*, **10**, 30-46.

- DiMario R.J., Quebedeaux J.C., Longstreth D., Dassanayake M., Hartman M.M. and Moroney J.V. (2016) The cytoplasmic carbonic anhydrases β CA2 and β CA4 are required for optimal plant growth at low CO₂. *Plant Physiol.*, **171**(1), 280-293.
- Edwards G.E. and Mohamed A.K. (1973) Reduction of carbonic anhydrase activity in zinc deficient leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci.*, **13**, 351-354.
- Fabre N., Reiter I.M., Becuwe-Linka N., Genty B. and Rumeau D. (2007) Characterization and expression analysis of genes encoding alpha and beta carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, **30**, 617-629.
- Fedorchuk T., Rudenko N., Ignatova L. and Ivanov B. (2014) The presence of soluble carbonic anhydrase in the thylakoid lumen of chloroplasts from *Arabidopsis* leaves. *J. Plant Physiol.*, **171**(11), 903-906.
- Ferreira F.J., Guo C. and Coleman J.R. (2008) Reduction of plastid-localized carbonic anhydrase activity results in reduced *Arabidopsis* seedling survivorship. *Plant Physiol.*, **147**, 585-594.
- Frick U.B. and Schaller A. (2002) cDNA microarray analysis of fusicoccin-induced changes in gene expression in tomato plants. *Planta*, **216**, 83-94.
- Frigerio S., Campoli C., Zorzan S., Fantoni L.I., Crosatti C., Drepper F., Haehnel W., Cattivelli L., Morosinotto T. and Bassi R. (2007) Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level. *J. Biol. Chem.*, **282**, 29457-29469.
- Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.B., Rudella A., Sun, Q. and van Wijk K.J. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database, *Plant Cell*, **16**, 478-499.
- Hewett-Emmett D. and Tashian R.E. (1996) Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α , β , and γ -carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **5**, 50-77.
- Hoang C.V. and Chapman K.D. (2002) Biochemical and molecular inhibition of plastidial carbonic anhydrase reduces the incorporation of acetate into lipids in cotton embryos and tobacco cell suspensions and leaves. *Plant Physiol.*, **128**, 1417-1427.
- Hu H., Boisson-Dernier A., Israelsson-Nordstrom M., Bohmer M., Xue S., Ries A., Godoski J., Kuhn J.M. and Schroeder J.I. (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 87-93.
- Ignatova L.K., Moskvina O.V., Romanova A.K. and Ivanov B.N. (1998) Carbonic anhydrases in the C3-plant leaf cell. *Aust. J. Plant Physiol.*, **25**, 673-677.
- Ignatova L.K. and Romanova A.K. (1992) Involvement of carbonic anhydrase in inhibition of photosynthesis of pea protoplasts by CO₂ excess. *Sov. Plant Physiol.*, **39**, 461-465.
- Ignatova L. K., Moskvina O. V., and Ivanov B. N. (2001) Effects of carbonic anhydrase inhibitors on proton exchange and photosynthesis in pea protoplasts. *Russ. J. Plant Physiol.*, **48**, 467-472.
- Ignatova L.K., Novichkova N.S., Mudrik V.A., Lyubimov V.Y., Ivanov B.N. and Romanova A.K. (2005) Growth, photosynthesis, and metabolism of sugar beet at an early stage of exposure to elevated CO₂. *Russ. J. Plant Physiol.*, **52**(2), 158-164.
- Ignatova L.K., Rudenko N.N., Khristin M.S. and Ivanov B.N. (2006) Heterogeneous origin of carbonic anhydrase activity of thylakoid membranes. *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 525-532.
- Ignatova L.K., Rudenko N.N., Mudrik V.A., Fedorchuk T.P. and Ivanov B.N. (2011) Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII. *Photosynth. Res.*, **110**, 89-98.
- Kende H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Plant Mol. Biol.*, **44**, 283-307.
- Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Sung M.C., Park Y.I., Los D.A. and Pronina N.A. (2013) CO₂-concentrating mechanism in cyanobacterial photosynthesis: organization, physiological role, and evolutionary origin. *Photosynth. Res.*, **117**, 133-146.

- Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C. and Morel F.M.M. (2005) A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, **435**, 42-43.
- Lapointe M., MacKenzie T.D.B. and Morse D. (2008) An external δ -carbonic anhydrase in a free-living marine dinoflagellate may circumvent diffusion-limited carbon acquisition. *Plant Physiol.*, **147**, 1427-1436.
- Lazova G.N. and Stemler A.J. (2008) A 160 kDa protein with carbonic anhydrase activity is complexed with rubisco on the outer surface of thylakoids. *Cell Biol. Int.* **32**, 646-653.
- Liljas A., Kannan K.K. and Bergsten P. (1972) Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nature. New Biol.*, **235**, 131-137.
- Liljas A. and Laurberg M. (2000) A wheel invented three times. The molecular structures of the three carbonic anhydrases. *EMBO Reports*, **1(1)**, 16-17.
- Lu Y.K. and Stemler A.J. (2002) Extrinsic photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts. *Plant Physiol.*, **128**, 643-649.
- Maciejewska U., Polkowska-Kowalczyk L., Swiezewska E. and Szkopinskae A. (2002) Plastoquinone: possible involvement in plant disease resistance. *Acta Biochim. Pol.*, **49**, 775-780.
- Maeda S., Badger M.R. and Price G.D. (2002) Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol. Microbiol.*, **43**, 425-435.
- Majeau N., Arnoldo M. and Coleman J.R. (1994) Modification of carbonic anhydrase activity by antisense and over-expression constructs in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, **25**, 377-385.
- Majeau N., and Coleman J.R. (1996) Effect of CO₂ concentration on carbonic anhydrase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea. *Plant Physiol.*, **112(2)**, 569-574.
- Makita Y., Shimada S., Kawashima, M., Kondou-Kuriyama, T., Tetsuro Toyoda, T., and Matsui, M. (2015) MOROKOSHI: transcriptome database in *Sorghum bicolor*. *Plant Cell Physiol.*, **56**, e6 (1-8).
- McGinn P.J. and Morel F.M. (2008) Expression and regulation of carbonic anhydrases in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* and in natural phytoplankton assemblages from Great Bay, New Jersey. *Physiol. Plant.*, **133(1)**, 78-91.
- Moroney J.V., Ma Y., Frey W.D., Fusilier K.A., Pham T.T., Simms T.A., DiMario R.J., Yang J. and Mukherjee B. (2011) The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynth. Res.*, **109**, 133-149.
- Moskvin O.V., Shutova T.V., Khristin M.S., Ignatova L.K., Villarejo A., Samuelsson G., Klimov V.V. and Ivanov B.N. (2004) Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids. *Photosynth. Res.*, **79(1)**, 93-100.
- Newman T., deBruijn F.J. and Green P. (1994) Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.*, **106**, 1241-1255.
- Novichkova N.S. *in preparation*.
- Park H., Song B. and Morel F.M.M. (2007) Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ. Microbiol.*, **9**, 403-413.
- Perales M., Eubel H., Heinemeyer J., Colaneri A., Zabaleta E. and Braun H.P. (2005) Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I + III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*. *J. Mol. Biol.*, **350**, 263-277.
- Pieterse C.M., Van Der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., and Van Wees S.C. (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 489-521.
- Porter M.A. and Grodzinski B. (1984) Acclimation to high CO₂ in bean carbonic anhydrase and ribulose bisphosphate carboxylase. *Plant Physiol.*, **74**, 413-416.
- Price G.D., Badger M.R., Bassett M.E., and Canberra A.C. (1985) Involvement of plasmalemmasomes and carbonic anhydrase in photosynthetic utilization

- of bicarbonate in *Chara corallina*, *Austral. J. Plant Physiol.*, **12**, 241-256.
- 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. (1994) Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by anti-sense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO₂ assimilation. *Planta*, **193**, 331-340.
- Prins H.B.A. and Helder R.J. (1985) HCO₃⁻ assimilation by *Potamogeton lucens*: polar cation transport and the role of H⁺ extrusion. In Lucas W. J., and Merry J. A. (eds.) *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms*, American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA, pp. 271-286.
- Pronina N.A., Allakhverdiev S.I., Kupriyanova E.V., Klyachko-Gurvich G.L. and Klimov V.V. (2002) Carbonic anhydrase in subchloroplast particles of pea plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, **49(3)**, 303-310.
- Restrepo S., Myers K.L., del Pozo O., Martin G.B., Hart A.L., Buell C.R., Fry W.E. and Smart C.D. (2005) Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol. Plant-Microbe Int.*, **18(9)**, 913-922.
- Roberts S.B., Lane T.W. and Morel F.M.M. (1997) Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **33**, 845-850.
- Rudenko N.N., Ignatova L.K. and Ivanov B.N. (2007) Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms. *Photosynth. Res.*, **91(1)**, 81-89.
- Rudenko N.N., Ignatova L.K., Fedorchuk T.P. and Ivanov B.N. (2015) Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. *Biochemistry (Moscow)*, **80(6)**, 674-687.
- Rudenko N.N., Vetoshkina D.V., Fedorchuk T.P. and Ivanov B.N. (2017) Effect of light intensity under different photoperiods on expression level of Carbonic Anhydrase genes of the α- and β-families in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Biochemistry (Moscow)*, **82(9)**, 1025-1035.
- Rudenko N.N., Fedorchuk T.P., Vetoshkina D.V., Zhurikova E.M., Ignatova L.K. and Ivanov B.N. (2018) Influence of knockout of *At4g20990* gene encoding α-CA4 on photosystem II light-harvesting antenna in plants grown under different light intensities and day lengths. *Protoplasma*, **255(1)**, 69-78.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C. and Manners J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 11655-11660.
- Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., del Pozo O., Martin G.B., Klessig D. (2002) The tobacco salicylic acid binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99(10)**, 11640-11645.
- So A.K.C. and Espie G.S. (2005) Cyanobacterial carbonic anhydrases. *Can. J. Bot.*, **83**, 721-734.
- So A.K.C., Espie G.S., Williams E.B., Shively J.M., Heinhorst S. and Cannon G.C. (2004) A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. *J. Bacteriol.*, **186**, 623-630.
- Tachibana M., Allen A. E., Kikutani S., Endo Y., Bowler C. and Matsuda Y. (2011) Localization of putative carbonic anhydrases in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. *Photosynth. Res.*, **109**, 205-221.
- Utsunomia E. and Muto S. (1993) Carbonic anhydrase in the plasma membranes from C3 and C4 plants. *Physiol. Plant.*, **88**, 413-419.
- Villarejo A., Buren S., Larsson S., Dejardin A., Monne M., Rudhe C., Karlsson J., Jansson S., Lerouge P., Rolland N., von Heijne G., Grebe M., Bako L. and Samuelsson G. (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway *en route* to the higher plant chloroplast, *Nature Cell Biol.*, **7**, 1224-1231.

- Wang M., Lawal A., Stephenson P., Sidders J. and Ramshaw C. (2011) Post-combustion CO₂ capture with chemical absorption: A state of the art review. *Chem. Eng. Res. Des.*, **89**, 1609-1624.
- Xue S., Hu H., Ries A., Merilo E., Kollist H. and Schroeder J.I. (2011) Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO₂ signal transduction in guard cell. *EMBO J.*, **30(8)**, 1645-1658.
- Zhurikova E.M., Ignatova L.K., Semenova G., Rudenko N.N., Mudrik V.A. and Ivanov B.N. (2015) Effect of knockout of α -carbonic anhydrase 4 gene on photosynthetic characteristics and starch accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Russ. J. Plant Physiol.*, **62**, 564-569.
- Zhurikova E.M., Ignatova L.K., Rudenko N.N., Mudrik V.A., Vetoshkina D.V. and Ivanov B.N. (2016) The participation of two carbonic anhydrases of alpha family in photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry (Moscow)*, **81(10)**, 1182-1187.