

Журикова Елена Михайловна

**Исследование участия альфа-карбоангидразы 2 и альфа-карбоангидразы 4 в  
фотосинтетическом метаболизме *Arabidopsis thaliana***

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Пушино-2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Институте фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН)

Научные руководители: доктор биологических наук  
**Иванов Борис Николаевич**  
кандидат биологических наук  
**Игнатова Людмила Казимировна**

Официальные оппоненты: **Погосян Сергей Иосифович**,  
доктор биологических наук, профессор,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова», биологический факультет,  
профессор кафедры биофизики.

**Войцеховская Ольга Владимировна**,  
кандидат биологических наук,  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Ботанический институт  
им. В.Л. Комарова Российской академии наук,  
зав. лабораторией экологической физиологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Национальный исследовательский Нижегородский  
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Защита состоится 25 ноября 2016 г. в \_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 002.066.01,  
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института  
фундаментальных проблем биологии Российской академии наук по адресу: 142290, г. Пущино  
Московской обл., ул. Институтская, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФПБ РАН: (<http://www.ibbp.psn.ru>)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » сентября 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

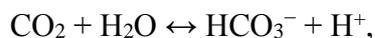


Галина Николаевна Назарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Карбоангидраза (КА), фермент, катализирующий взаимопревращение двух форм неорганического углерода в соответствии с реакцией



присутствует во всех живущих на Земле организмах. Известно участие КА в ключевых процессах в животных и водорослях. С учетом важности для метаболизма компонентов катализируемой карбоангидразами реакции,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  и  $\text{H}^+$ , можно полагать, что и в высших растениях эти ферменты должны участвовать в процессах биосинтеза, фотосинтеза, дыхания и других, ускоряя поставку или удаление углерода в разных формах и протона, обеспечивая необходимую скорость протекания биохимических реакций и поддержание кислотно-щелочного баланса. Значение карбоангидраз для высших растений подчеркивается тем, что в небольшом геноме *Arabidopsis thaliana* найдено 19 генов, кодирующих карбоангидразы, принадлежащие трем основным семействам  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (Fabre et al., 2007). В одном компартменте клетки может содержаться несколько карбоангидраз, так в митохондриях расположено пять КА  $\gamma$  семейства и одна КА  $\beta$  семейства. К настоящему времени в этих органеллах было идентифицировано четыре карбоангидразы (далее названия указаны по номенклатуре, принятой для карбоангидраз *A. thaliana*, (Fabre et al., 2007):  $\beta$ КА1,  $\beta$ КА5,  $\alpha$ КА1 и  $\alpha$ КА4. Последняя была обнаружена в тилакоидной мембране, но ее более точное расположение в этой структуре не было установлено (Friso et al., 2004). Однако, достоверно не известно о конкретном участии какой-либо КА в процессе фотосинтеза, протекающем в высших растениях. В строме хлоропластов на свету рН около 7,8, и преобладающей формой неорганического углерода является бикарбонат-ион, тогда как субстратом Рубиско служит  $\text{CO}_2$ , медленно образующийся из бикарбоната в результате спонтанной дегидратации. Казавшееся очевидным участие в процессе фотосинтеза стромальной  $\beta$ КА1, которая по количеству белка занимает второе место после Рубиско и должна бы ускорять дегидратацию бикарбоната, не подтвердилось, поскольку снижение до 1% ее содержания не привело к снижению фотосинтеза (Price et al., 1994). Большое количество источников карбоангидразной активности в хлоропластах, однако, предполагает, что они могут принимать участие в реакциях, включенных в процесс фотосинтеза.

Одним из самых эффективных путей при исследовании функций белков/ферментов в настоящее время является использование мутантных растений с нокаутом исследуемого белка. При предварительном анализе фотосинтетических характеристик ряда мутантов арабидопсиса, с нокаутированными генами 14-ти карбоангидраз особенно интересными для дальнейшего анализа возможного участия этих карбоангидраз в фотосинтезе оказались мутантные растения с нокаутом гена *At2g28210* или гена *At4g20990*, которые соответственно кодируют карбоангидразы  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА4.

Особенностью растений, обусловленной «сидячим» образом жизни, является их способность приспосабливаться к различным условиям внешней среды. Известно, что процесс фотосинтеза является не только источником энергии для клетки, но и чувствительным сенсором условий внешней среды: температуры, освещенности, концентрации  $\text{CO}_2$  и т.д. (Rochaix J.D.,

2011). Возможно, что, участвуя в обеспечении оптимального протекания реакций фотосинтеза, карбоангидразы могут быть компонентами системы адаптации.

Таким образом, проблема состоит в том, что, несмотря на многочисленные предположения, роль карбоангидраз в метаболизме клеток высших растений и, в частности, в процессах фотосинтеза до сих пор не была достоверно установлена.

### **Цель работы**

Выяснить участвуют ли в фотосинтетическом метаболизме высшего растения *A. thaliana* карбоангидразы  $\alpha$ -семейства,  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2, и, если участвуют, то на каком из этапов этого сложного многопланового процесса они функционируют.

В процессе работы решались следующие задачи:

1. Измерить морфофизиологические показатели, связанные прямо или косвенно с процессом фотосинтеза, растений с нокаутом генов *At2g28210* или *At4g20990*, кодирующих  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА4 (по две линии каждого мутанта).
2. Установить местонахождение исследуемых карбоангидраз.
3. Установить этапы процесса фотосинтеза, в которые включены исследуемые карбоангидразы и сформулировать рабочую гипотезу об их функционировании.

### **Научная новизна работы**

В диссертационной работе впервые показано, что  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА4 имеют важное значение для фотосинтетического метаболизма высшего растения *A. thaliana*, участвуя в регуляции энергозависимого нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a*. Установлено, что две исследованные карбоангидразы имеют противоположное влияние на этот тип нефотохимического тушения, что позволяет оперативно устанавливать величину тушения, необходимую для оптимального функционирования фотосинтетического аппарата растений в конкретных условиях окружающей среды.

Впервые установлено местонахождение двух карбоангидраз в хлоропласте высшего растения *A. thaliana*. Данные, полученные в работе, свидетельствуют о присутствии вблизи ФС2 карбоангидразы, принадлежащей к  $\alpha$  семейству, а именно  $\alpha$ КА4. До настоящего времени не было известно о местоположении и функциях  $\alpha$ КА2 в растительной клетке. Впервые были получены данные, свидетельствующие, что  $\alpha$ КА2 расположена на стромальной стороне тилакоидной мембраны.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные данные расширяют фундаментальные знания о роли карбоангидраз в процессе фотосинтеза.

Разработанный методологический подход и использованная совокупность методов сбора и оценки показателей фотосинтеза могут быть полезными при исследовании функций различных белков в фотосинтезе высших растений, так как дают комплексную характеристику световой и темновой стадий фотосинтеза и позволяют установить место функционирования исследуемого белка.

Обнаруженная в работе особенность растений, нокаутированных по гену *At4g20990*, кодирующему  $\alpha$ КА4, накапливать значительное количество крахмала имеет важное практическое значение, поскольку крахмал представляет собой один из наиболее распространенных продуктов фотосинтеза, используемых в разных отраслях промышленности.

### **Апробация результатов работы**

Материалы диссертации были представлены на Международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013); 17-ой, 19-ой и 20-ой Международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология-наука 21 века» (Пушино, 2013, 2015 и 2016); Школе конференции молодых ученых «Биосистема: от теории к практике» (Пушино, 2013); VII съезде Российского фотобиологического общества (Краснодарский край Шепси, 2014); Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений» (Москва, 2015); Всероссийской научной конференции «Механизмы регуляции функций растительных органелл» (Иркутск, 2014); VIII съезде Общества физиологов растений России и Всероссийская научная конференция с международным участием "Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015); XXI Пущинских чтениях по фотосинтезу и Всероссийской конференции «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты» (Пушино, 2015); 7<sup>th</sup> International Conference Photosynthesis Research for Sustainability – 2016 (Пушино, 2016), 17th International Congress on Photosynthesis Research (Маастрихт, 2016).

### **Личный вклад соискателя**

Постановка всех экспериментальных задач, проведение экспериментов, обработка полученных результатов и формулировка выводов самостоятельно проводилась лично соискателем или при его непосредственном участии.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 3 в реферируемых российских научных журналах, 2 из которых рекомендованы ВАК, и 17 в материалах и тезисах конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 132 страницах текста и включает 32 рисунка и 17 таблиц. Список литературы содержит 216 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** составляет первую часть диссертации. В нем изложены современные представления о функциях и местоположении КА в живых организмах, механизмы катализа ими карбоангидразной реакции и механизмы ингибирования этих ферментов. Подробно описаны шесть генных семейств этих ферментов, представители, трех из которых обнаружены в клетках высшего растения *A. thaliana*. Кроме того, подробно описано строение и функционирование фотосинтетической электрон-транспортной цепи, механизмы развития нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* в листьях, а также современные представления о компонентах этого тушения.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали растения *A. thaliana* экотип Columbia (ДТ) и растения, нокаутированные по гену *At4g20990*, кодирующему  $\alpha$ КА4 (гомозиготные линии 9-12 и 8-8, полученные из линий SALK\_117962 и SALK\_024517C, соответственно); или по гену *At2g28210*, кодирующему  $\alpha$ КА2 (гомозиготные линии 9-11 и 8-3, полученные из линий SALK\_120400 и SALK\_080341C, соответственно). Семена растений любезно предоставлены Prof. J.V. Moroney (Louisiana State University, USA). Растения выращивали в климатической камере при 8-ми часовом светопериоде, величине ФАР 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с, при постоянной температуре 18-20°C и концентрации CO<sub>2</sub> 450 ppm. Для экспериментов использовали 55-65-дневные растения.

Экстракты РНК выделяли с помощью набора реагентов Aurum total RNA Mini Kit, BioRad, USA. и проводили обратную транскрипцию с помощью набора реагентов BioRad, USA. Полученная таким образом кДНК и специфические праймеры к гену *At2g28210*, кодирующему  $\alpha$ КА2 (прямой 5'- GGC GGT TCA CGA TAA TTC AGA CAC A-3' и обратный 5'- AAA AAA TTA AAT AAA TAG TAC ACT GTG GTT GTA-3') и праймеры к гену *At4g20990*, кодирующему  $\alpha$ КА4 (прямой 5'-TCCTCACCAAGCTACTAAATGGAATAAA-3' и обратный 5'-TTGACGACAGTCCAAATGACGC-3'), были использованы при проведении ПЦР в обычном режиме и количественной ПЦР (кПЦР) с реактивами Evrogen, Россия. После проведения ПЦР в обычном режиме содержание продуктов ПЦР оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. кПЦР проводили в трех биологических и двух статистических повторностях. В качестве положительного контроля использовали праймеры к гену актина 7 *At5g09810* (Борисова-Мубаракшина и др., 2014).

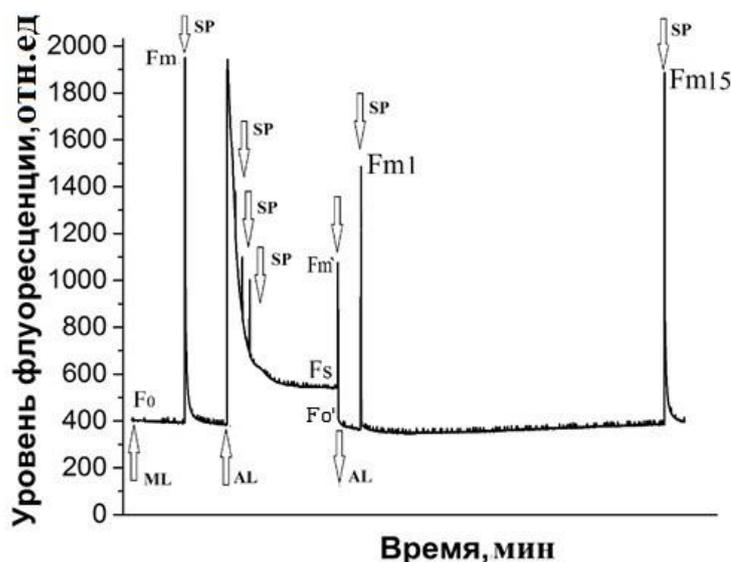
Определение содержания крахмала в листьях проводили с помощью йодного окрашивания образцов, измеряя поглощение при 620 нм (Kaplan et al., 2012). Для построения калибровочной кривой использовали коммерческий крахмал.

Электронную микроскопию срезов листьев проводили, как описано в работе (Семенова и др., 2011).

Скорость ассимиляции CO<sub>2</sub> листом измеряли при содержании CO<sub>2</sub> в воздухе 700 ppm и освещении светом 460 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с в течение 7 минут с помощью двух инфракрасных

газовых анализаторов: GFS-3000, работающего в системе с DUAL-PAM-100, и LCPPro<sup>+</sup> фирмы ADC BioScientific Ltd. (Великобритания).

Измерения флуоресценции хлорофилла *a* листа проводили с использованием флуориметра Mini-PAM (Walz, Германия). Предварительно затемненный в течение 30 минут лист освещали низкоинтенсивным модулированным светом; после того, как флуоресценция достигала уровня  $F_0$  подавали вспышку насыщающего света (8000 мкмоль квантов/ м<sup>2</sup>с) длительностью 0,8 с для оценки максимального квантового выхода флуоресценции хлорофилла *a* в адаптированных к темноте листьях,  $Y^* = (F_m - F_0)/F_m$ . После возвращения уровня флуоресценции к  $F_0$  листья освещали с помощью лампы флуориметра белым светом интенсивностью 100 или 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup> с; на 20-ой, 40-ой и 60-ой секундах после начала освещения подавали вспышку насыщающего света. При этом происходило измерение: 1) эффективного квантового выхода ФС2 ( $Y$ ), (Genty, 1989), 2) коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции  $qN$ , 3) величины NPQ, нефотохимического тушения флуоресценции, выражающего тушение Штерна-Фольмера (Gilmore et al., 1991). В конце пяти-семиминутного освещения и на 1 и 15 минутах после выключения действующего света вновь подавали вспышку насыщающего света и регистрировали параметры, указанные выше. Относительный уровень восстановления пластохинона оценивали после выключения действующего света. Протокол эксперимента показан на рисунке 1. Выше указанные показатели были вычислены по формулам:  $Y = (F'_m - F_s)/F'_m$ ;  
 $qN = (F_m - F'_m)/(F'_m - F_0')$ ;  $NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$ ;  $qN1 = (F_{m1} - F'_m)/(F_m - F_0')$ ;  $qN15 = (F_{m15} - F'_m)/(F_m - F_0')$ ;  
 $PQ = 1 - ((F'_m - F_s)/(F'_m - F_0'))$



*Рисунок 1.* Протокол проведения эксперимента по измерению характеристик флуоресценции хлорофилла *a* листа. Стрелками показано включение и выключение света: ML-измерительный свет, SP-вспышка насыщающего света, AL-действующий свет.  $F_m$  – максимальная величина выхода флуоресценции хлорофилла *a* в адаптированных к темноте листьях в ответ на вспышку насыщающего света,  $F_s$  – выход флуоресценции при стационарном освещении,  $F'_m$  – максимальная величина выхода флуоресценции в ответ на вспышку насыщающего света в условиях освещения,  $F_0'$ – уровень флуоресценции после выключения действующего света,  $F_{m1}$  and  $F_{m15}$  – величины выхода флуоресценции в ответ на вспышки насыщающего света, подававшиеся через 1 мин и 15 мин после прекращения освещения, соответственно.

Быструю фазу индукции флуоресценции хлорофилла ФС2 (ОЛР-тест) в промежутке времени 0,01-1 с измеряли с помощью флуориметра, оснащенного синим светодиодом и кремниевым фотодиодом. Из полученных индукционных кривых рассчитывали параметр  $S_m = (A_m)/(F_m - F_0)$  – нормированная общая площадь над ОЛР кривой, характеризующая емкость пула электронных акцепторов до полного восстановления пула пластохинона; а также параметры  $ABC/RC$ ;  $TR_0/RC$ ;  $ET_{20}/RC$ ;  $\phi_{RE10}$ .

Светоиндуцированные окислительно-восстановительные превращения P700 в листьях были измерены с использованием PAM-101 (WALZ, Германия), регистрируя изменения поглощения при 820 нм относительно 870 нм. Квантовый выход ФС1 рассчитывали по формуле:  $Y(I) = (P_m' - P)/P_m$ , где  $P_m$  – максимальный сигнал P700 при подаче вспышки насыщающего света (10000 мкмоль квантов/м<sup>2</sup> с) на фоне освещения дальним красным светом,  $P$  – сигнал P700 перед подачей вспышки насыщающего света,  $P_m'$  – сигнал P700 во время подачи вспышки насыщающего света при освещении действующим светом.

Содержание пероксида водорода в листе измеряли, регистрируя выход люминесценции при добавке препарата, полученного из гомогената замороженных в жидком азоте листьев, в смесь 5 мкМ пероксидазы с 50 мМ люминолом. Для регистрации люминесценции использовали люминометр Lum-101 (Россия).

Концентрацию хлорофилла в образце рассчитывали, используя формулы, предложенные в работе (Winterman and De Mots, 1965).

Для выделения тилакоидов листья гомогенизировали в среде, содержащей 35 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,4 М сахарозу, 20 мМ аскорбат натрия, 10 мМ KHCO<sub>3</sub>, 2 мМ ЭДТА, доведенной до состояния «slush» (пограничного состояния вода/лед). Полученный гомогенат фильтровали и центрифугировали при 120×g в течение 1,5 минут, затем супернатант центрифугировали при 3400×g в течение 6 минут. Осадок хлоропластов ресуспендировали в среде шокирования (разбавленная в 10 раз среда выделения) и осаждали при тех же условиях. Осадок тилакоидов трижды отмывали для удаления высокоактивной стромальной КА (Москвин и др., 1995) средой ресуспендирования, содержащей 35 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,4 М сахарозу, 2 мМ аскорбат натрия, 1 мМ KHCO<sub>3</sub>, 0,5 мМ ЭДТА натрия. Отмытые тилакоиды, ресуспендировали в среде с 10% глицерином, замораживали и хранили при -80°C или использовали для выделения мембран, обогащенных ФС1 или ФС2.

Для выделения мембран, обогащенных ФС1 или ФС2, тилакоиды ресуспендировали и инкубировали в течение 30 минут с Тритоном X-100 взятом в количестве равном содержанию хлорофилла в суспензии, после чего осаждали при 12000×g в течение 20 минут. Полученный осадок ресуспендировали в среде, содержащей 50 мМ MES-NaOH, 35 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 М сахарозу, 20 мМ аскорбат натрия, 10 мМ KHCO<sub>3</sub>, и соединения, защищающие белки от действия протеаз: 5 мМ ЭДТА натрия, 1 мМ α-аминокапроновую кислоту, 1 мМ бензамидин и 1 мМ PMSF. Полученную суспензию инкубировали при 0°C в течение 30 минут с додецил-β-D-мальтозидом (ДМ) при соотношении концентраций ДМ/Хл = 4,3. Мембраны, обогащенные ФС2, осаждали при 32000×g в течение 40 минут. Из супернатанта осаждали мембраны, обогащенные ФС1 при 175000×g в течение 2 часов. Осадки мембран однократно отмывали в той же среде и

осаждали в том же режиме. ФС2- и ФС1- мембраны, с добавленным 20% глицерином, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

КА активность измеряли электрометрическим методом по скорости уменьшения рН (от 8,3 до 7,8) при гидратации CO<sub>2</sub>. Измерения проводили в термостатированной ячейке при 1,7-2,2°C. В ячейку вносили 4 мл вероналового буфера (25 мМ), 0,02-0,04 мл исследуемого препарата и 2,3 мл воды, насыщавшейся CO<sub>2</sub> при 0°C не менее 1 часа. Время изменения рН при спонтанной гидратации CO<sub>2</sub> среды без препарата принимали за контроль. Активность карбоангидразы выражали в мкмоль Н<sup>+</sup>/мг Хл × мин с учетом буферной емкости сред и препаратов, которую определяли титрованием 0,1 N HCl.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **Зависимость экспрессии генов, кодирующих αКА2 и αКА4, в растениях ДТ от освещенности растений и концентрации CO<sub>2</sub> в воздухе**

Изменение в растениях ДТ экспрессии генов двух исследованных КА под влиянием факторов среды, имеющих определяющее значение для скорости фотосинтеза, интенсивности света и концентрации CO<sub>2</sub> в воздухе (Журикова и др., 2015; 2016), уже свидетельствовало о возможном участии αКА2 и αКА4 в процессе фотосинтеза. При этом в течение первых 5-7 дней после переноса растений с низкого света на высокий уровень экспрессии гена, кодирующего αКА2, уменьшался, а гена, кодирующего αКА4 – резко увеличивался (Журикова и др., 2016). Таким образом, в течение относительно небольшого периода изменения освещенности растений экспрессия генов этих карбоангидраз изменялась в противоположном направлении. При дальнейшем пребывании растений на высоком свете, в течение более двух недель, экспрессия гена, кодирующего αКА2, также, как и гена, кодирующего αКА4, становилась выше, чем на низком свете. Последнее может свидетельствовать о необходимости обеих карбоангидраз при высокой освещенности растений.

Выращивание растений при разной концентрации CO<sub>2</sub> в воздухе приводило к тому, что при увеличенной концентрации CO<sub>2</sub> экспрессия гена, кодирующего α-КА4, была выше (Журикова и др., 2015), а экспрессия гена, кодирующего α-КА2, наоборот, – существенно ниже (Руденко, не опубликовано).

### **Содержание крахмала в листьях растений мутантных по αКА4 или αКА2**

В листьях растений мутантных по αКА4 (обе линии) содержание крахмала было в 2-3 раза больше, а в растениях мутантных по αКА2 – в 1,5-2 раза меньше, чем в растениях ДТ (Табл. 1). В таблице 1 приведены данные типичного эксперимента. Электронная микроскопия показала, что размеры и количество крахмальных зерен в хлоропластах мутанта по αКА4 намного больше, чем в хлоропластах растений ДТ, и различие между мутантом и ДТ становилось больше при увеличении возраста листа (Журикова и др., 2015).

Таблица 1. Содержание крахмала в листьях растений ДТ и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (линии 9-12 и 8-8) или по  $\alpha$ КА2 (линии 9-11 и 8-3) после 3 ч освещения светом интенсивностью 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с.

Растения	Содержание крахмала (мг/г сыр. веса)
ДТ	5,57 ± 0,61
Мутант по $\alpha$ КА4, линия 9-12	9,37 ± 0,98*
Мутант по $\alpha$ КА4, линия 8-8	14,17 ± 1,24*
ДТ	2,05 ± 0,13
Мутант по $\alpha$ КА2, линия 9-11	1,48 ± 0,13
Мутант по $\alpha$ КА2, линия 8-3	0,92 ± 0,10

Данные представлены в виде средних значений из 3 определений ± стандартная ошибка, \*  $p < 0,05$

При дальнейшем исследовании было выявлено, что повышенное содержание крахмала в мутанте по  $\alpha$ КА4 обусловлено его повышенным синтезом в течение светового дня. При этом оказалось, что в течение ночи весь избыточный крахмал в мутантных растениях утилизировался, и его содержание становилось даже ниже, чем в растениях ДТ (Табл. 2). Это может свидетельствовать о том, что увеличенный синтез крахмала на свету у мутантов по  $\alpha$ КА4 привел к возникновению у них и более активной системы деградации крахмала.

Таблица 2. Содержание крахмала в листьях растений ДТ и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (линии 9-12 и 8-8) после ночного периода и после 8 ч освещения светом интенсивностью 100 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с.

Растения	Содержание крахмала, мг/г сырого веса	
	После ночного периода	После 8 ч освещения
ДТ	2,01 ± 0,03	5,85 ± 0,34
Мутант по $\alpha$ КА4, линия 9-12	1,72 ± 0,30	7,88 ± 0,31
Мутант по $\alpha$ КА4, линия 8-8	1,61 ± 0,23	7,84 ± 0,28

### Скорость ассимиляции CO<sub>2</sub> листьями растений мутантных по $\alpha$ КА4 или $\alpha$ КА2

Скорость ассимиляции CO<sub>2</sub> листьями была измерена с помощью двух разных приборов (см. методы). Результаты измерений показали одинаковые тенденции, поэтому приводятся только данные, полученные с помощью газового анализатора LCPro<sup>+</sup>. Обнаружено, что скорость ассимиляции CO<sub>2</sub> листьями мутанта по  $\alpha$ КА4 была почти на 20-30% ниже чем у ДТ, а у мутантов по  $\alpha$ КА2 – выше на 10-20%, чем у ДТ (Рис. 2).

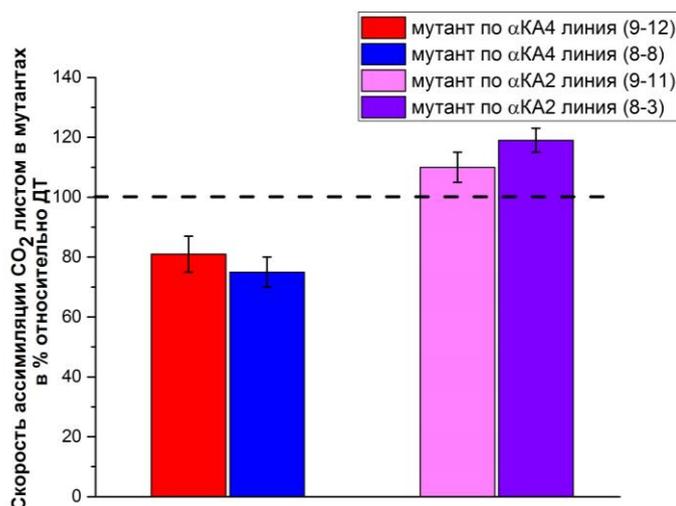


Рисунок 2. Скорость ассимиляции CO<sub>2</sub> листьями растений ДТ и растений мутантных по αKA4 (линии 9-12 и 8-8) или по αKA2 (линии 9-11 и 8-3). Интенсивность света 460 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с и концентрация CO<sub>2</sub> в воздухе 700 ppm. За 100% приняты значения скорости ассимиляции CO<sub>2</sub> листьями растений ДТ.

### Сравнение характеристик флуоресценции хлорофилла *a* листьев мутантов по αKA2 или по αKA4 с характеристиками флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений ДТ

Для выявления возможного влияния нокаутов исследуемых генов на функционирование фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) проводили измерения флуоресценции при двух интенсивностях света (100 и 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с) и трех концентрациях CO<sub>2</sub> (100, 800 и 1500 ppm). При низкой интенсивности света параметры флуоресценции хлорофилла *a* листьев обоих мутантов почти не отличались от параметров флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений ДТ. Это может быть связано с тем, что на низком свете, когда ФЭТЦ работает с низкой скоростью, независимо от концентрации CO<sub>2</sub>, отсутствие αKA4 или αKA2 не влияет на протекание фотосинтеза. Наибольшая разница в параметрах флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений ДТ и растений мутантных по αKA4 или αKA2 проявлялась при высокой интенсивности света (500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с) и оптимальной для фотосинтеза концентрации CO<sub>2</sub> (800 ppm). Предварительными измерениями установлено, что максимальная скорость фотосинтеза в листьях арабидопсиса наблюдалась именно при 800 ppm (Мудрик В.А. не опубликовано).

Эффективный квантовый выход (Y), измеренный как в первую минуту освещения, так и после достижения стационарного уровня, у растений мутантных по αKA4 (обе линии) был достоверно выше, чем Y растений ДТ, а у растений мутантных по αKA2 (обе линии) эффективный квантовый выход был значительно ниже, чем у растений ДТ (Рис. 3). При этом Y\*, максимальный квантовый выход ФС2 в адаптированных к темноте листьях, в мутантах и по αKA4, и по αKA2 не отличался от такового в растениях ДТ.

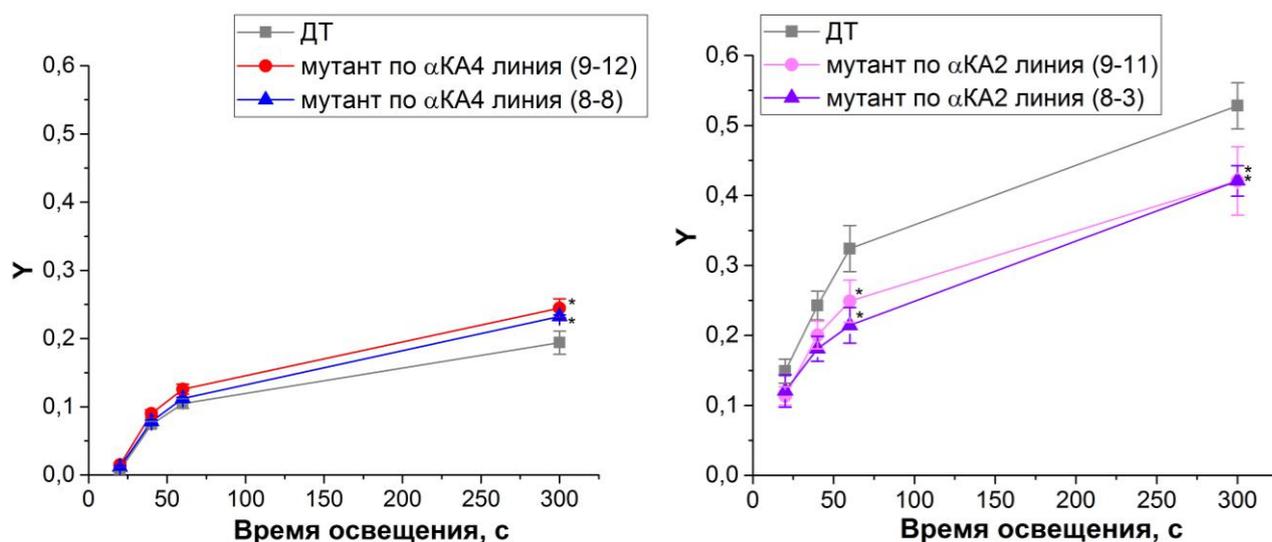


Рисунок 3. Эффективный квантовый выход ФС2 листьев растений ДТ и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (линии 9-12 и 8-8) или по  $\alpha$ КА2 (линии 9-11 и 8-3). Интенсивность света 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с, концентрация СО<sub>2</sub> в воздухе 800 ppm. Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений  $\pm$  стандартная ошибка, \*  $p < 0,05$ .

Таким образом, при высокой интенсивности света и оптимальной концентрации СО<sub>2</sub> уменьшение по сравнению с ДТ эффективного квантового выхода в мутанте по  $\alpha$ КА2 и его увеличение в мутанте по  $\alpha$ КА4 вступали в противоречие с тем, что скорость ассимиляции СО<sub>2</sub> в первом мутанте была выше (Рис. 2), а во втором – ниже (Рис. 2), чем в растениях ДТ. Такое видимое противоречие, вероятно, объясняется изменениями скорости альтернативного потока электронов в ФЭТЦ у мутантных растений (см. далее).

Уровень нефотохимического тушения (НФХТ) флуоресценции хлорофилла *a* листьев характеризовали величиной NPQ и коэффициентом qN (см. методы). Оба параметра имели совершенно одинаковую тенденцию к изменению при изменении объекта и/или условий проведения экспериментов.

В первую минуту освещения светом 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с при оптимальной концентрации СО<sub>2</sub>, НФХТ в мутанте по  $\alpha$ КА4 развивалось несколько медленнее, чем в растениях ДТ (Рис. 4). При достижении «стационарного» фотосинтеза отчетливо выявилось, что НФХТ в мутанте по  $\alpha$ КА4 было ниже, чем в растениях ДТ (Рис. 5). У мутантов по  $\alpha$ КА2 при интенсивности света 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с и оптимальной концентрации СО<sub>2</sub> НФХТ в первую минуту освещения было ниже относительно ДТ (Рис. 4). При достижении стационарного фотосинтеза величина НФХТ в мутанте по  $\alpha$ КА2 оказалась достоверно выше, чем в ДТ (Рис. 5).

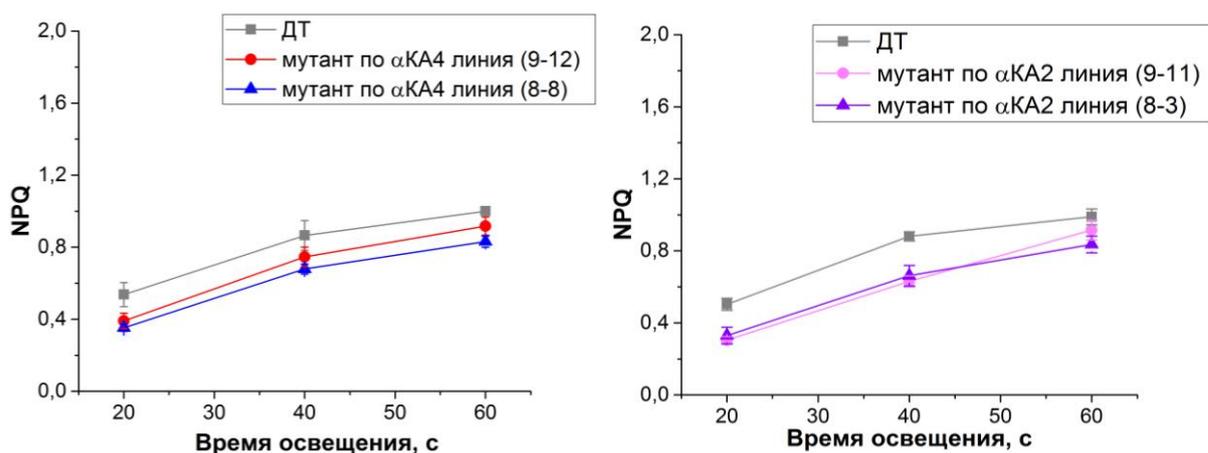


Рисунок 4. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений ДТ и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (линии 9-12 и 8-8) или по  $\alpha$ КА2 (линии 9-11 и 8-3) в первую минуту освещения. Интенсивность света 500 мкмоль квантов/ $m^2$ с и концентрация  $CO_2$  в воздухе 800 ppm.

Для того, чтобы установить процесс, являющийся причиной более высокого или более низкого НФХТ в мутантах после достижения стационарного состояния на свету были определены компоненты этого тушения. Выяснилось, что энергозависимый компонент  $qN1$  ( $qE$ ), характеризующий подкисление люмена, у растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (обе линии) был значительно ниже, чем у растений ДТ, а у растений мутантных по  $\alpha$ КА2 в стационарных условиях наоборот выше на 40-50%, чем у растений ДТ (Рис. 5). Второй по времени релаксации компонент НФХТ -  $qN15$ , характеризующий тушение, обусловленное функционированием виолаксантинового цикла и, соответственно, накоплением зеаксантина и иногда обозначаемый  $qZ$ , при концентрации  $CO_2$  800 ppm был одинаков у обоих мутантов и ДТ (Рис. 5).

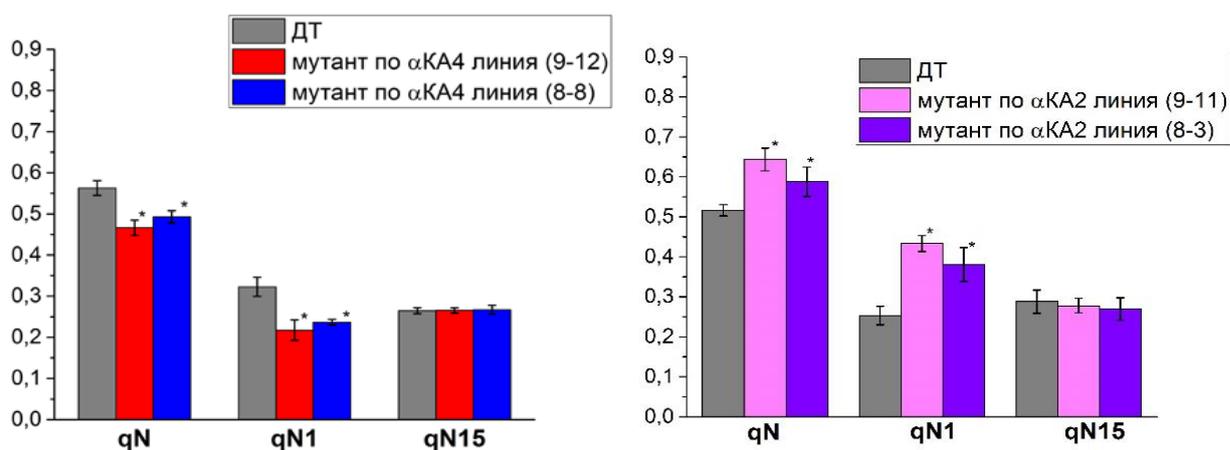


Рисунок 5. Коэффициент нефотохимического тушения и его компоненты у растений ДТ и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (линии 9-12 и 8-8) или по  $\alpha$ КА2 (линии 9-11 и 8-3). Интенсивность света 500 мкмоль квантов/ $m^2$ с и концентрация  $CO_2$  в воздухе 800 ppm. Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений  $\pm$  стандартная ошибка, \*  $p < 0,05$ .

## Устойчивость растений мутантных по $\alpha$ КА4 или $\alpha$ КА2 к действию света высокой интенсивности

Поскольку уровень НФХТ флуоресценции хлорофилла *a* листьев обоих мутантов отличался от уровня НФХТ в растениях ДТ, было исследовано действие света высокой интенсивности на функциональную активность ФЭТЦ. Устойчивость к действию света высокой интенсивности (500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с) оценивали с помощью параметра  $(F_m - F_0)/F_0$ , который характеризует максимальную эффективность функционирования ФС2, но более чувствителен к изменению внешних условий, чем  $(F_m - F_0)/F_m$ , особенно при измерении в условиях стресса (Lichtenthaler and Buschmann, 2005). У мутантов по  $\alpha$ КА4 этот параметр был ниже, чем у ДТ, после 3 и 6 часов действия света высокой интенсивности (Рис. 6), а у мутанта по  $\alpha$ КА2 не отличался от ДТ и даже имел тенденцию к повышению (Рис. 6). Большее фотоингибирование ФС2 в растениях мутантных по  $\alpha$ КА4 по сравнению с ДТ хорошо согласуется с более низкой величиной НФХТ флуоресценции.

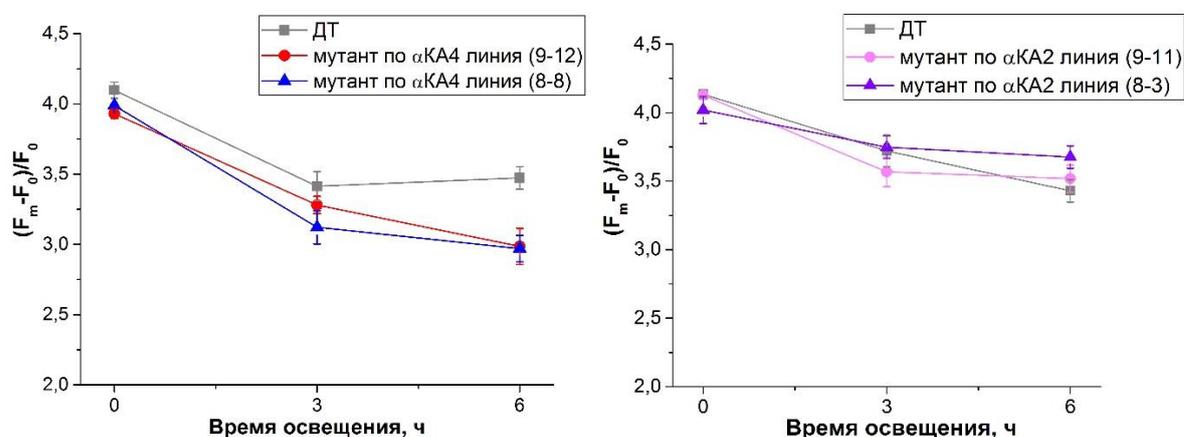


Рисунок 6. Влияние освещения сильным светом на параметр  $(F_m - F_0)/F_0$ , характеризующий максимальную эффективность функционирования ФС2 в листьях растений ДТ и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (линии 9-12 и 8-8) или по  $\alpha$ КА2 (линии 9-11 и 8-3). Интенсивность света 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с, концентрация CO<sub>2</sub> в воздухе 700 ppm.

## Сравнение квантового выхода ФС1 в листьях растений мутантных по $\alpha$ КА4 или $\alpha$ КА2 с квантовым выходом ФС1 в листьях растений ДТ

Измерения с помощью ОЛР-теста показали, что в растениях мутантных по  $\alpha$ КА4 пул пластохинона более восстановлен, а у мутанта по  $\alpha$ КА2 более окислен, чем в ДТ. Мы предположили, что более высокая степень восстановления пула связана с изменением оттока электронов от этого пула к акцепторам ФС1. Для проверки этого предположения был измерен квантовый выход ФС1,  $Y(I)$ . Этот показатель у мутанта по  $\alpha$ КА4 после 20 секунды освещения и после достижения «стационарного» фотосинтеза был значительно ниже, чем у растений ДТ (Рис. 7), а у мутанта по  $\alpha$ КА2  $Y(I)$  был выше, чем у растений ДТ (Рис. 7).

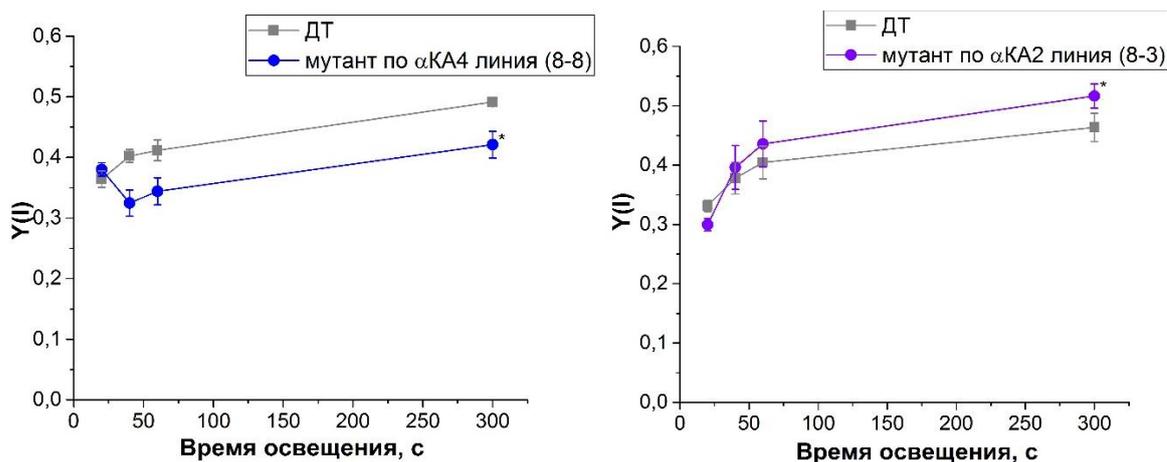


Рисунок 7. Квантовый выход ФС1 листьев растений ДТ и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (линия 8-8) или по  $\alpha$ КА2 (линия 8-3), при освещении светом 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с и концентрации СО<sub>2</sub> 800 ppm. Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений  $\pm$  стандартная ошибка, \*  $p < 0,05$ .

Изменение в мутантах по сравнению с ДТ величины квантового выхода ФС1 согласуется с изменением скорости ассимиляции СО<sub>2</sub> листом, которая у мутантов по  $\alpha$ КА4 была ниже, а у мутантов по  $\alpha$ КА2 - выше, чем в растениях ДТ (Рис. 2). Такая согласованность может быть связана с тем, что цикл Кальвина – главный "потребитель" электронов, выходящих из ФЭТЦ через ФС1.

### Светоиндуцированное накопление пероксида водорода в листьях растений ДТ и растений мутантных по $\alpha$ КА4 или $\alpha$ КА2

Как уже отмечалось, у растений мутантных по  $\alpha$ КА4, наблюдали более низкую скорость ассимиляции СО<sub>2</sub> при более высоком эффективном квантовом выходе ФС2. Поскольку эффективный квантовый выход на свету (при умножении на интенсивность поглощенного света) соответствует скорости полного потока электронов по ФЭТЦ, указанное различие могло свидетельствовать о том, что при более низком потоке электронов к НАДФ<sup>+</sup>, восстановленная форма которого используется для фиксации СО<sub>2</sub> в цикле Кальвина, увеличен какой-либо из альтернативных потоков электронов. Известно, что одним из главных альтернативных путей электронного транспорта является перенос электронов на кислород с последующим образованием пероксида водорода. Содержание пероксида водорода было измерено после краткосрочного освещения (5 минут) сильным светом адаптированных к темноте листьев. Было обнаружено, что в листьях растений мутантных по  $\alpha$ КА4 светоиндуцированный прирост содержания Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> значительно, в 1,5-2 раза больше, чем в растениях ДТ (Рис. 8). В листьях растений мутантных по  $\alpha$ КА2 прирост содержания Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> был меньше, чем в листьях растений ДТ (Рис. 8). Это свидетельствует о том, что в обоих мутантах происходит изменение соотношения потоков электронов в ФЭТЦ по сравнению с соотношением в растениях ДТ.

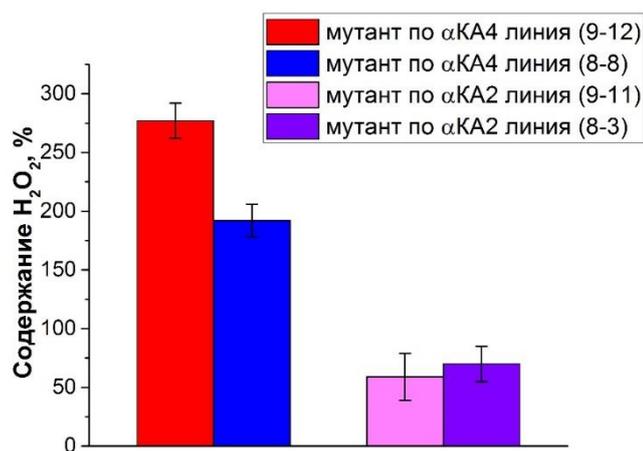


Рисунок 8. Светоиндуцированный прирост пероксида водорода в листьях растений мутантных по αKA4 (линии 9-12 и 8-8) или αKA2 (линии 9-11 и 8-3) после 5 минут освещения светом интенсивностью 500 мкмоль квантов/м<sup>2</sup>с. За 100% принято содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в листьях растений ДТ.

### Определение местонахождения αKA4 и αKA2 в тилакоидной мембране

Ряд изменений характеристик флуоресценции хлорофилла *a* листьев указывал на то, что исследуемые КА расположены в тилакоидной мембране. Для αKA4 это соответствовало данным литературы, в работе (Friso et al., 2004) эта КА была выявлена среди белков тилакоидных мембран. Влияние нокаутной мутации по гену *At2g28210*, кодирующему αKA2, на такие важные показатели фотосинтеза, как эффективные квантовые выходы ФС1 и ФС2, величину энергозависимого компонента НФХТ qE, степень восстановления пула пластохинона, скорость ассимиляции CO<sub>2</sub> и т.д. позволяет предположить, что и эта карбоангидраза находится в тилакоидных мембранах и принимает непосредственное участие в процессе фотосинтеза. К сожалению, наличие в тилакоидах двух КА α-семейства усложняет процесс поиска более точного местонахождения исследуемых карбоангидраз в системе тилакоидных мембран, прежде всего, из-за кроссконтаминации препаратов фотосистем. Для установления присутствия исследуемых КА в мутантных растениях мы воспользовались свойством стимуляции КА активности ацетазоламидом в субмикромольных концентрациях, присущее всем карбоангидразам α-семейства. Для установления местонахождения исследуемых карбоангидраз в тилакоидной мембране выделяли тилакоиды и препараты тилакоидных мембран, обогащенные ФС1 или ФС2 (ФС1- и ФС2-мембраны, соответственно), из мутантных растений и растений ДТ и измеряли их КА активность.

Измерение КА активности тилакоидов из растений мутантных по обоим карбоангидразам показало, что стимуляция КА активности тилакоидов ацетазоламидом наблюдалась в тилакоидах мутанта по αKA4 обеих линий (Табл. 3), а в тилакоидах мутанта по αKA2 такая стимуляция отсутствовала (Табл. 3), и проявлялось ингибиторное действие ацетазоламида. У тилакоидов, выделенных из растений ДТ, стимуляцию КА активности наблюдали всегда, что может свидетельствовать о хорошем качестве выделенных тилакоидов как из растений ДТ, так и из мутантных растений. По-видимому, в тилакоидах мутанта по αKA2 стимуляция КА активности не выявлялась по причине «закрытости» оставшейся в мембране αKA4, которая, вероятнее всего, расположена с люменальной стороны тилакоидной мембраны, а ацетазоламид, будучи

водорастворимым соединением, плохо проникает через мембрану. Таким образом, за наблюдавшуюся в тилакоидах ДТ и мутанте по  $\alpha$ КА4 стимуляцию КА активности ацетазоламидом, ответственна  $\alpha$ КА2, что позволяет предположить её нахождение в ламеллярных мембранах на их стромальной стороне.

Таблица 3. Влияние  $10^{-7}$  М ацетазоламида (АА) на КА активность тилакоидов растений дикого типа и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 или по  $\alpha$ КА2.

Тилакоиды	КА активность, $\mu\text{моль Н}^+/\text{мг}\times\text{Хл мин}$	
	-	+ АА
ДТ	$41,4 \pm 8,7$	$47,5 \pm 4,2$
мутант по $\alpha$ КА4, линия 9-12	$58,0 \pm 11,6$	$61,6 \pm 9,7$
мутант по $\alpha$ КА4, линия 8-8	$55,7 \pm 7,8$	$68,6 \pm 10,6$
ДТ	$11,7 \pm 5,3$	$19,3 \pm 3,7$
мутант по $\alpha$ КА2, линия 9-11	$58,4 \pm 10,7$	$42,9 \pm 9,3$
мутант по $\alpha$ КА2, линия 8-3	$43,7 \pm 2,9$	$38,7 \pm 4,7$

В ФС2-мембранах из мутанта по  $\alpha$ КА4 стимуляции КА активности ацетазоламидом не было, а в ФС2-мембранах из ДТ стимуляция была (Табл. 4). Это убедительно свидетельствует, что именно  $\alpha$ КА4 ответственна за КА активность в ФС2-мембранах арабидопсиса. КА-активность ФС2-мембран из растений мутантных по  $\alpha$ КА4 была результатом присутствия в ФС2 еще одного, «высокомолекулярного», носителя КА активности (Lu and Stemler, 2002; Khristin et al., 2004; Ignatova et al., 2011), активность которого ингибируется уже при низкой концентрации ацетазоламида. В ФС2-мембранах мутанта по  $\alpha$ КА2 стимуляция ацетазоламидом наблюдалась, что согласуется с присутствием в этих мембранах  $\alpha$ КА4 (Табл. 4).

Таблица 4. Влияние  $10^{-7}$  М ацетазоламида (АА) на КА активность ФС2-мембран растений дикого типа и растений мутантных по  $\alpha$ КА4 или по  $\alpha$ КА2.

ФС2-мембраны	КА активность, $\mu\text{моль Н}^+/\text{мг}\times\text{Хл мин}$	
	-	+ АА
ДТ	$41,4 \pm 8,7$	$47,5 \pm 4,2$
мутант по $\alpha$ КА4, линия 9-12	$58,0 \pm 11,6$	$61,6 \pm 9,7$
мутант по $\alpha$ КА4, линия 8-8	$55,7 \pm 7,8$	$68,6 \pm 10,6$
ДТ	$11,7 \pm 5,3$	$19,3 \pm 3,7$
мутант по $\alpha$ КА2, линия 9-11	$58,4 \pm 10,7$	$42,9 \pm 9,3$
мутант по $\alpha$ КА2, линия 8-3	$43,7 \pm 2,9$	$38,7 \pm 4,7$

С учетом данных литературы о присутствии  $\alpha$ КА4 среди белков тилакоидных мембран, наличие ацетазоламид-стимулируемой КА активности в ФС1-мембранах из растений мутантных по  $\alpha$ КА4 (данные в диссертации), свидетельствует о наличии в этих мембранах ещё одной КА  $\alpha$ -семейства. Последнее является важным дополнительным аргументом в пользу того, что  $\alpha$ КА2 находится в тилакоидной мембране. Местонахождение  $\alpha$ КА2 до нашей работы не было известно.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в работе результаты представляют собой первые в мировой литературе данные о том, что карбоангидразы высших растений принимают участие в реакциях, составляющих процесс фотосинтеза, и показывают, какие это реакции.

Сравнение связанных с фотосинтезом морфофизиологических показателей растений мутантных по  $\alpha$ КА2 или  $\alpha$ КА4 показало, что исследованные показатели отличались в мутантах по  $\alpha$ КА2 или  $\alpha$ КА4 от таковых в ДТ в противоположные стороны (Табл. 1; Рис. 2, 5, 7, 8). Хорошо выраженное повышение содержания крахмала в мутанте по  $\alpha$ КА4 (Табл. 1) может быть следствием увеличения относительного вклада альтернативного потока электронов к кислороду в общем потоке электронов по ФЭТЦ, что приводит к увеличению отношения АТФ/НАДФН в хлоропластах. В пользу этого свидетельствует то, что светоиндуцированный прирост  $H_2O_2$  в листьях мутанта по  $\alpha$ КА4 после пяти минут освещения значительно больше, чем в ДТ (Рис. 8). В мутанте по  $\alpha$ КА2 как содержание крахмала, так и светоиндуцированный прирост содержания  $H_2O_2$  были меньше, чем в растениях ДТ (Табл. 1, Рис. 8). Возможно, в этом мутанте соотношение потоков электронов к НАДФ<sup>+</sup> и к  $O_2$  изменилось в сторону увеличения потока электронов к главному физиологическому акцептору, НАДФ<sup>+</sup>.

Различие в морфофизиологических показателях растений ДТ и растений мутантных по исследуемым КА не позволяет установить конкретную функцию той или иной КА. Регистрация флуоресценции хлорофилла *a* листьев помогает оценить основные характеристики процесса фотосинтеза, а изменение освещенности и концентрации  $CO_2$  при измерении – подобрать условия, при которых становится возможным выявить различие в характеристиках мутантов и растений ДТ. Наибольшие различия между мутантными растениями и ДТ наблюдались при освещении светом высокой интенсивности 500 мкмоль квантов/ $m^2 \times c$  при оптимальной концентрации  $CO_2$  800 ppm.

У растений мутантных по  $\alpha$ КА2 эффективный квантовый выход ФС2 ( $Y$ ) был ниже, чем у ДТ, а у растений мутантных по  $\alpha$ КА4 выше, чем у растений ДТ (Рис. 3). Снижение величины  $Y$  у растений мутантных по  $\alpha$ КА2 может быть результатом более высокого уровня диссипации поглощенной энергии в тепло (Рис. 5), тогда как более высокие значения  $Y$  у растений мутантных по  $\alpha$ КА4 может быть следствием, наоборот, более низкого уровня диссипации поглощенной энергии в тепло (Рис. 5).

Изменения в мутантах эффективного квантового выхода не позволяют строить предположения о механизмах функционирования КА в хлоропластах, поскольку величина  $Y$  зависит от процессов подачи электронов к акцепторам ФС2 и оттока электронов от них, и может

изменяться при изменении любого из них. С другой стороны, молекулярные механизмы нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* и, соответственно, факторы, влияющие на величину этого тушения, к настоящему времени довольно хорошо описаны.

При высокой интенсивности света и оптимальной концентрации CO<sub>2</sub> уровень НФХТ в мутанте по  $\alpha$ КА4 оказался ниже, чем в ДТ, причем эта разница была обусловлена энергозависимым компонентом НФХТ,  $qE$  ( $qN1$ ) (Рис. 5). В настоящее время принимается, что величина  $qE$  характеризует степень протонирования PsbS белка (Ruban, 2016), и меньшее значение параметра  $qN1$  у мутанта по  $\alpha$ КА4 может свидетельствовать о том, что в отсутствие этой КА происходит «недопротонирование» PsbS белка. В пользу этого предположения говорит тот факт, что у растений мутантных по  $\alpha$ КА4 происходит более медленная активация НФХТ в первую минуту освещения (Рис. 4): в литературе имеются данные об участии PsbS в развитии НФХТ именно в первую минуту освещения (Ikeuchi et al. 2014). Таким образом,  $\alpha$ КА4, вероятно, участвует в развитии энергозависимого нефотохимического тушения, обеспечивая поддержание PsbS белка в протонированном состоянии.

Важной особенностью растений мутантных по  $\alpha$ КА4 было то, что фотоингибирование ФС2 в них было больше, чем в ДТ (Рис. 6). В соответствии с этими данными, описанное выше участие  $\alpha$ КА4 в стимуляции энергозависимого тушения, которое отражает диссипацию поглощенной энергии света, позволяет рассматривать данный фермент как часть системы защиты фотосинтетического аппарата от фотоингибирования, что вероятно, и является основной функцией  $\alpha$ КА4 в фотосинтезе.

В растениях мутантных по  $\alpha$ КА2 уровень НФХТ был выше, чем в растениях ДТ (Рис. 5). Разложение коэффициента  $qN$  на компоненты выявило, что компонент  $qN1$  ( $qE$ ), обусловленный накоплением протонов в люмене тилакоидов, у мутанта по  $\alpha$ КА2 на 40-50% выше, чем этот компонент в растениях ДТ (Рис. 5). Это предполагает, что в отсутствие  $\alpha$ КА2, возможно, происходит увеличение протонирования PsbS белка, что, в свою очередь, могло бы быть следствием повышения в этом мутанте концентрации протонов в люмене тилакоидов при исчезновении в результате мутации связанного с  $\alpha$ КА2 канала их утечки из него.

Таким образом, основной результат проведенного исследования состоит в том, что установлено участие  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА4 в метаболизме высшего растения *A. thaliana* и показано что, вероятно, основной процесс, в котором они принимают участие – регулирование диссипации энергии света, поглощаемой пигментами фотосинтетического аппарата. При этом их влияние на процесс диссипации энергии противоположно,  $\alpha$ КА4 способствует усилению этой диссипации, а  $\alpha$ КА2 – ее уменьшению. Такое разнонаправленное действие этих ферментов обеспечивает оперативную настройку фотосинтетического аппарата растений необходимую для оптимального функционирования в конкретных условиях окружающей среды.

В таблице 5 представлены свойства растений мутантных по  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА4 относительно свойств растений ДТ. Видно, что отсутствие одной из этих карбоангидраз приводило к фенотипу, отличающемуся от ДТ в противоположную сторону по сравнению с фенотипом мутанта по другой КА.

Таблица 5. Сравнение свойств растений мутантных по генам *At4g20990* и *At2g28210*, кодирующим  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2, относительно свойств растений ДТ.

Свойства	Мутант по $\alpha$ КА2	Мутант по $\alpha$ КА4
Вес мутантных растений в % от ДТ	~70	110-120
Содержание крахмала в % от ДТ	50-70	170-250
Эффективный квантовый выход ФС2, $\Upsilon$	При всех [CO <sub>2</sub> ] ниже, чем у ДТ	Зависит от содержания CO <sub>2</sub> , при оптимальной [CO <sub>2</sub> ] выше ДТ
Энергозависимый компонент НФХТ, $qN1$	Выше, чем у ДТ при оптимальной [CO <sub>2</sub> ]	Ниже, чем у ДТ при оптимальной [CO <sub>2</sub> ]
Устойчивость ФС2 к фотоингибированию	Как у ДТ	Ниже, чем у ДТ
Квантовый выход ФС1, $\Upsilon(I)$	Выше, чем у ДТ	Ниже, чем у ДТ
Скорость ассимиляции CO <sub>2</sub>	Выше, чем у ДТ	Ниже, чем у ДТ
Содержание перекиси в листьях	Меньше, чем в ДТ	Больше в 1,5-2 раза, чем в ДТ

Используя специфическое свойство карбоангидраз  $\alpha$ -семейства увеличивать активность в присутствии микромолярных концентраций веществ, при более высоких концентрациях, действующих как ингибиторы (Pies et al., 2004), в частности, ацетазоламида, мы показали, что  $\alpha$ КА4 расположена вблизи ФС2. Это хорошо соответствует выводам, сделанным выше о ее связи с PsbS белком, который располагается среди хлорофилл-связывающих белков антенны ФС2. Используя это же свойство карбоангидраз  $\alpha$ -семейства, получены данные, которые позволяют предполагать, что  $\alpha$ КА2 расположена на стромальной стороне тилакоидов.

С учетом обнаруженного влияния мутаций по  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА4 на энергозависимое тушение флуоресценции хлорофилла *a*, которое зависит от накопления протонов в люмене и тесно связано с протонированием PsbS белка, а также данных о расположении этих карбоангидраз в тилакоидах предлагается предварительная схема их включения в процессы, протекающие в ФЭТЦ на свету (Рис. 9). Мы считаем, что  $\alpha$ КА4 располагается вблизи ФС2 и участвует в развитии нефотохимического тушения, локально поставляя протоны PsbS белку. Это является именно регуляторным влиянием, поскольку энергозависимое тушение может развиваться и без участия этой КА за счет протонов люменального пространства («bulk» протонов). В стационарных условиях, оптимальных для фотосинтеза, последние интенсивно "утекают" к АТФ-синтазе, располагающейся в ламеллах стромы. Находясь вблизи ФС2,  $\alpha$ КА4 позволяет обеспечить PsbS белок протонами даже при активном синтезе АТФ.

Что касается  $\alpha$ КА2, то рассмотренные выше данные, полученные с выделенными тилакоидами и фрагментами тилакоидных мембран предполагают, что она находится на стромальной стороне ламеллярных мембран. Без дополнительных сведений об ее точном

расположении конкретный процесс с ее участием, обеспечивающий уменьшение содержания в люмене протонов, стимулирующих энергозависимое тушение флуоресценции хлорофилла *a*, пока трудно идентифицировать. В качестве предварительной гипотезы, объясняющей указанную роль  $\alpha$ КА2, можно представить, что она со стромальной стороны тилакоидной мембраны участвует в формировании специфического канала выхода протонов из люмена. Похожая гипотеза о роли одной из тилакоидных КА была предложена ранее (Moskvin et al., 2000; Иванов и др., 2007) на основе измерения влияния ингибиторов карбоангидраз на поглощение протонов тилакоидами.

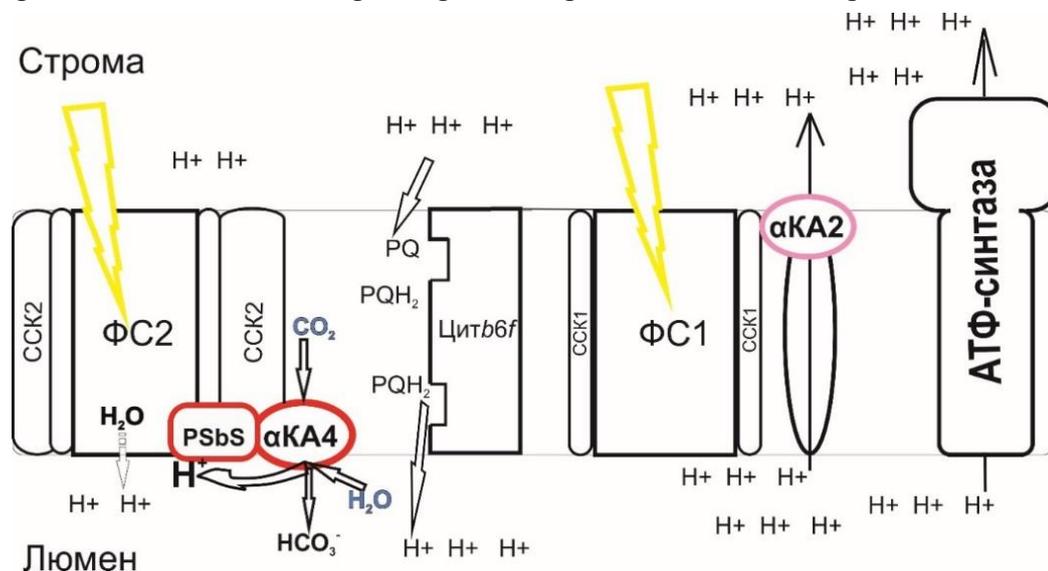


Рисунок 9. Гипотетическая схема расположения и функционирования  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2 в тилакоидной мембране.

## ВЫВОДЫ

1. Найдено, что гены, кодирующие карбоангидразы  $\alpha$ КА4 и  $\alpha$ КА2, экспрессируются в листьях растений *Arabidopsis thaliana* (var. Columbia), причем уровень их экспрессии зависит от освещения и концентрации  $\text{CO}_2$  в воздухе. При увеличении освещенности растений увеличивалась экспрессия обоих генов. При концентрации  $\text{CO}_2$  750 ppm экспрессия гена *At2g28210*, кодирующего  $\alpha$ КА2, была ниже, а экспрессия гена *At4g20990*, кодирующего  $\alpha$ КА4, - выше, чем при концентрации  $\text{CO}_2$  150 ppm.
2. Выявлены морфофизиологические отличия растений, нокаутированных по гену *At2g28210* или по гену *At4g20990* от растений дикого типа, экотипа Columbia. В мутанте по  $\alpha$ КА2 скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  листьями была выше, а образование  $\text{H}_2\text{O}_2$  на свету и содержание крахмала в листьях были ниже, чем в листьях растений дикого типа. В противоположность этому, в мутанте по  $\alpha$ КА4 скорость ассимиляции  $\text{CO}_2$  листьями была ниже, а образование  $\text{H}_2\text{O}_2$  на свету и содержание крахмала в листьях были выше, чем в листьях растений дикого типа. Установлено, что различие в содержании крахмала в мутанте по  $\alpha$ КА4 было результатом изменения скорости его накопления на свету.
3. Влияние нокаута гена, кодирующего  $\alpha$ КА4, на нефотохимическое тушение флуоресценции, и отсутствие во фрагментах тилакоидных мембран, обогащенных фотосистемой 2, из мутантов по  $\alpha$ КА4, характерной для карбоангидраз  $\alpha$ -семейства стимуляции ацетазоламидом в

субмикромольной концентрации карбоангидразной активности свидетельствуют о расположении этой карбоангидразы в тилакоидной мембране вблизи фотосистемы 2. Влияние нокаута гена, кодирующего  $\alpha$ КА2, на нефотохимическое тушение флуоресценции, и отсутствие стимуляции ацетазоламидом карбоангидразной активности целых тилакоидов, выделенных из растений, мутантных по  $\alpha$ КА2, но наличие таковой в тилакоидах из мутантов по  $\alpha$ КА4, предполагают расположение этой карбоангидразы на стромальной стороне тилакоидной мембраны.

4. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений, нокаутированных по гену *At4g20990*, кодирующему  $\alpha$ КА4, было на 30-40% меньше, чем в растениях дикого типа, а у растений, нокаутированных по гену *At2g28210*, кодирующему  $\alpha$ КА2, - на 20-30% больше. Установлено, что различие в обоих случаях обусловлено величиной компонента нефотохимического тушения флуоресценции, зависящего от концентрации протонов в люмене (энергозависимое тушение). Найдено, что фотосинтетический аппарат растений мутантных по  $\alpha$ КА4, обладал меньшей устойчивостью к повреждающему действию света высокой интенсивности, чем аппарат растений дикого типа, что согласуется с данными об уменьшенной величине нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* в этом мутанте.
5. Отличия характеристик флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений мутантных по  $\alpha$ КА2 и  $\alpha$ КА4 от соответствующих характеристик растений дикого типа, экотипа Columbia, и между собой свидетельствует, что эти карбоангидразы регулируют развитие энергозависимого компонента нефотохимического тушения флуоресценции, который быстро, в секундном диапазоне, изменяется в ответ на изменение условий протекания фотосинтеза. Противоположное влияние этих карбоангидраз на данный компонент нефотохимического тушения позволяет оперативно устанавливать величину этого тушения, необходимую для оптимального функционирования фотосинтетического аппарата растений в конкретных условиях окружающей среды.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

### Статьи

1. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Руденко Н.Н., Мудрик В.А., Ветошкина Д.В., Иванов Б.Н. (2016) Участие двух карбоангидраз альфа семейства в фотосинтетических реакциях *Arabidopsis thaliana*. Биохимия, т. 81, выпуск 10, с. 1463-1470.
2. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Семенова Г.А., Руденко Н.Н., Мудрик В.А., Иванов Б.Н. (2015) Влияние нокаута гена  $\alpha$ -карбоангидразы 4 на фотосинтетические характеристики *Arabidopsis thaliana* и накопление крахмала в листьях. Физиология растений. т. 62, выпуск 4, с. 564-569.
3. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Иванов Б.Н. (2013) Влияние отсутствия  $\alpha$ -карбоангидразы 2 в мутантных растениях *Arabidopsis thaliana* на показатели фотосинтеза. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук, т. 3, выпуск 12, с. 33-35.

## Материалы и тезисы конференций

1. Игнатова Л.К., Журикова Е.М., Руденко Н.Н., Федорчук Т.П., Иванов Б.Н. (2015) Участие карбоангидраз в регуляции функций хлоропласта. Материалы Всероссийской научной конференции «Механизмы регуляции функций растительных органелл». Иркутск, с. 32-34.
2. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Мудрик В.А., Иванов Б.Н. (2015) Флуоресцентные показатели растений *Arabidopsis thaliana*, нокаутированных по генам, кодирующим альфа-карбоангидразу 2 или альфа-карбоангидразу 4. Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений». Москва, с. 257-260.
3. Игнатова Л.К., Руденко Н.Н., Федорчук Т.П., Журикова Е.М., Иванов Б.Н. (2015) Множественность форм и функций карбоангидраз клеток высших растений. Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых ученых «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений». Москва, с. 298-302.
4. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Иванов Б.Н. (2013) Исследование участия карбоангидраз в фотосинтетическом метаболизме *Arabidopsis thaliana*. Международная научно-методическая конференция «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы». Воронеж, тезисы, с. 126.
5. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Иванов Б.Н. (2013) Характеристики фотосинтеза мутантных растений *Arabidopsis thaliana* с заблокированным синтезом некоторых карбоангидраз хлоропластов. 17 Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века». Пушкино, тезисы, с. 485.
6. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Мудрик В.А., Иванов Б.Н. (2013) Выяснение роли двух карбоангидраз  $\alpha$  семейства в фотосинтезе. Школа конференция молодых ученых «Биосистема: от теории к практике». Пушкино, тезисы, с. 11.
7. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Мудрик В.А., Иванов Б.Н. (2014) Характеристики фотосинтеза растений *Arabidopsis thaliana* мутантных по генам, кодирующим карбоангидразу  $\alpha 2$  или  $\alpha 4$ . VII съезд Российского фотобиологического общества. Краснодарский край, Шепси, тезисы с. 39.
8. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Мудрик В.А., Иванов Б.Н. (2015) участие тилакоидной  $\alpha$ -КА4 в защите фотосинтетического аппарата от фотоингибирования. 19 Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века». Пушкино, тезисы, с. 395.
9. Игнатова Л.К., Журикова Е.М., Иванов Б.Н. (2015) Влияние нокаута генов *At2g28210* и *At4g20990*, кодирующих карбоангидразы  $\alpha$ -2 и  $\alpha$ -4, на показатели фотосинтеза растений *Arabidopsis thaliana*. XXI Пушкинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты». Пушкино, тезисы, с. 38.
10. Руденко Н.Н., Федорчук Т.Н., Игнатова Л.К., Журикова Е.М., Иванов Б.Н. (2015) Роль тилакоидной  $\alpha$  карбоангидразы-4 в метаболизме *Arabidopsis thaliana*. XXI Пушкинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты». Пушкино, тезисы, с. 77.
11. Игнатова Л.К., Журикова Е.М., Руденко Н.Н., Федорчук Т.П., Иванов Б.Н. (2015) Карбоангидразы клеток высших растений. VIII съезд Общества физиологов растений России, Петрозаводск, тезисы, с. 224.
12. Руденко Н.Н., Федорчук Т.Н., Игнатова Л.К., Журикова Е.М., Иванов Б.Н. (2015) Роль тилакоидной  $\alpha$  карбоангидразы-4 в метаболизме *Arabidopsis thaliana*. VIII съезд Общества физиологов растений России, Петрозаводск, тезисы, с. 455.
13. Иванов Б.Н., Опанасенко В.К., Федорчук Т.П., Журикова Е.М., Руденко Н.Н., Игнатова Л.К. (2015) Роль карбоангидраз тилакоидов хлоропластов высших растений в процессах трансформации световой энергии, протекающих с участием протонов. V съезд биофизиков России. Ростов, тезисы, с. 257.
14. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Мудрик В.А., Иванов Б.Н. (2016) Влияние отсутствия альфа-карбоангидразы 4 на работу фотосинтетической электрон-транспортной цепи в растениях *Arabidopsis thaliana*. 20 Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века». Пушкино, тезисы, с. 351.
15. Zhurikova Elena, Ignatova Lyudmila, Mudrik Vilen, Ivanov Boris (2016) Participation of carbonic anhydrase alpha-4 in the development of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in *Arabidopsis thaliana*. 7th International Conference Photosynthesis Research for Sustainability – 2016. Pushchino, abstract p. 69.
16. Ignatova Lyudmila, Zhurikova Elena and Ivanov Boris (2016) The properties of two sources carbonic anhydrase activity in photosystem II of higher plants. 7th International Conference Photosynthesis Research for Sustainability – 2016. Pushchino, abstract, p. 65.
17. Zhurikova E.M., Ignatova L.K., Vetoshkina D.V., Mudrik V.A., Ivanov B.N. (2016) The role of alpha carbonic anhydrase 4 in the photosynthetic metabolism of *Arabidopsis thaliana*. 17th International Congress on Photosynthesis Research. Maastricht, abstract p. 240.