

УДК 577.1

УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗЫ САНЗ В СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ ВОДООКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ 2 ИЗ *Chlamydomonas reinhardtii*

© 2021 А.К. Шукшина, В.В. Терентьев*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ
«Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: v.v.terentyev@gmail.com

Поступила в редакцию 26.02.2021

После доработки 19.05.2021

Принята к публикации 19.05.2021

Участие карбоангидраз (КА) и КА-активности в функционировании фотосистемы 2 (ФС2) изучается давно и показано во многих работах. Однако на данный момент только для САНЗ из *Chlamydomonas reinhardtii* имеются доказательства её ассоциации с донорной стороной ФС2, где КА-активность САНЗ может оказывать влияние на функционирование водоокисляющего комплекса (ВОК). Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что САНЗ также участвует в организации нативной структуры ВОК независимо от её КА-активности. Показано, что у препаратов ФС2 из дикого типа (ДТ) *C. reinhardtii* высокая O₂-выделяющая активность ВОК прослеживается вплоть до 100 мМ NaCl в среде измерения и практически не снижается при увеличении времени инкубации с NaCl. При этом функция ВОК в ФС2 из мутанта *cia3*, лишённого САНЗ, значительно подавляется уже при концентрациях NaCl выше 35 мМ, достигая 50% при 100 мМ NaCl и увеличенном времени инкубации препаратов. Предполагается, что отсутствие САНЗ в ФС2 из *cia3* вызывает нарушение нативной структуры ВОК, позволяя более масштабные конформационные изменения его белков и, как следствие, подавление функции активного центра ВОК при повышении ионной силы среды. Результаты вестерн-блот-анализа свидетельствуют о более затруднённом удалении белка PsbP в ФС2 из *cia3* при повышенных концентрациях NaCl, по-видимому, за счёт изменений в межмолекулярных взаимодействиях между белками ВОК при отсутствии САНЗ. При этом значения максимального квантового выхода ФС2 практически не отличались у препаратов из ДТ и *cia3*, указывая на отсутствие влияния САНЗ на фотоиндуцированный перенос электронов в реакционном центре ФС2. Полученные результаты указывают на участие белка САНЗ в нативной организации ВОК и, как следствие, в стабилизации его функционального состояния в ФС2 из *C. reinhardtii*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Chlamydomonas reinhardtii*, карбоангидраза САНЗ, фотосистема 2, водоокисляющий комплекс, O₂-выделяющая активность, белок PsbP.

DOI: 10.31857/S0320972521070058

ВВЕДЕНИЕ

Металлсодержащие ферменты карбоангидразы (ЕС 4.2.1.1) (КА), катализирующие медленную спонтанную реакцию $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, широко представлены в фотосинтезирующих организмах [1–5].

В зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, являющейся классическим модельным объектом для изучения фотосинтеза, присутствует 12 генов, кодирующих различные изоформы КА, относящиеся к трём независимым (из 8 известных на сегодняшний день) α , β

и γ семействам [3, 5, 6]. Недавно КА-подобные белки стромы хлоропласта LC1B и LC1C (Low-CO₂ Inducible B- и C-белки соответственно), образующие при активации CO₂-концентрирующего механизма (СКМ) димерные комплексы LC1B–LC1C, окружающие пиреноид [7], также отнесли к β -КА, хотя показать КА-активность комплекса LC1B–LC1C, содержащего один атом Zn, авторам не удалось [8]. Считается, что большинство КА в *C. reinhardtii* прямо или опосредованно вовлечены в СКМ, значительно повышающий содержание C_i (CO₂ и HCO₃⁻) в строме хлоропласта [9]. Это необходимо для смещения активности рибулозо-1,5-бифосфат карбоксилазы-оксигеназы (ЕС 4.1.1.39) (Рубиско) в сторону ассимиляции CO₂ в цикле Кальвина–Бенсона [10].

САНЗ является последней из трёх α -КА найденных в *C. reinhardtii*. Как было установлено, фермент локализуется в люмене тилакои-

Принятые сокращения: БК – бикарбонат, HCO₃⁻; ВОК – водоокисляющий комплекс; ДТ – дикый тип; *cia3* – мутант, лишённый САНЗ в люмене тилакоидов; КА – карбоангидраза; СКМ – CO₂-концентрирующий механизм; ФС2 – фотосистема 2; Хл – хлорофилл; ЭА – этоксизоламид.

* Адресат для корреспонденции.

дов [11, 12]. Изначально для САНЗ также было предположено участие в СКМ [11, 12], и в ходе дальнейших исследований это предположение отчасти подтверждалось. Так, с помощью иммунодетекции с использованием первичных антител к САНЗ и электронной микроскопии было показано высокое присутствие белка САНЗ в люмене тилакоидов, пронизывающих пиреноид. Предполагалось, что ускорение ферментом реакции дегидратации бикарбоната (БК) ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) повышает там количество CO_2 , который свободно диффундирует через тилакоидную мембрану к Рубиско, сконцентрированной в пиреноиде [13, 14]. Более того, было показано, что фосфорилирование САНЗ при активации СКМ приводит к повышению содержания молекул фермента в тилакоидах пиреноида [15].

Тем не менее одновременно с этим было определено, что уровень экспрессии гена, кодирующего САНЗ, слабо варьирует даже при значительном снижении содержания CO_2 [15, 16] в отличие от уровней экспрессии генов других КА, участие которых в СКМ было установлено [16]. Подавление формирования пиреноида, т.е. блокирование активации СКМ, также не оказывало влияния на уровень экспрессии этого гена [17].

В ряде работ было показано, что САНЗ является мембраносвязанным белком в значительном количестве присутствующим в мембранных препаратах, обогащённых фотосистемой 2 (ФС2) [15, 18–21], но отсутствующим в мембранах ламелл, содержащих преимущественно комплексы фотосистемы 1 и цитохромного b_6f -комплекса [18, 19]. Добавление рекомбинантного белка САНЗ к препаратам ФС2, изолированным из мутанта *cia3*, лишённого САНЗ, показало полное связывание белка с мембранной фракцией, т.е. с ФС2 [22].

Отсутствие белка САНЗ в люмене тилакоидов в *cia3* приводило к значительному фотоингибированию функции ФС2 светом интенсивностью 2200 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ в отличие от дикого типа (ДТ), что полностью предотвращалось добавлением избытка БК [19]. В то же время одинаковая с *cia3* степень фотоингибирования ФС2 в клетках ДТ наблюдалась в присутствии ингибитора КА этоксиизоламида (ЭА) [19]. Для ДТ в присутствии ЭА также было показано значительно сниженное стимулирование фотосинтетического выделения O_2 низкими концентрациями БК (0–60 мкМ) в среде, обеднённой по $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, в результате чего кривая зависимости O_2 -выделяющей активности от концентрации БК была близка к таковой, полученной для *cia3* [18]. Все это свидетельствовало о том, что САНЗ за счёт своей КА-активности оказывает

влияние на функционирование ФС2, вероятно, взаимодействуя с её донорной стороной [18, 19].

Исследования по реконструкции фотосинтетической активности ФС2 из *cia3* рекомбинантным белком САНЗ в среде, обеднённой по $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ при pH 5,5, показало возрастание O_2 -выделяющей активности ФС2 в присутствии БК более чем на 70%, при этом максимальное стимулирование наблюдалось уже при 250 мкМ БК [22]. Также было определено, что для проявления максимальной фотосинтетической активности ФС2 рекомбинантный белок САНЗ должен присутствовать (связаться) с ней в соотношении 1/1 [22]. Было предположено, что дегидратазная КА-активность САНЗ ускоряет реакцию между протонами и ионами БК, стимулируя таким образом отвод H^+ от активного центра водоокисляющего комплекса (ВОК), поддерживая его высокую активность [22]. Это предположение согласовывалось с данными, полученными при pH > 6,5 [20, 21]. Так, отсутствие САНЗ (*cia3*) приводило к более выраженному подавлению фотосинтетической активности ФС2 при смещении pH от оптимального для ВОК диапазона (6,2–6,5) в сторону щелочных значений. При pH 7,0 разница между фотосинтетическими активностями ФС2 из ДТ и *cia3* была максимальной и достигала ~20%. При этом ингибиторы КА снижали активность ФС2 из ДТ до уровня *cia3*, указывая на роль КА-активности САНЗ. В свою очередь, добавление БК восстанавливало активность ФС2 из *cia3* до уровня ДТ, указывая на роль реакции между ионами БК и протонами (дегидратазное направление), выделяющимися от ВОК со скоростью до 75 H^+/c [20].

Гидратазная КА-активность САНЗ ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) была определена как для рекомбинантного белка со значением ~300 единиц Вильбур–Андерсона на 1 мг белка [23], так и для мембранных препаратов, обогащённых ФС2, со значением 30–50 единиц Вильбур–Андерсона на 1 мг хлорофилла (Хл) [15, 20]. Изучение этой активности САНЗ с помощью масс-спектрометрии выявило необычный для α -КА pH-оптимум в области 6,5, что удивительно совпадает с pH-оптимумом для ВОК [24].

Функциональная активность ВОК определяется белками, входящими в его состав и окружающими его активный центр. Для зеленых водорослей и высших растений это в основном три белка – PsbO, PsbP и PsbQ [25, 26]. Удаление даже одного из них приводит к значительным конформационным изменениям в нативной структуре ВОК [27], в том числе и в белковом окружении его активного центра, и, как следствие, к критическому снижению его активности [28, 29]. Состав и свойства (в том числе pH и

ионная сила) среды, в которую обращён ВОК и которая *in vivo* представлена люменом тилакоида, по-видимому, также могут оказывать влияние на активность «собранного» ВОК через конформационные изменения белков. Имеются данные о возможном участии белка САНЗ в организации нативной структуры ВОК. Например, было обнаружено, что ФС2 из *cia3* характеризуются повышенным содержанием низкопотенциальной редокс-формы цитохрома *b559*, белка корового комплекса ФС2, по сравнению с ФС2 из ДТ [21]. Согласно литературным данным, нарушение нативной структуры ВОК приводит к увеличению доли низкопотенциальной редокс-формы цитохрома *b559* [30, 31], по-видимому, в результате взаимодействия белка PsbE цитохрома *b559* с белком PsbP ВОК [32]. В то же время с помощью быстрой ОJ(I)P-кинетики возрастания флуоресценции Хл *a* были получены данные, свидетельствующие о затруднённом переносе электронов между Q_A и Q_B на акцепторной стороне ФС2 из *cia3* по сравнению с ФС2 из ДТ [21], что могло быть следствием конформационных изменений белков кора ФС2 [33–35], вызванных нарушением структуры ВОК при отсутствии САНЗ. Значительные конформационные изменения суперкомплекса ФС2, вызванные удалением отдельных белков ВОК, были ранее показаны с помощью электронной микроскопии с последующим анализом одночастичных изображений [36]. При этом кинетика окисления Q_A после единичной насыщающей вспышки действительно замедлялась, что свидетельствовало о снижении скорости переноса электронов между Q_A и Q_B [37, 38].

Таким образом, белок САНЗ может локализоваться в непосредственной близости от белков ВОК, оказывая влияние на их пространственную организацию, тем более что присутствие САНЗ в изолированных коровых комплексах ФС2 было ранее показано [15, 19]. Как следствие, сборка ВОК в отсутствие САНЗ может приводить к появлению небольших изменений в его нативной структуре, что не оказывает влияния на функцию ВОК при оптимальных условиях, но явно проявляется при неоптимальных или стрессовых условиях, таких как смещённый pH [20–22], высокий свет [19], низкий уровень CO_2/HCO_3^- [18, 19, 22].

В данной работе мы изучали функциональное и структурное состояния ВОК в препаратах ФС2 из ДТ и *cia3 C. reinhardtii* в широком диапазоне значений ионной силы в среде измерения при оптимальном для функционирования ВОК pH 6,5. Полученные данные свидетельствовали о структурной роли белка САНЗ в нативной организации ВОК, поддерживающей его O_2 -выде-

ляющую активность вплоть до 100 мМ NaCl, по-видимому, за счёт сохранения конформационной структуры всего комплекса, в том числе активного центра ВОК. Роль САНЗ обсуждается в сравнении с белками ВОК, в частности с PsbP, удаление или отсутствие которого критически сказывается на функции ВОК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали мембранные препараты, обогащенные ФС2, изолированные из двух штаммов зеленой микроводоросли *C. reinhardtii*: мутант, лишенный клеточной стенки CC-503 cw92 mt+, используемый в данном исследовании в качестве ДТ, и двойной мутант *cia3*, лишенный клеточной стенки и карбоангидразы САНЗ в люмене тилакоидов. Оба штамма использовались в опубликованных ранее работах [15, 18–22]. Культуры водорослей выращивали в одинаковых условиях при температуре 25 °С, продувании воздухом, обогащенным 5% CO_2 , непрерывном освещении люминесцентными лампами («холодный» белый свет) с интенсивностью света 90–100 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Клетки собирали на экспоненциальной фазе роста.

Для изолирования ФС2 применяли методику, описанную ранее [20, 21], с изменениями. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g, 10 мин, осадок ресуспендировали в охлажденном буфере А (50 мМ Hepes-NaOH, pH 7,8, 100 мМ NaCl, 2 мМ EDTA). Непосредственно перед разрушением клеток в буфер А добавляли аскорбат Na до конечной концентрации 1 мМ. Клетки разрушали с помощью механического гомогенизатора типа Beadbeater («BioSpec», США) с использованием 0,5 мм циркониевых бус (zirconia/silica, «BioSpec»), 4 цикла по 30 с охлаждением ячейки во льду между циклами в течение 3–5 мин. На финальном этапе мембранные препараты, обогащенные ФС2, ресуспендировали в охлажденном буфере С (20 мМ MES-NaOH, pH 6,5, 15 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 300 мМ сахароза) до концентрации 2–4 мг Хл/мл, гомогенизировали в присутствии 10% (v/v) глицерина и хранили при –70 °С.

Общую концентрацию Хл в препаратах определяли спектрофотометрически после экстракции пигментов 80%-ным ацетоном [39].

Скорость фотосинтетического выделения O_2 измеряли при 25 °С с помощью электрода Кларка в 1-мл ячейке («Hansatech», Великобритания) в среде, содержащей 20 мМ MES-NaOH, pH 6,5 и 400 мМ сахарозы. Концентрацию NaCl в среде измерения варьировали от 0 до 500 мМ в зависи-

мости от эксперимента. В качестве экзогенных доноров электрона использовали 1 мМ феррицианид К и 0,2 мМ 2,6-дихлоро-*p*-бензохинон. Интенсивность насыщающего света ($\lambda > 600$ нм) составляла 1950 мкмоль фотонов \cdot м $^{-2}$ \cdot с $^{-1}$. Концентрация Хл в ячейке во время измерений была 10 мкг/мл. Перед включением освещения препараты уравнивали в ячейке со средой измерения в течение 3 мин. Полученные результаты нормировались к значениям, измеренным при 35 мМ NaCl, которые у ФС2 из ДТ и *cia3* были близки и находились в диапазоне 275–283 мкмоль O₂ (мг Хл \cdot ч) $^{-1}$.

Переменную флуоресценцию Хл ФС2 измеряли с помощью ХЕ-РАМ-флуориметра («Walz», Германия) в 1-см кварцевой кювете при постоянном перемешивании в той же среде и при той же концентрации Хл, что и при измерении скорости фотосинтетического выделения O₂. Максимальный квантовый выход ФС2 рассчитывали по формуле: $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, где F_o – фоновый уровень флуоресценции препаратов, адаптированных к темноте, а F_m – фотоиндуцированный насыщающим светом ($\lambda > 650$ нм) максимальный уровень флуоресценции.

Для вестерн-блот-анализа препараты отбирались из ячейки после измерения скорости выделения O₂. Мембранную фракцию, содержащую ФС2, отделяли центрифугированием при 12 000 g, 10 мин. Белки, содержащиеся в супернатанте, осаждали добавлением 1/5 части 50%-ного водного раствора трихлоруксусной кислоты, последующей инкубацией в течение 1–2 ч и центрифугированием при 12 000 g, 10 мин. Полученные осадки трижды промывали 100%-ным ледяным ацетоном и подсушивали на воздухе в течение ночи. Осадки мембранной фракции и белков из супернатантов растворяли в буфере для нанесения (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 8 М мочевины, 3% Ds-Na, 0,005% бромфеноловый синий, 10% сахаразы, 5% меркаптоэтанол), прогревали 3 мин при 95 °С и центрифугировали 10 мин при 12 000 g. Супернатанты отбирали для нанесения на гель.

Электрофорез в денатурирующих условиях и вестерн-блот-анализ проводили так же, как было описано ранее с использованием камеры Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США) [20, 21], с небольшими изменениями. Для электрофоретического разделения белков использовали 12,5%-ный Ds-Na-ПААГ. Препараты наносили из расчёта 1 мкг Хл/дорожка, исходя из концентрации Хл, равной 10 мкг/мл при проведении экспериментов. Электрофорез проводили при постоянном напряжении в режиме (на 2 геля) 100 В в концентрирующем геле (20 мин) и 200 В в разрешающем ге-

ле (60–70 мин). После электрофореза белки переносили на PVDF-мембрану (Immun-Blot PVDF Membrane 0,2 мкм, «Bio-Rad») с использованием модуля для мокрого блоттинга Mini Trans-Blot («BioRad») при постоянной силе тока 270 мА, 40 мин. О полноте переноса судили по отсутствию полос исследуемых белков в ПААГ, окрашенном после блоттинга. Мембраны инкубировали с первичными антителами против белков D1 (PsbA), PsbO и PsbP (соответственно AS11 1786, AS06 142-33 и AS06 142-23 («Agriser», Швеция)) в течение ночи при 4 °С при разведении 1 : 2000. Со вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена («GE Healthcare», США), мембраны инкубировали в течение 1 ч при разведении 1 : 5000. Детектирование проводили с помощью набора Pierce ECL Plus («Thermo Scientific», США) и системы для гель-документирования ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad»). Относительную оптическую плотность полос определяли с помощью программы Image J.

Окрашивание мажорных белковых полос на PVDF-мембране после проведения детектирования блота проводили с помощью 0,2%-ного раствора Понсо в 5%-ной ледяной уксусной кислоте (3–5 с) с последующей отмывкой в дистиллированной воде до осветления фона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты работы свидетельствовали о том, что при pH 6,5 O₂-выделяющая активность ФС2 из ДТ *C. reinhardtii* слабо изменяется (в пределах 10%) в диапазоне концентраций NaCl 5–100 мМ с максимальными значениями активности при 35 мМ и 50 мМ NaCl (рис. 1, а). Это согласовывалось с имеющимися в литературе данными об активности ВОК в ФС2 из *C. reinhardtii* при разных концентрациях NaCl [28, 29]. Снижение концентрации NaCl в среде измерения до 2 и 0 мМ приводило к подавлению скорости выделения O₂ препаратами до 85% и 70% соответственно. Согласно ранее опубликованным данным, это могло быть результатом удаления ионов Cl⁻ из мест их локализации вблизи активного центра ВОК, что, как известно, негативно влияет на его функциональное состояние [40] (см. также обсуждение в статье Terentyev et al. [20]). Препараты ФС2 из *cia3* показывали схожую с ФС2 из ДТ концентрационную зависимость O₂-выделяющей активности от NaCl от 0 до 35 мМ, где она была максимальной (100%) (рис. 1, а). Значения скоростей выделения O₂ ФС2 из ДТ и *cia3* при 35 мМ NaCl были близки (см. «Материалы и методы») и, со-

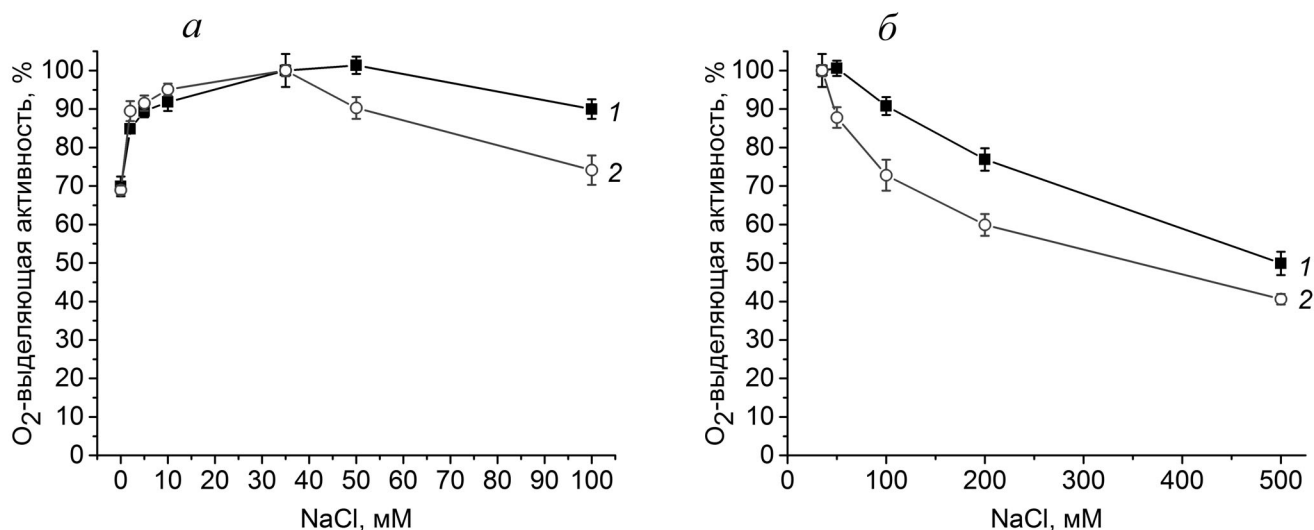


Рис. 1. Зависимость скорости фотосинтетического выделения O_2 препаратами ФС2 из ДТ (1) и *cia3* (2) от концентрации NaCl в среде измерения при оптимальном для активности ВОК pH 6,5. Исследуемый диапазон концентраций NaCl – 0–100 мМ (а) и 35–500 мМ (б). Данные нормированы к значениям, полученным при 35 мМ NaCl. Результаты представляют средние значения \pm стандартные отклонения ($n = 4-7$)

ответственно, приняты за 100%. Однако в отличие от ДТ повышение концентрации NaCl выше 35 мМ подавляло скорость выделения O_2 препаратами ФС2 из *cia3*, так что при 50 мМ NaCl она снижалась до ~90%, а при 100 мМ NaCl – уже до ~75%.

Значительное увеличение концентрации NaCl в среде измерения, которое должно было вызвать сильные конформационные изменения белков ВОК, действительно приводило к подавлению O_2 -выделяющей активности ФС2 из ДТ до 75% при 200 мМ NaCl, что соответствовало данным, полученным ранее на ФС2 из шпината [41], и до 50% – при 500 мМ NaCl (рис. 1, б). В тех же условиях активность ВОК в ФС2 из *cia3* подавлялась на 10–15% сильнее. Результаты свидетельствовали о более выраженном негативном влиянии повышения ионной силы раствора на функциональную активность ВОК в ФС2 из *cia3*, что могло быть следствием более выраженных конформационных изменений белков ВОК. Наиболее вероятно, что причиной этого могло быть изначальное присутствие некоего структурного нарушения в нативной организации ВОК у *cia3* по сравнению с ДТ, вызванного отсутствием белка САН3, что согласуется с нашим недавним предположением [21].

Дополнительное инкубирование препаратов в присутствии 35, 50 и 100 мМ NaCl практически не оказывало влияния на ФС2 из ДТ. Через 30 мин при всех трёх концентрациях O_2 -выделяющая активность снижалась не более чем на 10% (рис. 2), что было скорее результатом влияния инкубации препаратов при повышен-

ной до 25 °С температуре в ячейке измерения, чем действием ионной силы раствора. Схожая небольшая потеря скорости выделения O_2 отмечалась и в случае ФС2 из *cia3* при инкубации с 35 мМ NaCl, однако при 50 и 100 мМ NaCl наблюдалось дополнительное подавление активности ВОК, значительно возрастающее со временем инкубации (рис. 2). В результате O_2 -выделяющая активность ФС2 из *cia3* снижалась примерно на 12% и 19% через 15 мин и на 17% и 31% – через 30 мин инкубации при концентрации NaCl соответственно 50 и 100 мМ относительно значений, наблюдаемых без дополнительной инкубации препаратов. В итоге через 30 мин при 100 мМ NaCl потеря активности ВОК у ФС2 из *cia3* достигала 50%.

Однако эффективность преобразования поглощенной световой энергии ФС2, определяемая как максимальный квантовый выход (F_v/F_m), практически не изменялась у препаратов из ДТ и *cia3* при концентрациях 35, 50 и 100 мМ NaCl (рис. 3). Более того, дополнительная инкубация ФС2 из ДТ и *cia3* с NaCl лишь незначительно и практически в одинаковой степени снижала значение F_v/F_m (максимально не более чем на 12%), что, вернее всего, как это было описано выше, являлось результатом инкубации препаратов при 25 °С, чем действием ионной силы среды. Эти результаты указывали на независимость фотоиндуцированного переноса электронов в реакционном центре ФС2 от присутствия или отсутствия белка САН3. Таким образом, отсутствие белка САН3 в препаратах ФС2 влияло только на функциональное состояние ВОК.

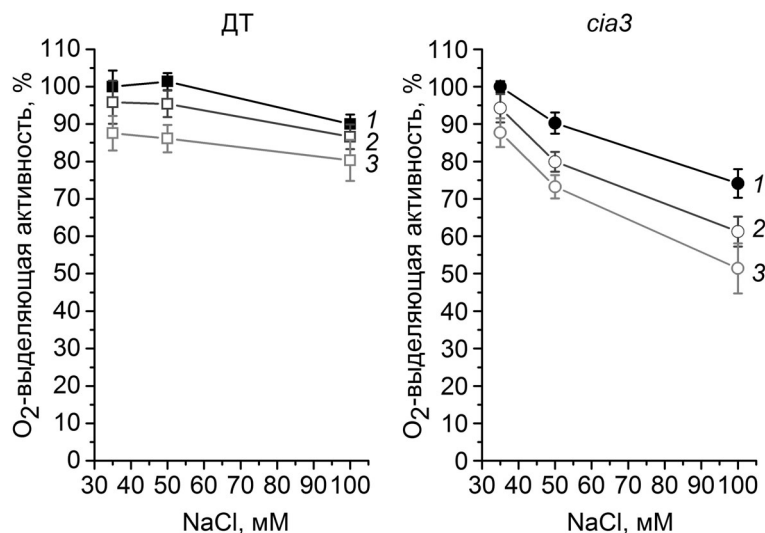


Рис. 2. Зависимость O_2 -выделяющей активности ФС2 из ДТ и *cia3* при разных концентрациях NaCl в среде измерения от времени инкубации при 25 °С. 1 – Без дополнительной инкубации, 2 – 15 мин инкубации, 3 – 30 мин инкубации. Данные нормированы к значениям, полученным при 35 мМ NaCl. Результаты представляют средние значения \pm стандартные отклонения ($n = 3-7$)

При этом эксперименты, проведенные в присутствии 0,5 мкМ ЭА, известного ингибитора КА, показали полное отсутствие его влияния на зависимость O_2 -выделяющей активности ФС2 из ДТ (также как и из *cia3*) от концентрации NaCl (рис. 4). Это указывало на то, что наб-

людаемые отличия в скорости выделения O_2 в ФС2 из ДТ и *cia3* при концентрациях NaCl выше 35 мМ (рис. 1 и 2) не были обусловлены КА-активностью САНЗ.

С помощью вестерн-блот-анализа (рис. 5) были исследованы препараты ФС2, отобранные

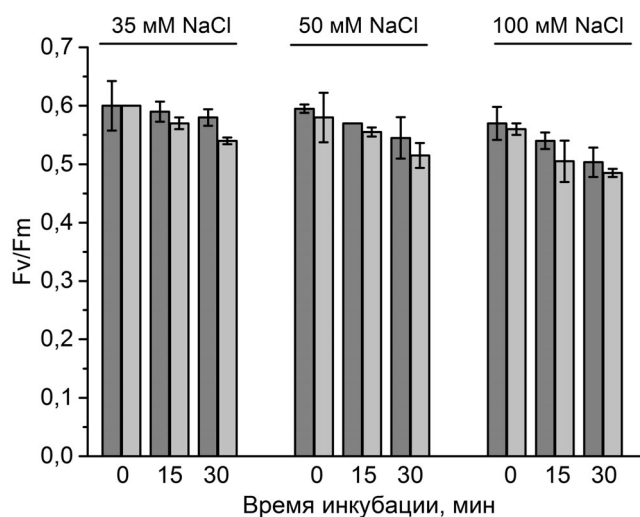


Рис. 3. Эффективность преобразования поглощенной световой энергии в ФС2 из ДТ (темно-серые колонки) и *cia3* (светло-серые колонки) при концентрации NaCl в среде измерения, соответственно 35, 50 и 100 мМ, и времени дополнительной инкубации, указанной под колонками. Учитывая время, необходимое для установившегося состояния препаратов со средой измерения, «0» соответствует 3 мин инкубации. Результаты представляют средние значения \pm стандартные отклонения ($n = 3$)

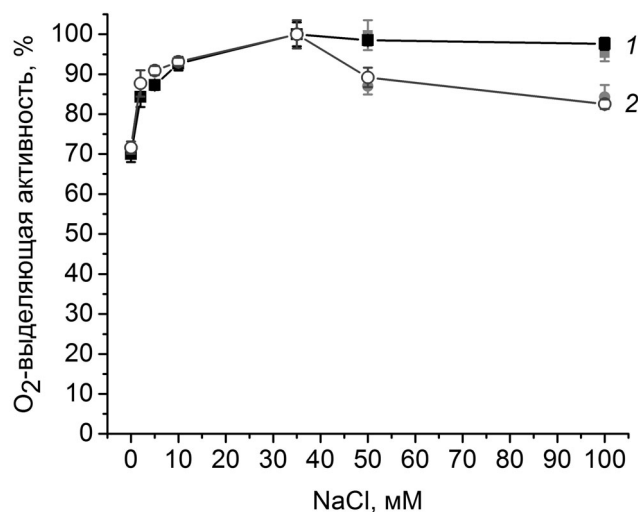


Рис. 4. Влияние ингибитора КА на скорость фотосинтетического выделения O_2 препаратами ФС2 из ДТ (1) и *cia3* (2) при разных концентрациях NaCl в среде измерения. Каждое измерение проводили в присутствии 0,5 мкМ ЭА в ячейке. Значения O_2 -выделяющей активности ФС2 из ДТ и *cia3*, полученные при отсутствии ЭА, показаны серыми квадратами и кружками при 50 и 100 мМ NaCl соответственно. Данные нормированы к значениям, полученным при 35 мМ NaCl. Результаты представляют средние значения \pm стандартные отклонения ($n = 3$)

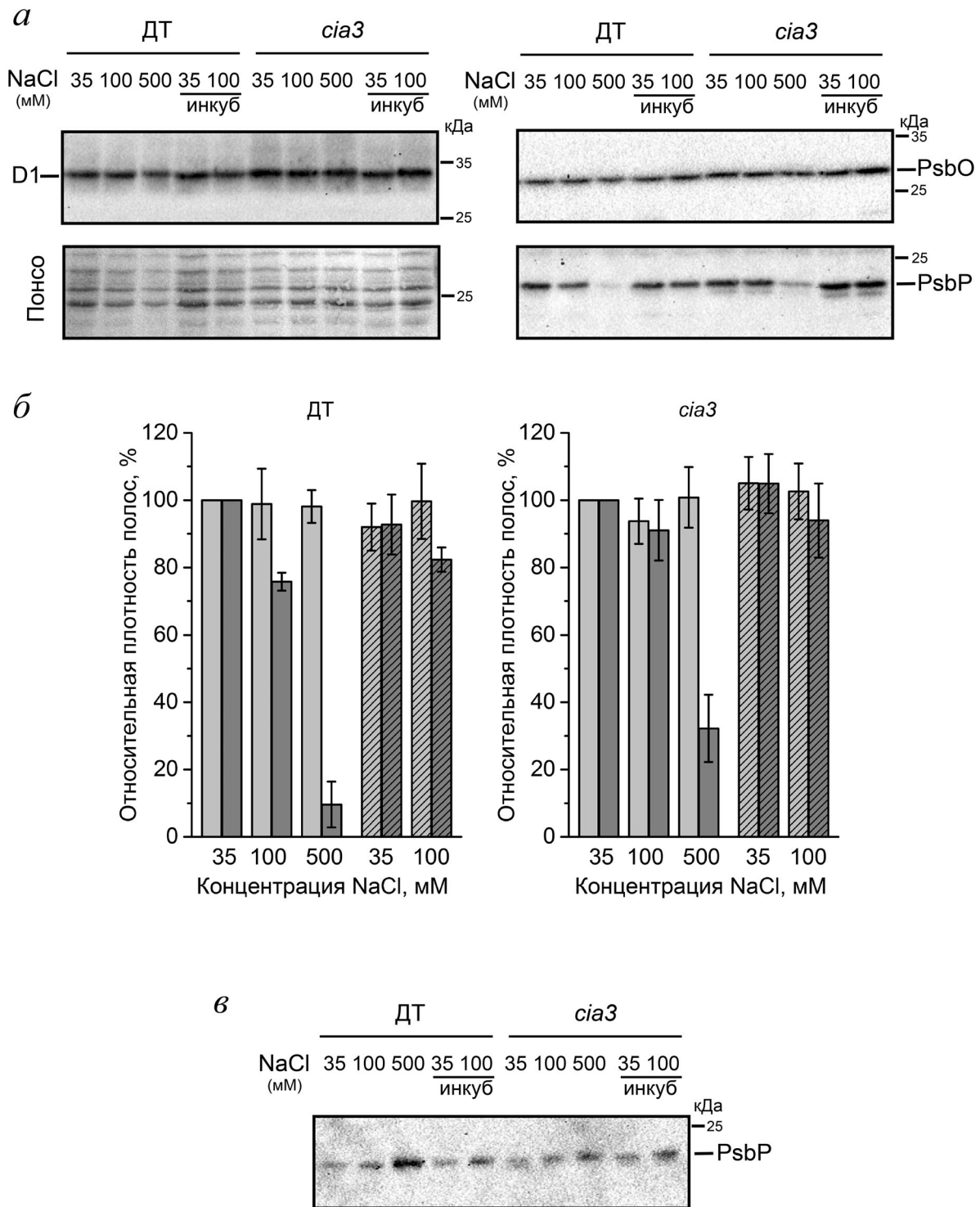


Рис. 5. Вестерн-блот-анализ препаратов ФС2 из ДТ и *cia3*, отобранных после экспериментов, представленных на рис. 1 и 2. *а* – Вестерн-блоты осажденных из образцов мембранных препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* с использованием первичных антител против белков D1, PsbO и PsbP, а также PVDF-мембрана, окрашенная Понсо. Над дорожками указаны концентрации NaCl, при которых проводились эксперименты. «Инкуб» обозначает препараты, инкубированные 30 мин при указанной концентрации NaCl. *б* – Относительная плотность полос белков PsbO (светло-серые колонки) и PsbP (темно-серые колонки), нормированных к значениям, полученным для соответствующих полос белка D1. Заштрихованные колонки – это препараты, инкубированные 30 мин. Значения, полученные при 35 мМ NaCl, использовались для PsbO и PsbP как 100% на каждом вестерн-блоте отдельно для ФС2 из ДТ и *cia3*. Результаты представляют средние значения \pm стандартные отклонения ($n = 3$). *в* – Вестерн-блот белков, осажденных из супернатантов после удаления мембранной фракции ФС2 (*а*), с использованием первичных антител против белка PsbP

из ячейки после проведения измерений скорости выделения O_2 при разных концентрациях NaCl (см. «Материалы и методы»), в том числе и после инкубации с NaCl в течение 30 мин (рис. 1 и 2). Использовали антитела против белка D1, который является белком коровьего комплекса ФС2 и к интенсивности сигнала которого были нормированы результаты, полученные для других белков. Это было необходимо, поскольку сам отбор препаратов, как и осаждение ФС2 при разных концентрациях NaCl, приводили к потерям препаратов и, как следствие, к различиям в конечном содержании белков в образцах (рис. 5, а). Также использовали антитела к белкам PsbO и PsbP, которые являются белками ВОК. Сравнение результатов при 35 мМ NaCl по белкам PsbO и PsbP, нормированных к интенсивности соответствующих полос D1, показало схожие значения для ФС2 из ДТ и *cia3* (соответственно $104 \pm 6,3\%$ и $97 \pm 4,6\%$ для белка PsbO и $95 \pm 9,1\%$ и $105 \pm 10,0\%$ для белка PsbP), что свидетельствовало об одинаковом содержании этих белков в составе ВОК в ФС2 из ДТ и *cia3*. Это полностью согласовывалось с нашими данными, опубликованными ранее [21].

При повышении концентрации NaCl содержание белка PsbO не изменялось как в препаратах из ДТ, так и из *cia3* по отношению к D1 (рис. 5, б), что согласовывалось с известными литературными данными [29, 42]. В отличие от этого содержание белка PsbP в препаратах из ДТ и *cia3* имело тенденцию к уменьшению и было более выражено в ФС2 из ДТ. Так, содержание PsbP в ФС2 из ДТ снижалось до ~75% уже при 100 мМ NaCl, а при 500 мМ NaCl оставалось ~10% белка. В то же время содержание PsbP в ФС2 из *cia3* не уменьшалось при 100 мМ NaCl, и даже при 500 мМ NaCl в составе ВОК оставалось ~30% белка, т.е. более чем в 3 раза больше по сравнению с ДТ (рис. 5). Интересно, что дополнительная инкубация ФС2 из ДТ и *cia3* в течение 30 мин в присутствии 100 мМ NaCl не усиливала удаление белка PsbP, несмотря на то, что O_2 -выделяющая активность ФС2 из *cia3* в этом случае снижалась вдвое (рис. 2).

Вестерн-блот-анализ супернатантов после удаления из них мембранной фракции, содержащей ФС2, показал возрастание содержания PsbP при повышении концентрации NaCl (рис. 5, в). Максимальное количество PsbP в супернатанте наблюдалось при 500 мМ NaCl, при этом было значительно выше в случае ФС2 из ДТ по сравнению с препаратами из *cia3*. Это согласовывалось с данными по удалению белка PsbP из ФС2 в мембранной фракции (рис. 5, а).

Белки D1 и PsbO не детектировались в препаратах супернатантов при всех исследуемых концентрациях NaCl (не показано).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные в нашей предыдущей работе [21], указывали на присутствие небольших структурных нарушений в нативной организации ВОК в ФС2 из *cia3*, вызванных отсутствием белка САНЗ (см. «Введение»). В частности, повышение pH вызывало более сильные конформационные изменения белков, в том числе белков ВОК в ФС2 из *cia3* по сравнению с ФС2 из ДТ [21], что, в свою очередь, значительно снижало функциональную активность ВОК [20, 21].

С использованием препаратов из разных окисленных организмов (высших растений, красных водорослей, цианобактерий) ранее было показано, что удаление даже одного из белков ВОК приводит к конформационным изменениям всего комплекса [27, 43–45], что негативно сказывается на функции активного центра ВОК даже при оптимальных условиях из-за изменений, происходящих в его ближайшем белковом окружении, несмотря на сохранность в структуре его лигандов [43, 45]. Однако при оптимальных условиях, таких как pH 6,5, 35 мМ NaCl, 25 °C и др., значительных отличий в функциональном состоянии ВОК (O_2 -выделяющая активность, восстановление дихлорофенолиндофенола от воды) в ФС2 из ДТ и *cia3* *S. reinhardtii* не наблюдалось как в этой (рис. 1 и 4), так и в предыдущих работах [20, 21]. Это указывало на то, что нарушения в нативной структуре ВОК, вызванные отсутствием САНЗ, по-видимому, были не настолько критичны, как, например, при удалении PsbP, что приводило к значительной потере активности ВОК ФС2 из *S. reinhardtii* [28, 46].

Данное предположение согласовывалось с результатами по влиянию сниженных концентраций ионов Cl^- на функцию ВОК (рис. 1, а). Так, следствием отсутствия (мутанты, не содержащие PsbP, например, FUD39 и BF25 [28, 46]) или удаления белка PsbP из ФС2, а немного в меньшей степени и белка PsbQ, было появление сильной зависимости функции ВОК от ионов Cl^- [28, 29, 40, 47]. В этом случае ВОК достигал максимальной активности только при концентрациях NaCl выше 10–20 мМ [28, 40, 47], в то время как для «собранного» ВОК в ФС2 из *S. reinhardtii* эта зависимость от Cl^- была довольно низкой с константой диссоциации (K_d) ~30 мкМ [28]. Как следует из результатов,

представленных на рис. 1, а и 4, O₂-выделяющая активность препаратов в диапазоне концентраций NaCl 2–35 мМ изменялась в небольших пределах (не более 10%, а при 2 мМ NaCl – на ~15%), а кривая зависимости скорости выделения O₂ от концентрации NaCl была практически идентичной для ФС2 из ДТ и *cia3*. Даже при отсутствии NaCl в среде измерения O₂-выделяющая активность ФС2 из ДТ и *cia3* снижалась одинаково и не более чем на 30%, что согласовывалось с данными для ФС2 с «собранным» ВОК [40], поскольку удаление в этом случае белков PsbP, PsbQ или PsbP + PsbQ приводило к значительному (>80%) подавлению функции ВОК [28, 40].

Высокая скорость выделения O₂ препаратами ФС2 из ДТ *C. reinhardtii*, как было показано ранее, прослеживалась исследователями вплоть до 100 мМ NaCl [29], что также было характерным и для ФС2 из высших растений [40]. Устойчивость конформационной структуры белков ВОК к подобному повышению ионной силы раствора, вероятно, отражает физиологические условия его функционирования. Несмотря на то что предполагаемая концентрация ионов Cl⁻ в хлоропласте довольно низкая (~1–3 мМ), активный транспорт ионов Cl⁻ через тилакоидную мембрану на свету может приводить к значительному увеличению (до 50 раз) содержания ионов Cl⁻ в небольшом объеме люмена [48, 49]. При этом полученные в экспериментах с ФС2 из *cia3* результаты свидетельствовали об индуцировании конформационных изменений белков ВОК повышением ионной силы, негативно отражающихся на O₂-выделяющей активности, уже при концентрациях NaCl > 35 мМ (рис. 1 и 4). Т.е. при отсутствии САНЗ белки ВОК имели гораздо большую возможность к конформационным изменениям, поскольку структура ВОК, по-видимому, была более «рыхлой».

Более того, были получены свидетельства даже об изменении межмолекулярных взаимодействий белков ВОК при отсутствии САНЗ. Как следует из данных вестерн-блот-анализа, в ФС2 из *cia3* была отмечена значительно более низкая степень удаления белка PsbP из ВОК при повышенных концентрациях NaCl по сравнению с наблюдаемым для ФС2 из ДТ (рис. 5). Вероятно, это было следствием появления дополнительных гидрофобных или электростатических связей между PsbP и другими белками в результате отсутствия белка САНЗ в месте его локализации в ВОК. Стоит отметить, что для САНЗ как раз предполагается гидрофобное или/и электростатическое взаимодействие с донорной стороной ФС2 [19]. Интересно, что для гена, кодирующего PsbP, ранее был обнаружен

более высокий уровень экспрессии в *cia3* (по сравнению с ДТ), хотя уровни экспрессии генов, кодирующих другие белки ФС2, например, D1 и PsbO, а также белков фотосистемы 1, были одинаковыми в ДТ и *cia3* [19]. При этом наши результаты свидетельствуют о схожем содержании самого белка PsbP в препаратах ФС2 из ДТ и *cia3* (см. «Результаты исследования»). Таким образом, отсутствие САНЗ в люмене тилакоида изменяет интенсивность экспрессии гена, кодирующего белок именно ВОК (PsbP), для которого в данной работе мы показываем значительно измененные взаимодействия с другими белками.

Для селективного удаления (отмывки) белков PsbP и PsbQ из ФС2 высших растений обычно применяется инкубация препаратов с 1 М NaCl [30, 42, 50], что позволяет удалить подавляющую часть PsbP и PsbQ из ВОК (до 97%), в то время как PsbO полностью остается [42]. Как было показано ранее, при подобной NaCl-обработке в ФС2 из *C. reinhardtii* наблюдается только частичное удаление белков PsbP и PsbQ [29]. Однако, согласно результатам нашей работы, практически полное (~90%) удаление белка PsbP в ФС2 из ДТ наблюдалось уже при 500 мМ NaCl даже при отсутствии длительной инкубации, при том, что содержание PsbO в ФС2 оставалось неизменным (рис. 5). Наиболее вероятно, что такая высокая степень удаления PsbP была связана с повышенной температурой в ячейке (25 °С) и освещением ФС2 насыщающим светом при измерении скорости выделения O₂ (см. «Материалы и методы» и статью Terentyev et al. [21]), после чего препараты отбирали для проведения вестерн-блот-анализа. В литературе имеются данные, что освещение стимулирует удаление PsbP и PsbQ из ВОК [29, 42].

В таких экспериментальных условиях ~20% белка PsbP в препаратах ФС2 из ДТ отмывалось уже при 100 мМ NaCl (рис. 5), что, вероятно, определяло наблюдаемое снижение O₂-выделяющей функции (рис. 1 и 2). При этом дополнительное инкубирование до 30 мин не увеличивало количество удаленного PsbP из ВОК (рис. 5) и практически не снижало скорость выделения O₂ препаратами из ДТ (рис. 2). В отличие от этого, в ФС2 из *cia3* белок PsbP почти полностью сохранялся при 100 мМ NaCl даже после 30 мин инкубации (рис. 5), хотя O₂-выделяющая активность в этом случае подавлялась до ~75% уже до инкубации, а после 30 мин инкубации – снижалась до ~50% (рис. 2). Эти результаты поддерживали предположение о более масштабных конформационных изменениях белков ВОК в ФС2 из *cia3*, индуцируемых повышением ионной силы. Более того, они указывали на основную роль

подобных изменений в наблюдаемом подавлении функции активного центра ВОК при повышении концентрации NaCl в диапазоне 35–100 мМ. Стоит отметить также, что, согласно полученным данным, конформационные перестройки белков ВОК в ФС2 из *cia3* ещё и значительно усиливались со временем.

Ранее было показано, что КА-активность САНЗ может значительно стимулировать O₂-выделяющую активность ВОК в присутствии ионов БК, как было предположено, за счёт ускорения дегидратазной реакции, что стимулировало отвод протонов, возникающих там в большом количестве в результате окисления воды [20–22], от активного центра ВОК (см. «Введение»). Это позволяло проявлять и поддерживать максимальную эффективность активного центра, поскольку локальное закисление пространства около него внутри ВОК может ингибировать его функцию [22]. Полученные нами результаты по влиянию ингибитора ЭА, который, как было показано ранее, при концентрациях 0,2–0,5 мкМ полностью подавлял стимулирующий эффект САНЗ на фотосинтетическую активность ФС2 [20–22], свидетельствовали об отсутствии его влияния на O₂-выделяющую активность в ФС2 из ДТ при концентрациях до 100 мМ NaCl (рис. 4). С одной стороны, это согласовывалось с нашими предыдущими данными об отсутствии влияния ингибиторов КА на активность ВОК при оптимальном pH 6,5 в случае как ДТ, так и *cia3* [20]. С другой стороны, это указывало на то, что наблюдаемое ингибирование

активности ВОК в ФС2 из *cia3* при повышении концентрации NaCl (рис 1, а) было результатом конформационных перестроек, сказывающихся в том числе и на ближайшем белковом окружении активного центра ВОК и приводящих к снижению самого уровня его функциональности. Т.е. это не было следствием локальных условий, например, сильного закисления, как это было сказано выше, не позволяющих достичь максимального уровня его активности, как это наблюдалось в предыдущих работах [20–22].

Таким образом, полученные результаты явно свидетельствуют о том, что белок САНЗ участвует в формировании нативной структуры ВОК ФС2 из *C. reinhardtii*, которая препятствует масштабным конформационным перестройкам его белков при значительном изменении ионной силы среды, что, соответственно, обуславливает сохранение высокой O₂-выделяющей активности ВОК в широком диапазоне физиологически возможных концентраций NaCl (2–100 мМ).

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90056.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе отсутствуют исследования, в которых использовали в качестве объектов людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rudenko, N. N., Fedorchuk, T. P., Terentyev, V. V., Dymova, O. V., Naydov, I. A., et al. (2020) The role of carbonic anhydrase α -CA4 in the adaptive reactions of photosynthetic apparatus: the study with α -CA4 knockout plants, *Protoplasma*, **257**, 489-499, doi: 10.1007/s00709-019-01456-1.
- Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Nadeeva-Zhurikova, E. M., Fedorchuk, T. P., Ivanov, B. N., and Borisova-Mubarakshina, M. M. (2020) Advances in understanding the physiological role and locations of carbonic anhydrases in C3 plant cells, *Protoplasma*, doi: 10.1007/s00709-020-01566-1.
- Aspatwar, A., Haapanen, S., and Parkkila, S. (2018) An update on the metabolic roles of carbonic anhydrases in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Metabolites*, **8**, 22, doi: 10.3390/metabo8010022.
- 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., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P., and Ivanov, B. N. (2015) Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 674-687, doi: 10.1134/S0006297915060048.
- Jensen, E. L., Maberly, S. C., and Gontero, B. (2020) Insights on the functions and ecophysiological relevance of the diverse carbonic anhydrases in microalgae, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2922, doi: 10.3390/ijms21082922.
- Wang, Y., and Spalding, M. H. (2014) Acclimation to very low CO₂: contribution of limiting CO₂ inducible proteins, LCIB and LCIA, to inorganic carbon uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **166**, 2040-2050, doi: 10.1104/pp.114.248294.
- Jin, S., Sun, J., Wunder, T., Tang, D., Cousins, A. B., et al. (2016) Structural insights into the LCIB protein family reveals a new group of β -carbonic anhydrases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 14716-14721, doi: 10.1073/pnas.1616294113.
- Yamano, T., Sato, E., Iguchi, H., Fukuda, Y., and Fukuzawa, H. (2015) Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7315-7320, doi: 10.1073/pnas.1501659112.
- Bauwe, H., Hagemann, M., and Fernie, A. R. (2010) Photorespiration: players, partners and origin, *Trends Plant Sci.*, **15**, 330-336, doi: 10.1016/j.tplants.2010.03.006.
- Karlsson, J., Ciarke, A. K., Chen, Z. Y., Huggins, S. Y., Park, Y., et al. (1998) A novel α -type carbonic anhydrase

- associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂, *EMBO J.*, **17**, 1208-1216, doi: 10.1093/emboj/17.5.1208.
12. Karlsson, J., Hiltonen, T., Husic, H. D., Ramazanov, Z., and Samuelsson, G. (1995) Intracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **109**, 533-539, doi: 10.1104/pp.109.2.533.
 13. Sinetova, M. A., Kupriyanova, E. V., Markelova, A. G., Allakhverdiev, S. I., and Pronina, N. A. (2012) Identification and functional role of the carbonic anhydrase Cah3 in thylakoid membranes of pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 1248-1255, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.014.
 14. Markelova, A. G., Sinetova, M. P., Kupriyanova, E. V., and Pronina, N. A. (2009) Distribution and functional role of carbonic anhydrase Cah3 associated with thylakoid membranes in the chloroplast and pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **56**, 761-768, doi: 10.1134/S1021443709060053.
 15. Blanco-Rivero, A., Shutova, T., Román, M. J., Villarejo, A., and Martinez, F. (2012) Phosphorylation controls the localization and activation of the luminal carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *PLoS One*, **7**, e49063, doi: 10.1371/journal.pone.0049063.
 16. Fang, W., Si, Y., Douglass, S., Casero, D., Merchant, S. S., et al. (2012) Transcriptome-wide changes in *Chlamydomonas reinhardtii* gene expression regulated by carbon dioxide and the CO₂-concentrating mechanism regulator CIA5/CCM1, *Plant Cell*, **24**, 1876-1893, doi: 10.1105/tpc.112.097949.
 17. Mitchell, M. C., Metodieva, G., Metodiev, M. V., Griffiths, H., and Meyer, M. T. (2017) Pyrenoid loss impairs carbon-concentrating mechanism induction and alters primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Exp. Bot.*, **68**, 3891-3902, doi: 10.1093/jxb/erx121.
 18. Park, Y. H., Karlsson, J., Rojdestvenski, I., Pronina, N., Klimov, V., et al. (1999) Role of a novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.*, **444**, 102-105, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00037-X.
 19. Villarejo, A., Shutova, T., Moskvina, O., Forssén, 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Shutova, T., Kenneweg, H., Buchta, J., Nikitina, J., Terentyev, V., et al. (2008) The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal, *EMBO J.*, **27**, 782-791, doi: 10.1038/emboj.2008.12.
 23. Mitra, M., Mason, C. B., Xiao, Y., Ynalvez, R. A., Lato, S. M., and Moroney, J. V. (2005) The carbonic anhydrase gene families of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Can. J. Bot.*, **83**, 780-795, doi: 10.1139/b05-065.
 24. Benlloch, R., Shevela, D., Hainzl, T., Grundström, C., Shutova, T., et al. (2015) Crystal structure and functional characterization of photosystem II-associated carbonic anhydrase CAH3 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **167**, 950-962, doi: 10.1104/pp.114.253591.
 25. Nagao, R., Suzuki, T., Okumura, A., Niikura, A., Iwai, M., et al. (2010) Topological analysis of the extrinsic PsbO, PsbP and PsbQ proteins in a green algal PSII complex by cross-linking with a water-soluble carbodiimide, *Plant Cell Physiol.*, **51**, 718-727, doi: 10.1093/pcp/pcq042.
 26. Enami, I., Okumura, A., Nagao, R., Suzuki, T., Iwai, M., and Shen, J.-R. (2008) Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species, *Photosynth. Res.*, **98**, 349-363, doi: 10.1007/s11120-008-9343-9.
 27. Kondo, J., and Noguchi, T. (2018) PsbP-induced protein conformational changes around Cl⁻ ions in the water oxidizing center of photosystem II, *Photosynthetica*, **56**, 178-184, doi: 10.1007/s11099-017-0749-5.
 28. Rova, M., Franzén, L.-G., Fredriksson, P.-O., and Styring, S. (1994) Photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking the 23 kDa psbP protein shows increased sensitivity to photoinhibition in the absence of chloride, *Photosynth. Res.*, **39**, 75-83, doi: 10.1007/BF00027145.
 29. Suzuki, T., Minagawa, J., Tomo, T., Sonoike, K., Ohta, H., and Enami, I. (2003) Binding and functional properties of the extrinsic proteins in oxygen-evolving photosystem II Particle from a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* having His-tagged CP47, *Plant Cell Physiol.*, **44**, 76-84, doi: 10.1093/pcp/pcg010.
 30. Khorobrykh, A. (2019) Hydrogen peroxide and superoxide anion radical photoproduction in PSII preparations at various modifications of the water-oxidizing complex, *Plants*, **8**, 329, doi: 10.3390/plants8090329.
 31. Mamedov, F., Gadjeva, R., Styring, S. (2007) Oxygen-induced changes in the redox state of the cytochrome *b* 559 in photosystem II depend on the integrity of the Mn cluster, *Physiol. Plant.*, **131**, 41-49, doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00938.x.
 32. Nishimura, T., Nagao, R., Noguchi, T., Nield, J., Sato, F., and Ifuku, K. (2016) The N-terminal sequence of the extrinsic PsbP protein modulates the redox potential of Cyt *b*559 in photosystem II, *Sci. Rep.*, **6**, 21490, doi: 10.1038/srep21490.
 33. Allakhverdiev, S. I., Tsuchiya, T., Watabe, K., Kojima, A., Los, D. A., et al. (2011) Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule (QA)- and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll *a* and chlorophyll *d*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8054-8058, doi: 10.1073/pnas.1100173108.
 34. Shibamoto, T., Kato, Y., Sugiura, M., and Watanabe, T. (2009) Redox potential of the primary plastoquinone electron acceptor Q_A in photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* determined by spectroelectrochemistry, *Biochemistry*, **48**, 10682-10684, doi: 10.1021/bi901691j.
 35. Johnson, G. N., Rutherford, A. W., and Krieger, A. (1995) A change in the midpoint potential of the quinone Q_A in photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1229**, 202-207, doi: 10.1016/0005-2728(95)00003-2.
 36. Boekema, E. J., van Breemen, J. F. L., van Roon, H., and Dekker, J. P. (2000) Conformational changes in photosystem II supercomplexes upon removal of extrinsic subunits, *Biochemistry*, **39**, 12907-12915, doi: 10.1021/bi0009183.
 37. Semin, B. K., Davletshina, L. N., and Mamedov, M. D. (2018) Effect of different methods of Ca²⁺ extraction from PSII oxygen-evolving complex on the Q_A – oxidation kinetics, *Photosynth. Res.*, **136**, 83-91, doi: 10.1007/s11120-017-0441-4.

38. Roose, J. L., Frankel, L. K., Bricker, T. M. (2010) Documentation of significant electron transport defects on the reducing side of photosystem II upon removal of the PsbP and PsbQ extrinsic proteins, *Biochemistry*, **49**, 36-41, doi: 10.1021/bi9017818.
39. Porra, R. J., Thompson, W. A., and Kriedemann, P. E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **975**, 384-394, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0.
40. Miyao, M., and Murata, N. (1985) The Cl⁻ effect on photosynthetic oxygen evolution: interaction of Cl⁻ with 18-kDa, 24-kDa and 33-kDa proteins, *FEBS Lett.*, **180**, 303-308, doi: 10.1016/0014-5793(85)81091-7.
41. Miyao, M., and Murata, N. (1984) Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolution system and its replacement by chloride ions, *FEBS Lett.*, **170**, 350-354, doi: 10.1016/0014-5793(84)81342-3.
42. Miyao, M., and Murata, N. (1983) Partial disintegration and reconstitution of the photosynthetic oxygen evolution system. Binding of 24 kilodalton and 18 kilodalton polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **725**, 87-93, doi: 10.1016/0005-2728(83)90227-X.
43. Tomita, M., Ifuku, K., Sato, F., and Noguchi, T. (2009) FTIR evidence that the PsbP extrinsic protein induces protein conformational changes around the oxygen-evolving mn cluster in photosystem II, *Biochemistry*, **48**, 6318-6325, doi: 10.1021/bi9006308.
44. Uno, C., Nagao, R., Suzuki, H., Tomo, T., and Noguchi, T. (2013) Structural coupling of extrinsic proteins with the oxygen-evolving center in red algal photosystem II as revealed by light-induced FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry*, **52**, 5705-5707, doi: 10.1021/bi4009787.
45. Nagao, R., Tomo, T., and Noguchi, T. (2015) Effects of extrinsic proteins on the protein conformation of the oxygen-evolving center in cyanobacterial photosystem II as revealed by fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **54**, 2022-2031, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00053.
46. Nishimura, T., Sato, F., and Ifuku, K. (2017) *In vivo* system for analyzing the function of the PsbP protein using *Chlamydomonas reinhardtii*, *Photosynth. Res.*, **133**, 117-127, doi: 10.1007/s11120-017-0370-2.
47. Bryson, D. I., Doctor, N., Johnson, R., Baranov, S., and Haddy, A. (2005) Characteristics of iodide activation and inhibition of oxygen evolution by photosystem II, *Biochemistry*, **44**, 7354-7360, doi: 10.1021/bi047475d.
48. Cruz, J. A., Sacksteder, C. A., Kanazawa, A., and Kramer, D. M. (2001) Contribution of electric field ($\Delta\psi$) to steady-state transthylakoid proton motive force (pmf) *in vitro* and *in vivo*. Control of pmf parsing into $\Delta\psi$ and ΔpH by ionic strength, *Biochemistry*, **40**, 1226-1237, doi: 10.1021/bi0018741.
49. Raven, J. A. (2020) Chloride involvement in the synthesis, functioning and repair of the photosynthetic apparatus *in vivo*, *New Phytol.*, **227**, 334-342, doi: 10.1111/nph.16541.
50. Yanykin, D. V., Khorobrykh, A. A., Terentyev, V. V., and Klimov, V. V. (2017) Two pathways of photoproduction of organic hydroperoxides on the donor side of photosystem 2 in subchloroplast membrane fragments, *Photosynth. Res.*, **133**, 129-138, doi: 10.1007/s11120-017-0373-z.

INVOLVEMENT OF CARBONIC ANHYDRASE CAH3 IN STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STABILISATION OF THE WATER-OXIDIZING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II FROM *Chlamydomonas reinhardtii*

A. K. Shukshina and V. V. Terentyev*

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: v.v.terentyev@gmail.com

The involvement of carbonic anhydrases (CA) and CA activity in the functioning of photosystem II (PSII) has been studied for a long time and has been shown in many works. However, so far only for CAH3 from *Chlamydomonas reinhardtii* there is evidence for its association with the donor side of PSII, where the CA activity of CAH3 can influence the functioning of the water-oxidizing complex (WOC). Our results suggest that CAH3 is also involved in the organization of the native structure of WOC independently of its CA activity. It was shown that in PSII preparations from wild type (WT) the high O₂-evolving activity of WOC was observed up to 100 mM NaCl in the medium and practically did not decrease with increasing incubation time with NaCl. At the same time, the WOC function in PSII preparations from CAH3-deficient mutant *cia3* is significantly inhibited already at NaCl concentrations above 35 mM, reaching 50% at 100 mM NaCl and increased incubation time. It is suggested that the absence of CAH3 in PSII from *cia3* causes disruption of the native structure of WOC, allowing more pronounced conformational changes of its proteins and, consequently, suppression of the WOC active center function, when the ionic strength of the medium is increased. The results of Western blot analysis indicate a more difficult removal of PsbP protein from PSII of *cia3* at higher NaCl concentrations, apparently due to the changes in the intermolecular interactions between proteins of WOC in the absence of CAH3. At the same time, the values of the maximum quantum yield of PSII did not practically differ between preparations from WT and *cia3*, indicating no effect of CAH3 on the photoinduced electron transfer in the reaction center of PSII. The obtained results indicate the involvement of the CAH3 protein in the native organization of the WOC and, as a consequence, in the stabilization of its functional state in PSII from *C. reinhardtii*.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, carbonic anhydrase CAH3, photosystem II, water-oxidizing complex, O₂-evolving activity, PsbP protein