

УДК 577.1

## НЕРЕШЁННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КАРБОАНГИДРАЗ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ ВЫСШИХ СЗ-РАСТЕНИЙ

### Обзор

© 2021 Н.Н. Руденко, Б.Н. Иванов\*

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН Федерального исследовательского центра  
«Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», 142290 Пушкино,  
Московская обл., Россия; электронная почта: ivboni@rambler.ru*

Поступила в редакцию 06.06.2021

После доработки 09.08.2021

Принята к публикации 09.08.2021

В обзоре представлены современные данные о карбоангидразах, обнаруженных в различных компартментах фотосинтезирующих клеток высших СЗ-растений. Рассмотрены имеющиеся на настоящий момент сведения об уровнях экспрессии генов некоторых из этих карбоангидраз и их зависимости от факторов среды и возраста растения. Проанализированы имеющиеся гипотезы о функциях карбоангидраз плазмалеммы, цитоплазмы, а также стромы и тилакоидов хлоропластов, прежде всего, об участии этих ферментов в подаче молекул углекислого газа рибулозобисфосфаткарбоксилазе (Рубиско). Подробно описаны трудности установления физиологической роли карбоангидраз в клетках растений.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** карбоангидраза, высшие растения, фотосинтез, хлоропласт, тилакоиды.

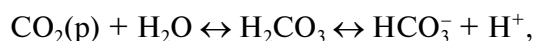
**DOI:** 10.31857/S0320972521100055

### ВВЕДЕНИЕ

Первое упоминание о присутствии в тканях фермента, функционирование которого зависит от  $\text{CO}_2$ , появилось в 1928 году [1]; в 1933 году этот фермент был назван карбоангидразой [2]. После его очистки было обнаружено, что он содержит цинк в активном центре [3]. Карбоангидразы (КА) – одна из немногих, если не единственная группа ферментов, представленная во всех живых организмах, от древних прокариот до млекопитающих. Обнаруженные к настоящему времени КА разделены на 8 семейств на основании консервативных нуклеотидных последовательностей их генов [4–6]; семейства названы буквами греческого алфавита от  $\alpha$  до  $\iota$ . Представители этих семейств не гомологичны, а сами семейства, как полагают, возникали независимо в ходе эволюции [4]. КА разных семейств различаются не только белковой частью,

но и некоторыми структурными элементами реакционного центра [7].

Отнесение ферментов к КА обусловлено тем, что их основная, или единственная, каталитическая активность – катализ реакций гидратации углекислого газа  $\text{CO}_2$  и дегидратации бикарбоната  $\text{HCO}_3^-$ :



где  $\text{CO}_2(\text{p})$  – растворенный углекислый газ. Ферменты значительно увеличивают скорость обеих реакций;  $k_{\text{cat}}$  может быть в миллион раз выше, чем константа спонтанной, не катализируемой реакции, причём в большей степени ускоряется реакция гидратации. Угольная кислота – нестойкое соединение, которое легко распадается на  $\text{CO}_2$  и воду, а в водных растворах диссоциирует в соответствии с  $pK_1$ , равным 6,35; поэтому её часто не включают в уравнения этих реакций.

Сопряжённые формы неорганического углерода (ФНУ),  $\text{CO}_2$  и  $\text{HCO}_3^-$ , создают в водной среде буфер. Данная буферная система неизбежно возникает в клетках организмов, поскольку углекислый газ присутствует в атмосфере Земли (по данным обсерватории Мауна Лоа на 01 июля 2021 года его содержание в воздухе состави-

Принятые сокращения: АА – ацетазоламид; ДТ – дикий тип; КА – карбоангидраза; НФХТ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла; Рубиско – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа; ФНУ – формы неорганического углерода; ФС1 и ФС2 – фотосистемы 1 и 2; ФФ – фотофосфорилирование; ЭА – этоксизоламид.

\* Адресат для корреспонденции.

ло 418,17 ppm; <https://keelingcurve.ucsd.edu>). Жизнь на Земле зародилась около 4 млрд лет назад, когда содержание углекислого газа в атмосфере составляло 80%, и воды морей и океанов, находившиеся в равновесии с атмосферой, имели величины рН в диапазоне от трёх до пяти [8]. Реакции клеточного метаболизма требуют оптимальной для этих реакций и устойчивой величины рН, и необходимость присутствия буферной системы и есть, возможно, основная причина, почему ферменты с функцией ускорения интерконверсии бикарбоната и  $\text{CO}_2$  появлялись независимо в разных группах клеточных организмов. КА, появившиеся уже в первых организмах, сыграли не последнюю роль в преобразовании биосферы – считается [9], что во времена доминирования цианобактерий, появившихся 3,8 млрд лет назад, огромные количества  $\text{CO}_2$ , содержащегося в атмосфере в древние геологические эпохи, было поглощено этими организмами за счёт биогенной кальцификации, осуществляемой при участии КА, и отложено в виде строматолитов, слоистых отложений известняка. Возникновение фермента, ускоряющего с целью регулирования обмена протонов при биохимических реакциях взаимопревращение ФНУ и таким образом влияющего на их локальную концентрацию, могло явиться базой для появления клеточных процессов, в которых участвуют ФНУ. В литературе имеется и предположение, что высокая концентрация  $\text{CO}_2$  в древней атмосфере Земли привела к включению различных ФНУ в процессы в организмах и к сопутствующему появлению ферментов, катализирующих взаимопревращение ФНУ [10].

Как пример того, что КА, катализируя быстрый перевод одной ФНУ в другую, выполняет важную функцию, можно привести ситуацию в эритроцитах, где КА в 20 000 раз ускоряет превращение углекислого газа в бикарбонат, покидающий эритроцит в обмен на ионы хлора [11]. Во многом благодаря запросам медицины роль КА в организмах млекопитающих детально изучена, и оказалось, что наличие КА обеспечивает выполнение критических функций в лёгких, крови, почках, глазах и т.д. [12]. Внутри клеток КА играют важную роль в функционировании митохондрий, превращая  $\text{CO}_2$ , образующийся при дыхании, в бикарбонат. Можно отметить, что все КА клеток и тканей позвоночных животных относятся к  $\alpha$ -семейству [4, 12].

Особое значение имеет взаимопревращение ФНУ в автотрофах, которые выполняют на Земле функцию включения неорганического углерода в органические соединения. Для них ФНУ, поступающие из воздуха или воды, являются источником построения самого организма. Прежде

де всего, КА требуются на пути из среды к центрам карбоксилирования, где происходит связывание (фиксация) неорганического углерода в органические соединения, поскольку неоднократно должно происходить взаимопревращение ФНУ для преодоления мембран и водных фаз клеток. Вблизи центров карбоксилирования для обеспечения высокой скорости этого процесса КА нужны для поддержания необходимой локальной концентрации или бикарбоната, или  $\text{CO}_2$  в зависимости от фермента, участвующего в первичной фиксации углерода в высших растениях – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Рубиско) в С3-растениях или фосфоенолпируват-карбоксилаза (ФЕП-карбоксилаза) в С4-растениях [13].

Огромный прогресс достигнут в понимании деталей участия КА в обеспечении неорганическим углеродом метаболизма простейших фотоавтотрофов, бактерий и зелёных микроводорослей. Для последних показана целая система КА, обслуживающих отдельные этапы поступления ФНУ из среды в клетку. Эти исследования подробно описаны в обзоре Moroney et al. [14]. В нашем обзоре мы представим современные данные о присутствии КА в фотосинтезирующих клетках высших С3-растений, причём особое внимание будет уделено хлоропластам, где протекают основные реакции фотосинтеза. К сожалению, имеется мало доказанных положений, как в этих клетках используется катализ карбоангидразами взаимопревращений ФНУ для достижения физиологически необходимого результата. Будут представлены имеющиеся на этот счёт гипотезы и рассмотрены причины, затрудняющие выяснение функций КА в растениях.

### ВАРЬИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КА В ЛИСТЬЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Первое сообщение о КА-активности в листьях нескольких видов высших растений появилось в 1939 году [15]. Позднее было установлено, что в высших растениях присутствуют КА, относящиеся к трём семействам:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [16]. Присутствие КА трёх семейств может способствовать устойчивому функционированию карбоангидразных систем растения, подвергающегося действию постоянно меняющихся условий внешней среды, т.к. представители нескольких семейств могут иметь более широкий диапазон молекулярных масс, оптимумов рН и возможностей находиться или в составе мембран, или в растворимом состоянии. По современным данным, количество генов, кодирующих КА в клетках высших растений, различается у разных ви-

дов: от четырёх в геноме *Spirodela polyrhiza* до семидесяти девяти — в геноме *Triticum aestivum* [17]. В геноме арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) идентифицировано 19 генов, кодирующих эти ферменты. Названия КА арабидопсиса, используемые далее, даются в соответствии с предложенными в работе Fabre et al. [18]. Авторы нашли, что в листьях арабидопсиса экспрессируются 3 гена  $\alpha$ -семейства, кодирующие  $\alpha$ КА1,  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА3. Руденко с соавт. [19] не обнаружили экспрессии последнего, но показали, что листья арабидопсиса содержат транскрипты гена *At4g20990*, кодирующего  $\alpha$ КА4, обнаруженную ранее среди белков тилакоидной мембраны [20]. В листьях арабидопсиса имеется 6 активных генов  $\beta$ ca, и было найдено, что все они экспрессируются [18, 19]; при этом в результате альтернативного сплайсинга экзонов образуется до 17 форм мРНК [21]. Интенсивность экспрессии генов большинства КА  $\beta$ -семейства и содержание соответствующих белков в несколько раз превышает уровень экспрессии генов КА  $\alpha$ -семейства [17].

Хотя субстратами КА являются ФНУ, попытки определить характер изменений уровня транскриптов генов КА в зависимости от содержания  $\text{CO}_2$  в атмосфере не привели к однозначному результату. Fabre et al. [18] показали, что ген *aca2* экспрессировался в листьях арабидопсиса только при пониженном уровне  $\text{CO}_2$ . Wang et al. [21] обнаружили, что профили экспрессии генов  $\beta$ ca то возрастали, то снова снижались через 1, 6, 12, 24 и 48 ч как при повышенном, так и при пониженном содержании  $\text{CO}_2$ . При этом в листьях арабидопсиса интенсивность экспрессии генов всех КА  $\gamma$ -семейства, расположенных в митохондриях, существенно снижалась после четырёх недель при высоком, 2000 ppm, уровне  $\text{CO}_2$  [22]. Неоднозначные и противоречивые данные были получены в ходе многочисленных исследований по определению изменений КА-активности или интенсивности экспрессии генов  $\beta$ ca1,  $\beta$ ca2 и  $\beta$ ca4 в растениях различных видов в зависимости от воздействия таких факторов, как засуха, засоление, холодовой стресс и других. Результаты этих исследований подробно описаны в обзоре Polishchuk [23]. Такая вариабельность экспрессии генов разных КА создаёт трудности для сопоставления уровня экспрессии того или иного гена с предполагаемой функцией белка, кодируемого этим геном.

Причина неоднозначных результатов может состоять в том, что направление изменений уровня экспрессии генов КА под действием стрессовых факторов зависит от продолжительности действия фактора, возраста растения,

длины фотопериода [19]. Продолжительность светового дня более 12 ч способствует переходу арабидопсиса в генеративную фазу, и этот переход сопровождается не только усилением экспрессии тех групп генов, которые ответственны за цветение, но и изменением интенсивности экспрессии многих других генов. В условиях длинного дня (16 ч), которые больше похожи на те условия, в которых эти растения растут в природе, через 3 дня адаптации к высокой интенсивности света происходило возрастание уровня экспрессии большинства генов КА хлоропластов, а непосредственно перед переходом растений к развитию репродуктивных органов содержание транскриптов этих генов снижалось почти до нуля [19]. Возможно, это связано с тем, что КА хлоропластов требуются, прежде всего, в процессах, протекающих в условиях вегетации. Необходимы дополнительные исследования для проверки этого предположения.

### КАРБОАНГИДРАЗЫ ВНЕ ХЛОРОПЛАСТОВ

В высших растениях важная роль КА в процессе фотосинтеза, а именно на стадии первичной фиксации неорганического углерода, надёжно установлена в растениях с С4-типом фотосинтеза. В этих растениях первичное связывание неорганического углерода происходит в цитоплазме клеток мезофилла листа, где углерод в форме бикарбоната присоединяется к молекуле фосфоенолпирувата с участием ФЕП-карбоксилазы [13]. КА цитоплазмы способствует быстрому переводу в бикарбонат поступающего из воздушной фазы  $\text{CO}_2$ . Мутанты с КА-активностью менее 10% от активности КА растений дикого типа (ДТ) имели сильно подавленный рост и очень низкую скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  при обычной концентрации этого газа в воздухе [24]. Рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа в этих растениях расположена в хлоропластах клеток обкладки сосудистых пучков, где являющийся субстратом этого фермента  $\text{CO}_2$  освобождается при декарбоксилировании соединений, поступающих из клеток мезофилла [13].

Более сложная картина наблюдается в фотосинтезирующих клетках доминирующих на Земле С3-растений, в которых первичная фиксация  $\text{CO}_2$  осуществляется с участием Рубиско, расположенной в хлоропластах клеток мезофилла. Необходимость КА для фотосинтеза С3-растений подтверждалась тем, что этоксизоламид (ЭА), специфический ингибитор КА, способный проникать через биологические мембраны, в концентрациях, когда он не влиял на

фотосинтетический перенос электронов, подавлял  $\text{CO}_2$ -зависимое выделение кислорода в протопластах фотосинтезирующих клеток листьев СЗ-растения гороха [25]. Однако ЭА способен ингибировать активность всех КА фотосинтезирующей клетки, а КА могут играть важную роль не только в непосредственной подаче  $\text{CO}_2$  к Рубиско, но и в обеспечении потока неорганического углерода из воздуха в клетки и внутри клеток — в хлоропласты. Вопрос о том, какие КА и каким образом обеспечивают процесс фотосинтеза в СЗ-растениях, до сих пор остаётся нерешённым.

Уже в плазмалемме фотосинтезирующих клеток расположена КА, наличие которой было обнаружено по проявлению её активности [26–28], а затем показано методом встраивания в геном арабидопсиса гена зелёного флуоресцирующего белка [18]. Wang et al. [29] показали, что в плазмалемме клеток арабидопсиса расположена  $\beta\text{KA4}$ , что она находится там в комплексе с аквапорином PIP2;1. С использованием везикул плазматической мембраны листьев высших растений различных видов также было продемонстрировано, что аквапорины плазмалеммы способствуют транспорту  $\text{CO}_2$ , и что снижение концентрации КА приводит к более низкой проницаемости плазматической мембраны для  $\text{CO}_2$  [30]. Чтобы облегчить переход  $\text{CO}_2$  через плазматическую мембрану, КА должны взаимодействовать с аквапоринами на границах раздела мембрана–жидкая фаза [31]. Исследования, проведённые с использованием методов генетической трансформации, показали, что изменение содержания аквапоринов на единицу площади листьев приводит к изменениям проводимости мезофилла [32]. Инкубация черешков *Populus trichocarpa* в присутствии ингибитора аквапоринов, хлорида ртути, приводила к уменьшению КА-активности на 32% и снижению скорости ассимиляции  $\text{CO}_2$  примерно на 27%, что сопровождалось уменьшением проницаемости мезофилла для  $\text{CO}_2$  [33]. Эти эффекты были обратимы при высоком уровне  $\text{CO}_2$  в атмосфере, т.е. фотосинтез был лимитирован скоростью диффузии  $\text{CO}_2$  при отсутствии эффекта  $\text{HgCl}_2$  на фотохимические процессы в этих растениях. Motaouzezi и Guu [33] предположили, что  $\text{HgCl}_2$  может подавлять проницаемость мезофилла для  $\text{CO}_2$  как путём ингибирования аквапоринов, так и вследствие подавления активности КА, функционирующей в комплексе с ними. Экспериментальные данные демонстрируют существование функционального взаимодействия аквапоринов и КА в обеспечении проводимости мезофилла для неорганического углерода в листьях

высших растений, и это имеет существенное значение для понимания механизмов проникновения  $\text{CO}_2$  внутрь клеток листа. Однако механизм сопряжения функционирования КА с переносом  $\text{CO}_2$  через клеточные мембраны с участием аквапоринов остаётся неясным, и его выяснение — одна из важных задач будущих исследований. Кроме того, учитывая роль аквапоринов в защитных реакциях растений против биотических и абиотических стрессовых факторов [34], возможно, что функционирующая в комплексе с аквапоринами КА также может участвовать в этих реакциях. Можно предположить, что поведение аквапоринов клеточных мембран как в нормальных, так и в стрессовых условиях зависит от активности КА.

В цитоплазме арабидопсиса были найдены  $\beta\text{KA2}$  и  $\beta\text{KA3}$  [18], а позже и  $\beta\text{KA4}$  [35]. Предполагается, что по градиенту концентрации неорганического углерода, создаваемого в клетке при фиксации  $\text{CO}_2$  внутри хлоропласта, в цитоплазме диффундирует бикарбонат, и цитоплазматические КА нужны для конверсии в него входящего через плазмалемму  $\text{CO}_2$ , а затем для конверсии последнего в  $\text{CO}_2$  перед входом в мембрану оболочки хлоропласта, поскольку липофильные молекулы  $\text{CO}_2$ , как считается, способны легче, чем  $\text{HCO}_3^-$ , проникать через клеточные мембраны [36]. Однако следует принять во внимание, что вход  $\text{CO}_2$  в хлоропласт может обеспечиваться и аквапоринами (см. далее).

В фотосинтезирующих клетках высших СЗ-растений в снабжении хлоропластов неорганическим углеродом могут участвовать и КА митохондрий. В митохондриях СЗ-растений обнаружены 5 КА  $\gamma$ -семейства, образующие сферический домен, являющийся частью комплекса I дыхательной цепи [37]. Кроме того, в матриксе митохондрий арабидопсиса была обнаружена КА  $\beta$ -семейства,  $\beta\text{KA6}$  [18]. Zabaleta et al. [38] предположили, что домен из пяти КА способствует образованию из  $\text{CO}_2$  бикарбоната с последующим его переносом из митохондрий в хлоропласты. Эта экспортная система, как показано в работе Riazunnisa et al. [39], может быть особенно важна в условиях, способствующих интенсификации фотодыхания. В этом процессе при недостатке  $\text{CO}_2$  вследствие оксигеназной активности Рубиско в хлоропластах образуется гликолевая кислота, поступающая в пероксисомы, в которых из неё образуется глицин, возвращающийся затем в митохондрии, где при декарбоксилировании в процессе конденсации двух молекул глицина выделяется  $\text{CO}_2$ . Что касается механизма направленной транспортировки неорганического углерода из митохондрий в хлоропласты, то можно предположить существование

специфического взаимодействия поверхностей этих органелл, поскольку их часто находят в клетке в контакте друг с другом. Однако пока данная проблема остаётся нерешённой.

### КАРБОАНГИДРАЗА ОБОЛОЧКИ ХЛОРОПЛАСТА

Аквапорины в клетках высших растений присутствуют не только в плазмалемме, но также во внутренней мембране оболочки хлоропластов [40]. Было обнаружено, что мутанты с нокаутированным геном, кодирующим аквапорин AtPIP1;2, обладали сниженной проницаемостью хлоропластов для  $\text{CO}_2$  [41, 42]. Perez-Martin et al. [43] на основе данных об однонаправленном изменении интенсивности экспрессии генов, кодирующих аквапорины оболочки хлоропластов и КА в листьях растений *Olea europaea*, при изменении влажности пришли к выводу, что эти белки могут функционировать совместно, осуществляя поставку  $\text{CO}_2$  в строму хлоропластов. Авторы при этом предполагали участие в этом процессе растворимой КА стромы.

При изучении диффузии  $\text{H}_2\text{O}_2$  как участника ретроградного сигналинга было показано, что  $\text{H}_2\text{O}_2$ , продуцируемая внутри хлоропластов, диффундирует в цитоплазму через каналы, образованные в оболочке хлоропластов аквапоринами, и что ингибитор КА ацетазоламид (АА) существенно подавляет эту диффузию [44]. Поскольку АА ингибировал и КА-активность оболочки хлоропласта, в этой работе было предположено, что ингибирующий эффект АА на проницаемость аквапоринов оболочки хлоропластов является, по крайней мере частично, результатом действия АА на КА, связанную с аквапоринами, подобно  $\beta\text{КА}4$  в мембране плазмалеммы (см. выше). Таким образом, возможно, что в оболочке хлоропластов содержится КА, которую ещё предстоит идентифицировать.

### КАРБОАНГИДРАЗЫ СТРОМЫ ХЛОРОПЛАСТОВ

На свету, т.е. в условиях, когда возможен фотосинтез, рН стромы хлоропласта, где в С3-растениях расположена Рубиско, становится слабощелочным, достигая величин 7,7–8,0 [45], при которых концентрация  $\text{HCO}_3^-$  в строме возрастает до 350–700 мкМ, по сравнению с 70 мкМ в темноте при рН 7,0, температуре 20 °С и содержании в воздухе 0,04%  $\text{CO}_2$ . Таким образом, при «световых» величинах рН стромы более 95% не-

органического углерода находится в форме  $\text{HCO}_3^-$  и, чтобы обеспечить наблюдаемые *in vivo* высокие скорости фиксации  $\text{CO}_2$ , требуются высокие скорости конверсии  $\text{HCO}_3^-$  в  $\text{CO}_2$ , которых нельзя достичь в спонтанной реакции. Представлялось очевидным, что какая-то КА должна участвовать в такой конверсии и подаче  $\text{CO}_2$  к Рубиско, но проблема участия КА в этом процессе до сих пор остаётся предметом исследований и гипотез.

В строме хлоропластов присутствует КА, содержание которой в среднем составляет 1–20% от общего белка листьев [46] и которая является вторым по содержанию белком листьев после Рубиско. Эта КА в листьях арабидопсиса была идентифицирована как продукт гена *At3g01500* и названа  $\beta\text{КА}1$  [18]. Позже стромальные КА  $\beta$ -семейства листьев высших растений других видов стали также называть  $\beta\text{КА}1$  [29, 43].

Трансформация растений табака антисмысловыми конструктами гена стромальной КА приводила к уменьшению её содержания до 1–2% от уровня в ДТ, но существенных изменений скорости фотосинтеза, активности Рубиско, содержания хлорофилла и проводимости устьиц не наблюдалось; при этом, однако, в мутантных растениях происходило снижение парциального давления  $\text{CO}_2$  в сайтах карбоксилирования [47]. Можно отметить, что оставшиеся 1–2% КА стромы – довольно существенная величина, учитывая большое содержание этого фермента и его высокую ферментативную активность. В работе Ferreira et al. [48] было показано, что растения арабидопсиса с нокаутированным геном, кодирующим стромальную  $\beta\text{КА}1$ , демонстрировали более низкую, чем растения ДТ, выживаемость, но последняя могла быть восстановлена либо введением сахарозы в питательную среду, либо увеличением содержания  $\text{CO}_2$  в воздухе во время выращивания. Хотя у  $\beta\text{КА}1$ -дефицитных проростков была снижена способность к светозависимой скорости ассимиляции  $\text{CO}_2$ , а развитие первых настоящих листьев замедлено, выжившие зрелые растения  $\beta\text{КА}1$ -дефицитных мутантов не проявляли фенотипических отличий от растений ДТ. Это рассматривалось как свидетельство неспособности  $\beta\text{КА}1$  участвовать в фотосинтезе в зрелых листьях [48].

С другой стороны, был обнаружен ряд свидетельств функциональной и структурной связи стромальной  $\beta\text{КА}$  и Рубиско. Перенос растений гороха, выращенных при концентрации  $\text{CO}_2$  1000 ppm, в условия нормального содержания  $\text{CO}_2$  в атмосфере приводил к быстрому увеличению содержания РНК генов и КА, и Рубиско,

после чего активность соответствующих ферментов в листьях увеличивалась [49]. Эксперименты по иммуноцитолокализации показали, что в строме хлоропластов листьев гороха растворимая βКА расположена вблизи Рубиско [50]. КА, аналогичная βКА1 арабидопсиса, была идентифицирована в растении *Brassica napus* с помощью масс-спектрометрического анализа как белок, взаимодействующий с изоформами большой субъединицы Рубиско [51].

Противоречие экспериментальных данных о роли βКА1 в фотосинтезе – возможно, следствие участия не только этой стромальной КА в снабжении CO<sub>2</sub> Рубиско. В строме хлоропластов обнаружена ещё одна КА, αКА1 [52]. Снижение ряда показателей фотосинтетической активности растений с нокаутом гена, кодирующего αКА1, а также способности накапливать крахмал [53], позволяет предполагать участие αКА1 в фотосинтезе и то, что эта КА играет важную роль в поставках CO<sub>2</sub> к Рубиско.

С использованием праймеров, комплементарных двум формам альтернативного сплайсинга матричной РНК гена *At3g01500*, кодирующего βКА1, *βca1a* и *βca1b*, в листьях арабидопсиса были обнаружены различия в интенсивности экспрессии этих форм при увеличении интенсивности света, а именно: увеличение содержания транскриптов формы *βca1b* и уменьшение *βca1a* [19]. Обнаруженное при этом увеличение экспрессии при повышенном освещении также гена *aca1* позволило авторам предположить совместное участие αКА1 и βКА1b в поставке CO<sub>2</sub> Рубиско. Возможно, βКА1 не является непосредственным поставщиком CO<sub>2</sub> для реакции карбоксилирования, а выполняет какую-то важную, но вспомогательную функцию. Например, высокоэкспрессируемая форма *βca1b* кодирует КА, выполняющую роль ускорителя преобразования поступающего в хлоропласт CO<sub>2</sub> в бикарбонат, чтобы увеличить концентрацию последнего во всем объёме стромы в соответствии с величиной рН и сделать его доступным для КА, которая непосредственно снабжает Рубиско CO<sub>2</sub>. Если только одна из форм βКА1 совместно с αКА1 участвует в подаче CO<sub>2</sub> Рубиско, то важно выяснить функциональную значимость процессов, в которых участвует другая форма этой КА.

### КАРБОАНГИДРАЗЫ ТИЛАКОИДОВ ХЛОРОПЛАСТОВ И ИХ ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ

Одной из первых работ, продемонстрировавших, что в хлоропластах высшего С3-растения

гороха имеются КА, расположенные в тилакоидной мембране, была работа Комаровой с соавт., опубликованная в 1982 году в журнале «Биохимия» [54]. Это было подтверждено в целом ряде исследований, где было показано, что КА имеются в тилакоидных мембранах и С4-растений, и водорослей [55]. Более того, оказалось, что в тилакоидах находится несколько КА [56, 57]. Известно, что для обеспечения переноса электронов на акцепторной стороне фотосистемы 2 (ФС2) необходимо присутствие одного из компонентов КА-реакции, бикарбоната [58], взаимодействие которого с негемовым железом обеспечивает быстрый перенос электронов от Q<sub>A</sub> на Q<sub>B</sub> [59]. После электрофореза фрагментов тилакоидных мембран, обогащённых ФС2 (ФС2-мембран), из гороха и арабидопсиса КА-активность была обнаружена в областях геля, содержащих как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные белки, причём последние относились к коровому комплексу ФС2 [56, 60, 61]. КА-активность присутствовала и в элюатах этих зон [62]. Было предположено [55], что именно КА-активность, обнаруженная в высокомолекулярной фракции, управляет поставкой бикарбоната акцепторной стороне ФС2. При этом результаты работ Руденко с соавт. [56], Khristin et al. [60] и Ignatova et al. [61] могут быть интерпретированы как свидетельствующие, что эта активность – не результат присутствия фермента КА, а следствие наличия специфической структуры в составе корового комплекса ФС2, т.е. высокомолекулярный носитель КА-активности – не отдельный белок, а конструкция из аминокислот соседствующих белков, у которых активный центр образован аминокислотами разных белковых субъединиц, как в КА γ-семейства. Вопрос о наличии КА-активности на акцепторной стороне ФС2 требует дальнейшего изучения, учитывая его принципиальную важность для понимания регуляции фотосинтетического электронного транспорта.

Ингибирующий эффект на активность ФС2 известных ингибиторов КА, АА и ЭА, был обнаружен давно и связывался с действием на донорную сторону ФС2 [63]. Позже, однако, было установлено, что этот эффект обусловлен, по крайней мере частично, их способностью неспецифически подавлять перенос электронов в ФС2 [64, 65]. Недавно было найдено, что другой ингибитор КА сульфонамидной природы, трифторметансульфонамид, снижает фотосинтетическое выделение кислорода, специфически ингибируя КА-активность ФС2-мембран [66].

То, что для эффективного переноса электронов не только на акцепторной, но и на донорной

стороне ФС2 необходим бикарбонат, было обнаружено в работах Klimov et al. [67, 68], и авторы предположили наличие здесь КА, которая участвует в его поставке. Недавно в тилакоидных мембранах арабидопсиса вблизи комплекса ФС2 найдена КА, которая была идентифицирована как  $\alpha$ КА4, кодируемая геном *At4g20990*; именно она оказалась низкомолекулярным источником КА-активности в ФС2-мембранах [69]. Присутствие  $\alpha$ КА4 в тилакоидах было ранее установлено путём протеомного анализа [20].

КА-активность была обнаружена также во фрагментах тилакоидных мембран, обогащённых фотосистемой 1 (ФС1) – ФС1-мембранах, происходящих из стромальных тилакоидных мембран, т.е. мембран, не входящих в граны [70]. Влияние ингибиторов и детергентов на КА-активность ФС1-мембран отличалось от влияния на КА-активность ФС2-мембран, и при выделении белков-носителей этой активности из ФС1- и ФС2-мембран обнаружилось различие их молекулярных масс [61]. КА-активность ФС1-мембран была одинаково чувствительна как к плохо проникающему в мембраны АА, так и к липорастворимому ЭА [61, 62], что указывало на расположение носителя КА-активности на стромальной поверхности тилакоидной мембраны, где она доступна обоим ингибиторам. С помощью масс-спектрального анализа установлено присутствие в стромальных тилакоидных мембранах арабидопсиса карбоангидразы  $\alpha$ КА5 [71].

Помимо тилакоидных мембран, КА-активность найдена в тилакоидном люмене хлоропластов гороха и арабидопсиса [57, 72]. Эта активность по целому ряду характеристик отличалась от активности тилакоидных мембран, и было доказано, что её носителем служит растворимый белок [72]. Эту КА по целому ряду свойств удалось идентифицировать как КА  $\beta$ -семейства. Заманчиво предположить, что это –  $\beta$ КА5, которая была определена, как расположенная в хлоропластах [18]. Уровень экспрессии гена *At4g33580*, кодирующего  $\beta$ КА5, на 2–3 порядка ниже, чем гена *At3g01500*, кодирующего стромальную  $\beta$ КА1, однако нокаут по гену *At4g33580* приводит к значительному отставанию растений в росте (Дж. Морони, личное сообщение). К настоящему моменту  $\beta$ КА5 является единственной КА, отсутствие которой приводит к значительным изменениям в фенотипе арабидопсиса при нормальных условиях вегетации.

**Физиологическое значение КА-активностей тилакоидов.** Роль этих активностей в метаболизме хлоропласта остаётся пока не выясненной полностью. Имеются более или менее обоснованные

предположения, причём часто не одно, об их функциональной роли. Например, помимо функции регулятора подачи бикарбоната к негемовому железу, расположенному между  $Q_A$  и  $Q_B$  (см. выше), КА-активности на акцепторной стороне ФС2 была приписана функция подачи протонов для протонирования пластохинона в сайте  $Q_B$  при превращении его в пластогидрохинон [73].

В ряде случаев вывод о функции КА делается на основании эффектов нокаута соответствующих генов. Было обнаружено, что в мутанте с отсутствующим синтезом  $\alpha$ КА4 в определенных условиях уменьшена по сравнению с ДТ энергозависимая часть нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* (НФХТ) [74–77]. Эта часть НФХТ зависит от поступления протонов к белку PsbS, находящемуся в тесной связи со светособирающим комплексом ФС2, что позволило сделать вывод, что данная КА, располагаясь в мембране на её люменальной стороне, участвует в этом процессе как поставщик протонов, освобождающихся при гидратации  $CO_2$ . Мутанты арабидопсиса, в которых отсутствовала  $\alpha$ КА4, были менее устойчивы к фотоингибированию по сравнению с растениями ДТ [75], что подтверждало участие этой КА в развитии НФХТ, предохраняющего ФС2 от фотоингибирования.

Тилакоидной КА, ориентированной в люмен и расположенной вблизи донорной стороны ФС2, приписывается и роль в ускорении дегидратационной реакции, т.е. связывания бикарбоната с протонами, появляющимися здесь в результате окисления воды. Поскольку локальное подкисление вблизи водоокисляющего комплекса ФС2, возрастающее при увеличении скорости освобождения протонов при повышении интенсивности света, может вызывать повреждение этого комплекса [78], удаление протонов способно устранить данную причину фотоингибирования ФС2. В зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* указанная роль была предположена для карбоангидразы САНЗ, связанной с тилакоидной мембраной на люменальной стороне [79]. Были получены убедительные свидетельства в пользу такой её физиологической роли: отсутствие этой КА сопровождалось снижением устойчивости водоросли к действию света высокой интенсивности [80] и при увеличении рН среды [10, 81]. Данные, полученные в работе, проведённой с использованием препаратов ФС2-мембран, выделенных из шпината [82], показали, что  $HCO_3^-$  на донорной стороне ФС2 действительно функционирует как мобильный акцептор протонов, появляющихся в результате окисления воды.

Таким образом, две разные гипотезы о роли КА на люменальной стороне ФС2 предполагают её участие в защите от фотоингибирования. Возможно, функционирование здесь КА создаёт условия для обоих процессов. В работе Rudenko et al. [76] представлена гипотетическая схема, согласно которой  $\alpha$ КА4 арабидопсиса, располагаясь вблизи светособирающего комплекса ФС2, направлено подаёт протоны, возникающие при гидратации  $\text{CO}_2$  белкам, ответственным за развитие НФХТ, с одновременным высвобождением в той же реакции бикарбоната, который связывает протоны, возникающие при окислении воды в водоокисляющем комплексе ФС2, расположенном рядом.

Характеристики фотосинтеза мутанта с выключенным геном, кодирующим  $\alpha$ КА2, были исследованы параллельно таковым мутанта с выключенным геном, кодирующим  $\alpha$ КА4. Эффекты выключения этих генов на светоиндуцированное накопление перекиси водорода, содержание крахмала, эффективный квантовый выход ФС2, НФХТ и скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  в одинаковых условиях эксперимента оказались разнонаправленными относительно растений ДТ [75]. Такое противоположное влияние на характеристики фотосинтеза нокаутных генов, кодирующих  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2, позволило предположить, что  $\alpha$ КА2, как и  $\alpha$ КА4, расположена в тилакоидной мембране. Тот факт, что в мутантах по  $\alpha$ КА2, НФХТ возрастало относительно величины в ДТ за счёт энергозависимого компонента, предполагал, что в ДТ данная КА как-то регулирует удаление протонов, участвующих в развитии этого тушения. В растениях ДТ уровень экспрессии гена, кодирующего  $\alpha$ КА2, повышался при выращивании растений при высокой интенсивности света в условиях короткого дня [19], что, возможно, отражает необходимость этой КА для удаления избытка протонов в светособирающем комплексе, где развивается НФХТ.

В работе Zhurikova et al. [75] было предположено, что  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2, регулируя, соответственно, подачу и удаление протонов, создают такую их концентрацию, которая обеспечивает развитие НФХТ, необходимого в данных условиях. Это может достигаться катализом на свету реакций гидратации  $\text{CO}_2$  и дегидратации бикарбоната, при которых, соответственно, высвобождаются и связываются протоны. Это предполагает расположение этих КА на противоположных сторонах тилакоидной мембраны, поскольку направление КА-реакции определяется величиной рН и/или концентрацией ФНУ, которые могут различаться в компартментах, разделённых мембраной. Если верно предположе-

ние, что  $\alpha$ КА4 подаёт протоны, располагаясь в мембране ближе к люмену (см. выше), то  $\alpha$ КА2, регулирующая удаление протонов, должна располагаться на стромальной стороне тилакоидной мембраны. Поскольку светособирающий комплекс ФС2 расположен в основном в гранальных тилакоидах, возможно, и  $\alpha$ КА2 располагается там. Однако пока не выявлена КА-активность, которую можно связать с присутствием этой КА.

Одна из перспективных идей в решении проблемы конверсии бикарбоната в  $\text{CO}_2$  и подачи последнего Рубиско – предположение об участии в этом процессе тилакоидных КА. Чтобы быть «донором»  $\text{CO}_2$ , КА, катализируя дегидратацию бикарбоната, должна располагаться в непосредственной близости от сосредоточенной в строме хлоропласта Рубиско, т.к. молекулы  $\text{CO}_2$ , оказавшись в слабощелочной среде стромы, сразу же превращались бы обратно в бикарбонат. По этой причине в поставке  $\text{CO}_2$  Рубиско не могут участвовать КА, расположенные вблизи ФС2 в гранальных мембранах. Скорее всего, такую поставку могут осуществлять КА, расположенные вблизи ФС1, поскольку эта фотосистема находится в стромальных тилакоидах, на стромальной поверхности которых в составе мультиферментных комплексов может располагаться часть Рубиско [83, 84]. В этих тилакоидах, как указано выше, была найдена  $\alpha$ КА5.

Участие КА, расположенной на стромальной поверхности стромальных тилакоидных мембран, в конверсии бикарбоната в  $\text{CO}_2$  и подаче его Рубиско – гипотеза, но протекание дегидратации бикарбоната именно здесь, возможно, проявляется в обнаруженной ещё в 1964 году [85] стимуляции бикарбонатом фотофосфорилирования (ФФ) в тилакоидах. Подорванов с соавт. [86] и Онойко с соавт. [87] обнаружили, что ингибиторы КА, АА и ЭА устраняли эффект стимуляции ФФ бикарбонатом, но, как уже упоминалось, эти ингибиторы подавляют и перенос электронов. Было, однако, найдено, что добавление в суспензию тилакоидов гидрофильного ингибитора КА, мафенида, в концентрации, не оказывающей ингибирующего влияния на перенос электронов, также значительно снижало стимуляцию ФФ [65]. Выдвинуто предположение [71], что дегидратация бикарбоната с участием  $\alpha$ КА5 приводит к стимуляции ФФ вследствие возрастания рН на мембране: в реакции дегидратации бикарбоната связываются протоны, что уменьшает их концентрацию на поверхности мембраны, в то время как часть образовавшихся молекул  $\text{CO}_2$  проникает через мембрану из примембранного слоя [88] в люмен



тилакоида, где гидратация молекул  $\text{CO}_2$  с помощью люминальной КА приводит к увеличению концентрации протонов. Важно, что это происходит в стромальных тилакоидах, где расположена АТФ-синтаза. Очевидно, однако, что *in vivo* большая часть молекул  $\text{CO}_2$ , образовавшихся при дегидратации бикарбоната на поверхности мембраны, должны направляться в строму хлоропластов. Как указано выше, помимо фермента, растворенного в строме, имеется Рубиско на поверхности мембран [83, 84], и молекулы  $\text{CO}_2$ , образовавшиеся с участием  $\alpha\text{КА5}$ , могут перехватываться именно этой Рубиско. По некоторым данным [89], Рубиско может связываться с мембраной через АТФ-синтазу, которая расположена в тех же стромальных мембранах, что и  $\alpha\text{КА5}$ . В работе Anderson и Carol [50] было оценено, что около 60% Рубиско связано с тилакоидными мембранами.

Можно отметить, что показана связь Рубиско с КА в составе контактирующего с тилакоидной мембраной супрамолекулярного комплекса, хотя авторы рассматривали только растворимую КА стромы [90]. Возникает интересная проблема, которую важно выяснить в будущих исследованиях, — не существует ли комплекс  $\alpha\text{КА5}$  и Рубиско.

### ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ФУНКЦИЙ КАРБОАНГИДРАЗ В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Экспериментальные результаты предполагают, что КА в фотосинтезирующих клетках СЗ-растений катализируют реакции, обеспечивающие или поставку, или удаление в определенном месте того продукта реакции (протона, бикарбоната или  $\text{CO}_2$ ), который необходим для осуществления важного для метаболизма клетки процесса. Особенностью, затрудняющей выявление участия в таком процессе той или иной КА растительных клеток, является то, что необходимый результат может обеспечиваться совместным функционированием нескольких КА. Это функционирование может быть параллельным или сопряженным.

Как свидетельство в пользу возможного параллельного выполнения несколькими КА одной и той же функции, можно рассматривать данные о том, что экспрессия гена, кодирующего цитоплазматическую  $\beta\text{КА2}$ , через две недели после повышения освещенности растений арабидопсиса становилась выше, а гена, кодирующего другую цитоплазматическую КА,  $\beta\text{КА3}$ , — ниже [19]. Вероятно, степень участия этих КА в

метаболических процессах в цитоплазме изменяется в зависимости от внешних условий, диктующих, какая КА становится ведущей в обеспечении протекания этих процессов. Иллюстрацией такой ситуации может также служить доказанное изменение в зависимости от условий участия двух КА водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, САН1 и САН2, в поставке неорганического углерода в клетку: САН1 индуцируется низкими концентрациями  $\text{CO}_2$  в окружающей среде, а САН2 — высокими [16].

Предположенное нами на основе имеющихся данных (см. выше) участие в преобразовании  $\text{HCO}_3^-$  в  $\text{CO}_2$  в строме хлоропластов нескольких растворимых КА параллельно с ориентированными в строму тилакоидными КА также вполне возможно и представляется даже необходимым. Это способствовало бы повышению надёжности системы и её способности к адаптации при изменении условий среды с целью обеспечения оптимальной скорости подачи  $\text{CO}_2$  центрам карбоксилирования, т.е. обеспечения стабильного протекания важнейшего физиологического процесса в растениях. Решение этой проблемы, по нашему мнению, является приоритетным для выяснения роли КА в фотосинтезе.

Функционирование нескольких КА, которое можно назвать сопряженным, иллюстрируется деятельностью  $\beta\text{КА1}$  и  $\beta\text{КА4}$ , которые расположены, соответственно, в строме и плазматической мембране и которые, как было установлено [91, 92], совместно регулируют устьичную проводимость. О сопряженном функционировании двух КА свидетельствует и факт того, что выключение синтеза только сразу двух цитоплазматических КА,  $\beta\text{КА2}$  и  $\beta\text{КА4}$ , приводило к существенному подавлению роста мутантов при выращивании в условиях пониженного содержания  $\text{CO}_2$  [35]; это указывало на их совместное участие в поступлении неорганического углерода в клетку.

Сопряженное функционирование КА в фотосинтезирующих клетках высших растений подразумевает то, что эти ферменты действуют в кооперации для достижения необходимого физиологического результата. Выше описана гипотетическая возможность такого функционирования  $\alpha\text{КА4}$  и  $\alpha\text{КА2}$ . Основанием для данного предположения явилось противоположное направление изменений уровня экспрессии генов *aca4* и *aca2* при увеличении освещенности в условиях «длинного» дня [19] — предполагается, что изменение соотношения содержания этих белков может обеспечить тот баланс их функционирования, который необходим для достижения нужной величины НФХТ в тех или иных

физиологических условиях. Необходимо, однако, подчеркнуть, что использование оценки уровней экспрессии генов для установления функций КА, которые эти гены кодируют, требует осторожности, поскольку уровень экспрессии генов не всегда можно сопоставлять с количеством соответствующих белков, и предложенная гипотеза, очевидно, требует дополнительной проверки.

Фундаментальное значение имеет вопрос о специфических механизмах функционирования тех КА, которые связаны с мембранами клеток. Вследствие расположения активного центра таких КА на поверхности мембраны продукты катализируемых ими реакций попадают в примембранные перемешиваемые слои, где их стационарная концентрация может значительно возрастать по сравнению с концентрацией в кон-

Расположение и предполагаемые функции карбоангидраз, обнаруженных в фотосинтезирующих клетках С3-растений (с приведением источника данных)

Клеточная структура	Карбоангидраза	Предполагаемые функции
Плазмалемма	βКА4 [18, 29]	в комплексе с аквапорином облегчает поступление CO <sub>2</sub> через плазматическую мембрану в клетки [30, 32, 33]
Цитоплазма	βКА2 [18] βКА3 [18] βКА4 [35]	функционируя совместно, преобразуют поступающий в цитоплазму CO <sub>2</sub> в HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , а затем переводят последний обратно в CO <sub>2</sub> перед входом в мембрану оболочки хлоропласта
Митохондрии	βКА6 [18] в матриксе; 5 γКА в составе сферического домена, связанного с комплексом I дыхательной цепи [37]	домен из пяти γКА и βКА6 участвуют в образовании бикарбоната из CO <sub>2</sub> и формируют систему транспорта бикарбоната из митохондрий в хлоропласты [37, 38]; эта система особенно важна при недостатке CO <sub>2</sub> в воздухе, когда в фотосинтезирующих клетках стимулируется фотодыхание [22, 39]
Оболочка хлоропластов	?	в комплексе с аквапоринами способствует выходу из стромы в цитоплазму H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , продуцируемой внутри хлоропластов [44]; участвует в преобразовании HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> цитоплазмы в CO <sub>2</sub> и в комплексе с аквапоринами, расположенными в оболочке хлоропластов, облегчает поставку CO <sub>2</sub> в строму (данная работа)
Строма хлоропластов	βКА1 [18] αКА1 [52]	обе участвуют в преобразовании HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> стромы в CO <sub>2</sub> для обеспечения им Рубиско [94], функционируя последовательно или параллельно [19, данная статья]; βКА1 совместно с плазмалеммой βКА4 в замыкающих клетках устьиц участвует в регуляции размера устьичной щели, т.е. газообмена между воздухом и апопластом [91]; βКА1 участвует в процессах защиты от стрессов [6, 23], что частично может быть связано с её способностью связывать салициловую кислоту [95]
Тилакоидные мембраны	αКА4 [69] вблизи ФС2 на люменальной стороне мембраны  αКА5 вблизи ФС1 на стромальной поверхности стромальных мембран [71]  αКА2 (?) [75]	защищает от фотоингибирования двумя путями: 1. поставляет бикарбонат для связывания протонов, освобождающихся в результате окисления воды при освещении [76]; 2. участвует в развитии НФХТ как поставщик протонов, освобождающихся при гидратации CO <sub>2</sub> , белку PsbS [75, 76]  участвует в стимуляции ФФ при увеличении концентрации бикарбоната в строме хлоропласта [65, 71]; благодаря расположению на стромальной поверхности стромальных тилакоидных мембран участвует в конверсии бикарбоната в CO <sub>2</sub> и подаче последнего мембрано-связанной Рубиско (данная работа)
Люмен	βКА5 (?) [57, 72]	регуляция pH для защиты белков люмена при быстрых изменениях интенсивности света [57]; обеспечение с участием CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -буфера облегчённой диффузии протонов к каналу АТФ-синтазы [87]

Примечание. Названия указаны в соответствии с номенклатурой, предложенной в ранее опубликованной работе [18].

тактирующей с мембраной водной фазе. Если вблизи мембраносвязанных КА расположены другие мембраносвязанные ферменты (например, Рубиско), которые используют в качестве субстрата продукты КА-реакции, то для таких ферментов создаются условия существенного увеличения скорости катализируемых ими реакций. Важный и практически неисследованный вопрос – в какой степени данное обстоятельство определяет функцию мембраносвязанных КА.

В связи с выяснением функций мембраносвязанных КА возникает также вопрос: участвуют ли КА фотосинтезирующих клеток в формировании трансмембранных каналов? Известно, что в клетках животных КА, хотя не сами по себе, формируют эти каналы, но функционируют в комплексе с трансмембранными каналами, сформированными другими белками [93]. Выше были представлены данные, которые показывают существование такой связи и в клетках растений, а именно связи КА с каналами, формируемыми аквапоринами как в плазмалемме, так и оболочке хлоропласта. В частности, показано [42], что в мутанте арабидопсиса по аквапоринам проницаемость оболочки хлоропласта для  $\text{CO}_2$  в 2 раза меньше, чем в ДТ. Можно, например, предполагать, что описанные выше эффекты нокаута гена, кодирующего  $\alpha\text{KA}2$  [74, 75], обусловлены тем, что эта КА регулирует проводимость канала выхода протонов из тилакоидов. Молекулярные механизмы возможного участия КА в функционировании каналов, в частности в обеспечении транспорта продуктов катализируемой ими реакции, однако, не выявлены. Проблемы при исследовании этих механизмов возникают, в частности из-за того, что трудно бывает разделить действие применяемых ингибиторов на КА и собственно на проводимость каналов.

Таким образом, основные трудности изучения функций конкретных КА в фотосинтезирующих клетках высших растений обусловлены тем, что в одном компартменте может присутствовать несколько ферментов, действующих совместно. Ингибиторный анализ оказывается бесполезным, поскольку специфические ингибиторы подавляют активность всех КА. В свою очередь, нокаут гена одной из КА при параллельном выполнении несколькими КА какой-то функции может не привести к угнетению данной функции, а при сопряжённом участии КА в обеспечении какого-то процесса или необходимой локальной концентрации продуктов карбоангидразной реакции такой нокаут, хотя и мо-

жет проявиться в изменении или протекания исследуемого процесса или этих концентраций, не позволяет без дополнительных исследований выявить механизм действия данной КА.

В ранее опубликованных работах [35, 48, 76, 91] отсутствие тех или иных КА в соответствующих одиночных мутантах не показало в нормальных благоприятных условиях существенных отличий от растений ДТ, и эти отличия обнаруживались только после помещения растений в стрессовые условия. Это также создаёт трудности выявления функций КА, поскольку показывает, что отсутствие такого фермента как КА может не проявляться в оптимальных условиях жизни растения и может стать заметным или при резком изменении интенсивности света, или содержания одной из ФНУ, например  $\text{CO}_2$  при изменении внешних условий или протонов при нарушении проницаемости мембран. Это может быть свидетельством участия КА в защите растений от влияния неблагоприятных условий. Нарушение метаболизма при благоприятных условиях наблюдали только у двойных мутантов по КА [35, 91]. Поэтому полезным для выявления функций КА и наличия системы этих ферментов может быть использование двойных или даже тройных мутантов.

В таблице представлены имеющиеся в настоящее время данные о КА, идентифицированных в структурах фотосинтезирующих клеток СЗ-растений, и их предполагаемых функциях. Знаки вопроса поставлены: 1) когда носитель КА-активности, выявленной в оболочке хлоропласта, еще не идентифицирован, 2) по причине отсутствия окончательных доказательств нахождения  $\alpha\text{KA}2$  в тилакоидной мембране, 3) а также вследствие весьма предварительного отождествления обнаруженной люменальной КА с  $\beta\text{KA}5$ . Указаны только основные предполагаемые функции выявленных КА и обнаруженных КА-активностей.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной научной программы (тема № 121040500121-3).

**Благодарности.** Авторы благодарят к.б.н. М.А. Козулеву за полезные дискуссии по теме при подготовке обзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Henriques, O. M. (1928) Die Bindungsweise des Kohlendioxyds im Blute, *Biochem. Z.*, **200**, 1-24.
- Meldrum, N. U., and Roughton, F. J. W. (1933) Carbonic anhydrase. Its preparation and properties, *J. Physiol.*, **80**, 113-142, doi: 10.1113/jphysiol.1933.sp003077.
- Keilin, D., and Mann, T. (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme, *Biochem. J.*, **34**, 1163-1176, doi: 10.1042/bj0341163.
- Hewett-Emmett, D., and Tashian, R. E. (1996) Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **5**, 50-77, doi: 10.1006/mpev.1996.0006.
- DiMario, R. J., Machingura, M. C., Waldrop, G. L., and Moroney, J. V. (2018) The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms, *Plant Sci.*, **268**, 11-17, doi: 10.1016/j.plantsci.2017.12.002.
- Rudenko, N. N., Borisova-Mubarakshina, M. M., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P., Nadeeva-Zhurikova, E. M., and Ivanov, B. N. (2021) Role of plant carbonic anhydrases under stress conditions, in *Plant Stress Physiology* (Hossain, A., ed.) InTech, London, pp. 301-325, doi: 10.5772/intechopen.91971.
- Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Zhurikova, E. M., Yanyushin, M. F., and Ivanov, B. N. (2018) The multiplicity of functions of carbonic anhydrases in higher plants, in *Carbonic Anhydrases. Biochemistry, Mechanism of Action and Therapeutic Applications* (Penttinen, J., ed.) Nova Science Publishers, N. Y., pp. 111-137.
- Сорохтин О. Г., Ушаков С. А. (2002) Развитие Земли, Изд-во МГУ, Москва.
- Куприянова Е. В., Пронина Н. А. (2011) Карбоангидраза – фермент, преобразивший биосферу, *Физиология растений*, **58**, 163-176.
- Terentyev, V. V., Shukshina, A. K., and Shitov, A. V. (2019) Carbonic anhydrase CAH3 supports the activity of photosystem II under increased pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 582-590, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.06.003.
- Reithmeier, R. A. (2001) A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion exchangers, *Blood Cells Mol. Dis.*, **27**, 85-89, doi: 10.1006/bcmd.2000.0353.
- Sly, W. S., and Hu, P. Y. (1995) Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies, *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 375-401, doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.002111.
- Эдвардс Дж., Уокер Д. (1986) Фотосинтез С3- и С4-растений: механизмы и регуляция, Мир, Москва.
- Moroney, J. V., Ma, Y., Frey, W. D., Fusilier, K. A., Pham, T. T., et al. (2011) The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles, *Photosynth. Res.*, **109**, 133-149, doi: 10.1007/s11120-011-9635-3.
- Neish, A. C. (1939) Chloroplasts. II. Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf, *Biochem. J.*, **33**, 300-308, doi: 10.1042/bj0330300.
- Moroney, J. V., Bartlett, S. G., and Samuelsson, G. (2001) Carbonic anhydrases in plants and algae, *Plant Cell Environ.*, **24**, 141-153, doi: 10.1046/j.1365-3040.2001.00669.x.
- Момаяеви, М., McKown, A. D., Bell, S. C. S., and Guy, R. D. (2020) Emerging roles for carbonic anhydrase in mesophyll conductance and photosynthesis, *Plant J.*, **101**, 831-844, doi: 10.1111/tpj.14638.
- 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, doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01651.x.
- 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  $\alpha$ - and  $\beta$ -families in *Arabidopsis thaliana* leaves, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1025-1035, doi: 10.1134/S000629791709005X.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J.-B., Rudella, A., et al. (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, doi: 10.1105/tpc.017814.
- Wang, M., Zhang, Q., Liu, F.-C., Xie, W.-F., Wang, G.-D., et al. (2014) Family-wide expression characterization of *Arabidopsis* beta-carbonic anhydrase genes using qRT-PCR and promoter::GUS fusions, *Biochimie*, **97**, 219-227, doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.020.
- Soto, D., Córdoba, J. P., Villarreal, F., Bartoli, C., Schmitz, J., et al. (2015) Functional characterization of mutants affected in the carbonic anhydrase domain of the respiratory complex I in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, **83**, 831-844, doi: 10.1111/tpj.12930.
- Polishchuk, O. V. (2021) Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases, *Planta*, **253**, 58, doi: 10.1007/s00425-020-03553-5.
- Von Caemmerer, S., Quinn, V., Hancock, N. C., Price, G. D., Furbank, R. T., and Ludwig, M. (2004) Carbonic anhydrase and C4 photosynthesis: a transgenic analysis, *Plant Cell Environ.*, **27**, 697-703, doi: 10.1111/j.1365-3040.2003.01157.x.
- Игнатова Л. К., Москвин О. В., Иванов Б. Н. (2001) Влияние ингибиторов карбоангидразы на протонный обмен и фотосинтез протопластов гороха, *Физиология растений*, **48**, 545-550.
- Игнатова Л. К., Романова А. К. (1992) Участие карбоангидразы в ингибировании фотосинтеза протопластов гороха избытком CO<sub>2</sub>, *Физиология растений*, **39**, 711-717.
- Ignatova, L. K., Moskvina, O. V., Ivanov, B. N., and Romanova, A. K. (1993) The effect of CO<sub>2</sub> uptake by pea protoplasts on O<sub>2</sub> evolution rate and parameters of chlorophyll fluorescence quenching, *Plant Physiol. Biochem.*, **31**, 295-301.
- Utsunomiya, E., and Muto, S. (1993) Carbonic anhydrase in the plasma membranes from leaves of C3 and C4 plants, *Physiol. Plant.*, **88**, 413-419, doi: 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01353.x.
- Wang, C., Hu, H., Qin, X., Zeise, B., Xu, D., et al. (2016) Reconstitution of CO<sub>2</sub> regulation of SLAC1 anion channel and function of CO<sub>2</sub>-Permeable PIP2;1 Aquaporin as Carbonic anhydrase 4 interactor, *Plant Cell*, **28**, 568-582, doi: 10.1105/tpc.15.00637.
- Zhao, M., Tan, H.-T., Scharwies, J., Levin, K., Evans, J. R., and Tyerman, S. D. (2017) Association between water and carbon dioxide transport in leaf plasma membranes: assessing the role of aquaporins, *Plant. Cell Environ.*, **40**, 789-801, doi: 10.1111/pce.12830.
- Terashima, I., Hanba, Y., Tazoe, Y., Vyas, P., and Yano, S. (2006) Irradiance and phenotype: comparative ecophysiology of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion, *J. Exp. Bot.*, **57**, 343-354, doi: 10.1093/jxb/erj014.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D., Bota, J., Otto, B., et al. (2006) Tobacco aquaporin NtAQP1 is

- involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> *in vivo*, *Plant J.*, **48**, 427-439, doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02879.x.
33. Momayyezi, M., and Guy, R. D. (2018) Concomitant effects of mercuric chloride on mesophyll conductance and carbonic anhydrase activity in *Populus trichocarpa* Torr. & Gray, *Trees*, **32**, 301-309, doi: 10.1007/s00468-017-1632-5.
  34. Afzal, Z., Howton, T., Sun, Y., and Mukhtar, M. (2016) The roles of aquaporins in plant stress responses, *J. Dev. Biol.*, **4**, 9, doi: 10.3390/jdb4010009.
  35. DiMario, R. J., Quebedeaux, J. C., Longstreth, D. J., Dassanayake, M., Hartman, M. M., and Moroney, J. V. (2016) The cytoplasmic carbonic anhydrases  $\beta$  CA2 and  $\beta$  CA4 are required for optimal plant growth at low CO<sub>2</sub>, *Plant Physiol.*, **171**, 280-293, doi: 10.1104/pp.15.01990.
  36. Boron, W. F., Endeward, V., Gros, G., Musa-Aziz, R., and Pohl, P. (2011) Intrinsic CO<sub>2</sub> permeability of cell membranes and potential biological relevance of CO<sub>2</sub> channels, *Chem. Phys. Chem.*, **12**, 1017-1019, doi: 10.1002/cphc.201100034.
  37. Sunderhaus, S., Dudkina, N. V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., et al. (2006) Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants, *J. Biol. Chem.*, **281**, 6482-6488, doi: 10.1074/jbc.M511542200.
  38. Zabaleta, E., Martin, M. V., and Braun, H.-P. (2012) A basal carbon concentrating mechanism in plants? *Plant Sci.*, **187**, 97-104, doi: 10.1016/j.plantsci.2012.02.001.
  39. Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Bauwe, H., and Raghavendra, A. S. (2006) Markedly low requirement of added CO<sub>2</sub> for photosynthesis by mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*): possible roles of photorespiratory CO<sub>2</sub> and carbonic anhydrase, *Physiol. Plant.*, **128**, 763-772, doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00803.x.
  40. Simm, S., Pappasotiropoulos, D. G., Ibrahim, M., Leisegang, M. S., Muller, B., et al. (2013) Defining the core proteome of the chloroplast envelope membranes, *Front. Plant Sci.*, **4**, 11, doi: 10.3389/fpls.2013.00011
  41. Heckwolf, M., Pater, D., Hanson, D. T., and Kaldenhoff, R. (2011) The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO<sub>2</sub> transport facilitator, *Plant J.*, **67**, 795-804, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04634.x.
  42. Tolleter, D., Chochois, V., Poiré, R., Price, G. D., and Badger, M. R. (2017) Measuring CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> permeabilities of isolated chloroplasts using a MIMS-18O approach, *J. Exp. Bot.*, **68**, 3915-3924, doi: 10.1093/jxb/erx188.
  43. Perez-Martin, A., Michelazzo, C., Torres-Ruiz, J. M., Flexas, J., Fernández, J. E., Sebastiani, L., and Diaz-Espejo, A. (2014) Regulation of photosynthesis and stomatal and mesophyll conductance under water stress and recovery in olive trees: correlation with gene expression of carbonic anhydrase and aquaporins, *J. Exp. Bot.*, **65**, 3143-3156, doi: 10.1093/jxb/eru160.
  44. (Mubarakshina) Borisova, M. M., Kozuleva, M. A., Rudenko, N. N., Naydov, I. A., Klenina, I. B., and Ivanov, B. N. (2012) Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 1314-1321, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.036.
  45. Wu, W., and Berkowitz, G. A. (1992) Stromal pH and photosynthesis are affected by electroneutral K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> exchange through chloroplast envelope ion channels, *Plant Physiol.*, **98**, 666-672, doi: 10.1104/pp.98.2.666.
  46. Okabe, K., Yang, S.-Y., Tsuzuki, M., and Miyachi, S. (1984) Carbonic anhydrase: Its content in spinach leaves and its taxonomic diversity studied with anti-spinach leaf carbonic anhydrase antibody, *Plant Sci. Lett.*, **33**, 145-153, doi: 10.1016/0304-4211(84)90004-X.
  47. Price, G. D., von Caemmerer, S., Evans, J. R., Yu, J.-W., Lloyd, J., et al. (1994) 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, doi: 10.1007/BF00201810.
  48. 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, doi: 10.1104/pp.108.118661.
  49. Majeau, N., and Coleman, J. R. (1992) Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding tobacco chloroplastic carbonic anhydrase, *Plant Physiol.*, **100**, 1077-1078, doi: 10.1104/pp.100.2.1077.
  50. Anderson, L. E., and Carol, A. A. (2004) Enzyme colocalization with Rubisco in pea leaf chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **82**, 49-58, doi: 10.1023/B:PRES.0000040443.92346.37.
  51. Wang, L., Jin, X., Li, Q., Wang, X., Li, Z., and Wu, X. (2016) Comparative proteomics reveals that phosphorylation of  $\beta$  carbonic anhydrase 1 might be important for adaptation to drought stress in *Brassica napus*, *Sci. Rep.*, **6**, 39024, doi: 10.1038/srep39024.
  52. Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., Déjardin, A., Monné, M., et al. (2005) Evidence for a protein transported through the secretory pathway enroute to the higher plant chloroplast, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1224-1231, doi: 10.1038/ncb1330.
  53. Buren, S. (2010) Targeting and function of CAH1-Characterisation of a novel protein pathway to the plant cell chloroplast. PhD Thesis, Umea University, Sweden.
  54. Комарова Ю. М., Доман Н. Г., Шапошникова Г. Л. (1982) Две формы карбоангидразы в хлоропластах бобов, *Биохимия*, **47**, 1027-1034.
  55. 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**, 798-813, doi: 10.1134/S0006297915060048.
  56. Руденко Н. Н., Игнатова Л. К., Каморницкая В. Б., Иванов Б. Н. (2006) Присутствие нескольких карбоангидраз в тилакоидах листьев гороха, *Докл. АН*, **408**, 553-555.
  57. 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**, 81-89, doi: 10.1007/s11120-007-9148-2.
  58. Wydrzynski, T., and Govindjee (1975) A new site of bicarbonate effect in Photosystem II of photosynthesis: evidence from chlorophyll fluorescence transients in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **387**, 403-408, doi: 10.1016/0005-2728(75)90121-8.
  59. Van Rensen, J. J. S., Tonk, W. J. M., and de Bruijn, S. M. (1988) Involvement of bicarbonate in the protonation of the secondary quinone electron acceptor of photosystem II via the non-haem iron of the quinone-iron acceptor complex, *FEBS Lett.*, **226**, 347-351, doi: 10.1016/0014-5793(88)81452-2.
  60. Khristin, M. S., Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Ivanov, B. N., and Klimov, V. V. (2004) Photosystem II associated carbonic anhydrase activity in higher plants is situated in core complex, *FEBS Lett.*, **577**, 305-308, doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.001.
  61. 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, doi: 10.1134/s0006297906050099.

62. 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, doi: 10.1007/s11120-011-9699-0.
63. Swader, J. A., and Jacobson, B. S. (1972) Acetazolamide inhibition of photosystem II in isolated spinach chloroplasts, *Phytochemistry*, **11**, 65–70, doi: 10.1016/S0031-9422(00)89968-9.
64. Shitov, A. V., Zharmukhamedov, S. K., Shutova, T. V., Allakhverdiev, S. I., Samuelsson, G., and Klimov, V. V. (2011) A carbonic anhydrase inhibitor induces bicarbonate-reversible suppression of electron transfer in pea photosystem II membrane fragments, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **104**, 366–371, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.04.001.
65. Федорчук Т. П., Опанасенко В. К., Руденко Н. Н., Иванов Б. Н. (2018) Исследование стимуляции фотофосфорилирования бикарбонатом в изолированных тилакоидах: эффекты ингибиторов карбоангидраз, *Биологические мембраны*, **35**, 34–41.
66. Shitov, A. V., Terentyev, V. V., Zharmukhamedov, S. K., Rodionova, M. V., Karacan, M., et al. (2018) Is carbonic anhydrase activity of photosystem II required for its maximum electron transport rate? *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 292–299, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.01.009.
67. Klimov, V. V., Hulsebosch, R. J., Allakhverdiev, S. I., Wincencjusz, H., Van Gorkom, H. J., and Hoff, A. J. (1997) Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 16277–16281, doi: 10.1021/bi9717688.
68. Klimov, V., and Baranov, S. (2001) Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1503**, 187–196, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00222-X.
69. Ignatova, L., Zhurikova, E., and Ivanov, B. (2019) The presence of the low molecular mass carbonic anhydrase in photosystem II of C3 higher plants, *J. Plant Physiol.*, **232**, 94–99, doi: 10.1016/j.jplph.2018.11.017.
70. Пронина Н. А., Аллахвердиев С. И., Куприянова Е. В., Клячко-Гурвич Г. Л., Климов В. В. (2002) Локализация карбоангидразы в субхлоропластных частицах гороха, *Физиология растений*, **49**, 431–439.
71. Fedorchuk, T. P., Kireeva, I. A., Opanasenko, V. K., Terentyev, V. V., Rudenko, N. N., et al. (2021) Alpha carbonic anhydrase 5 mediates stimulation of ATP synthesis by bicarbonate in isolated arabidopsis thylakoids, *Front. Plant Sci.*, doi: 10.3389/fpls.2021.662082.
72. 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**, 903–906, doi: 10.1016/j.jplph.2014.02.009.
73. Stemler, A. J. (1997) The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase, *Physiol. Plant.*, **99**, 348–353, doi: 10.1034/j.1399-3054.1997.990220.x.
74. Журикова Е. М., Игнатова Л. К., Семенова Г. А., Руденко Н. Н., Мудрик В. А., Иванов Б. Н. (2015) Влияние нокаута гена альфа-карбоангидразы 4 на фотосинтетические характеристики *Arabidopsis thaliana* и накопление крахмала в листьях, *Физиология растений*, **62**, 602–608.
75. Zhurikova, E. M., Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Mudrik, V. A., Vetoshkina, D. V., and Ivanov, B. N. (2016) Participation of two carbonic anhydrases of alpha family in photosynthetic reactions in *Arabidopsis thaliana*, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1182–1187, doi: 10.1134/S0006297916100151.
76. 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  $\alpha$ -CA4 on photosystem II light-harvesting antenna in plants grown under different light intensities and day lengths, *Protoplasma*, **255**, 69–78, doi: 10.1007/s00709-017-1133-9.
77. Rudenko, N. N., Fedorchuk, T. P., Terentyev, V. V., Dymova, O. V., Naydov, I. A., et al. (2020) 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, doi: 10.1007/s00709-019-01456-1.
78. Virgin, I., Styring, S., and Andersson, B. (1988) Photosystem II disorganization and manganese release after photoinhibition of isolated spinach thylakoid membranes, *FEBS Lett.*, **233**, 408–412, doi: 10.1016/0014-5793(88)80472-1.
79. Villarejo, A., Shutova, T., Moskvina, O., Forssen, M., Klimov, V. V., and Samuelsson, G. (2002) A photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution, *EMBO J.*, **21**, 1930–1938, doi: 10.1093/emboj/21.8.1930.
80. Shutova, T., Kenneweg, H., Buchta, J., Nikitina, J., Terentyev, V., et al. (2008) The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O<sub>2</sub> evolution rate by proton removal, *EMBO J.*, **27**, 782–791, doi: 10.1038/emboj.2008.12.
81. Terentyev, V. V., Shukshina, A. K., Ashikhmin, A. A., Tikhonov, K. G., and Shitov, A. V. (2020) The main structural and functional characteristics of photosystem-II-enriched membranes isolated from wild type and *cia3* mutant *Chlamydomonas reinhardtii*, *Life*, **10**, 63, doi: 10.3390/life10050063.
82. Koroidov, S., Shevela, D., Shutova, T., Samuelsson, G., and Messinger, J. (2014) Mobile hydrogen carbonate acts as proton acceptor in photosynthetic water oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6299–6304, doi: 10.1073/pnas.1323277111.
83. Süß, K. H., Arkona, C., Manteuffel, R., and Adler, K. (1993) Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5514–5518.
84. Бабаджанова М. П., Бабаджанова М. А., Алиев К. А. (2002) Свободный и мембраносвязанный мультиферментные комплексы цикла Кальвина листьев хлопчатника, *Физиология растений*, **49**, 663–669.
85. Punnett, T., and Iyer, R. V. (1964) The enhancement of photophosphorylation and the hill reaction by carbon dioxide, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2335–2339, doi: 10.1016/S0021-9258(20)82238-8.
86. Подорванов В. В., Золотарева Е. К., Черноштан А. А. (2005) Роль гидрокарбоната в светозависимом поглощении протонов изолированными хлоропластами, *Физиология и биохимия культурных растений*, **37**, 326–332.
87. Онойко Е. Б., Полищук А. В., Золотарева Е. К. (2010) Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы, *Доп. НАН України*, **10**, 160–165.
88. Missner, A., Kügler, P., Saparov, S. M., Sommer, K., Mathai, J. C., et al. (2008) Carbon dioxide transport through membranes, *J. Biol. Chem.*, **283**, 25340–25347, doi: 10.1074/jbc.M800096200.
89. Süß, K.-H. (1990) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-binding chloroplast thylakoid membrane proteins. *In vitro* evidence that H<sup>+</sup>-ATP synthase may serve as a membrane receptor, *Z. Naturforsch.*, **45**, 633–637.

90. Jebanathirajah, J. A., and Coleman, J. R. (1998) Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*, *Planta*, **204**, 177-182, doi: 10.1007/s004250050244.
91. Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordström, M., Böhmer, M., Xue, S., et al. (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO<sub>2</sub>-controlled stomatal movements in guard cells, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 87-93, doi: 10.1038/ncb2009.
92. Tian, W., Hou, C., Ren, Z., Pan, Y., Jia, J., et al. (2015) A molecular pathway for CO<sub>2</sub> response in Arabidopsis guard cells, *Nat. Commun.*, **6**, 6057, doi: 10.1038/ncomms7057.
93. Wang, X., Suzawa, T., Ohtsuka, H., Zhao, B., Miyamoto, Y., et al. (2010) Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway, *J. Cell. Physiol.*, **225**, 709-719, doi: 10.1002/jcp.22267.
94. Graham, D., and Reed, M. (1971) Carbonic anhydrase and the regulation of photosynthesis, *Nat. New Biol.*, **231**, 81-83, doi: 10.1038/newbio231081a0.
95. Slaymaker, D. H., Navarre, D. A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G. B., and 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**, 11640-11645, doi: 10.1073/pnas.182427699.

## UNSOLVED PROBLEMS OF CARBONIC ANHYDRASES FUNCTIONING IN PHOTOSYNTHETIC CELLS OF HIGHER C3 PLANTS

### Review

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

*Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: ivboni@rambler.ru*

The review presents current data on carbonic anhydrases found in various compartments of the photosynthetic cells of the higher plants. The available data on the gene expression of some of these carbonic anhydrases and its dependence on environmental factors and plant age are considered. The existing hypotheses about the functions of carbonic anhydrases of plasma membrane, cytoplasm as well as of stroma and thylakoids of chloroplast, first of all, about the participation of these enzymes in the feeding of carbon dioxide molecules to ribulose-bisphosphate carboxylase (Rubisco) are analyzed. The difficulties of establishing the physiological role of plant cell carbonic anhydrase are described in detail.

**Keywords:** carbonic anhydrase, higher plants, photosynthesis, chloroplasts, thylakoids