

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Журикова Елена Михайловна

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ АЛЬФА-КАРБОАНГИДРАЗЫ 2 И
АЛЬФА-КАРБОАНГИДРАЗЫ 4 В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ
МЕТАБОЛИЗМЕ *Arabidopsis thaliana*

03.01.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук
Иванов Б.Н.
кандидат биологических наук
Игнатова Л.К.

Пушино – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Семейства карбоангидраз	12
1.1.1. Карбоангидразы α –семейства.....	12
1.1.2. Карбоангидразы β –семейства.....	13
1.1.3. Карбоангидразы γ –семейства.....	15
1.1.4. Карбоангидразы δ , ϵ и ζ – семейства.....	15
1.2. Растворимые и мембраносвязанные КА высших растений.....	17
1.2.1. Плазмалеммная карбоангидраза.....	17
1.2.2. Цитоплазматические карбоангидразы.....	18
1.2.3. Митохондриальные карбоангидразы.....	19
1.2.4. Хлоропластные карбоангидразы.....	20
1.2.4.1. Стромальные карбоангидразы.....	20
1.2.4.2. Тилакоидные карбоангидразы.....	22
1.2.4.3. Люменальная карбоангидраза.....	26
1.3. Ингибиторы и активаторы карбоангидраз.....	27
1.4. Организация фотосинтетической электрон-транспортной цепи.....	30
1.5. Флуоресценция хлорофилла <i>a</i> как чувствительный показатель эффективности работы электрон-транспортной цепи.....	41
1.5.1. Эффект Каутского. Кривая индукции флуоресценции хлорофилла <i>a</i> фотосистемы 2.....	42
1.5.2. Типы тушения флуоресценции хлорофилла <i>a</i> . Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	43
1.5.2.1. Энергозависимый компонент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	45
1.5.2.2. Фотоингибирование.....	50

1.5.2.3. State transitions.....	51
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
2.1. Условия выращивания растений <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
2.2. Измерение уровня экспрессии генов, кодирующих исследуемые карбоангидразы.....	55
2.3. Определение содержания крахмала в листе.....	56
2.4. Проведение электронной микроскопии.....	56
2.5. Измерение ассимиляции CO ₂ листом.....	57
2.6. Измерение флуоресценции хлорофилла <i>a</i> листьев.....	57
2.6.1. Применение ПАМ-флуориметрии для измерения флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	57
2.6.2. Измерение ОЖР-кинетики флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	59
2.7. Измерение квантового выхода фотосистемы 1.....	60
2.8. Определение содержания пероксида водорода в листе.....	61
2.9. Определение концентрации хлорофилла в образце.....	61
2.10. Выделение тилакоидов.....	62
2.11. Выделение тилакоидных мембран, обогащенных ФС1 или ФС2.....	62
2.12. Измерение карбоангидразной активности.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	64
3.1. Зависимость экспрессии генов <i>At4g20990</i> или <i>At2g28210</i> , кодирующих αКА4 или αКА2, от внешних факторов.....	64
3.2. Внешний вид и вес растений мутантных по αКА4 или αКА2.....	65
3.3. Содержание крахмала в листьях растений мутантных по αКА4 или αКА2.....	67
3.4. Скорость ассимиляции CO ₂ листьями растений мутантных по αКА4 или αКА2.....	70
3.5. Сравнение характеристик флуоресценции хлорофилла <i>a</i> листьев растений мутантных по αКА2 или по αКА4.....	72

3.5.1. Измерение параметров флуоресценции хлорофилла <i>a</i> листьев с помощью ПАМ-флуориметрии.....	72
3.5.1.1. Параметры флуоресценции хлорофилла <i>a</i> листьев растений мутантных по α КА4.....	72
3.5.1.2. Параметры флуоресценции хлорофилла <i>a</i> листьев растений мутантных по α КА2.....	79
3.5.2. Оценка устойчивости растений мутантных по α КА4 или α КА2, к действию света высокой интенсивности.....	85
3.5.3. Оценка относительного уровня восстановления пула пластохинона растений мутантных по α КА4 или α КА2.....	86
3.5.4. Измерение ОЖР – кинетики флуоресценции хлорофилла <i>a</i> листьев растений мутантных по α КА4 или α КА2.....	87
3.6. Измерение квантового выхода ФС1 растений мутантных по α КА4 или α КА2.....	89
3.7. Измерение светоиндуцированного содержания пероксида водорода в листе растений мутантных по α КА4 или α КА2.....	90
3.8. Определение местонахождения α КА4 и α КА2 в тилакоидной мембране.....	91
3.8.1. Особенности выделения фрагментов тилакоидных мембран, обогащенных ФС2 или ФС1 из растений мутантных по α КА4 или α КА2.....	92
3.8.2. Карбоангидразная активность тилакоидов и ФС1- и ФС2-мембран.....	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	99
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат;

АТФ – аденозинтрифосфат;

ВДЭ – виолаксантиндеэпоксидаза

ВОК – водоокисляющий комплекс;

ДМ – β -додецилмальтозид (n-додецил- β -D-мальтозид);

ДТ – растения *Arabidopsis thaliana* экотип Columbia

КА – карбоангидраза;

НАДФ⁺ – окисленный никотинамидаденин-динуклеотидфосфат;

НАДФН – восстановленный никотинамидаденин-динуклеотидфосфат;

НФХТ – нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*;

РЦ – реакционный центр;

Рубиско – рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа;

ССК – светособирающий комплекс;

Тритон/Хл – отношение Тритон X-100/хлорофилл в средах обработки тилакоидов;

ФЕП – фосфоенолпируват;

ФЕП-карбоксилаза – фосфоенолпируват-карбоксилаза;

ФС1 – фотосистема 1;

ФС2 – фотосистема 2;

Хл – хлорофилл;

ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь;

АА – ацетазоламид (5-ацетиламино-1,3,4-тиадиазол-2-сульфонамид)

САМ – метаболизм по типу толстянковых;

Р680 – первичный донор электронов РЦ ФС2;

Р700 – первичный донор электронов РЦ ФС1;

RMSF – фенилметилсульфонилфлуорид

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез – это уникальный процесс, благодаря которому осуществляется превращение простых неорганических веществ, углекислого газа и воды, в сложные органические. Концентрация CO_2 , проникающего в клетку высших растений, невелика, растворенная в воде молекула CO_2 гидратируется и в результате этой реакции образуется ион бикарбоната и протон (HCO_3^- и H^+). Неорганический углерод резервируется в цитоплазме и хлоропласте в виде бикарбонат-иона. Скорость спонтанной гидратации невелика, и у всех живых организмов существует фермент, ускоряющий взаимопревращение форм неорганического углерода – карбоангидраза (карбонатгидролизаза КФ 4.2.1.1).

Актуальность и разработанность темы диссертации. Роль карбоангидраз в фотосинтетическом метаболизме высших растений до сих пор не была выяснена. У высшего растения *Arabidopsis thaliana* обнаружено 19 генов, кодирующих карбоангидразы, принадлежащие трем основным семействам: α , β и γ карбоангидразы (Fabre et al., 2007). Часто в одной органелле клетки содержится несколько карбоангидраз; так в хлоропластах обнаружено шесть источников карбоангидразной активности, как неизвестной природы, так и принадлежащих α и β семействам (Ignatova and Ivanov, 2016). Из восьми КА α семейства известно только местонахождение двух КА, и обе находятся в хлоропластах: α КА1 (по номенклатуре, принятой для карбоангидраз *A. thaliana*) в строме и α КА4 в тилакоидной мембране, более точное местонахождение последней КА не было выяснено.

Множественность форм карбоангидразы свидетельствует о возможном разнообразии функций этого фермента. В строме хлоропласта находится β КА1, которая по количеству белка занимает второе место после Рубиско и несколько десятилетий известна исследователям и изучается, но функции этой КА еще не выяснены. Снижение до 1% содержания этой КА не привело

к снижению фотосинтеза (Price et al., 1994), то есть количество белка не всегда коррелирует с важностью его функции.

Особенностью растений, обусловленной «сидячим» образом жизни, является их способность приспосабливаться к весьма различным условиям внешней среды и стрессовым условиям. Собственно, процесс фотосинтеза является не только источником энергии для клетки, но и чувствительным сенсором (Rochaix J.D., 2011) условий внешней среды: температуры, освещенности, концентрации CO₂ и т.д. Мы полагаем, что важную роль в процессах адаптации могут играть карбоангидразы.

Эффективным путем при исследовании функций белков/ферментов в настоящее время является использование мутантных растений с нокаутом исследуемого белка.

Целью работы было выяснить участвуют ли в фотосинтетическом метаболизме высшего растения *A. thaliana* карбоангидразы α -семейства, α КА4 и α КА2, и, если участвуют, то на каком из этапов этого сложного многопланового процесса они функционируют.

Основные задачи состояли в следующем:

1. Измерить морфофизиологические показатели, связанные прямо или косвенно с процессом фотосинтеза, растений с нокаутом генов *At2g28210* или *At4g20990*, кодирующих α КА2 и α 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. В диссертационной работе впервые показано, что α КА2 и α 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 ФС 2 карбоангидразы, принадлежащей к α семейству, а именно α КА4. До настоящего времени не было известно о местоположении и функциях α КА2 в растительной клетке. Впервые были получены данные, свидетельствующие, что α 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 подобранная (использованная) совокупность методов сбора и оценки показателей фотосинтеза могут быть полезными при исследовании функций различных белков в фотосинтезе высших растений, так как дает комплексную характеристику световой и темновой стадий фотосинтеза.

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

Методология и методы диссертационного исследования. Для установления участия и функций в фотосинтезе исследуемых карбоангидраз были использованы растения *A. thaliana* с нокаутом генов *At2g28210* или *At4g20990*, кодирующих α КА2 и α КА4 (по две линии каждого мутанта). Многие стороны процесса фотосинтеза были измерены следующими методами: морфофизиологический анализ растений, измерение скорости ассимиляции CO_2 листом, измерение содержания пероксида водорода в листе, ПАМ-флуориметрия, измерение уровня экспрессии генов и т.д. Такой подход позволил установить место функционирования КА в сложном и многостороннем процессе фотосинтеза. Выделение препаратов тилакоидных мембран, обогащенных ФС1 или ФС2 и измерение КА активности, используя характерное для КА α -семейства свойство стимуляции КА активности специфическим непроникающим в мембрану ингибитором КА ацетазоламидом, позволило установить местонахождение исследованных карбоангидраз в тилакоидной мембране.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Совокупность измеренных морфофизиологические характеристик растений арабидопсиса дикого типа (var. Columbia) и растений с нокаутом генов *At2g28210* или *At4g20990*, кодирующих α КА2 и α КА4 показывает, что эти карбоангидразы участвуют в метаболизме, поскольку их отсутствие изменяет эти характеристики, причем в противоположном направлении.
- 2) Карбоангидразы α КА2 и α КА4 участвуют в регуляции диссипации световой энергии, поглощенной пигментным аппаратом фотосинтеза, что проявляется в изменении в мутантах по этим карбоангидразам величины нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* листьев, причем изменение этого

тушения обусловлено изменением его компонента, который зависит от концентрации протонов во внутритилакоидном пространстве.

3) Карбоангидразы α КА2 и α КА4 находятся в тилакоидных мембранах: α КА2 - на стромальной стороне ламеллярных мембран, а α КА4 в гранальных мембранах вблизи ФС2.

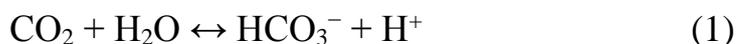
Степень достоверности результатов.

Достоверность результатов работы подтверждается большим числом экспериментов, проведенных с использованием современных методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Выводы и предположения, сформулированные в диссертации, подкреплены данными, представленными в приведенных таблицах и рисунках.

Апробация результатов работы. Материалы диссертации были представлены на 14 российских и международных конференциях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Карбоангидраза – металлсодержащий фермент, который ускоряет обратимую гидратацию CO_2 в клетках (уравнение 1).



КА является одним из самых активных ферментов: количество оборотов (k_{cat}) некоторых изоформ, например, КАП, может достигать 10^6 c^{-1} (Chegwidden and Carter, 2000). Впервые КА обнаружена в бычьих клетках крови в 1932 году (Meldrum and Roughton, 1933). Долгое время присутствие КА в тканях растений не было подтверждено. В 1947 году в работе (Bradfield, 1947) было впервые доказано наличие КА в тканях растений. После того как в 1963 году (Veith and Blankeship, 1963) были выявлены КА в бактериях *Neisseria sicca*, было высказано предположение, что происхождение КА ведется от прокариот. Карбоангидразы вовлечены в широкий диапазон физиологических процессов. Животные КА участвуют в дыхании, поддержании кислотно-щелочного баланса, костной резорбции, кальцификации, антиоксидантной системе и многих биосинтетических путях (Cabisco and Levine, 1996; Sly and Hu, 1995; Chegwidden et al., 1995). Обилие КА в листьях растений, как и в других органах фотосинтезирующих организмов, предполагает целый ряд важных физиологических функций в метаболизме, особенно в синтезе жирных кислот, биосинтезе аминокислот и фотосинтезе (Badger and Price, 1994; Fett and Coleman, 1994; Hatch and Burnell, 1990; Hoang and Chapman, 2002; Raven and Newman, 1994).

1.1. Семейства карбоангидраз

На данный момент выделяют пять независимых семейств КА, обозначаемых α -, β -, γ -, δ - и ζ -, которые отличаются по наличию консервативных участков в генах, кодирующих их (Hewett-Emmett and Tashian, 1996; Moroney et al., 2011). Все представители этих семейств

содержат в активном центре ион металла, чаще всего цинк. Катализируя одну и ту же реакцию, КА этих семейств имеют разные аминокислотные остатки вокруг иона металла. Семейство α КА является эволюционно самым молодым семейством и является единственным семейством, обнаруженным у млекопитающих (Hewett-Emmett, 2000). α КА распространены в эубактериях (Soltes-Rak et al., 1997; Elleby et al., 2001), высших растениях (Fabre et al., 2007; Villarejo et al., 2005) и водорослях (Fukuzawa et al., 1990; Fujiwara et al., 1990); представители КА β -семейства встречаются в бактериях (Sawaya et al., 2006), водорослях (Eriksson et al., 2006) и высших растениях с C3 и C4 типом фотосинтеза (Majeau et al., 1992; Roeske and Ogren, 1990); γ КА обнаружены в археобактериях, например в *Methanosarcina thermophila* (Kisker et al., 1996), в высших растениях (Braun and Zabaleta, 2007), а также в зеленых и диатомовых водорослях (Moroney et al., 2011). КА δ -, ζ -семейств обнаружены в клетках диатомовой водоросли *Thalassiosira weissfloggi* и бактерии *Thiobacillus neapolitanus*. Однако изучение кристаллической структуры ζ КА из бактерии *Halothiobacillus neapolitanus* выявило, что данная КА имеет структуру β -семейства и поэтому ζ -семейство должно быть ликвидировано из систематики (Sawaya et al., 2006).

Несмотря на то, что все семейства КА имеют разное строение активного центра, механизм катализа гидратации CO_2 у всех одинаковый. Катализ происходит в два этапа по механизму «пинг-понг» (Lindskog and Silverman, 2000; Zimmerman and Ferry, 2008; Rowlett, 2010). На первой стадии происходит нуклеофильная атака CO_2 на цинк-связанный гидроксид-ион в активном центре фермента КА, что приводит к образованию бикарбоната, который потом вытесняется из активного центра случайной диффузией воды (уравнение 2). На второй стадии происходит ионизация связанной с цинком молекулы воды и удаление протона из активного центра на внешний буфер (В) (уравнение 3). Роль внешнего буфера играют аминокислотные остатки в активном центре фермента. В эритроцитарной КАII эту роль выполняет

His64. Передача протона является лимитирующей стадией всего катализа (Silverman and McKenna, 2007).



1.1.1. Карбоангидразы α -семейства

Кристаллическая структура α КА млекопитающих впервые была получена в 1972 году (Liljas et al., 1972). Выявлено не менее 10 изоформ α -КА человека, а наиболее активной и изученной из всех является КАII. Активный центр α КА представляет собой искаженный тетраэдр, в центре которого располагается ион цинка, окруженный гидроксил ионом и тремя остатками гистидина. В КАII это гистидиновые остатки в положениях His94, His96 и His119 (Christianson and Cox 1999). В структуре α КА преобладают антипараллельные β -листы, образующие сферу с двумя половинами, а активный центр представляет собой воронкообразное углубление с атомом цинка в глубине сферы (Moroney et al., 2001). Большинство α КА являются мономерами с молекулярной массой около 30 кДа, но существуют исключения. Периплазматическая КА, САН1, из *Chlamydomonas reinhardtii* является гетеротетрамером с двумя субъединицами с молекулярной массой 37 кДа и двумя по 4 кДа, соединенными дисульфидными связями (Kato et al., 1990).

На данный момент в зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* идентифицированы три α КА: две растворимые КА обнаружены в периплазматическом пространстве (САН1 и САН2) и одна мембраносвязанная КА обнаружена в ФС2 (САН3).

В секвенированном геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено восемь генов, кодирующих α КА. О местонахождении и функциях α КА известно не так много. Установлено, что α КА1 синтезируется во всех органах растения,

кроме корней (Fabre et al., 2007). В листе эта КА локализована в строме хлоропласта (Villarejo et al., 2005). α КА2 синтезируется в стеблях и корнях, а α КА3 – в стручках и цветках (Fabre et al., 2007). С помощью масс-спектрометрического протеомного анализа было показано, что α КА4 находится в тилакоидной мембране *A. thaliana* (Friso et al., 2004). Изучение экспрессии генов различных α КА позволило сделать вывод, что для генов *AtαCA4-8* уровень экспрессии очень низкий (Fabre et al., 2007).

1.1.2. Карбоангидразы β -семейства

КА β -семейства были впервые идентифицированы в 1990 году, после того как была определена последовательность гена, кодирующего КА из *Spinacea oleraceae*, отличающаяся от последовательности гена, кодирующего α КА (Burnell et al., 1990). При этом, кристаллографическая структура β КА не была определена до 2000 года. Впервые была показана структура фермента β -семейства из красной водоросли *Porphyridium purpureum* (Mitsubishi et al., 2000). Следующие структуры были определены для фермента из высшего растения *Pisum sativum* (Kimber et al., 2000) и бактерии *Escherichia coli* (Cronk et al., 2001). Из данных по кристаллографии очищенных белков был сделан вывод о том, что β КА могут быть димерами, тримерами и октомерами. β КА образованы уникальной α/β структурой, которая не встречается в других белках. Несмотря на то, что β КА могут принимать разнообразные олигомерные формы с молекулярной массой от 45 до 200 кДа, основной структурной единицей является димер или его структурный эквивалент (Rowlett, 2010). Все β КА содержат в активном центре один атом цинка на один мономер. Активный центр представляет собой псевдо-тетраэдр, где ион цинка находится в окружении двух остатков цистеина (Cys160, Cys223), одного остатка гистидина (His220) и «X». «X» может быть остатком

аспаргиновой кислоты или переменным лигандом таким, как вода или органический/неорганический ион (Rowlett et al., 2014).

В геноме *A. thaliana* содержится 6 генов, кодирующих βКА (Moroney et al., 2001). Гены, кодирующие βКА, являются самыми высокоэкспрессируемыми в листьях растений. βКА1 и βКА5 располагаются в хлоропластах, βКА2 и βКА3 – в цитозоле, βКА4 – в плазмалеммной мембране, а βКА6 – в митохондриях (Fabre et al., 2007).

Физиологическая роль многих βКА ещё не установлена.

Предполагается, что в хлоропластах высших растений βКА1 необходима для поставки CO₂ к ключевому ферменту цикла Кальвина – рибулозобисфосфаткарбоксилазе/оксигеназе (Рубиско). Митохондриальная βКА в *Ch. reinhardtii* может участвовать в переходе углекислого газа, выделяемого при дыхании, в бикарбонат, который транспортируется из митохондрий и может быть использован в фотосинтезе (Giordano et al., 2003). В C₄ растениях βКА могут обеспечивать HCO₃⁻ фосфоенолпируваткарбоксилазу (ФЕП-карбоксилазу) для получения щавелевоуксусной кислоты.

В мутантных растениях *A. thaliana* с заблокированным синтезом двух КА, βКА1 и βКА4, происходило снижение проводимости устьичных клеток при разных концентрациях CO₂ (Hu et al., 2010). Дальнейшие исследования тех же авторов показали, что ионы бикарбоната в замыкающих клетках приводят к усиленной активации анионных каналов именно с помощью регуляции βКА1/βКА4. Уменьшение уровня экспрессии в *Nicotiana tabacum* стромальной βКА1 до 1% не приводило к снижению ассимиляции CO₂ (Majeau et al., 1994). Тем не менее, было показано, что в *P. sativum* экспрессия Рубиско и стромальной КА увеличивается при изменении уровня CO₂ от высокой концентрации к низкой (Majeau et al. 1996).

1.1.3. Карбоангидразы γ – семейства

Впервые γ КА охарактеризована из археобактерии *M. thermophila* (Alber and Ferry, 1994). γ КА присутствуют в клетках не только бактерий, но и диатомовых водорослей и растений (Moroney et al., 2011). Они являются гомотримерами, субъединицы которых сформированы левосторонними параллельными β -складчатыми структурами. Активный центр γ КА представляет собой тетраэдр, схожий с активным центром α КА, в состав которого входят три остатка гистидина (His 81, His 117 и His 122) и вода. Первый гистидин принадлежит одной субъединице, а два других – второй (Ferry et al. 2010). Тетрамер содержит три атома металла, которые расположены на границе субъединиц. Следует отметить, что важные для каталитической активности остатки Glu62, Glu84 и Asn202 не сохраняются в *A. thaliana*. Arg59 имеет важное значение для стабильности тримера γ КА и, соответственно, для КА активности. γ КА из *E. coli* являются цинк содержащими ферментами, однако имеются и железо- и кобальт-содержащие представители γ -семейства, которые обладают большей скоростью гидратации CO_2 (Tripp et al., 2004). Вполне возможно, что γ КА из *M. thermophila* содержат разные переходные металлы в активном центре. При катализе γ КА используют механизм гидроксирования металла с переносом протона. В отличие от многих других классов КА, γ КА не проявляют эстеразную активность и меньше ингибируются сульфаниламидами (Smith and Ferry, 2000).

1.1.4. Карбоангидразы δ , ϵ и ζ – семейства

В 1997 году группа Франсуа Мореля сообщила об очистке из морских диатомовых *Thalassiosira weissflogii* 27-кДа мономерной карбоангидразы, TWCA1, которая была отнесена к δ -семейству. (Roberts et al., 1997). С

помощью рентгеноабсорбционной спектроскопии показано, что цинк в активном центре координирован тремя гистидинами и молекулой воды, как и в активных центрах КА α - и γ - семейств. Наличие молекулы воды в качестве четвертого лиганда позволяет предполагать, что каталитический механизм гидроксирования цинка у δ КА такой же, как у трех других семейств. При этом нуклеотидная последовательность гена, кодирующего δ КА, не гомологична последовательностям других генных семейств КА (Cox et al., 2000).

Из бактерии *Halothiobacillus neapolitanus* был выделен белок CsoS3, содержащийся в обкладке карбоксисом, который отнесли к новому семейству – ϵ КА. Никакой структурной гомологии белка CsoS3 с другими известными семействами КА не выявлено. Предположительно, молекулярная масса CsoS3 варьирует в пределах от 55,2 до 63,4 кДа, что значительно больше молекулярных масс субъединиц мономерных КА α -, β - и γ -семейств (17-32 кДа). Такая большая масса белка CsoS3 позволяет ему быть структурной единицей карбоксисом, выполняющей каталитическую функцию. В реакционном центре ϵ КА содержится атом цинка, координированный или тремя остатками гистидина, или комбинацией из гистидина, цистеина и, иногда, аспартата. Предполагаемой функцией ϵ КА в карбоксисомах является поставка CO_2 в активные центры Рубиско для поддержания оптимальной фиксации CO_2 (So et al., 2004).

В диатомовой водоросли *T. weissflogii* помимо δ КА обнаружен ещё один белок, названный CDCA1, и отнесенный к новому семейству КА – ζ -КА. Этот тип КА так же не имеет структурной гомологии с другими основными семействами. Особенностью CDCA1 является наличие в его активном центре иона Cd^{2+} . Позже было показано, что ζ КА может замещать Cd^{2+} на Zn^{2+} и наоборот (Xu et al., 2008). CDCA1 представляет собой уникальный пример биологически выгодной работы кадмия и, возможно, является следствием способности диатомовых водорослей адаптироваться к

низкому содержанию металла в океанах. По строению ζ КА является мономером, содержащим три очень схожих активных центра, что фактически делает этот белок псевдотримером (Alterio et al., 2015). Ион Cd белка CDCA1 находится на дне воронкообразного активного центра и скоординирован тремя консервативными остатками Cys263, His315, Cys325 и молекулой воды. Вторая молекула воды также вносит свой вклад в связывание Cd (II), а третья молекула воды образует водородные связи с этими двумя молекулами воды. В Zn-связанном CDCA1 атом металла координируется сходным образом, однако расстояние между цинком и его лигандами уменьшается по сравнению с Cd-связанным белком CDCA1 (Viparelli et al., 2010).

1.2. Растворимые и мембраносвязанные КА высших растений

1.2.1. Плазмалеммная карбоангидраза

Впервые присутствие плазмалеммной КА в высших растениях было показано в работе, проведенной на протопластах мезофилла гороха и клевера, где исследовалось влияние концентрации CO_2 (Игнатова и Романова, 1992). Добавление специфического ингибитора КА ацетазоламида (АА), характеризующегося низкой растворимостью в мембранах, уменьшало ингибирующее действие высоких концентраций CO_2 на выделение O_2 в протопластах. Дальнейшие исследования показали, что КА активность интактных протопластов составляла всего 3-9% от КА активности разрушенных протопластов (Ignatova et al., 1993). Плотность единиц КА в плазмалемме довольно высока, при том, что объем плазмалеммы составляет всего 0,3% от объема протопластов. Существование плазмалеммной КА было подтверждено и для других СЗ растений, в том числе двудольных (шпинат и петрушка) и однодольных (пшеница и овес) (Utsunomiya and Muto, 1993). Активность плазмалеммной КА изолированных препаратов шпината

увеличивалась при обработке мембран детергентом тритон X-100, что характерно для мембраносвязанных белков. С помощью вестерн-блот анализа показано, что молекулярная масса плазмалеммной КА близка к 28 кДа (Utsunomiya and Muto, 1993). В геноме *A. thaliana* обнаружен ген *Atlg70410*, кодирующий βКА4. С помощью зеленого флуоресцентного белка было обнаружено, что эта КА локализована в плазмалеммной мембране (Fabre et al., 2007). Основной функцией КА плазмалеммы является транспорт неорганического углерода в клетку (Ignatova et al., 1993). Недавно высказано предположение, что плазмалеммная βКА4 может инициировать CO₂-зависимое закрытие устьиц (Hu et al., 2015).

1.2.2. Цитоплазматические карбоангидразы

Диффузия CO₂ в цитоплазму ускоряется растворимой формой КА, наличие которой было показано для шпината (Kachru and Anderson, 1974) и картофеля (Rumeau et al., 1996). Содержание цитоплазматической КА в листьях картофеля составляло 13% от общего содержания растворимых КА (Rumeau et al., 1996). Цитоплазматическая КА является октамером с общей молекулярной массой 255 кДа и массой отдельного мономера, приблизительно равной 27 кДа. В C4 растениях цитоплазматическая КА может поставлять бикарбонат ФЕП-карбоксилазе, способствуя ассимиляции CO₂ (Hatch and Burnell, 1990). В цитоплазме *A. thaliana* обнаружены две растворимые КА β-семейства: βКА2 и βКА3 (Fabre et al., 2007). Мутантные растения, нокаутированные по генам, кодирующим βКА2 и βКА4, отставали в росте при низкой концентрации CO₂. Авторы предполагают, что βКА2 и βКА4 необходимы для нормального функционирования цитозольной ФЕП-карбоксилазы, участвующей в цикле трикарбоновых кислот и производстве аминокислот (DiMario et al., 2016).

1.2.3. Митохондриальные карбоангидразы

В геноме *A. thaliana* обнаружено пять генов, кодирующих γ КА, которые образуют часть митохондриального комплекса I; КА трех субъединиц комплекса имеют полностью активный центр (γ КА1, γ КА2 и γ КА3), а КА двух других субъединиц, в которых отсутствуют некоторые консервативные аминокислотные остатки, образующие активный центр, называют КА-подобными белками и обозначают γ КА4 и γ КА5. Белки γ КА4/ γ КА5 имеют 91% идентичности и, возможно, являются изоформами. КА активность всех этих пяти КА ещё не была продемонстрирована, хотя и было показано, что гомотримеры γ КА2 связывают $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (Martin et al., 2009). Физиологическую роль γ КА1-3/ γ КА4-5 субъединиц комплекса I пытаются определить с использованием мутантных линий *A. thaliana*. Нокаутирование генов, кодирующих γ КА2 или γ КА3, не приводило к фенотипическим изменениям. В мутантных растениях без γ КА2 комплекс I имел меньший размер, что могло бы указывать на существенную роль этой КА в организации белкового комплекса (Perales et al., 2005). Электронная микроскопия показала, что без γ КА2 остальной карбоангидразный комплекс имеет стандартную форму. Авторами был сделан вывод, что γ КА2 может замещаться другими КА (Sunderhaus et al., 2006). В двойных мутантах, в которых отсутствуют γ КА4/ γ КА5, наблюдалась светозависимая активация халконсинтазы – ключевого фермента синтеза антоцианов, возможно, что γ КА4 и γ КА5 играют важную роль в росте и развитии в *A. thaliana* в условиях высокого освещения (Wang et al., 2010).

Ещё одна КА, относящаяся к β -семейству, находится в митохондриях – β КА6. При высокой концентрации CO_2 , уровень экспрессии гена, кодирующего β КА6, в *A. thaliana* увеличивался, что может свидетельствовать о влиянии этой КА на адаптацию растения к высоким концентрациям CO_2 (Fabre et al., 2007). В другой работе использовали *A. thaliana* с повышенным

уровнем экспрессии гена, кодирующего β КА6, что приводило к увеличению биомассы растений, площади розетки растения и снижению интенсивности дыхания (Jiang et al., 2014). Другая группа исследователей предположила, что, как и в *Chlamydomonas*, в СЗ растениях существует CO_2 -концентрирующий механизм. Согласно их гипотезе, в митохондриях β КА6 конвертирует CO_2 до HCO_3^- , в то время как γ КА транспортируют бикарбонат в цитоплазму. Бикарбонат из цитоплазмы может быть перенесен в строму хлоропласта, однако механизм такого переноса ещё не известен (Zabaleta et al., 2012).

1.2.4. Хлоропластные карбоангидразы

1.2.4.1. Стромальные карбоангидразы

Большая часть карбоангидразной активности в листьях СЗ растений приходится на долю стромальной растворимой КА, которая может составлять от 1 до 20% от общего количества белка в ткани листьев (Okabe et al., 1984). С помощью зеленого флуоресцирующего белка (GFP) было показано, что в *A. thaliana* β КА1 располагалась в строме (Fabre et al., 2007). В клетку СЗ растений неорганический углерод поступает в виде молекулы CO_2 . Строма хлоропласта имеет слабощелочной pH, поэтому основной формой неорганического углерода в строме является бикарбонат. В то время как субстратом Рубиско является молекула CO_2 , поэтому казалось очевидным, что для конверсии бикарбоната в CO_2 и его поставки Рубиско необходима КА. Исследования *in vitro* с использованием частично очищенной Рубиско из пшеницы показали, что в присутствии КА снижается $K_m(\text{CO}_2)$ карбоксилазы (Bird et al., 1980). В растениях, выращенных при повышенной концентрации CO_2 , происходило существенное падение активности и КА, и Рубиско (Porter and Grodzinski, 1984). В опытах с фасолью ингибирование добавленной извне

КА приводило к подавлению карбоксилазной активности и возрастанию оксигеназной активности Рубиско (Porter and Grodzinski, 1984). Несмотря на кажущуюся связь активности КА и Рубиско, в последующих работах роль стромальной КА в фотосинтезе не была подтверждена. Противоречивые результаты были получены с использованием антисмысловых конструкций РНК. Растения *N. tabacum*, в которых содержание стромальной КА было снижено более чем на 90%, фенотипически не отличались от дикого типа, и даже снижение уровня КА до 1% не приводило к видимым дефектам (Maizeau et al., 1994). Однако, антисмысловая модификация *A. thaliana*, уменьшающая уровень стромальной КА на 90%, приводила к нежизнеспособности растений в стандартных условиях выращивания, и только при добавлении сахарозы в культуральную среду или при обеспечении высокого содержания CO₂ растения могли выживать (Kim and Bartlett, 1996). В работе (Price et al., 1996) обнаружено, что в мутантных растениях *N. tabacum*, в которых уровень экспрессии стромальной КА был снижен до 2% по сравнению с диким типом, не наблюдалось никакого изменения в процессе фотосинтеза, активности Рубиско, содержании хлорофилла и проводимости устьиц. Также интересно, что изотопный состав углерода сухого вещества листьев изменялся в мутантных растениях, что отражает существенное уменьшение средней концентрации CO₂ в хлоропласте. Существует много работ по определению роли стромальной КА в защите растений от стресса. Выявлено, что стромальная КА может связывать салициловую кислоту, которая является важным сигнальным компонентом, вызывающим целый каскад реакций, приводящих к увеличению экспрессии генов и пост-трансляционной активности белков, участвующих в защите растений от окислительного стресса (Slaymaker et al., 2002). Увеличение атмосферного CO₂ вызывает закрытие устьиц в листьях и, таким образом, влияет на приток CO₂ в растениях. Тем не менее, какие-либо CO₂-связывающие белки, которые бы контролировали этот ответ, не известны. Показано, что в растениях *A.*

thaliana, нокаутированных по генам *At3g01500* и *At1g70410*, кодирующим βКА1 и βКА4 соответственно, нарушена CO₂-зависимая регуляция устьиц (Hu et al., 2010). Таким образом, множество работ демонстрируют важность стромальной βКА1 для метаболизма растительной клетки, но ее точная роль в фотосинтезе ещё не установлена.

Недавно обнаружена ещё одна стромальная КА в *A. thaliana* – αКА1. В мутантных растениях, нокаутированных по гену, кодирующему данную КА, происходило уменьшение фотосинтетической активности и способности к накоплению крахмала. В то время как в 4-х недельных мутантах по βКА1 не было значимых отличий в фенотипе (Ferreira et al., 2008), в мутантных растениях по αКА1 наблюдалось снижение поглощения CO₂ до 40% и сопутствующее снижение темпов роста и накопления крахмала. Также в растениях мутантных по αКА1 изменялся уровень растворимых углеводов, образовавшихся при фотосинтезе. Эти данные указывают на то, что αКА1 каким-то образом участвует в процессе фотосинтеза и, возможно, именно она поставляет субстрат для Рубиско (Burén, 2010).

1.2.4.2. Тилакоидные карбоангидразы

В 1977 Семененко с соавторами показали, что большая часть КА активности, обнаруженной в *Chlorella* находилась в нерастворимой «мембранной» фракции, тогда как у *Scenedesmus* показано лишь небольшое количество КА активности в мембранной фракции в тилакоидах. Позже более детальная работа этих же авторов (Пронина и Семененко, 1988) показала, что только 20% КА активности, обнаруженной в мембранной фракции из *Chlorella*, относилась к тилакоидной КА, а остальная активность была связана с клеточными стенками и, вероятно, носитель активности содержался в плазмалемме. Впервые наличие мембраносвязанной формы КА было показано группой (Комарова и др., 1982), которая выделила две

изоформы КА из хлоропластов бобов. Эти две изоформы имели разную электрофоретическую подвижность. Одна форма представляла собой растворимую КА, расположенную в строме, а вторая, мигрирующая более медленно, была связана с тилакоидными мембранами. Активность КА проявлялась только после полного растворения мембраны с помощью детергента Triton X-100. Тилакоидная КА была визуализирована в геле при окрашивании бромтимоловым синим, позволяющим выявить ферментативную активность КА. Этот подход позволил не только продемонстрировать наличие тилакоидной КА, но и показал, что она может быть выделена из мембраны в активной форме.

Ваклинова с соавторами (1982) показали, что тилакоиды из гороха содержали прочносвязанную КА активность, которая подавлялась диуроном и гидроксиламином, ингибиторами активности фотосистемы 2 (ФС2), тогда как цитоплазматическая (растворимая) КА не была чувствительна к этим соединениям. Это была первая работа, которая показала, что тилакоидная КА сосредоточена в мембранах, обогащенных ФС2.

Долгое время считалось, что наличие КА активности тилакоидных мембран является следствием загрязнения тилакоидов высокоактивной стромальной КА. Однако, многие работы показали, что активность растворимой КА отличалась от активности тилакоидной КА по ряду свойств: величине K_m , зависимости каталитической реакции от pH – активность растворимой КА не зависела от pH, тогда как КА активность тилакоидов имела максимум при pH=6,8 (Ignatova et al., 1998). Аномальным свойством, обнаруженным для тилакоидной КА, стала стимуляция ее активности ингибиторами ацетазоламидом и азидом, взятыми в субмикромольных концентрациях (Москвин и др., 1995). Многие группы изучали КА активность, возможно, связанную непосредственно с ФС2. Все классические ингибиторы КА эффективно подавляли активность ФС2. К их числу относятся одновалентные анионы (формиат, нитрат, азид и т.д.) и

депротонированная форма имидазола (Stemler et al., 1983, Stemler et al., 1986). Необычным свойством обладала КА активность мембран, обогащенных ФС2, выделенных из кукурузы (Stemler et al., 1986): при действии сильного света в течение нескольких минут ингибировалась ее активность. При этом атразин, ингибитор активности ФС2, препятствовал такому "фотоингибированию" КА активности (Kyle et al., 1984). После многих лет изучения ингибирования ФС2 анионами и восстановления ее активности путем добавления бикарбоната было введено понятие «бикарбонатный эффект». Одна из первых гипотез, объясняющая очевидную потребность в бикарбонате для эффективной работы ФС2, состояла в том, что HCO_3^- каким-то образом участвует в выделении кислорода (Stemler, 1997).

С помощью вестерн-блот анализа с использованием антител против тилакоидной α КА из *Ch. reinhardtii*, Саh3, показано присутствие КА во фрагментах тилакоидных мембран (гороха и кукурузы), обогащенных ФС2. (Пронина, 2002; Lu and Stemler, 2002). Было показано, что в препаратах, выделенных из гороха, только растворимая КА, но не тилакоидная КА, имела кросс-реакцию с антителами против растворимой β КА шпината (Moskvin et al., 2004).

В начале 2000-х годов стали появляться факты, свидетельствующие о наличии в тилакоидной мембране более, чем одного носителя КА активности. Присутствие в тилакоидах, по крайней мере, двух разных источников КА активности продемонстрировали Lu and Stemler (2002). В мембранах, обогащенных ФС2, из тилакоидов мезофилла кукурузы были обнаружены два различных источника КА активности. Один из них, экстрагируемый в присутствии солей калия, натрия и, особенно, кальция в высокой концентрации, был обозначен как «внешний» источник КА активности, а другой – «внутренний» источник. Также было показано, что при инкубации тилакоидов гороха с Тритоном X-100 имеются два максимума КА активности, зависящие от отношения тритон/Хл (максимумы

наблюдались при отношениях, равных 0,3 и 1,0) (Rudenko et al., 2007).

Наличие двух максимумов свидетельствовало о присутствии в тилакоидах, как минимум, двух носителей КА активности.

В работе (Khristin et al., 2004) обнаружено, что по крайней мере, часть КА активности мембран, обогащенных ФС2, из пшеницы была связана с коровым комплексом этой фотосистемы. Присутствие двух источников КА активности, высокомолекулярного и низкомолекулярного, наблюдали после проведения нативного электрофореза ФС2-мембран из гороха и окрашивания геля на наличие КА активности. Наличие КА активности в окрашиваемых полосах геля было подтверждено при измерении КА активности элюатов этих полос стандартным электрометрическим методом (Ignatova et al., 2006). Подобным образом, было подтверждено наличие двух КА активностей в ФС2 из арабидопсиса (Ignatova et al., 2011). Причем, классический ингибитор КА, ацетазоламид, в концентрации около 10^{-7} М стимулировал КА активность низкомолекулярной фракции, элюированной из соответствующей полосы геля после проведения нативного электрофореза ФС2-мембран из гороха и арабидопсиса, и подавлял эту активность только в высоких концентрациях (Ignatova et al., 2006). На основании такого стимулирующего эффекта ацетазоламида было выдвинуто предположение, что эта низкомолекулярная КА относится к α -семейству, поскольку такая же стимуляция была найдена у КА α -семейства млекопитающих. Эта стимуляция КА активности рядом веществ, в частности азолами, к которым относится ацетазоламид, определяется тем, что лимитирующей стадией КА реакции является отвод протона из реакционного центра (Silverman, 1991), и азолы в низкой концентрации способны играть роль протонного переносчика (Piies et al., 2002). Относительно природы высокомолекулярной КА в мембранах, обогащенных ФС2, данных практически нет.

В работе (Шитов и др., 2009) получены данные о наличии КА активности, присущей белкам водоокисляющего комплекса ФС2, а именно –

PsbO, PsbP, PsbQ. Так как эти источники КА активности имели нетипичные для КА свойства (потребность в Mn^{2+} , нечувствительность или низкая чувствительность к действию ацетазоламида или этоксизоламида), авторы предположили, что они могут являться Mn^{2+} зависимыми КА, связанными с ФС2.

Мембранные препараты из гороха, обогащенные фотосистемой 1 (ФС1), также обладали КА активностью (Пронина и др., 2002), но не давали кросс-реакцию с антителами против α КА (САНЗ) тилакоидов *Ch. reinhardtii*, как это наблюдалось в ФС2-мембранах. КА активность ФС1-мембран в расчете на содержание как хлорофилла, так и белка, была выше, чем КА активность ФС2-мембран (Ignatova et al., 2006). Также показано, что кажущаяся молекулярная масса белка ФС1-мембран из гороха, обладающего КА активностью, была около 20 кДа (Руденко и др., 2006). Свойства носителя КА активности ФС1-мембран отличались от свойств КА в ФС2-мембранах: показано разное влияние температуры, детергентов и сульфамидных ингибиторов (Ignatova et al., 2006; Rudenko et al., 2007). В настоящее время КА активность ФС1-мембран ещё не отнесена ни к одному известному семейству КА.

1.2.4.3. Люменальная карбоангидраза

Относительно недавно была обнаружена КА активность в люмене тилакоидов гороха, наблюдаемая после разрушения тилакоидов Тритоном X-100 в высоких концентрациях (Rudenko et al., 2007). Присутствие этой КА в люмене было подтверждено на препаратах, выделенных из растений *A. thaliana* дикого типа и из мутантов, нокаутированных по гену *At3g01500*, кодирующему β КА1, что позволило получить тилакоиды, не загрязненные высокоактивной и обильной стромальной КА (Fedorchuk et al., 2014). Ряд свойств этой КА позволил отнести ее к β -семейству: при добавлении

дителиотреитола КА активность люменальной КА возрастала. Кажущаяся молекулярная масса этого белка составила 132 кДа. Его олигомерность и сходный характер зависимости ферментативной активности от сульфамидов также говорит о том, что эта КА относится к β -семейству (Rudenko et al., 2007; Fedorchuk et al., 2014).

Несмотря на такое разнообразие источников КА активности в хлоропласте высших растений функции и местоположение многих из них ещё неизвестны. На рисунке 1 представлена схема расположения КА в хлоропласте.

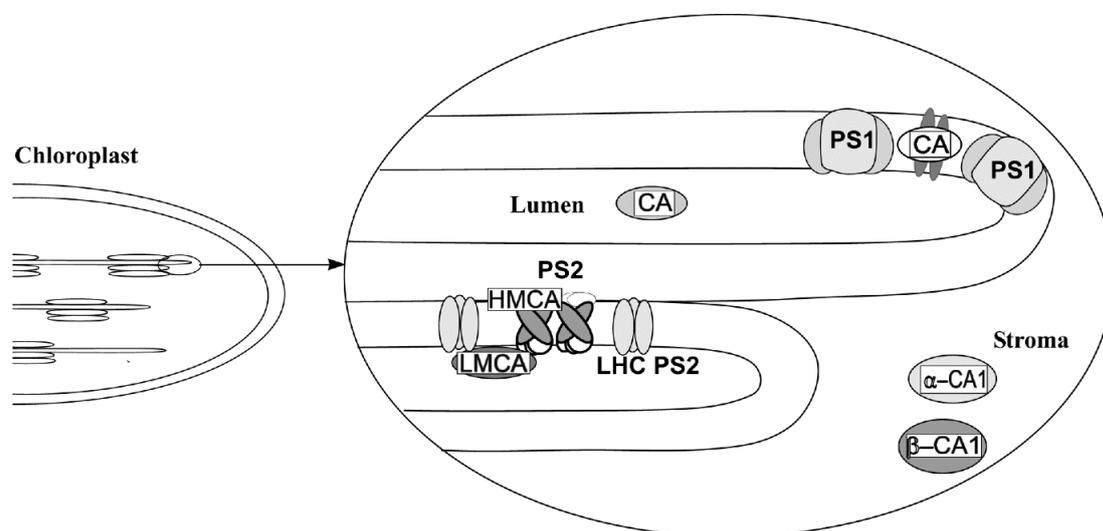


Рисунок 1. Схема расположения карбоангидраз в хлоропласте *A. thaliana*. ЛМКА - низкомолекулярная карбоангидраза фотосистемы 2, НМКА – высокомолекулярная карбоангидраза фотосистемы 2 (Ignatova and Ivanov, 2016).

1.3. Ингибиторы и активаторы карбоангидраз

Существует несколько классов ингибиторов КА, классифицируемых в зависимости от их удаленности и/или возможности прямого взаимодействия с металлом активного центра: 1) соединения, связывающие ион металла в активном центре (сульфаниламиды и их изостеры - сульфаматы/сульфамидов

(Di Fiore et al., 2006); 2) соединения, присоединяющиеся к цинк-координированной молекуле воды/иону гидроксида по «анкерному» механизму (фенолы) (Davis et al., 2010), 3) кумарины и родственные с ними соединения, которые, по-видимому, связываются ещё дальше от иона цинка, чем предыдущие типы, и препятствуют подходу субстрата к активному центру (Maresca et al., 2009).

Анкерное присоединение к цинк-координированной молекуле воды/гидроксид иона, вероятно, является наиболее «сложным» механизмом ингибирования КА. Первым соединением, имеющим такой ингибирующий эффект, был гидроксид фенол 1. Кристаллическая структура этой молекулы в комплексе с эритроцитарной КАII показала, что основное взаимодействие между ферментом и ингибитором состоит в том, что -ОН группа фенола образует две водородные связи с небелковым лигандом цинка и с амидом Thr199, аминокислотного остатка, консервативного для всех α КА (Nair et al., 1994).

Другим важным классом ингибиторов КА являются сульфаниламиды (Supuran et al., 2008), которые представлены такими соединениями как ацетазоламид (Neri et al., 2011), метазоламид (Supuran, 2010), этоксизоламид (Eriksson et al., 1988). Данный класс веществ используют в клинической практике уже много лет как мочегонные средства и противоглаукомные агенты. Сульфаниламиды и сульфаматы эффективно ингибируют КА большинства семейств. И сульфаниламиды, и сульфаматы связываются в депротонированной форме (т.е. как анионы), с ионом Zn в активном сайте фермента. На рисунке 2 изображена схема взаимодействия сульфаниламида, с активным центром α КА. Ионизированный атом N ингибитора замещает молекулу воды и ацетат-ион координированных Zn^{2+} нативного фермента. Гидрофобные взаимодействия между ацетазоламидом и ферментом способствуют стабилизации ингибитора в активном центре (Di Fiore et al., 2006).

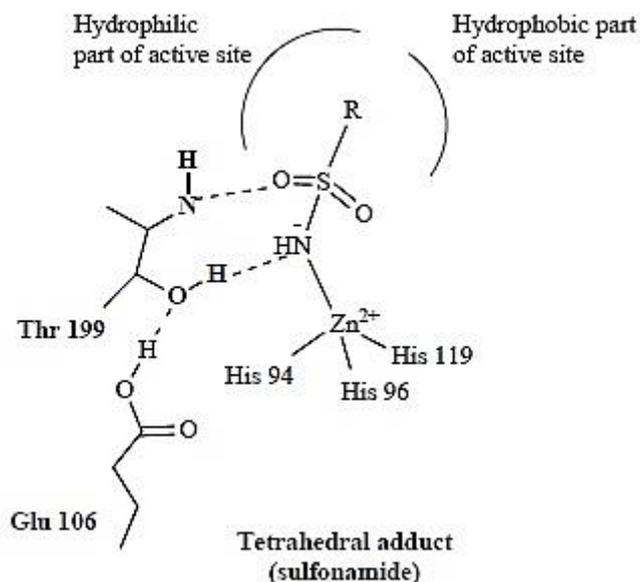


Рисунок 2. Общий механизм взаимодействия ингибитора сульфаниламида с реакционным центром α КА (Supurman, 2008).

Активаторы КА были хорошо изучены для разработки лекарственных препаратов. Все изоформы КА млекопитающих были исследованы на предмет их взаимодействия с несколькими классами активаторов, большинство из которых представляют собой амины, аминокислоты и олигопептиды (Temperini et al., 2008). Лимитирующей стадией для реакции гидратации CO_2 , катализируемой КА, является перенос протона от воды, связанной с Zn^{2+} , в реакцию среду, при этом формируется гидроксид цинка. С помощью электронной спектроскопии, рентгеновской кристаллографии и кинетических измерений было показано, что активатор связывается с активным центром КА и ускоряет переход протона в среду (Temperini et al., 2008). Показано, что активация некоторых представителей α КА (КАI и КАII) может быть терапевтическим подходом к повышению синаптической эффективности и, соответственно, может оказаться концептуально новым методом лечения болезни Альцгеймера и замедления старения (Sun et al., 2002).

1.4. Организация фотосинтетической электрон-транспортной цепи

Диаграмма, на которой компоненты фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ) располагаются в соответствии со своим окислительно-восстановительным потенциалом, имеет форму зигзага и поэтому получила название Z-схемы. Нумерация фотосистем отражает порядок их открытия. Фотосистема 2 (ФС2) может использовать свет с длиной волны не более 680 нм, тогда как фотосистема 1 (ФС1) может использовать свет с длиной волны до 700 нм. ФС2 образует очень сильный окислитель, который необходим для окисления воды, а ФС1 образует очень сильный восстановитель, который восстанавливает НАДФ⁺. Разность потенциалов между реакциями окисления воды и восстановления НАДФ⁺ составляет примерно 1,2 В. Суммарная энергия, которая достигается при поглощении двух фотонов фотосистемами (680 нм и 700 нм), эквивалентна разности потенциалов 3,45 В. Таким образом, лишь около трети энергии фотонов, поглощенных двумя фотосистемами, используется для переноса электронов от воды к НАДФ⁺. Кроме того, 1/8 часть световой энергии, поглощенной фотосистемами, запасается за счет переноса протонов в люмен тилакоидов при участии ФС2 и цитохром_{b₆/f}-комплекса. Этот процесс приводит к формированию протонного градиента между люменом и стромой. АТФ-синтаза, также расположенная в тилакоидной мембране, использует энергию протонного градиента для синтеза АТФ. Продукты светоиндуцированных стадий фотосинтеза, молекулы АТФ и НАДФН, используются в биосинтетических восстановительных реакциях цикла Кальвина – Бенсона. Все компоненты ФЭТЦ изображены на рисунке 3 (Heldt, 2005).

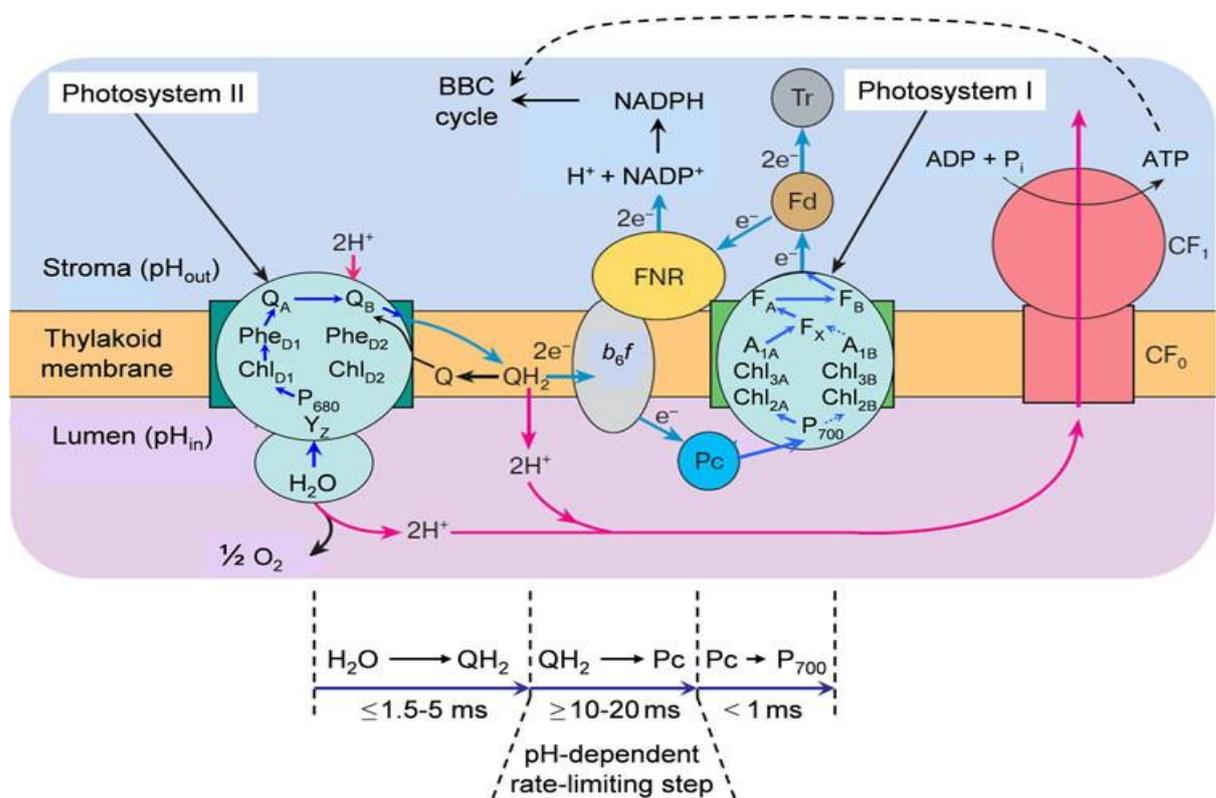


Рисунок 3. Схема электрон-транспортной цепи в хлоропластах и расположения белковых комплексов (фотосистемы 1, фотосистемы 2, цитохром *b6f* и АТФ-синтазы) в тилакоидной мембране (Tikhonov, 2013).

1.4.1. Фотосистема 2

Светоиндуцированная работа ФС2 обеспечивает извлечение электронов и протонов из молекул воды и восстановление пластохинона (PQ) до пластохинола (PQH₂). Реакции, приводящие к расщеплению воды и образованию молекулярного кислорода (O₂), протекают в Mn₄CaO₅ кластере, который представляет «сердце» водоокисляющего комплекса. Упрощенная схема переноса электрона в ФС2 показана на рисунке 4 (по Tikhonov, 2013):

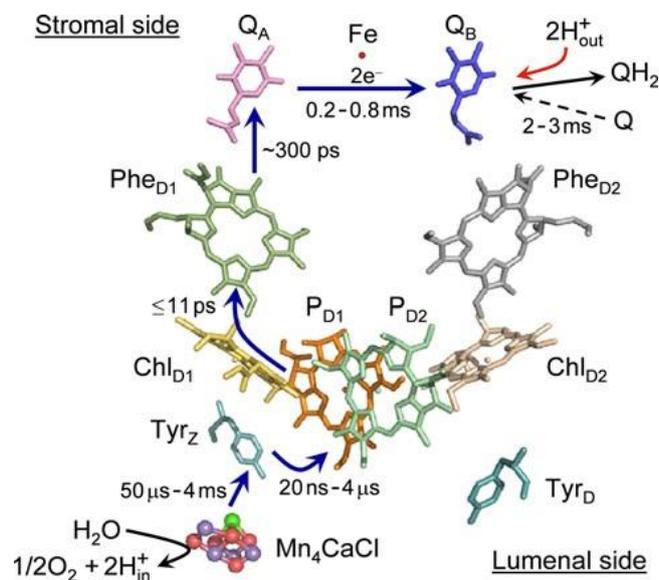


Рисунок 4. Упрощенная схема разделения зарядов и переноса электронов в фотосистеме 2 (Tikhonov, 2013).

ФС2 имеется во всех организмах, способных к кислородному фотосинтезу, – в цианобактериях, микроводорослях, диатомовых водорослях и наземных растениях (Falkowski and Raven, 1997).

ФС2 располагается в тилакоидной мембране в виде димера (*in vivo*), каждый мономер которого содержит 19-31 субъединиц, в зависимости от вида (Shi et al., 2012; Thorton et al., 2005). В то время как низкомолекулярные внешние субъединицы ФС2 у многих фототрофных организмов различаются, строение реакционного центра (РЦ) в значительной степени сохраняется. Коровый комплекс РЦ – это минимальный набор субъединиц, необходимых для окисления воды и переноса электронов, включая D1, D2, CP43, CP47 и *psbA* (α и β субъединицы). На сегодняшний день единственное существенное изменение наблюдается в белках субъединицы D1 цианобактерий. По крайней мере четыре класса изоформ белка D1 были идентифицированы в цианобактериях. Экспрессия изоформ этих белков контролируется с помощью дифференциальной регуляции транскрипции множественных копий гена *psbA* в пределах одного генома (Mulo et al., 2009;

Golden et al., 1995). Незначительные различия в аминокислотных последовательностях этих изоформ D1 контролируют эффективность работы ФС2 при изменении интенсивности света (Vinyard et al., 2013). Зеленые водоросли и растения содержат только одну изоформу D1 и, следовательно, используют другую систему регуляции работы при различных интенсивностях света.

Реакционный центр ФС2 непосредственно содержит только 6 молекул хлорофилла (Хл) *a* и два феофитина, а входящие в состав кор-комплекса светособирающие белки CP43 и CP47 содержат несколько β -каротинов и 13 и 16 молекул Хл *a* соответственно (Umena et al., 2011). Внутренняя антенна эффективно передает поглощенную энергию в РЦ, при этом антенные молекулы Хл находятся на безопасном расстоянии от молекул Хл *a* в РЦ, которые обладают высокой реакционной способностью (Amerongen and Croce, 2013). Кор-комплекс ФС2 высших растений содержит 20 различных субъединиц (Pagliano et al., 2013), а соотношение пигмент/белок является довольно низким. Чтобы увеличить эффективность поглощения солнечной энергии в процессе эволюции возникла потребность в дополнительном светособирающем комплексе. У высших растений и зеленых водорослей эта потребность реализована в виде пигмент-белкового комплекса с высоким отношением пигмент/белок (приблизительно $\frac{1}{2}$ относительно массы), который называется внешним светособирающим комплексом (ССК2), который вместе с кор-комплексом ФС2 образует более крупные суперкомплексы (Amerongen and Croce, 2013). Антенный комплекс высших растений сформирован из представителей мультигенных семейств ЛНС. Суперкомплексы содержат димер кор-комплекса, четыре тримера ЛНСII (кодируемых *Lhcb1-3*): два сильно связанных (S) и два умеренно связанных (M), и две мономерные формы каждого из CP29 (*Lhcb4*), CP26 (*Lhcb5*), и CP24 (*Lhcb6*). Размер суперкомплексов может уменьшаться при высокой освещенности растений (Kouril et al., 2012; Борисова и др., 2014). Также

существует регуляция перераспределения потока энергии между двумя фотосистемами за счет обратимого фосфорилирования белков ССК2 (*Lhcb1* и *Lhcb2*), приводящего к латеральной миграции части антенны от ФС2 к ФС1 и обратно (Caffarri et al., 2009).

1.4.2. Кислород-выделяющий комплекс

ФС2 уникальна тем, что она является ферментом, способным окислять воду до кислорода. При окислении воды высвобождается четыре протона и четыре электрона (уравнение 4).



Водоокисляющий комплекс (ВОК) находится на люменальной стороне ФС2 в кармане, образованном петлями белков D1 и CP43. В результате получения структуры ФС2 с разрешением 1,9 Å (Umena et al., 2011), удалось окончательно установить, что каталитический центр ВОК (рис. 4) содержит пять атомов кислорода в дополнение к четырем ионам Mn и одному иону Ca^{2+} , образуя кластер Mn_4CaO_5 . Ядро кластера представляет собой искаженный кубан из трех ионов Mn (Mn1-Mn3), четырех атомов кислорода (O1-O3 и O5) и одного иона Ca^{2+} . Четвертый ион Mn (Mn4) находится за пределами кубана и соединяется с ядром двумя μ -оксо-мостиками через O4 и O5. Форма всего кластера напоминает искаженный стул, с кубаном, выступающим в качестве основания стула, и Mn (Mn4), выступающим в качестве задней части стула. Исканность формы обеспечивает наиболее важную особенность структуры кластера Mn_4CaO_5 – гибкий характер комплекса, позволяющий кластеру легко подвергаться структурным перестройкам в течение каталитического цикла (S-цикла). Таким образом, природа в процессе эволюции разработала высокоэффективный катализатор расщепления воды, с помощью внедрения гибкой структуры в сложную белковую среду (Shen, 2012).

Цикл окисления воды состоит из пяти промежуточных состояний S (от S₀ до S₄), известный как цикл Кока (Kok, 1970), что соответствует последовательному высвобождению четырех электронов из воды (рис. 5). «Темновое» стабильное состояние S₁ является первым окисленным состоянием, а последующее освещение приводит к образованию состояний S₂ и S₃. После того как накапливаются четыре окисляющих эквивалента (S₄ состояние), происходит спонтанная реакция, которая приводит к высвобождению O₂ и формированию наиболее восстановленного состояния (S₀ состояние). При дальнейшем возбуждении светом, начальное состояние S₁ формируется еще раз, и каталитический цикл возобновляется (Рис. 5) (Yano et al., 2015).

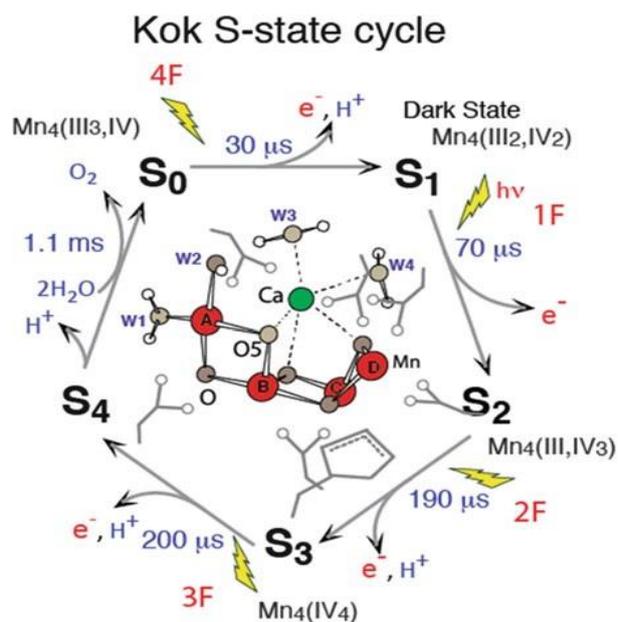


Рисунок 5. Цикл фотосинтетического окисления воды и выделения кислорода (S цикл или цикл Кока). Предполагаемая модель получена на основании кристаллографического анализа структуры, полученной с разрешением 1,9 Å (Yano et al., 2015).

1.4.3. Пул пластохинона

Пластохинон (PQ) представляет собой молекулу прениллипида, состоящую из 2,3-диметил-1,4-бензохинона и боковой цепи изопрениловых единиц, количество которых в высших растениях равно 9. Редокс-активной частью служит бензохиноновое кольцо, а боковая цепь обеспечивает нахождение молекулы в гидрофобном матриксе тилакоидной мембраны. Содержание PQ в тилакоидной мембране в расчете на ФС2 или ФС1 выше, чем других переносчиков ФЭТЦ (т.е. в мембране имеется пул молекул пластохинона, PQ-пул). В разных работах экспериментально найденное общее содержание PQ в хлоропластах составляет от 10 до 40 молекул на P700 (McCauley and Melis, 1986; Kruk and Karpinski, 2006); это значение варьируется не только в зависимости от вида и условий выращивания растений, но и от метода измерения. В хлоропластах PQ содержится также в пластоглобулах и в оболочке хлоропласта (Lichtenthaler, 2007). Количество фотоактивных молекул PQ в тилакоидных мембранах составляет от 5 до 12 в расчете на P700. Пластохинон представлен в мембране тремя редокс-формами: окисленная молекула (пластохинон, PQ), однократно восстановленная молекула (радикал пластосемихинон, $PQ^{\bullet-}$ или PQH^{\bullet}) и дважды восстановленная молекула (пластохинол, пластогидрохинон, PQH_2). Как переносчик ФЭТЦ молекула PQ восстанавливается до PQH_2 либо в акцепторной части ФС2, либо в акцепторной части b_6/f цитохромного комплекса. Восстановление PQ в ФС2 происходит через стадию пластосемихинона, Q_B^- , прочно связанного с белком; образуется ли долгоживущий $PQ^{\bullet-}$ в акцепторной части цитохромного комплекса высших растений не ясно (Ivanov, 1993). PQH_2 окисляется в донорной части b_6/f комплекса центром Риске до $PQ^{\bullet-}$, который, если не выходит из донорной ниши, окисляется там низкопотенциальным гемом цитохрома b_6 до PQ. *In vivo* возможно темновое восстановление PQ-пула, осуществляемое

тилакоидной НАД(Ф)Н-дегидрогеназой, которая использует НАДФН как источник электронов, – это начальный этап хлородыхания (Bennoun, 1982; Peltier and Cournac, 2002).

1.4.4. Цитохромный b_6/f комплекс

Цитохромный b_6/f комплекс (пластохинол-пластоцианин оксидоредуктаза) является межсистемным компонентом ФЭТЦ, который опосредует перенос электронов между ФС2 и ФС1 с помощью окисления восстановленного пластохинона (PQH_2) и восстановления пластоцианина (Pc) (Kurisu et al., 2003; Stroebel et al., 2003; Cramer et al., 2010, 2011).

Цитохромный b_6/f комплекс является функциональным гомодимером. Каждый мономер состоит из восьми полипептидных субъединиц, включая четыре основные субъединицы: железо-серный белок Риске, белки цитохрома b_6 и цитохрома f и субъединица IV. Каталитические функции цитохромного b_6/f комплекса обеспечиваются четырьмя окислительно-восстановительными центрами: железосерным кластером белка Риске, а также гемами цитохрома f и цитохрома b_6 , который содержит два гема, низкопотенциальный гем b_6^L и высокопотенциальный b_6^H . Цитохром f функционирует аналогично цитохрому c_1 в митохондриальном и бактериальном цитохромном bc_1 комплексах (Xia et al. 2013). Цитохромный комплекс b_6/f содержит два сайта связывания для молекул PQH_2 и PQ: сайт Q_o и сайт Q_i . Двухэлектронное окисление PQH_2 происходит в сайте Q_o , при этом два протона высвобождаются в люмен тилакоидов, тем самым внося вклад в транстилакоидный электрохимический градиента протонов. Этот сайт располагается в полости между субъединицей цитохрома b_6 и железосерным белком на люменальной стороне тилакоидной мембраны. Сайт Q_i располагается на стромальной стороне тилакоидной мембраны и функционирует для восстановления PQ. В соответствии с механизмом Q-

цикла Митчелла (Mitchell, 1976), первый электрон от PQH_2 передается на пластоцианин через белок Риске и затем цитохром *f*. Другой электрон направляется через низко- и высокопотенциальные гемы b_6^L и b_6^H , восстанавливая PQ в сайте Q_i . В сайте Q_i в процессе восстановления пластохинона из стромы берутся два протона, образуя PQH_2 . Существует предположение, что сайт Q_i может участвовать в циклическом потоке электронов через ФС1, когда ассоциация ферредоксин-НАДФ-редуктазы с цитохромным *b₆f* комплексом связывает его работу с ФС1 (Benz et al., 2010).

1.4.5. Пластоцианин

Пластоцианин – это медьсодержащий белок, вовлечённый в транспорт электронов от цитохромного *b₆f* комплекса к ФС1. Этот мономерный белок, у большинства сосудистых растений состоящий из 99 аминокислот, массой около 10,5 кДа. Пластоцианин свободно диффундирует в водной фазе люмена (Bendall and Howe 2016).

1.4.6. Фотосистема 1, ферредоксин и ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктаза

ФС1 цианобактерий, водорослей и высших растений является так же, как и ФС2, мультисубъединичным пигмент-белковым комплексом, который обеспечивает переход солнечной энергии в энергию разделенных зарядов. ФС1 катализирует светоиндуцированный перенос электронов от пластоцианина (или цитохрома c_6 в цианобактериях) на люменальной стороне мембраны тилакоидов до мобильного акцептора электронов ферредоксина (или флаводоксина у цианобактерий) на стромальной стороне мембраны (Jordan et al., 2001). Кофакторы переноса электрона ФС1 локализованы в субъединицах PsaA, PsaB и PsaC, составляющих ядро ФС1 (Haldrup et al., 1999). В соответствии с принятыми в настоящее время

представлениями специальная пара молекул хлорофиллов (Chl_{1A} и Chl_{1B}) расположена на стыке субъединиц PsaA и PsaB и формирует первичный донор электронов P700 (Amunts et al., 2007). P700 может отдать электрон в одну из двух квази-симметричных ветвей кофакторов, А-ветвь или В-ветвь. Каждая ветвь состоит из двух молекул хлорофилла (Chl_{2A} и Chl_{3A} в А-ветви; Chl_{2B} и Chl_{3B} в В-ветви) и одной молекулы филлохинона (A_{1A} или A_{1B} , соответственно). Две ветви сходятся на акцепторе F_X (один из трех Fe4-S4 кластеров ФС1), при этом семихиноновая форма филлохинона (A_{1A} или A_{1B}) отдает электрон F_X . В современной литературе нет единого мнения относительно равноценности вклада ветвей А и В в поток электронов через ФС1. Восстановленный F_X отдает электрон терминальным акцепторам электронов F_A и F_B (еще два Fe4-S4 кластера ФС1), которые связаны с субъединицей PsaC , расположенной на стромальной стороне ФС1, которые и восстанавливают ферредоксин. Ферредоксин – 12 кДа белок, который содержит Fe2-S2 кластер и свободно диффундирует в строме хлоропласта. В линейном транспорте электронов ферредоксин восстанавливает НАДФ⁺ через ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктазу (Tikhonov, 2013). ФНР является водорастворимым белком, который в строме *A. thaliana* представлен двумя изоформами, одна из которых непосредственно связана с мембраной, а вторая изоформа ассоциирована с мембраной через первую изоформу. Помимо линейного транспорта электронов, ферредоксин участвует в циклических транспортах электронов вокруг ФС1, донирует электроны ферментам, осуществляющим фиксацию азота и серы, регуляторным белкам тиоредоксинам и ряду ферментов синтезов хлорофиллов, фитохромов, жирных кислот и др. (Hanke and Mulo, 2013).

1.4.7. АТФ-синтаза

АТФ-синтаза является макромолекулярной конструкцией, которая использует транстилакоидный градиент протонов для синтеза АТФ. На рисунке 6 показано схематичное строение F_0F_1 -типа АТФ-синтазы, располагающейся в тилакоидной мембране. АТФ-синтаза состоит из двух индивидуальных фрагментов: мультисубъединичного белкового комплекса F_1 , обращенного в строму, и комплекса F_0 , закрепленного в мембране. Три каталитических центра, в которых из АДФ и фосфата образуется АТФ, располагаются между соседними субъединицами α и β гексамера $\alpha_3\beta_3$ (Abrahams et al., 1994). Комплексы F_1 и F_0 связаны с двумя субъединицами b и a «стержнем» (субъединица γ) (Stock et al., 1999; Lau and Rubinstein, 2012). АТФ синтаза F_0F_1 -типа работает как молекулярная машина, содержащая два внутренних ротора. Реакции синтеза АТФ и гидролиза АТФ связаны с направленными вращениями двух роторов, расположенных в F_0 и F_1 комплексах АТФ-синтазы (Düser et al., 2009). В режиме синтеза АТФ градиент протонов ($\Delta\mu_{H^+}$) служит движущей силой для вращения мембранного ротора F_0 , который представляет собой олигомерный кольцевой комплекс, содержащий 14 гидрофобных субъединиц (Saroussi et al., 2012). Оба ротора, кольцо и субъединица γ , механически связаны друг с другом. Вращение кольца, вызываемое движением протонов, приводит к направленному вращению субъединицы γ , обеспечивая синтез АТФ (Iino and Noji, 2012).

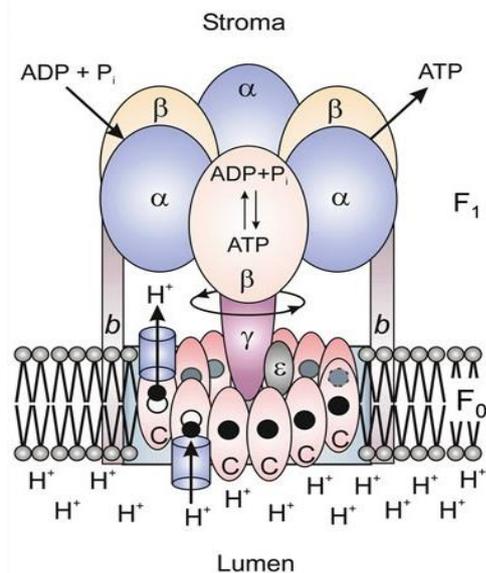


Рисунок 6. Схематичное строение АТФ-синтазы и ее расположение в тилакоидной мембране (Tikhonov et al., 2013).

1.5. Флуоресценция хлорофилла *a* как чувствительный показатель эффективности работы электрон-транспортной цепи

Энергия света, поглощенная светособирающими комплексами, может использоваться для осуществления фотохимических реакций, диссипировать в тепло или излучаться в виде флуоресценции. Благодаря тому, что все эти три процесса являются конкурентными между собой, выход излучения флуоресценции Хл *a* дает ценную информацию об эффективности фотохимии и тепловой диссипации (Murchie and Lawson, 2013).

Флуоресценция интактных листьев генерируется почти исключительно Хл *a*, поскольку энергия возбужденного состояния молекул Хл *b* с высокой эффективностью транспортируется к молекулам Хл *a*. В высших растениях и водорослях при длине волны около 680 нм при комнатной температуре около 90% флуоресценции излучается Хл *a*, входящим в состав ФС2 (Корнеев, 2002 и ссылки в нем; Govindjee, 1995).

1.5.1. Эффект Каутского. Кривая индукции флуоресценции хлорофилла *a* фотосистемы 2

Каутский и Хирш (1931) обнаружили, что в отличие от флуоресценции Хл в растворе, интенсивность флуоресценции зеленого листа не является постоянной величиной при постоянном возбуждающем освещении и показывает характерные переходные изменения во времени. Такое явление назвали индукцией флуоресценции Хл *a*, или просто – эффектом Каутского. Ход индукционной кривой разделяют на быструю фазу, длительностью около 1 с и обозначаемую как ОЛР, и медленную, длящуюся от секунды до десятков минут и обозначаемую как PSMT. Изменение уровня флуоресценции в течение времени можно фиксировать с помощью флуориметров двух типов (Stirbet, 2014). В первом используется принцип возбуждения флуоресценции светом одной длины волны, а ее измерение происходит в другом диапазоне спектра. Во втором типе флуориметров используется принцип импульсного модулирования, когда в качестве измеряемого излучения используется импульсный свет низкой интенсивности. Возникающая в результате вспышки измеряющего света разница в сигнале флуоресценции усиливается специальным селективным усилителем. Современный модулирующий флуориметр (ПАМ) имеет четыре источника света. Для измерения уровня флуоресценции с помощью ПАМа используется следующая очередность включения-выключения света. Включают источник измерительного света (ML), в результате чего флуоресценция достигает значения F_0 , при этом все реакционные центры остаются «открытыми». Затем применяют вспышку насыщающего света, которая восстанавливает Q_A сайты всех комплексов ФС2 и флуоресценция достигает максимального уровня F_m (РЦ ФС2 «закрываются»). По разнице между уровнями флуоресценции F_0 и F_m оценивают потенциальную эффективность фотохимии ФС2 в адаптированном к темноте состоянии. После того как

флуоресценция релаксирует до уровня F_0 (за счет оттока электронов от Q_A к пулу пластохинонов) включают действующий свет (AL), который вызывает изменения выхода флуоресценции. Снижение уровня флуоресценции называют тушением флуоресценции (Корнеев, 2002 и ссылки в нем). На рисунке 7 показана типичная индукционная кривая (Ruban, 2016).

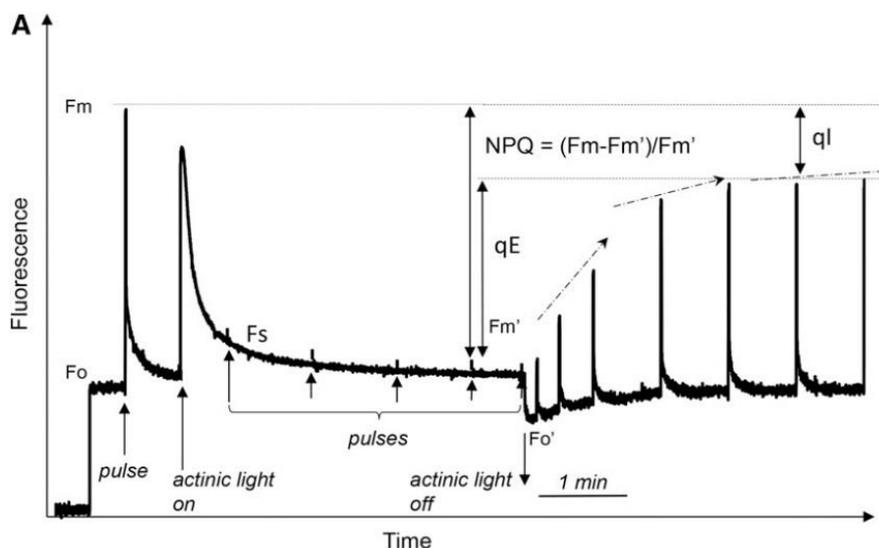


Рисунок 7. Типичная индукционная кривая флуоресценции хлорофилла *a* листа.

1.5.2. Типы тушения флуоресценции хлорофилла *a*. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*

Уровень флуоресценции зависит от целого ряда различных процессов, активация которых при адаптации к свету приводит к снижению уровня флуоресценции Хл (т.е. тушению флуоресценции). Различают два типа тушения флуоресценции – фотохимическое и нефотохимическое.

В основе фотохимического тушения флуоресценции Хл лежит тот факт, что в зависимости от окислительно-восстановительного состояния первичного акцептора ФС2 (Q_A) уровень флуоресценции комплексов ФС2 может отличаться в несколько раз – увеличиваться при восстановлении Q_A и

уменьшаться при его окислении. В условиях постоянного действующего света лишь часть Q_A находится в восстановленном состоянии. В результате подачи вспышки насыщающего света все центры Q_A переходят в восстановленное состояние и уровень флуоресценции увеличивается от F_s до F_m' . После выключения действующего света центры Q_A полностью окисляются и уровень флуоресценции снижается до F_0' . Можно оценить долю комплексов ФС2 с окисленным Q_A в момент до подачи вспышки, рассчитав коэффициент фотохимического тушения (qP). $qP=(F_m'-F_s)/(F_m'-F_0')$. Величина qP отражает степень окисленности пула Q_A . Величина qP зависит как от притока электронов к Q_A , так и от их оттока на пул пластохинона. Ингибирование реакций, потребляющих АТФ и НАДФН, замедляет окисление компонентов ФЭТЦ и, соответственно, отток электронов от Q_A . Величина фотохимического тушения контролируется преимущественно метаболизмом углерода – циклом Кальвина. Роль других процессов может быть существенной при стрессовом ингибировании фиксации CO_2 , в начале перехода от темноты к свету, на ранних этапах развития листа (Корнеев, 2002 и ссылки в нем).

Нефотохимическое тушение флуоресценции. Для того чтобы избежать повреждения реакционных центров светом, интенсивность которого превышает возможности электронного транспорта, растения вынуждены частично диссипировать энергию поглощенных квантов света в виде тепла. Увеличение тепловой диссипации в свою очередь способствует тушению флуоресценции Хл как конкурентного процесса. Для оценки степени нефотохимического тушения были предложены следующие параметры.

$qN=(F_m-F_m')/(F_m-F_0')$ – коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции,

$NPQ = (F_m-F_m')/F_m'$ – нефотохимическое тушение по Штерну-Фолмеру (Gilmore et al., 1991).

Нефотохимическое тушение зависит от ряда процессов, поэтому qN состоит из нескольких составляющих, называемых компонентами нефотохимического тушения флуоресценции (Корнеев, 2002 и ссылки в нем).

1.5.2.1. Энергозависимый компонент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a*

Основной вклад в нефотохимическое тушение вносит энергозависимый компонент, который активируется при возникновении протонного градиента ΔpH через тилакоидную мембрану (Wraight and Crofts, 1970). Быстрая фаза развития нефотохимического тушения – в течение 1-2 минут – обозначается как qE . qE связывают с активацией PsbS белка (Li et al., 2000; Horton et al., 2000). При высокой интенсивности света другая составляющая энергозависимого тушения (qZ) развивается медленнее, в течение 10-30 минут, что коррелирует с активацией виолаксантинового цикла. (Yamamoto, 1979; Nilkens et.al., 2010).

PsbS белок

PsbS белок имеет важное значение для защиты растений при высокой интенсивности света. В работе (Kozioł et al., 2007) предположено, что в ходе эволюции PsbS белок, относящийся к семейству ССК, появился вторым после CP29. Несмотря на обширные исследования конкретный механизм и локализация PsbS остаются неизвестными. Уровень экспрессии этого белка является определяющим фактором для развития qE (Li et al., 2002). Долгое время выделяли два компонента нефотохимического тушения флуоресценции: один напрямую зависит от PsbS белка и протонного градиента, а второй зависит от связывания зеаксантина с Lhcb белками и не зависит от транс-тилакоидного градиента pH (Dall'Osto et al., 2005). Также

предполагалось, что PsbS белок имеет два сайта протонирования и два сайта связывания с пигментами, т.е. белок может пространственно сближать две молекулы Хл, одна из которых передает энергию другой (Horton et al., 2005). Существовало и обратное мнение, что PsbS не связывает ни Хл, ни каротиноиды (Dominici et al., 2002); позже это было подтверждено с помощью биохимического анализа (Bonente et al., 2008). Недавно была представлена кристаллическая структура PsbS белка шпината с разрешением 2,35 Å, которая позволяет сделать вывод о том, что данный белок не является «каноническим» пигмент-связывающим белком и может менять свою конформацию в отсутствие пигментов (Fan et al., 2015). PsbS белок является 22 кДа гомодимером, имеющим два глутаминовых остатка Glu69 и Glu173 на люминальной стороне тилакоидной мембраны (Рис. 8). При нейтральных рН эти остатки остаются в непротонированной форме, а последующее протонирование при низком рН способствует активации всего белка. Активированный димер PsbS может непосредственно взаимодействовать с соседними белками ССК2, способствуя их конформационным изменениям и вызывая тушение в пределах ССК2 (Ruban, 2016).

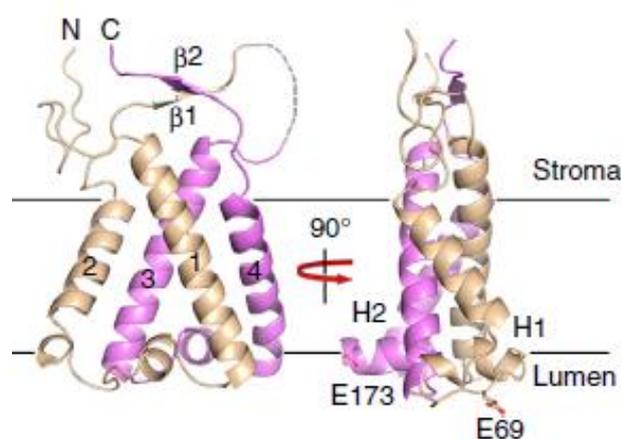


Рисунок 8. Структура и расположение в тилакоидной мембране PsbS белка (Fan et al., 2015).

Возможно, что PsbS белок, вызывая изменения в тилакоидной мембране, приводит к увеличению ее текучести, которая облегчает реорганизацию макроструктуры ФС2 в условиях сильной освещенности (Goral et al., 2012). Особый интерес вызывают работы, связанные с изучением влияния PsbS белка на гранальность тилакоидной мембраны. Изолированные фрагменты мембран из мутантных растений *A. thaliana* без PsbS белка содержали увеличенное число ФС2, расположенных в полукристаллических массивах – никаких подобных структур не было в растениях с сверхэкспрессируемым PsbS белком (Kereiche et al., 2010). Кроме того, требуются более высокие концентрации катионов Mg^{2+} для формирования правильной макроструктуры ФС2-ССК2 и укладки гран в растениях, не имеющих PsbS (Kiss et al., 2008). Однако, несмотря на влияние этого белка на организацию ФС2, его точное местоположение неизвестно.

Относительно местонахождения PsbS белка было высказано предположение о том, что в темноте он связывается с несколькими ЛНСб белками, преимущественно – с периферическим М-тримером ССК2 в суперкомплексах ФС2 (Рис. 9) (Gerotto et al., 2015). В работе (Correa-Galvis et al., 2016) показано, что у высших растений в темноте PsbS локализуется вокруг суперкомплекса ФС2, а при активации нефотохимического тушения PsbS начинает взаимодействовать с различными компонентами ССК2. Таким образом, весьма вероятно, что сайт нефотохимического тушения может быть расположен на тримере, а не на мономерных белках ССК2.

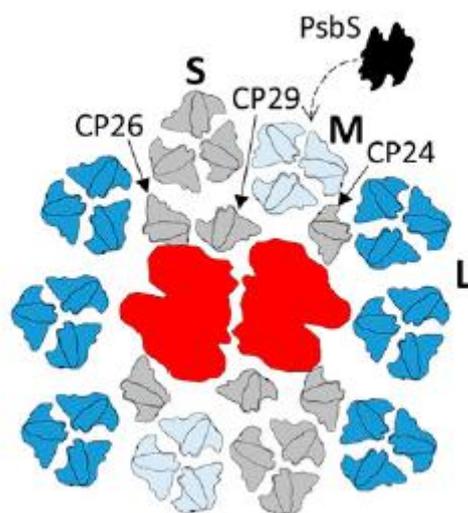


Рисунок 9. Структура компонентов антенны ФС2. S-сильно, M-средне, L-слабосвязанные с коровым комплексом тримеры, которые являются мажорными белками ССК2. CP24, CP26 и 29 – минорные белки мономерных комплексов антенны ФС2. Красным цветом показан коровый комплекс ФС2. Пунктирной стрелкой указано предполагаемое местонахождение PsbS белка в адаптированном к темноте состоянии.

Виолаксантиновый цикл

Виолаксантиновый цикл включает в себя взаимный переход виолаксантина и зеаксантина через промежуточное образование антероксантина (Yamamoto, 1979). Эти двухступенчатые реакции катализируются двумя ферментами, которые располагаются с разных сторон тилакоидной мембраны: люминальной виолаксантин-деэпоксидазой (ВДЭ) и стромальной зеаксантин-эпоксидазой. Активность ВДЭ регулируется изменением pH люмена (Hager, 1969), и для осуществления деэпоксидации требуется аскорбат в качестве кофактора (Yamamoto et al., 1971). ВДЭ обладает двумя доменами, которые обозначаются как цистеин- и глутамат-обогащенные домены (Hieber et al., 2002). При подкислении люмена происходят конформационные изменения в структуре фермента с его последующей активацией и присоединением к тилакоидной мембране (Рис.

10). Такой эффект был подтвержден на кристаллах фермента, выращенных при кислых и нейтральных pH (Arnoux et al., 2009). На основе кристаллической структуры предположили, что ВДЭ в активном состоянии является димером. На каждом мономере идентифицирован сайт связывания для аскорбата (Saga et al., 2010). По каким именно аминокислотным остаткам происходит протонирование и активация ВДЭ до сих пор не ясно. Предполагается, что Asp98, Asp117, Asp206 и His168 могут участвовать в первичной активации фермента (Fufezan et al., 2012).

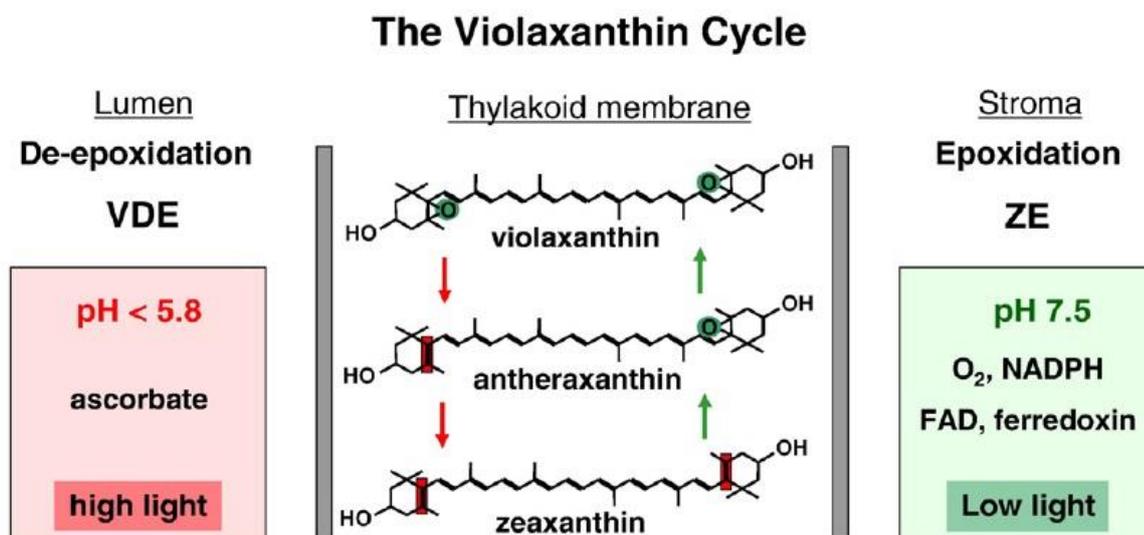


Рисунок 10. Схема реакций виолаксантинового цикла (Jahns et al., 2014).

Образование зеаксантина из виолаксантина занимает примерно 10-30 минут в условиях насыщающего света (Nilkens et al., 2010). В темноте и при низкой интенсивности света «тушитель» не образуется (Bouvier et al., 1996). Процесс эпексидации зеаксантина в 5-10 раз медленнее, чем его образование (Härtel et al., 1996). Согласно современным представлениям, виолаксантинный цикл играет одну из ведущих ролей в фотозащитных механизмах высших растений. Предполагают, что основной ролью зеаксантина является деактивация возбужденного синглетного хлорофилла

(¹Chl*) (Havaux and Niyogi, 1999; Müller et al., 2001), тушение триплетного хлорофилла (³Chl*) через образование триплетного состояния каротиноидов (³Car*), что позволяет избежать образования синглетного кислорода (Dall'Osto et al., 2012). Также зеаксантин после его отхода от сайта связывания с ССК2 в липидную фазу мембраны может действовать как антиоксидант, предотвращая перекисное окисление липидов (Johnson et al., 2007). Весь пул ксантофиллов требуется для оптимизации кинетики нефотохимического тушения (Johnson et al., 2008).

1.5.2.2. Фотоингибирование

Фотоингибирование первоначально определялось как «деструкция фотосинтетического аппарата сильным светом». Фотоингибированию подвержены как ФС2, так и ФС1. При этом ФС2 более чувствительна к фотоингибированию при любых избыточных условиях освещения во всех фотосинтезирующих организмах, а ФС1 повреждается в основном при холодовом стрессе в теплолюбивых растениях (Tikkanen et al., 2014.). Основной мишенью фотоингибирования является D1 белок, но длительное стрессовое воздействие может привести к деградации дополнительных белков ФС2 (Keren and Krieger-Liszkay, 2011). Для того, чтобы противостоять разрушению и сохранить фотосинтетическую активность, поврежденный белок D1 должен быстро деградировать, заново синтезироваться и интегрироваться в реакционный центр. Такой процесс называется оборот D1 белка. В строме осуществляется репарационный процесс, включающий в себя целый ряд ферментативных реакций, с помощью которых заменяется поврежденный белок. Осуществление такого процесса стерически затруднено из-за того, что ФС2 располагается в стыкованных гранях (Kirchhoff, 2014). Фосфорилирование ССК2 и РЦ ФС2 киназой STN8 позволяет расстыковать граны и облегчить репарацию D1 (Vainonen et al.,

2005). Было обнаружено, что оборот D1 происходит при низкой освещенности, а его скорость положительно коррелирует с интенсивностью света (Jansen et al., 1999). Ремонт D1 может занимать около 30 минут, поэтому фотоингибирование является самым медленным компонентом нефотохимического тушения (qI) (Nilkens et al., 2010). Хотя в классическом понимании, фотоингибирование влечет за собой разрушение ФС2, новые гипотезы о роли данного процесса предполагают адаптивную роль этого явления (Raven, 2011; Adams et al., 2013).

1.5.2.3. State transitions

State transitions (qT) – это процесс, который уравнивает распределение энергии возбуждения между двумя фотосистемами с помощью обратимой миграции тримеров ССК2 от ФС2 к ФС1. Эта миграция зависит от фосфорилирования ССК2, осуществляемого окислительно-восстановительными превращениями серин/треонин киназы STN7 (Bellafiore et al., 2005). Киназа активируется, когда пул пластохинона становится перевосстановленным. В состоянии 1 (пул пластохинона окислен) комплексы ССК2 не фосфорилированы и связаны с ФС2. После фосфорилирования часть ССК2 мигрирует в ламеллярную область тилакоидной мембраны и присоединяется к антенне ФС1, что приводит к состоянию 2. Таким образом, переход от состояния 1 в состояние 2 увеличивает размер антенны ФС1 и уменьшает размер антенны ФС2, тем самым являясь тонкой настройкой распределения энергии возбуждения между двумя фотосистемами. За счет state transitions антенна ФС1 высших растений может быть увеличена до 25% (Ruban and Johnson, 2009).

Возможно, что для развития нефотохимического тушения у растений в естественных условиях требуются только ΔpH, ССК2 и PsbS белок; причем последний может обеспечить самую быструю защиту РЦ при флуктуации

света (Ruban, 2016). На рисунке 11 изображена модель, показывающая, что протонирование и дезэпоксидация устанавливают равновесие между двумя внутренними состояниями ССК2. В данном случае, организация мембраны имеет решающее значение; агрегация ССК2 и ослабление комплекса ФС2-ССК2 стабилизируют «тушащее» состояние, в то время как "нормальная" сверхсложная структура не способствует состоянию тушения. Переход между этими состояниями во многом зависит от PsbS белка.

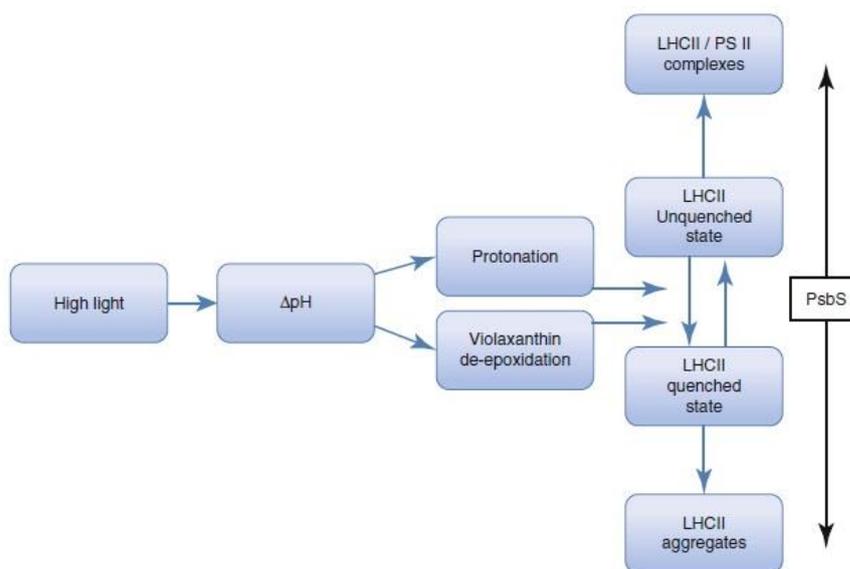


Рисунок 11. Модель состояния комплексов ФС2-ССК2 при действии света высокой интенсивности (Ruban, 2016).

В процессе эволюции сформировалась сложная система, призванная обеспечить как диссипацию избыточной световой энергии, поступающей в пигменты фотосинтетического аппарата, но в то же время при ограниченном поступлении этой энергии не позволяющая ей уйти в тепло, а использоваться в фотохимической реакции. Очевидно, что должна была быть сформирована и система контролирующая процесс диссипации энергии, поддерживающая оптимальный в данных условиях среды для данного вида растения уровень этой диссипации. Современные представления об этом процессе, описанные выше, центральную контролирующую роль отводят протонам, которые

взаимодействуют с компонентами системы диссипации энергии. Так как в хлоропласте и, в особенности, в тилакоидах выявлено было несколько источников карбоангидразной активности (см. выше), а одним из продуктов карбоангидразной реакции является протон, то нельзя исключить, что карбоангидразы участвуют в регуляции энергозависимого тушения. Это предположение было одним из оснований поиска влияния исследованных карбоангидраз на процесс диссипации энергии в листьях.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Условия выращивания растений *Arabidopsis thaliana*

В работе использовали растения *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia (ДТ) и растения, нокаутированные по гену *At4g20990*, кодирующему α КА4 (гомозиготные линии 9-12 и 8-8, полученные из линий SALK_117962 и SALK_024517C, соответственно); или по гену *At2g28210*, кодирующему α 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). После образования четырех настоящих листьев через 14-21 день растения пикировали в горшки с почвой объемом 150 мл. Растения выращивали в климатической камере при постоянной температуре 18-20°C, освещении 100 мкмоль квантов/м²с и концентрации CO₂ 450 ppm. Было установлено, что для выращивания *A. thaliana* больше подходят люминесцентные лампы низкого давления (ЛФУ-30 (30 Вт)). Для того чтобы измерить уровень экспрессии генов двух исследуемых КА, зависящий от освещенности, часть растений дикого типа, выращенных при 80 мкмоль квантов/м²с, на 14 дней была помещена в условия повышенной интенсивности света - 360 мкмоль квантов/м²с. Другая часть растений была оставлена в тех же условиях выращивания. Применение 8 часового светопериода для всех экспериментов позволило продлить вегетацию, чтобы предотвратить преждевременное цветение растений и увеличить биомассу листьев. Для экспериментов использовали 55-65 дневные растения.

2.2. Измерение уровня экспрессии генов, кодирующих исследуемые карбоангидразы

Листья растений, предварительно замороженные в жидком азоте, гомогенизировали растиранием стерильными пестиками, не давая листьям оттаять. Экстракты РНК выделяли с помощью набора реагентов Aurum total RNA Mini Kit, BioRad, USA. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм, а затем проводили обратную транскрипцию с помощью набора реагентов iScript Reverse Transcription Supermix BioRad, USA.

Полученная таким образом одноцепочечная ДНК и специфические праймеры к гену *At2g28210*, кодирующему α 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 α КА4 (прямой 5'-TCCTCACCAAGCTACTAAATGGAATAAA-3' и обратный 5'-TTGACGACAGTCCAAATGACGC-3'), были использованы при проведении ПЦР в обычном режиме на приборе Eppendorf Master cycler ep gradient и количественной ПЦР (кПЦР) на приборе iQ5 BioRad с реактивами Evrogen, Россия.

После проведения ПЦР в обычном режиме содержание продуктов ПЦР оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с использованием 89 мМ Трис-боратного буфера, содержавшего 20 мМ ЭДТА и бромистый этидий для визуализации ДНК и ультрафиолетовом свете. В качестве метчиков использовали *2-Log DNA Ladder, New England Biolabs (100-3000 n.o.)*.

кПЦР проводили в трех биологических и двух статистических повторностях, используя листья растений трех повторностей выращивания. В качестве положительного контроля использовали праймеры к гену актина 7 *At5g09810* (прямой 5'-GAAGGCTGGTTTTGCTGGTGAT- 3' и обратный 5'-

ССАТGTCATCCCAGTTACTTACAАТАСС -3’). Уровень экспрессии генов вычисляли по формуле:

$$2^{-(Ct \text{ образца} - Ct \text{ контроля})}$$

где, Ct – пороговый цикл ПЦР, при котором происходит регистрация прибором сигнала флуоресценции красителя SYBR Green.

2.3. Определение содержания крахмала в листе

Навеску листьев (100 мг) растирали в ступке со стеклом. К полученному гомогенату добавляли 1,5 мл 96% этанола и переносили в пробирки. Экстракт осаждали при 5000 об/мин в течение 5 минут на центрифуге miniSpin. Осадок ещё дважды промывали 1,5 мл 80% этанола и центрифугировали в том же режиме. Крахмальный осадок высушивали при комнатной температуре, солюбилизировали в 400 мкл дистиллированной воды и инкубировали в течение 30 минут в термостате «Термит» при 99°C, затем центрифугировали. Пробу супернатанта, с перешедшим в растворенное состояние крахмалом, добавляли к 1,5 мл 0,12% раствора KI и измеряли на спектрофотометре (Hitachi 557, Япония) поглощение при 620 нм. Для определения концентрации крахмала в исследуемой пробе использовали калибровочную кривую с коммерческим препаратом крахмала (Kaplan et al., 2012).

2.4. Проведение электронной микроскопии

Кусочки листьев фиксировали в 2% глутаровом альдегиде в фосфатном буфере (pH 7,4) с постфиксацией в 1% четырехоксида осмия. Дальнейшие процедуры проводили, как описано в работе (Семенова и др., 2011).

2.5. Измерение ассимиляции CO₂ листом

Для измерения ассимиляции CO₂ неотделенным листом применяли инфракрасный газовый анализатор: GFS-3000, который работает в системе с DUAL-PAM-100, и инфракрасный газоанализатор LCP⁺ фирмы ADC BioScientific Ltd. (Великобритания). Измерения проводили в потоке воздуха с концентрацией CO₂ 700ppm при освещении светом интенсивностью 460 мкмоль квантов/м²с в течение 7 минут.

2.6. Измерение флуоресценции хлорофилла *a* листьев

2.6.1. Применение ПАМ-флуориметрии для измерения флуоресценции хлорофилла *a* листьев

Для измерения флуоресценции хлорофилла *a* целого листа применяли флуориметр Mini-PAM (Walz, Германия). Перед измерением лист предварительно затемняли в течение 30 минут. После включения низкоинтенсивного модулированного света, не вызывающего активацию ФЭТЦ, регистрировали величину выхода флуоресценции F₀, затем подавали вспышку насыщающего света (8000 мкмоль квантов/ м²с) длительностью 0,8 с, при этом оценивали максимальный квантовый выход флуоресценции хлорофилла *a* на адаптированных к темноте листьях, как соотношение $Y=(F_m-F_0)/F_m$. После того как уровень флуоресценции уменьшался до F₀, листья освещали белым светом лампы флуориметра интенсивностью 100 или 500 мкмоль квантов/м² с, на 20, 40 и 60 секундах подавали вспышку насыщающего света. При этом происходила регистрация: 1) эффективного квантового выхода ФС 2 (Y), характеризующего поставку электронов от ФС

2 в ФЭТЦ при постоянном освещении (Genty, 1989), 2) коэффициента нефотохимического тушения флуоресценции qN , 3) величины NPQ, нефотохимического тушения флуоресценции, выражающую тушение Штерна-Фольмера и рассматриваемую как прямо пропорциональную концентрации тушителя (Gilmore et al., 1991). В конце пятиминутного периода освещения и на 1 и 15 минутах после выключения действующего света вновь подавали импульс насыщающего света и регистрировали параметры, указанные выше. Относительный уровень восстановления пластохинона оценивали после выключения действующего света. Протокол эксперимента показан на рисунке 12. Вышеназванные показатели вычислялись по формулам:

$$Y = (F'_m - F_s)/F'_m$$

$$qN = (F_m - F'_m)/(F'_m - F_0')$$

$$NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$$

$$qN1 = (F_{m1} - F'_m)/(F'_m - F_0')$$

$$qN15 = (F_{m15} - F_{m1})/(F'_m - F_0')$$

$$PQ = 1 - ((F'_m - F_s)/(F'_m - F_0'))$$

где F_m – максимальная величина выхода флуоресценции хлорофилла *a* в адаптированных к темноте листьях в ответ на вспышку сильного света,

F_s – выход флуоресценции при стационарном освещении,

F'_m – максимальная величина выхода флуоресценции в ответ на вспышку сильного 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

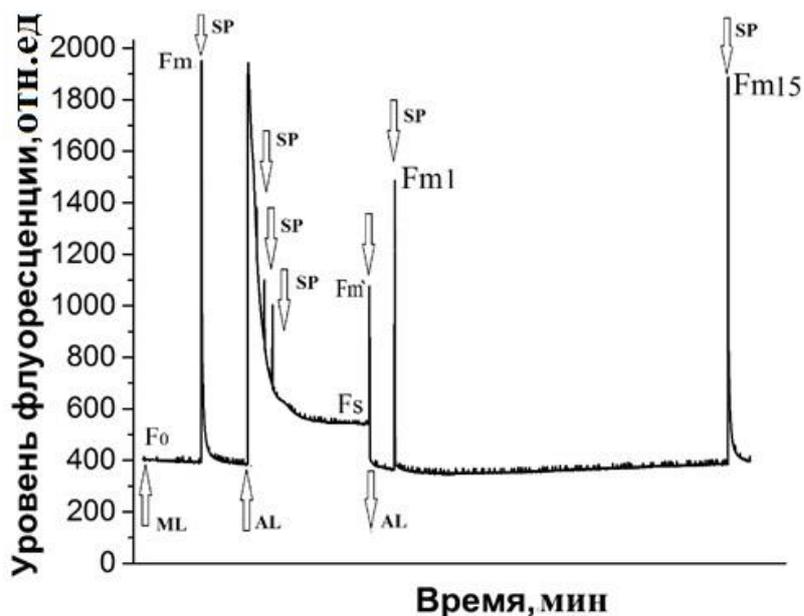


Рисунок 12. Протокол проведения эксперимента по измерению уровня флуоресценции хлорофилла *a* листа. Стрелками показано включение и выключение света: ML-измерительный свет, SP-вспышка насыщающего света, AL-действующий свет.

Результаты измерения флуоресценции хлорофилла *a* обрабатывали и выводили на компьютер с помощью программного обеспечения WinControl-3. Интенсивность света, подаваемого разными источниками, измеряли в диапазоне длин волн 400-700 нм с помощью LI-190SA Quantum Sensor.

2.6.2. Измерение ОЛР-кинетики флуоресценции хлорофилла *a*

Быструю фазу индукции флуоресценции хлорофилла ФС2 (ОЛР) в промежутке времени 0,01-1 с фиксировали с помощью флуориметра, оснащенного синим светодиодом и кремниевым фотодиодом. Перед измерением растения затемняли в течение 30 мин. Затем отделенный лист помещали в держатель и включали слабый измерительный свет интенсивностью 0,25 мкмоль квантов/м²с и подавали вспышку синего света интенсивностью 5000 мкмоль квантов/м²с длительностью 1 с.

На основе полученных измерений рассчитывали следующие параметры:

$S_m = (A_m)/(F_m - F_0)$ – нормированная общая площадь над кривой ОЛР

$ABC/RC = (M_0/V_J) (F_v/F_m)$ - кажущийся размер антенны ФС2;

$TR_0/RC = M_0/V_J$ – максимум поток энергии, поглощенной всеми РЦ ФС2 и используемый для первичного разделения зарядов

$ET_{20}/RC = (M_0/V_J) (1 - V_J)$ - максимальный поток электронов, перенесенных от от Qa к Qb в расчете на РЦ ФС2;

$\phi_{RE10} = (F_v/F_m) (1 - V_J)$ - максимальный поток электронов, перенесенных к конечным акцепторам ФС1 в расчете на РЦ ФС2;

где A_m – площадь над индукционной кривой флуоресценции,

V_J – относительный уровень флуоресценции в фазе J.

$V_J = (F_{2мс} - F_0)/(F_m - F_0)$;

M_0 - начальный наклон кривой относительной величины интенсивности переменной флуоресценции, выражает скорость переноса электрона на начальном этапе

$M_0 = 4 (F_{0,3мс} - F_0)/(F_m - F_0)$

V_I - относительная переменная флуоресценция в момент времени 30 мс (I фаза) после включения действующего света, $V_I = (F_{30мс} - F_0)/(F_m - F_0)$

2.7. Измерение квантового выхода фотосистемы 1

Светоиндуцированные окислительно-восстановительные превращения P700 на целых листьях были измерены с помощью DUAL-PAM-100 (WALZ, Германия). Фиксировали P700- зависимые изменения поглощения при 820 нм относительно 870 нм. Неотделенный лист, предварительно затемненный в течение 30 минут, помещали в камеру-прищепку с потоком воздуха с концентрацией CO₂ 700 ppm. Максимальное изменение сигнала P700 (Pm) измеряли с при подаче вспышки насыщающего света (10000 мкмоль

квантов/ $m^2 c$) в конце освещения дальним красным светом. После включения актиничного освещения ($460 \text{ мкмоль квантов}/m^2 c$) вспышки насыщающего света подавали также, как и при измерении уровня флуоресценции (см. пункт 2.6.1). Сигнал P700 (P) регистрировали непосредственно перед подачей вспышки насыщающего света, во время которой сигнал P700 достигал уровня (P_m').

Квантовый выход рассчитывали по формуле:

$$Y(I) = (P_m' - P)/P_m$$

2.8. Определение содержания пероксида водорода в листе

Листья растений взвешивали и замораживали в жидком азоте. Замороженный лист растирали в 0,4 мл 2 М трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и гомогенат переносили в пробирки с 3 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера. В пробирки добавляли активированный уголь для удаления феофитина и каротиноидов. После 1 часа инкубации при $4^\circ C$ гомогенат центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 10 мин. Супернатант титровали 2 М КОН до pH 7,0. Содержание пероксида водорода измеряли в 50 мкл супернатанта с помощью прибора Lum-101 (Россия) по люминесценции смеси 5 мкМ пероксидазы и 50 мМ люминола.

2.9. Определение концентрации хлорофилла в образце

К 10 мкл анализируемой пробы (тилакоиды, их фрагменты, гомогенат листьев) добавляли 1,5 мл 96% этанола и измеряли оптическую плотность при длинах волн: 649, 654 и 665 нм. В качестве контроля использовали 96% этанол. Для определения концентрации хлорофилла a и отношения $Xл a / Xл b$ в образце использовали формулы (Winterman and De Mots, 1965):

$$C_a = 13,7 \times A_{665} - 5,76 \times A_{649}, \text{ (мкг/мл)}$$

$$C_b = 25,8 \times A_{649} - 7,6 \times A_{665}, \text{ (мкг/мл)}$$

$C_{a+b} = (25,13 \times A_{654} \times V) / l$, (мкг/мл), где l -ширина кюветы, V -объем растворителя

2.10. Выделение тилакоидов

Розетки листьев после срезания взвешивали, промывали водой и выдерживали во влажной камере при 4°C для удаления крахмала. Листья растений взвешивали и гомогенизировали в среде выделения, содержащей 35 мМ K_2HPO_4 , 15 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, 0,4 М сахарозу, 20 мМ аскорбат натрия, 10 мМ $KHCO_3$, 2 мМ ЭДТА, доведенной до состояния «slush» (пограничного состояния вода/лед). Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя нейлоновой ткани и центрифугировали при $120 \times g$ в течение 1,5 минут. Осадок отбрасывали, а супернатант центрифугировали при $3400 \times g$ в течение 6 минут. Чтобы нарушить целостность оболочки хлоропластов, осадок ресуспендировали в среде шокирования (разбавленная в 10 раз среда выделения) и осаждали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в среде ресуспендирования, содержащей 35 мМ K_2HPO_4 , 15 мМ NaH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, 0,4 М сахарозу, 2 мМ аскорбат натрия, 1 мМ $KHCO_3$, 0,5 мМ ЭДТА натрия. Осадок тилакоидов трижды отмывали средой ресуспендирования, чтобы удалить стромальные карбоангидразы. Затем полученный осадок, содержащий тилакоиды, ресуспендировали в среде с 10% глицерином, замораживали и хранили при -80°C или использовали для выделения мембран, обогащенных ФС1 или ФС2.

2.11. Выделение тилакоидных мембран, обогащенных ФС1 или ФС2

Тилакоиды ресуспендировали и инкубировали в течение 30 минут с детергентом Тритон X-100 взятом в количестве равном содержанию хлорофилла в суспензии. Разрыхленные тилакоиды осаждали при $12000 \times g$ в течение 20 минут и ресуспендировали осадок в среде, содержащей: 50 мМ MES-NaOH, 35 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0,4 М сахарозу, 20 мМ аскорбат натрия, 10 мМ KHCO₃, 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 $32000 \times g$ в течение 40 минут. Из супернатанта осаждали мембраны, обогащенные ФС1 при $175000 \times g$ 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.

2.12. Измерение карбоангидразной активности

КА активность измеряли электрометрическим методом по скорости уменьшения рН (от 8,3 до 7,8) при гидратации CO₂. 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 образца и 2,3 мл воды, насыщенной CO₂ при 0°C не менее 1 часа. Время изменения рН при спонтанной гидратации CO₂ в среде без образца принимали за контроль. Активность карбоангидразы выражали в мкмоль Н⁺/мг Хл \times мин с учетом измерения буферной емкости сред и образцов, которую определяли титрованием 0,1 N HCl.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Зависимость экспрессии генов *At4g20990* или *At2g28210*, кодирующих α КА4 или α КА2, от внешних факторов

Исследование экспрессии генов *At2g28210* и *At4g20990* в листьях растений ДТ показало, что эти гены действительно экспрессируются, и уровень их экспрессии зависит от освещенности растений и содержания CO_2 в воздухе. Экспрессия генов обеих КА, возрастала при адаптации к повышенной освещенности после выращивания при низкой интенсивности света (Рис.13).

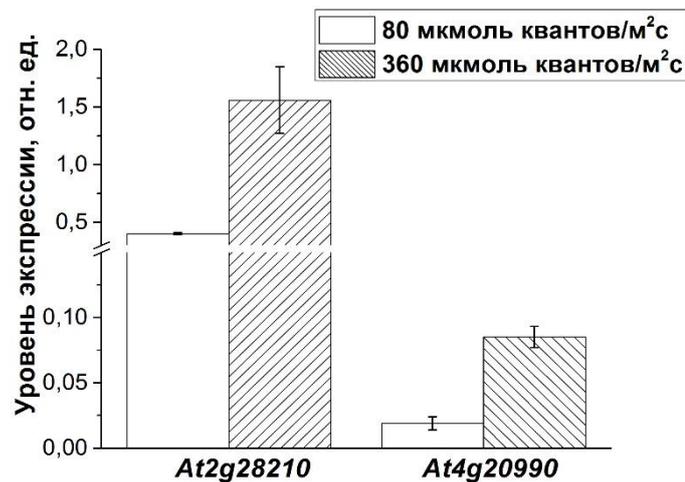


Рисунок 13. Уровни экспрессии генов *At2g28210* и *At4g20990*, кодирующих α КА2 и α КА4, соответственно, в листьях растений *A. thaliana* выращенных при освещенности 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (белые столбики) и 360 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (заштрихованные столбики).

Исследование влияния концентрации CO_2 в воздухе показало, что экспрессия гена *At4g20990*, кодирующего α КА4, в листьях растений 20-25 дневного возраста, выращенных при концентрации CO_2 в воздухе 750 ppm, была значительно выше, тогда как уровень экспрессии гена *At2g28210*,

кодирующего α КА2, наоборот, был значительно выше при выращивании растений при 150 ppm CO₂ (Рис. 14).

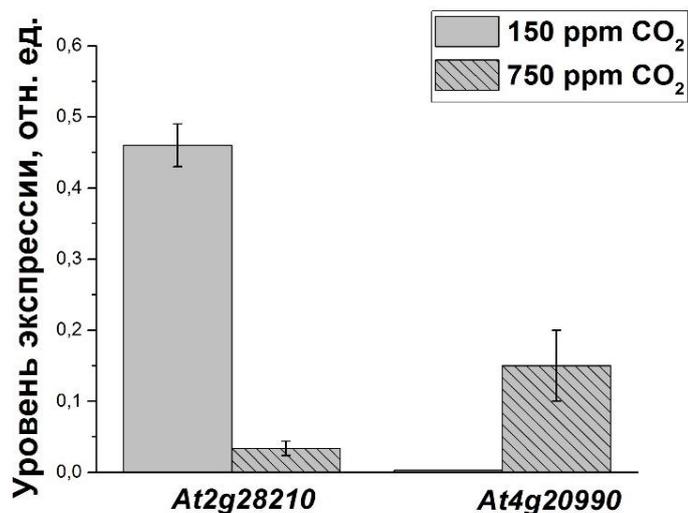


Рисунок 14. Уровни экспрессии генов *At2g28210* и *At4g20990*, кодирующих α КА2 и α КА4, соответственно, в листьях растений *A. thaliana* при содержании CO₂ в воздухе при выращивании: 150 ppm - серые столбики; 750 ppm - заштрихованные столбики.

Увеличение уровня экспрессии генов обоих ферментов при повышении освещенности растений и зависимость этого уровня от концентрации CO₂ свидетельствуют о возможном влиянии функционирования этих ферментов на процесс фотосинтеза в высших растениях.

3.2. Внешний вид и вес растений мутантных по α КА4 или α КА2

По внешнему виду мутанты по α КА4 мало отличались от растений ДТ (Рис. 15). На начальных стадиях роста количество листьев в розетке было таким же, как и у растений ДТ. Размер и сырой вес розетки мутантных растений по α КА4 были несколько больше, чем у ДТ (Табл. 1).



Дикий тип

Мутант по α КА4
линия 9-12 линия 8-8

Рисунок 15. Внешний вид растений ДТ и мутанта с нокаутом по гену *At4g20990*, кодирующему α КА4 (линии 9-12 и 8-8). Возраст растений 45 дней от посева.

По внешнему виду мутанты по α КА2 также мало отличались от растений ДТ, однако вес розетки у мутанта был ниже, чем у ДТ (Табл. 1).



Дикий тип

Мутант по α КА2
линия 9-11

линия 8-3

Рисунок 16. Внешний вид растений ДТ и мутанта с нокаутом по гену *At2g28210*, кодирующему α КА2 (линии 9-11 и 8-3). Возраст растений 65 дней от посева.

Таблица 1. Сырой вес розетки листьев растений *A. thaliana* нокаутированных по генам *At4g20990* или *At2g28210*, кодирующим α КА4 (линии 9-12 и 8-8) или α КА2 (линии 9-11 и 8-3), соответственно, относительно сырого веса дикого типа, принятого за 100%.

Растения	Вес, %
Мутант по α КА4, линия 9-12	119±10
Мутант по α КА4, линия 8-8	107±15
Мутант по α КА2, линия 9-11	71±5
Мутант по α КА2, линия 8-3	68±5

3.3. Содержание крахмала в листьях растений мутантных по α КА4 или α КА2

При выделении тилакоидов из листьев растений арабидопсиса было замечено, что листья растений мутантов по α КА4 содержали большее количество крахмала, чем ДТ. Даже выдерживание растений в течение 3-4 дней во влажной камере при 4°C в темноте не приводило к полной деградации крахмальных зерен. Количественный анализ содержания крахмала в листьях подтвердил это наблюдение (Табл. 2).

При дальнейшем исследовании было выявлено, что повышенное содержание крахмала в мутанте по α 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. 3). Это может свидетельствовать, о том, что увеличенный синтез крахмала на свету привел к возникновению в листьях и более активной системы деградации крахмала у мутантов по α КА4, чем у растений ДТ.

Таблица 2. Содержание крахмала в листьях растений ДТ и растений мутантных по α КА4 (линии 9-12 и 8-8) после 3 ч освещения (100 мкмоль квантов/м²с).

Растения	Содержание крахмала (мг/г сыр. веса)
ДТ	5,57 ± 0,61
Мутант по α КА4, линия 9-12	9,37 ± 0,98*
Мутант по α КА4, линия 8-8	14,17 ± 1,24*

Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений ± стандартная ошибка, * p < 0,05.

Таблица 3. Содержание крахмала в листьях растений ДТ и растений мутантных по α КА4 (линии 9-12 и 8-8) после ночи и после 8 ч освещения (100 мкмоль квантов/м²с).

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

Повышенное содержание крахмала в хлоропластах мутантных растений по α КА4 подтверждалось электронной микроскопией листьев. На электронных микрофотографиях хорошо видно, что размеры и количество крахмальных зерен в хлоропластах мутанта намного больше, чем в хлоропластах растений ДТ, причем различие между мутантом и ДТ становилось больше при увеличении возраста листа (Рис. 17).

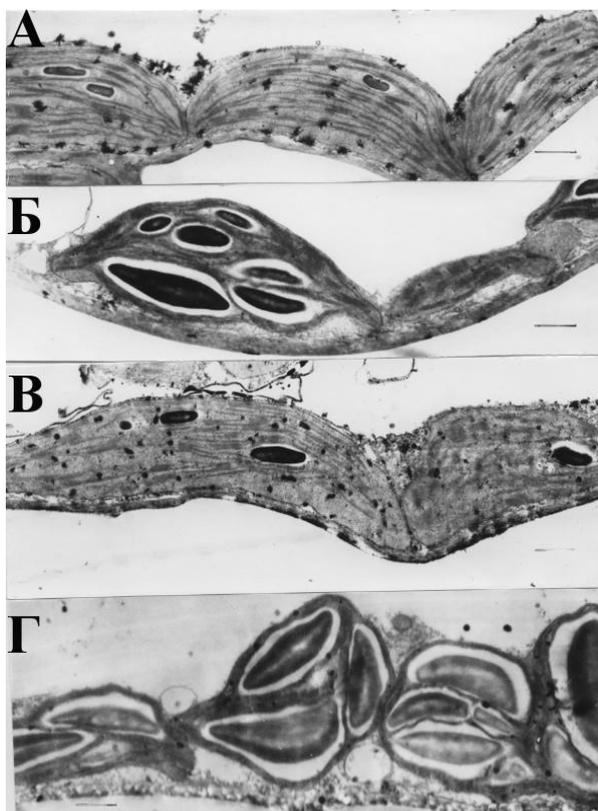


Рисунок 17. Электронные микрофотографии листьев *A. thaliana* дикого типа (А, В) и листьев растений мутантных по α КА4, линия 8-8 (Б, Г). А и Б – 2-х недельные листья, В и Г – 2-х месячные листья. Листья были срезаны после 3 ч освещения светом 100 мкмоль квантов/м²с.

В отличие от растений мутантных по α КА4, растения мутантные по α КА2 содержали меньшее количество крахмала в листьях по сравнению с ДТ (Табл. 4).

Таблица 4. Содержание крахмала в листьях растений ДТ и растений мутантных по α КА2 (линии 9-11 и 8-3) после 3 ч освещения. Интенсивность света 100 мкмоль квантов/м²с

Растения	Содержание крахмала (мг/г сыр. веса)
ДТ	2,05 ± 0,13
Мутант по α КА2, линия 9-11	1,48 ± 0,13
Мутант по α КА2, линия 8-3	0,92 ± 0,10

3.4. Скорость ассимиляции CO₂ листьями растений мутантных по αКА4 или αКА2

При измерении с помощью инфракрасного газоанализатора GFS-3000, связанного с DUAL-PAM, было найдено, что скорость ассимиляции CO₂ листьями мутанта по αКА4 была почти на 20% ниже (Табл. 5), чем у ДТ, а у мутантов по αКА2 – выше на 30-50%, чем у ДТ (Табл. 6).

Таблица 5. Скорость ассимиляции CO₂ листьями растений ДТ и растений мутантных по αКА4 в потоке CO₂ 700 ppm при освещенности 460 мкмоль квантов/м²с, измеренная при помощи газового анализатора GFS-3000.

Растения	Скорость ассимиляции CO ₂ , мкмоль CO ₂ /м ² с
ДТ	2,99±0,22
Мутант по αКА4, линия 9-12	2,43±0,17*
Мутант по αКА4, линия 8-8	2,42±0,03*

Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений ± стандартная ошибка, * p < 0,05.

Таблица 6. Скорость ассимиляции CO₂ листьями растений ДТ и растений мутантных по αКА2 в потоке CO₂ 700 ppm при освещенности 460 мкмоль квантов/м²с, измеренная при помощи газового анализатора GFS-3000.

Растения	Скорость ассимиляции CO ₂ , мкмоль CO ₂ /м ² с
ДТ	1,46±0,13
Мутант по αКА2, линия 9-11	2,22±0,12*
Мутант по αКА2, линия 8-3	1,95±0,65

Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений ± стандартная ошибка, * p < 0,05.

Такое неожиданное различие в скоростях ассимиляции CO₂ у мутантов по двум исследуемым КА относительно ДТ, вызвало необходимость подтверждения полученного результата. Измерение, в таких же условиях, скорости ассимиляции с помощью переносного инфракрасного газового анализатора LCPro⁺ на растениях другого цикла выращивания подтвердило установленную разницу между мутантами (Табл. 7).

Таблица 7. Скорость ассимиляции CO₂ листьями растений ДТ и растений мутантных по αКА4 или по αКА2 в потоке CO₂ 700 ppm при освещенности 460 мкмоль квантов/м²с, измеренная при помощи газового анализатора LCPro⁺.

Растения	Скорость ассимиляции CO ₂ , мкмоль CO ₂ /м ² с
ДТ	6,4±0,2
Мутант по αКА4, линия 9-12	5,2±0,3*
Мутант по αКА4, линия 8-8	4,8±0,2*
ДТ	8,1±0,4
Мутант по αКА2, линия 9-11	8,9±0,3
Мутант по αКА2, линия 8-3	9,6±0,4*

Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений ± стандартная ошибка, * p < 0,05

3.5. Сравнение характеристик флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений мутантных по α КА2 или по α КА4

Для того чтобы оценить влияние нокаута генов, кодирующих α КА4 или α КА2, на протекание фотосинтеза в мутантных растениях по сравнению с растениями ДТ были измерены параметры флуоресценции хлорофилла *a* листьев, используя два подхода: ПАМ-флуориметрию для выявления характеристик индукции фотосинтеза от включения актиничного света до достижения «стационарного» уровня, и ОЛР-тест, т.е. измерение индукции флуоресценции с микросекундным разрешением в течение 1 с, что позволяло оценить характеристики фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Все измерения проводили на неотделенных листьях, что обеспечивало возможность характеризовать протекание фотосинтеза *in vivo*.

3.5.1. Измерение параметров флуоресценции хлорофилла *a* листьев с помощью ПАМ-флуориметрии

3.5.1.2. Параметры флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений мутантных по α КА4

Параметры флуоресценции с помощью флуориметра mini-РАМ измеряли с использованием специальной установки, позволяющей поддерживать заданную концентрацию CO_2 в камере прищепке, куда помещали неотделенный лист растения. Поскольку экспрессия исследуемых КА зависела от концентрации CO_2 и освещенности, для выявления влияния нокаутов исследуемых генов на фотосинтез, проводили измерения флуоресценции при двух интенсивностях света (100 и 500 мкмоль квантов/м²с) и трех концентрациях CO_2 (100, 800 и 1500 ppm).

Максимальный квантовый выход (F_v/F_m), отражающий потенциальные возможности фотосинтетического аппарата растений, в мутантных по α КА4 растениях отличался от такового в растениях ДТ не более чем на 1-2% (Табл. 8). Это свидетельствовало о том, что отсутствие этих КА не влияет на организацию ФС2.

Электронный транспорт при фотосинтезе оценивали с помощью измерения эффективного квантового выхода ФС2 (Y) при постоянном освещении. При низкой интенсивности света, 100 мкмоль квантов/м²с, и концентрации CO₂ 100 ppm разница в параметрах флуоресценции растений ДТ и мутантов по α КА4 (обеих линий) была незначительной; при более высоких концентрациях CO₂ Y мутантов был несколько меньше, чем у ДТ (Рис. 18).

Таблица 8. Максимальный квантовый выход ФС2 листьев мутантных растений с нокаутом гена *At4g20990*, кодирующего α КА4, линии 9-12 и 8-8.

Растения	Параметр F_v/F_m
ДТ	0,81±0,01
Мутант по α КА4, линия 9 -12	0,80±0,01
Мутант по α КА4, линия 8-8	0,81±0,01

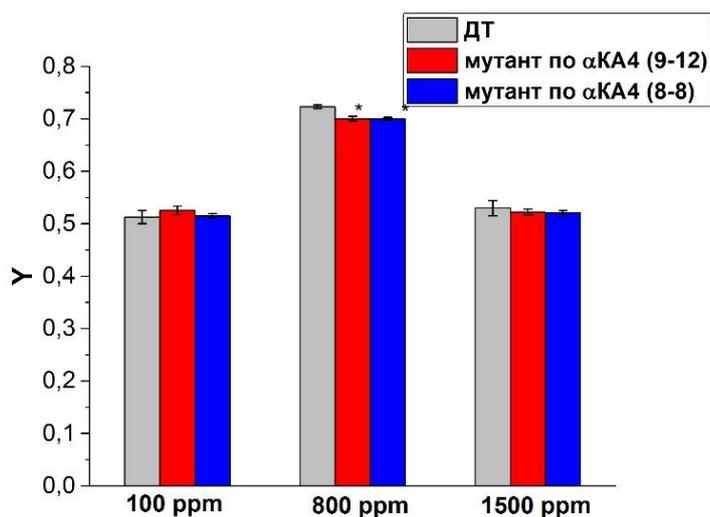


Рисунок 18. Эффективный квантовый выход ФС2 листьев мутантных растений с нокаутом гена *At4g20990*, кодирующего αКА4, линии 9-12 и 8-8, после 5 минут освещения светом интенсивностью 100 мкмоль квантов/м²с при концентрациях CO₂ в воздухе 100, 800 и 1500 ppm. Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений ± стандартная ошибка, * p < 0,05.

При интенсивности света 500 мкмоль квантов/м²с и низкой концентрации CO₂ эффективный квантовый выход и в первую минуту освещения, и при «стационарном фотосинтезе» был несколько ниже у линии 9-12, а у линии 8-8 не отличался от ДТ. Интересно, что при повышении концентрации CO₂ в воздухе до 800 и 1500 ppm квантовый выход мутантов становился выше, чем у растений ДТ (Рис. 19).

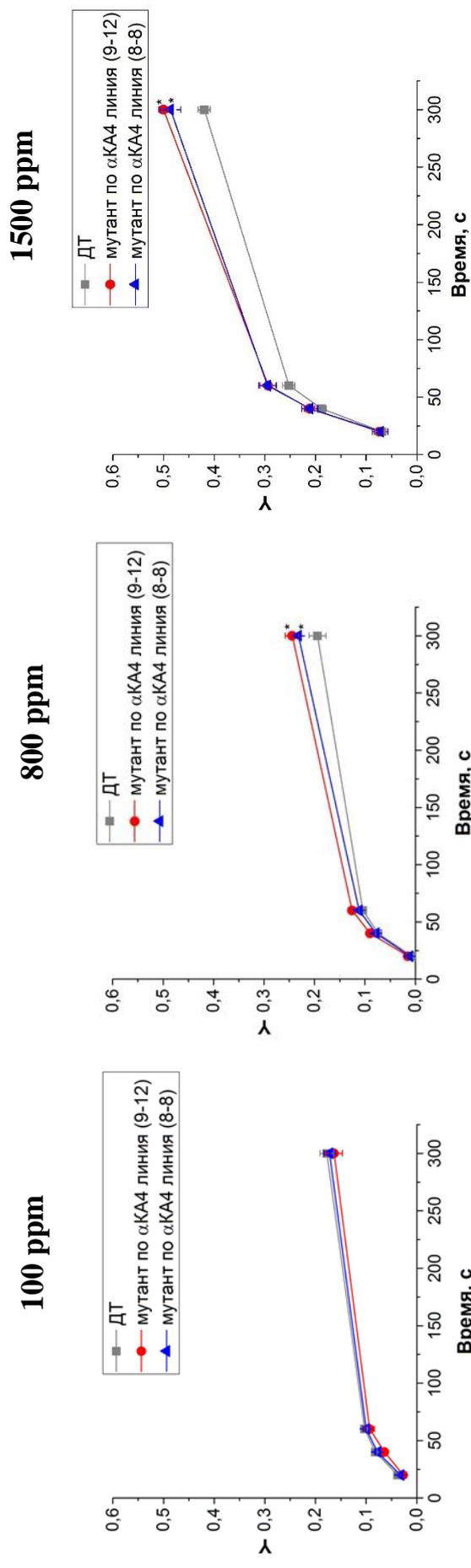


Рисунок 19. Эффективный квантовый выход ФС2 листьев мутантных растений, с нокаутом гена *At4g20990*, кодирующего α KA4, линии 9-12 и 8-8, измеренный в начале и в конце освещения светом 500 мкмоль квантов/м²с при концентрациях CO₂ в воздухе 100, 800 и 1500 ppm. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка, * $p < 0,05$.

Уровень нефотохимического тушения (НФХТ) флуоресценции, характеризуемого величиной NPQ (см. методы) при интенсивности света 100 мкмоль квантов/м²с и трех концентрациях CO₂ был одинаков у мутантов и у растений ДТ (данные не представлены). При высокой интенсивности света и низкой концентрации CO₂ величины NPQ у мутантов и у ДТ были одинаково высокими (Рис. 20). Наибольшее различие в величинах NPQ между мутантами и ДТ проявлялось при высокой интенсивности света и оптимальной для фотосинтеза концентрации CO₂, 800 ppm.

Предварительными измерениями установлено, что максимальная скорость фотосинтеза у листьев наблюдалась именно при 800 ppm (Мудрик В.А. неопубликованные данные). В первую минуту освещения светом 500 мкмоль квантов/м²с при высоких концентрациях CO₂, особенно при 800 ppm, NPQ в мутанте по αКА4 развивалось несколько медленнее, чем в растениях ДТ (Рис. 20). При достижении «стационарного» фотосинтеза отчетливо выявилось, что величина НФХТ в мутанте по αКА4 ниже, чем в растениях ДТ (Рис. 21).

Это различие проявлялось при выражении НФХТ с помощью коэффициента qN (см. Методы). Использование этого коэффициента для характеристики НФХТ флуоресценции позволяло выявить составляющие этого тушения. При разложении коэффициента qN на компоненты, различающиеся временем релаксации, оказалось, что разница в НФХТ между растениями ДТ и мутантами обусловлена энергозависимым компонентом qN1 (qE), характеризующим подкисление люмена, который у мутанта был ниже на 30-40%, чем у ДТ (Рис. 21). Второй по времени релаксации компонент НФХТ - qN15 (qZ), характеризующий тушение, обусловленное функционированием виолаксантинового цикла и, соответственно, накоплением зеаксантина, при низкой концентрации CO₂ был достоверно несколько выше у мутанта, тогда как при высоких концентрациях CO₂ не отличался у обеих линий мутанта и ДТ (Рис. 21).

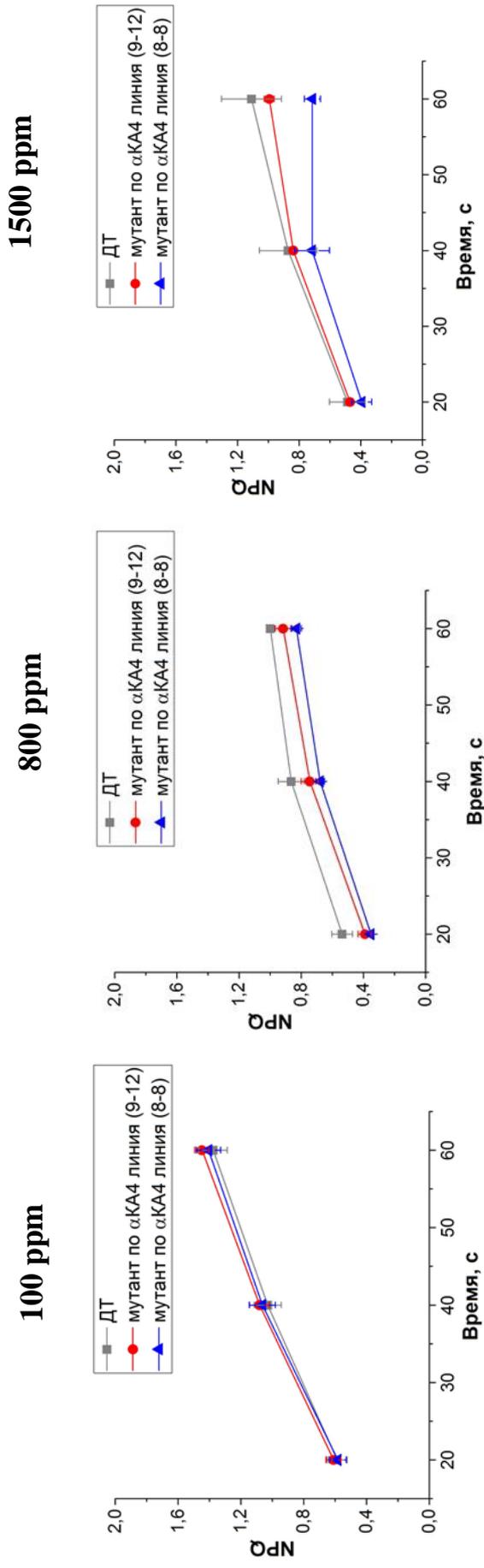


Рисунок 20. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* листьев мутантных растений, с нокаутом гена *At4g20990*, кодирующего α КА4, линии 9-12 и 8-8, измеренное в течение первой минуты освещения светом 500 мкмоль квантов/м²·с при концентрациях CO₂ в воздухе 100, 800 и 1500 ppm. Данные представлены в виде средних значений \pm 6 измерений \pm стандартная ошибка, * $p < 0,05$.

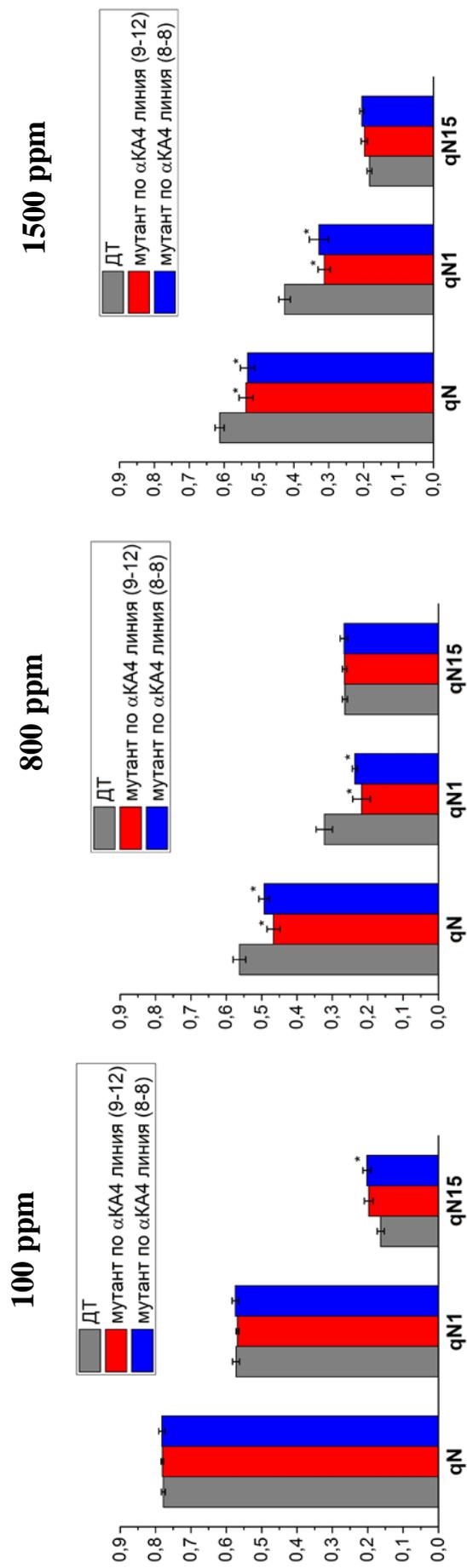


Рисунок 21. Коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* листьев мутантных растений, с нокаутом гена *At4g20990*, кодирующего αКА4, линии 9-12 и 8-8, измеренный в конце освещения и после выключения света интенсивности 500 мкмоль квантов/м²·с при концентрациях CO₂ в воздухе 100, 800 и 1500 ppm. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка, * *p* < 0,05.

3.5.1.2. Параметры флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений мутантных по α КА2

Характеристики флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений мутантных по α КА2 (две линии) и ДТ измеряли в тех же условиях, что и мутантов по α КА4: при двух интенсивностях света и трех концентрациях CO_2 . Максимальный квантовый выход (F_v/F_m) растений мутантных по α КА2 также почти не отличался от ДТ (Табл. 9). При низкой интенсивности света и двух концентрациях CO_2 эффективный квантовый выход ФС2 мутанта по α КА2 не отличался от параметров ДТ (Рис. 22). Такая схожесть значений может быть связана с тем, что на низком свету, когда ФЭТЦ работает с низкой скоростью, независимо от концентрации CO_2 , отсутствие α КА2 не влияет на протекание фотосинтеза.

Таблица 9. Максимальный квантовый выход ФС2 листьев мутантных растений с нокаутом гена *At2g28210*, кодирующего α КА2, линии 9-11 и 8-3.

Растения	Параметр F_v/F_m
ДТ	0,80±0,01
Мутант по α КА2, линия 9 -11	0,79±0,01
Мутант по α КА2, линия 8-3	0,79±0,01

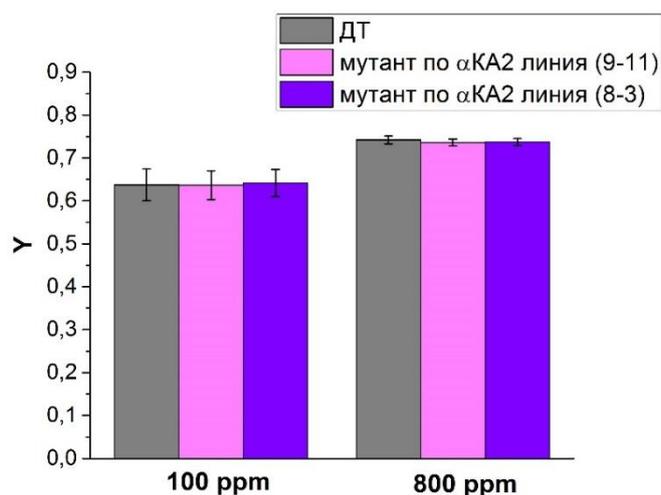


Рисунок 22. Эффективный квантовый выход ФС2 листьев мутантных растений, с нокаутом гена *At2g28210*, кодирующего αКА2, линии 9-11 и 8-3, после 5 минут освещения светом 100 мкмоль квантов/м²с при концентрациях CO₂ в воздухе 100 и 800 ppm.

При высокой интенсивности света, когда ФЭТЦ работает интенсивнее, выявляется разница в эффективном квантовом выходе между мутантом и ДТ. При интенсивности света 500 мкмоль квантов/м²с и низкой концентрации CO₂ Y мутанта был несколько ниже, чем у ДТ (Рис. 23). При увеличении концентрации CO₂ до 800 ppm, Y мутанта по αКА2 в растениях обеих линий был значительно ниже, чем у ДТ, причем при стационарном фотосинтезе эта разница достигала 20-25% (Рис. 23). При концентрации CO₂ 1500 ppm разница между значениями квантового выхода мутанта и ДТ немного уменьшалась (Рис. 23).

Уровень нефотохимического тушения, рассчитанного как величина NPQ при интенсивности света 100 мкмоль квантов/м²с и трех концентрациях CO₂ был одинаков у мутантов αКА2 и ДТ (данные не представлены), также, как и эффективный квантовый выход.

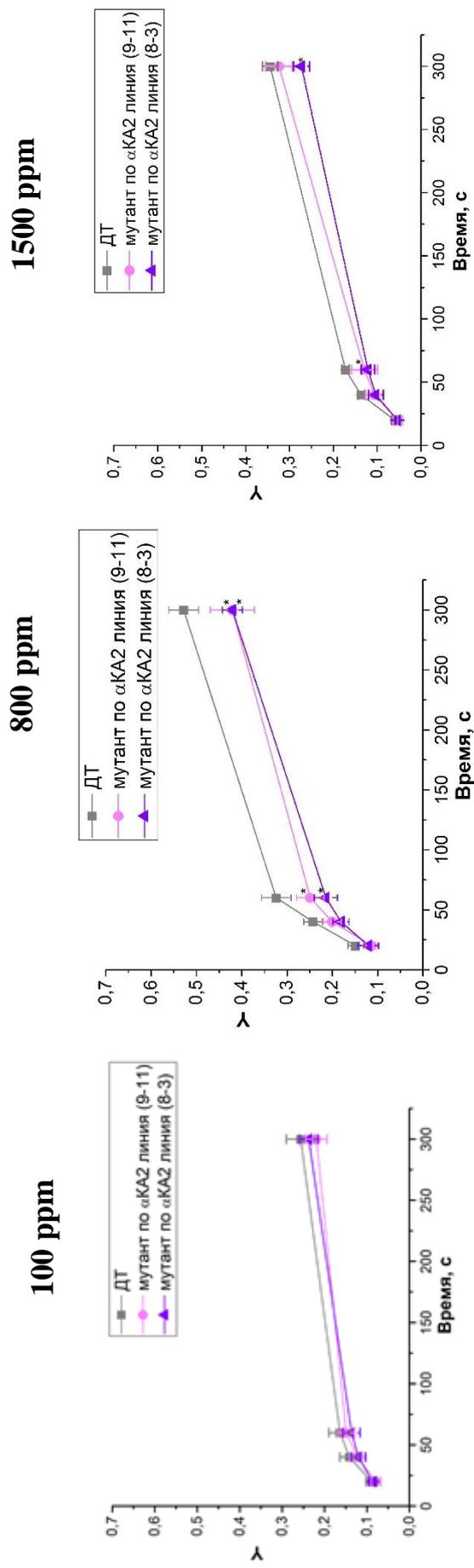


Рисунок 23. Эффективный квантовый выход ФС2 листьев мутантных растений, с нокаутом гена *Af2g28210*, кодирующего αКА2, линии 9-11 и 8-3, измеренный в начале и в конце освещения светом 500 мкмоль квантов/м²·с при концентрациях CO₂ в воздухе 100, 800 и 1500 ppm. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка, * p < 0,05.

Интересная закономерность была найдена при измерении НФХТ при высокой интенсивности света и трех концентрациях CO_2 . У мутантов по $\alpha\text{KA2 NPQ}$ в первую минуту освещения был ниже относительно ДТ, а к пятой минуте освещения становился или равным, или даже выше. (Рис. 24). Наиболее ярко такая тенденция проявлялась при оптимальной концентрации CO_2 .

При достижении стационарного фотосинтеза величины NPQ и $q\text{N}$ в мутанте по αKA2 при оптимальной концентрации CO_2 были достоверно выше, чем в ДТ (Рис. 24 и 25). Для того, чтобы установить процесс, являющийся причиной более высокого НФХТ в мутанте, было проведено разложение коэффициента $q\text{N}$, измеренного после пяти минут освещения, на составляющие его компоненты. Выяснилось, что энергозависимый компонент $q\text{N1}$ ($q\text{E}$), характеризующий подкисление люмена, у мутанта был несколько выше при 100 и 1500 ppm (5-10%) и значительно выше на 40-50%, чем у ДТ при 800 ppm (Рис. 25). Более медленно релаксирующий компонент НФХТ - $q\text{N15}$ ($q\text{Z}$) при 100 и 800 ppm был одинаков у мутанта и ДТ, а при 1500 ppm был незначительно выше (Рис. 25).

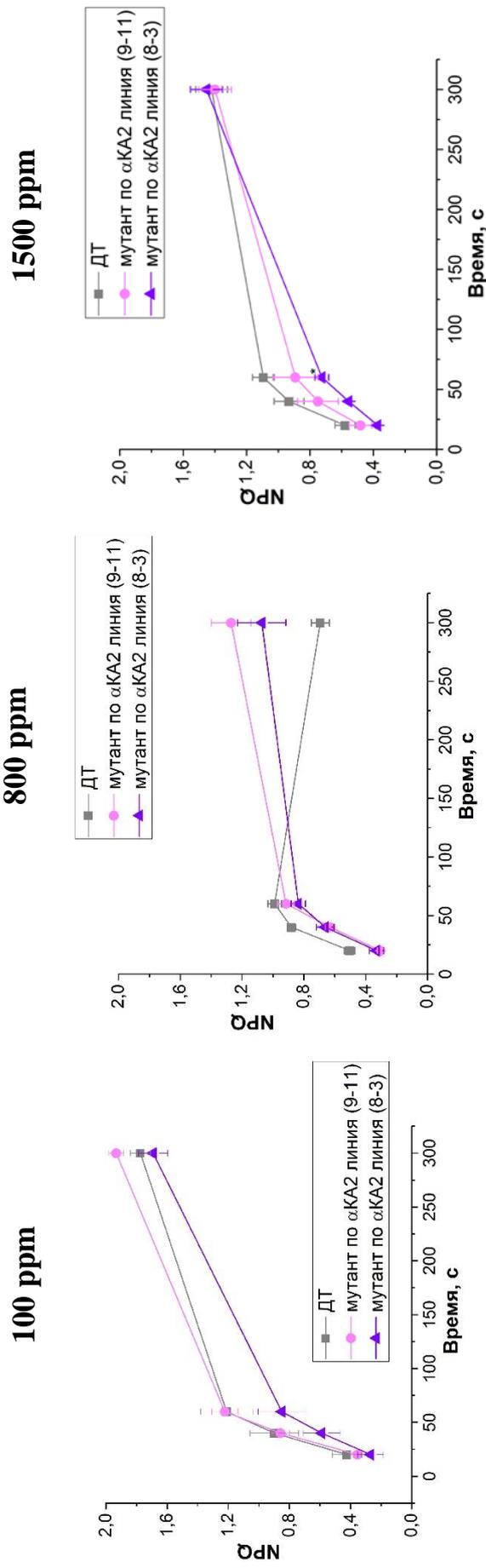


Рисунок 24. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* ФС2 листьев мутантных растений, с нокаутом гена *At2g28210*, кодирующего α КА2, линии 9-11 и 8-3, измеренное в начале и в конце освещения светом 500 мкмоль квантов/м²с при концентрациях CO₂ в воздухе 100, 800 и 1500 ppm. Данные представлены в виде средних значений из 6 измерений \pm стандартная ошибка, * $p < 0,05$.

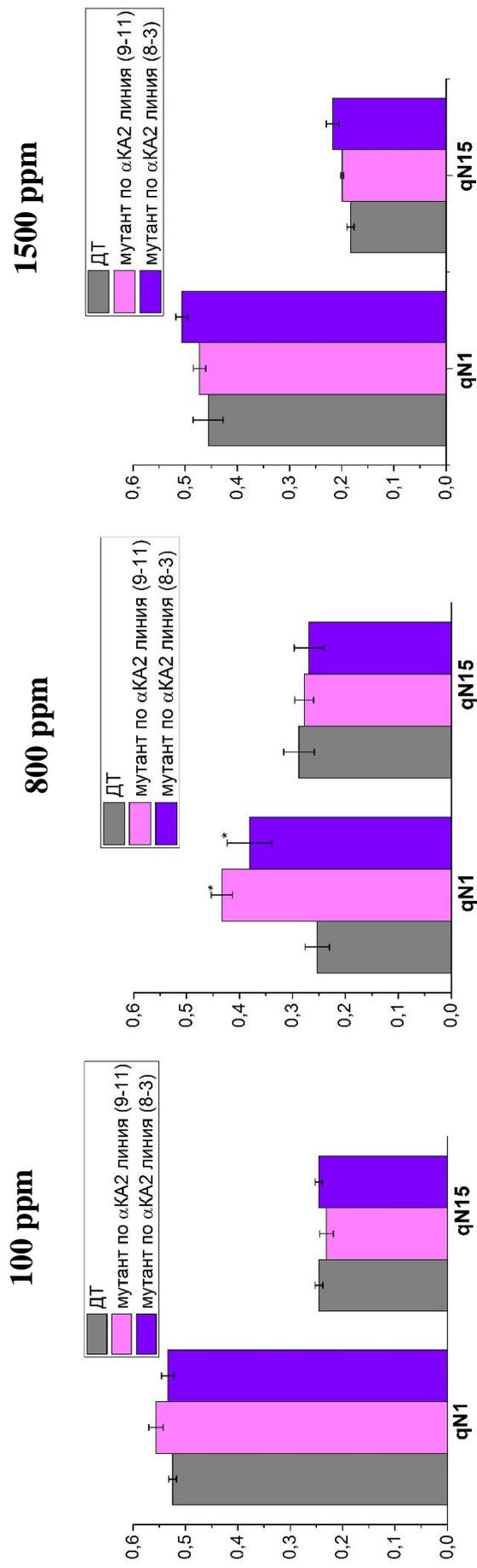


Рисунок 25. Коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* ФС2 листьев мутантных растений, с нокаутом гена *At2g28210*, кодирующего α KA2, линии 9-11 и 8-3, измеренный в конце освещения и после выключения света высокой интенсивности 500 мкмоль квантов/м²с при концентрациях CO₂ в воздухе 100, 800 и 1500 ppm. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартной ошибки, * $p < 0,05$.

3.5.2. Оценка устойчивости растений мутантных по α КА4 или α 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 возможному фотоингибирующему действию света высокой интенсивности оценивали с помощью параметра $(F_m - F_0)/F_0$, который характеризует максимальную эффективность функционирования ФС2, но более чувствителен, чем $(F_m - F_0)/F_m$, особенно при измерении в условиях стресса (Lichtenthaler and Buschmann, 2005). У мутантов по α КА4 этот параметр было ниже, чем у ДТ, после 3 и 6 часов действия света высокой интенсивности (Рис. 26), а у мутанта по α КА2 не отличался от ДТ (Рис. 27). Большее фотоингибирование ФС2 в мутантных растениях по α КА4 по сравнению с ДТ хорошо соответствовало более низкой величине НФХТ флуоресценции в этих мутантах.

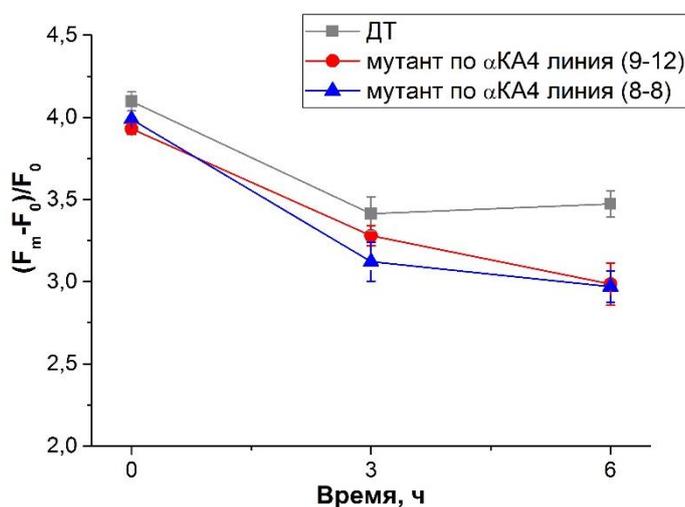


Рисунок 26. Максимальная эффективность функционирования ФС2 в листьях растений мутантных по α КА4 и в листьях растений ДТ, измеренная после 3-х и 6-ти часов освещения светом 500 мкмоль квантов/м²с при концентрации CO₂ 700 ppm.

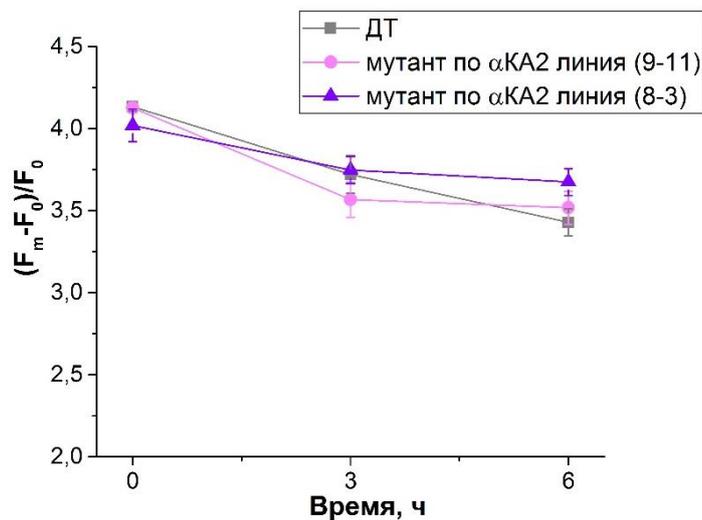


Рисунок 27. Максимальная эффективность функционирования ФС2 в листьях растений мутантных по αKA2 и в листьях растений ДТ, измеренная после 3-х и 6-ти часов освещения светом 500 мкмоль квантов/м²с при концентрации CO₂ 700 ppm.

3.5.3. Оценка относительного уровня восстановления пула пластохинона растений мутантных по αKA4 или αKA2

Окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона (PQ) является важным показателем в регуляции многих процессов связанных с работой электрон-транспортной цепи. Состояние этого пула регулирует перераспределение потоков электронов между линейным и циклическим потоками. Изменение в передаче электронов по ФЭТЦ может быть причиной изменения окислительно-восстановительного состояния пластохинонового пула. В растениях мутантных по αKA4 после пяти минут освещения высоким светом относительный уровень восстановления пула пластохинона был выше, чем в растениях ДТ (Табл. 10), а в растениях мутантных по αKA2 этот уровень был даже немного ниже, чем в растениях ДТ (Табл. 11).

Таблица 10. Относительный уровень восстановления пула пластохинона в листьях мутантов по α КА4 (линии 9-12 и 8-8) и растений ДТ после 5 минут освещения светом 500 мкмоль квантов/м²с при концентрации CO₂ 800 ppm.

Растения	Относительный уровень восстановления пула PQ
ДТ	0,42±0,01
Мутант по α КА4, линия 9-12	0,45±0,01
Мутант по α КА4, линия 8-8	0,49±0,02

Таблица 11. Относительный уровень восстановления пула пластохинона в листьях мутантов по α КА2 (линии 9-11 и 8-3) и ДТ после 5 минут освещения светом 500 мкмоль квантов/м²с при концентрации CO₂ 800 ppm.

Растения	Относительный уровень восстановления PQ
ДТ	0,55±0,01
Мутант по α КА2, линия 9-11	0,53±0,02
Мутант по α КА2, линия 8-3	0,52±0,01*

3.5.4. Измерение ОЛР – кинетики флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений мутантных по α КА4 или α КА2

Измерения параметров флуоресценции хлорофилла *a* с помощью ОЛР-теста позволяют получить более подробную информацию о состоянии электрон-транспортной цепи в первую секунду освещения, а именно о переносе электрона от донорной к акцепторной стороне ФС2. В таблице 12 приведены некоторые параметры флуоресценции мутантных растений по α КА4 или по α КА2.

Параметр S_m , представляющий собой нормированную общую площадь над ОЛР кривой и характеризующий емкость пула электронных акцепторов до полного восстановления пула пластохинона, у мутанта по α КА2 (обе линии) был ниже на 5-12%, чем у ДТ, у мутанта по α КА4 (обе линии) этот параметр был выше. Эти данные подтверждают показатели относительного уровня восстановления пула пластохинона, полученные другим методом, а именно с помощью ПАМ-флуориметрии. Противоположная тенденция отличия мутантов по двум карбоангидразам от растений ДТ наблюдалась и для других параметров, характеризующих функциональную активность ФЭТЦ: кажущегося размера антенны ФС2 и др. (Табл. 12). Это показывает, что отсутствие каждой из исследованных КАз влияет на перенос электронов в ФЭТЦ, и предполагает также, что обе КАзы, скорее всего, расположены в тилакоидной мембране.

Таблица 12. Основные ОЛР-параметры мутантных растений, нокаутированных по генам *At4g20990* или *At2g28210*, кодирующим α КА4 или α КА2.

Параметры	Мутант по α КА2		Мутант по α КА4	
	линия 9-11	линия 8-3	линия 9-12	линия 8-8
Площадь над ОЛР-кривой пропорциональная числу red/ох актов Q_A (S_m)	95	88	117	107
Кажущийся размер антенны ФС2 (ABC/RC)	104	106	91	92
Максимальный уловленный поток энергии /РЦ ФС2 (TR_0/RC)	105	105	92	93
Скорость потока электронов от Q_A к Q_B /РЦ ФС2 (ET20/RC)	105	105	94	94
Скорость электронного транспорта к акцепторам ФС1/РЦ ФС2 (ϕ_{RE10})	109	112	72	82

3.6. Измерение квантового выхода ФС1 растений мутантных по α КА4 или α КА2

Как показано выше, в мутантах по α КА4 пул пластохинона более восстановлен, а у мутанта по α КА2 более окислен, чем в ДТ (Табл.10 и 11). Мы предположили, что большая степень восстановления пула связана с замедленным оттоком электронов к акцепторам ФС1, а меньшая - с увеличенным оттоком. Для проверки этих предположений был измерен

квантовый выход ФС1, $Y(I)$. Этот показатель у мутанта по α КА4 после 20 секунды освещения и по достижению «стационарного» фотосинтеза был значительно ниже, чем у растений ДТ (Рис. 28). У мутанта по α КА2, после 20 секунды освещения $Y(I)$ был выше, чем у растений ДТ (Рис. 29).

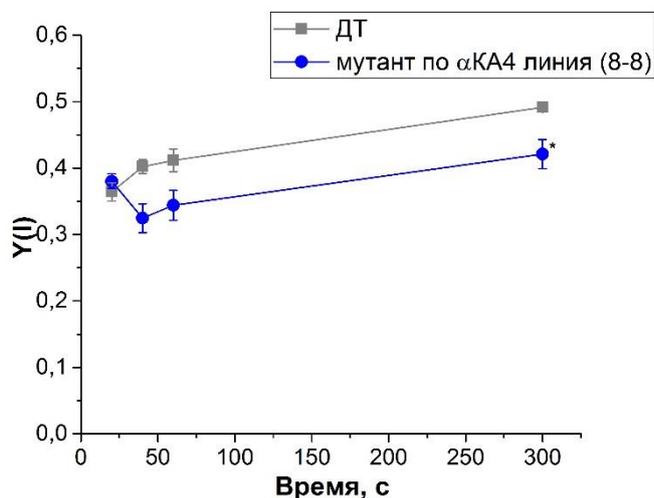


Рисунок 28. Квантовый выход ФС1 листьев растений ДТ и растений мутантных по α КА4 (линия 8-8), измеренный при освещении светом 500 мкмоль квантов/м²с и при концентрации CO₂ 800 ppm.

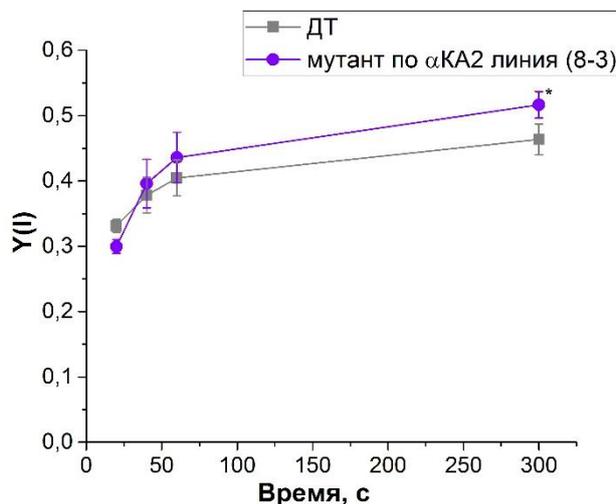


Рисунок 29. Квантовый выход ФС1 листьев растений ДТ и растений мутантных по α КА2 (линия 8-3), измеренный при освещении светом 500 мкмоль квантов/м²с и концентрации CO₂ 800 ppm.

Существенно, что величина квантового выхода ФС1 хорошо согласуется со скоростью ассимиляции CO_2 листом, которая у мутантов по $\alpha\text{КА4}$ была ниже, а у мутантов по $\alpha\text{КА2}$ - выше, чем в растениях ДТ (Табл. 5 и 6). Это не удивительно, если принять во внимание, что цикл Кальвина – главный "потребитель" электронов, выходящих из ФЭТЦ через ФС1.

3.7. Измерение светоиндуцированного содержания пероксида водорода в листе растений мутантных по $\alpha\text{КА4}$ или $\alpha\text{КА2}$

Главным акцептором электронов линейного потока является НАДФ⁺, восстановленная форма которого используется для синтеза углеводов в цикле Кальвина. У мутанта по $\alpha\text{КА4}$, наблюдали более низкую скорость ассимиляции CO_2 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⁺, 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 сильным светом адаптированных к темноте листьев. Было обнаружено, что в листьях мутанта по $\alpha\text{КА4}$ светоиндуцированный прирост содержания H_2O_2 значительно, в 1,5-2 раза больше, чем в ДТ (Рис. 30). В листьях мутантов по $\alpha\text{КА2}$ прирост содержания H_2O_2 был меньше, чем в листьях растений ДТ (Рис. 31). Это свидетельствует о том, что в обоих мутантах происходит изменение соотношения потоков электронов в ФЭТЦ по сравнению с соотношением в растениях ДТ.

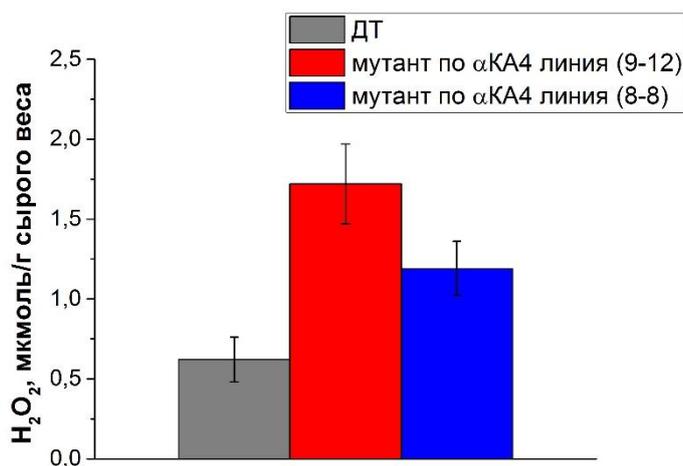


Рисунок 30. Светоиндуцированный прирост содержания пероксида водорода в листьях растений ДТ и растений мутантных по αKA4 (линии 9-12 и 8-8) после 5 минут освещения светом 500 мкмоль квантов/ m^2s .

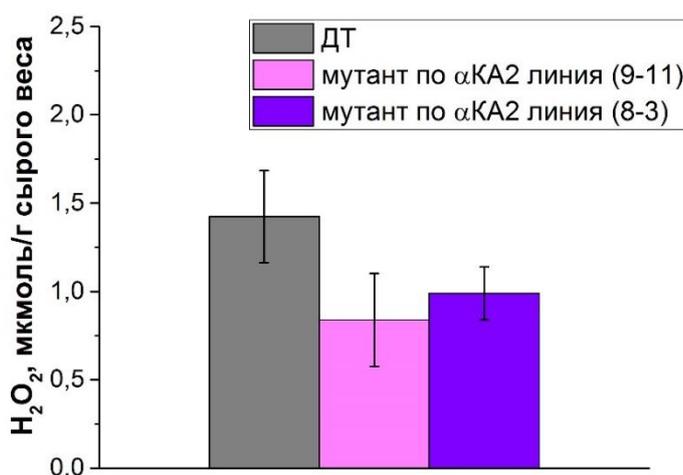


Рисунок 31. Светоиндуцированный прирост содержания пероксида водорода в листьях растений ДТ и растений мутантных по αKA2 (линии 9-11 и 8-3) после 5 минут освещения светом 500 мкмоль квантов/ m^2s .

3.8. Определение местонахождения αKA4 и αKA2 в тилакоидной мембране

Как уже отмечено выше, ряд изменений характеристик флуоресценции хлорофилла *a* листьев указывал на то, что исследуемые КАЗы 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 α КА2, на такие важные показатели фотосинтеза, как эффективные квантовые выходы ФС1 и ФС2, величину быстрого компонента НФХТ qE, степень восстановления пула пластохинона, скорость ассимиляции CO₂ 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 КАЗ α -семейства усложняет процесс поиска более точного местонахождения исследуемых карбоангидраз в системе тилакоидных мембран, прежде всего, из-за кроссконтаминации препаратов фотосистем. Кроме того, стимуляция КА активности ацетазоламидом в субмикромольных концентрациях, присуща всем карбоангидразам α -семейства (подробнее см. стр. 25 литобзора). Ранее у гороха стимуляция КА активности этим ингибитором наблюдалась у препаратов ФС2-мембран, но не у препаратов ФС1-мембран (Ignatova et al., 2006). 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.

3.8.1. Особенности выделения фрагментов тилакоидных мембран, обогащенных ФС2 или ФС1 из растений мутантных по α КА4 или α КА2

Одной из особенностей мутантных по α КА4 растений оказалась сложность получения препаратов тилакоидных мембран, обогащенных ФС2. По величине отношения хлорофиллов Хл *a*/Хл *b* можно в первом приближении судить о качестве полученных препаратов ФС1- и ФС2-мембран. Известно, что препараты, обогащенные ФС2, у высших растений имеют отношение Хл *a*/Хл *b* в диапазоне 1,6-1,8, а препараты, обогащенные

ФС1 - около 3,0. Для качественного выделения ФС1- и ФС2-мембран из листьев арабидопсиса концентрация ионов магния в среде инкубации тилакоидов и этих препаратов должна быть не менее 5 мМ (Ignatova et al., 2011), тогда как для выделения из листьев гороха достаточно 2 мМ MgCl₂. Однако, условия выделения ФС1- и ФС2-мембран, подобранные для ДТ, оказались неподходящими для получения ФС2-мембран из растений мутантных по αКА4. При увеличении концентрации MgCl₂ в среде происходило улучшение качества препаратов ФС-мембран (Табл. 13). Успешное разделение ФС1- и ФС2-мембран было достигнуто при увеличении концентрации хлористого магния до 10 мМ. Мы расцениваем этот факт, как косвенное свидетельство нахождения αКА4 в гранальных областях тилакоидных мембран и возможной ее связи со светособирающим комплексом ССК2, поскольку именно он обеспечивает образование гранальной структуры тилакоидов (Goral et al., 2012).

Таблица 13. Влияние концентрации MgCl₂ на отношение Хл *a*/Хл *b* мембранных препаратов, обогащенных ФС1 или ФС2, изолированных из растений мутантных по αКА4.

Растения	Концентрация MgCl ₂	Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>	
		ФС2-мембраны	ФС1-мембраны
ДТ	5 мМ	1,81 ± 0,04	3,56 ± 0,06
мутант по αКА4, линия 8-8	5 мМ	2,54 ± 0,09	2,93 ± 0,04
мутант по αКА4, линия 9-12	8 мМ	2,31 ± 0,05	4,85 ± 0,39
мутант по αКА4, линия 8-8		2,04 ± 0,06	3,92 ± 0,21
мутант по αКА4, линия 9-12	10 мМ	1,83 ± 0,01	3,35 ± 0,07
мутант по αКА4, линия 8-8		1,78 ± 0,00	3,10 ± 0,05

При выделении препаратов ФС1- и ФС2-мембран из растений, нокаутированных по α КА2, не возникло подобных сложностей. Все процедуры выделения проводили в условиях, подобранных для растений ДТ.

3.8.2. Карбоангидразная активность тилакоидов и ФС1- и ФС2-мембран

Измерение КА активности тилакоидов из растений мутантных по обоим карбоангидразам показало, что стимуляция КА активности тилакоидов ацетазоламидом наблюдалась в тилакоидах мутанта по α КА4 обеих линий (Табл. 14), а в тилакоидах мутантов по α КА2 такая стимуляция отсутствовала (Табл. 14), и проявлялось ингибиторное действие ацетазоламида. У тилакоидов, выделенных из растений ДТ, стимуляцию КА активности наблюдали всегда, что может свидетельствовать о хорошем качестве выделенных тилакоидов. По-видимому, в тилакоидах мутантов по α КА2 стимуляция КА активности не выявлялась по причине «закрытости» оставшейся в мембране α КА4, которая, вероятнее всего, расположена с люменальной стороны тилакоидной мембраны, а ацетазоламид, будучи водорастворимым соединением, плохо проникает через мембрану и его концентрация, 10^{-7} М, была к тому же низка. Таким образом, за наблюдавшуюся в тилакоидах ДТ и мутантах по α КА4 стимуляцию КА активности ацетазоламидом, ответственна α КА2, что позволяет предположить её нахождение в ламеллярных мембранах на их стромальной стороне.

Таблица 14. Влияние ацетазоламида (АА) (10^{-7}M) на КА активность тилакоидов растений дикого типа и растений мутантных по $\alpha\text{КА4}$ или по $\alpha\text{КА2}$.

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

В ФС2-мембранах из мутантов по $\alpha\text{КА4}$ стимуляции КА активности ацетазоламидом не было, а в ФС2-мембранах из ДТ стимуляция была (Табл. 15). Это убедительно свидетельствует о том, что именно $\alpha\text{КА4}$ ответственна за КА активность в ФС2-мембранах арабидопсиса. В ФС2-мембранах мутантов по $\alpha\text{КА2}$ стимуляция ацетазоламидом наблюдалась, что согласуется с присутствием в этих мембранах $\alpha\text{КА4}$ (Табл. 15).

Таблица 15. Влияние ацетазоламида (АА) (10^{-7} М) на КА активность ФС2-мембран растений дикого типа и растений мутантных по α КА4 или по α КА2

Растения	КА активность, μ моль H^+ /мг Хл мин	
	-АА	+ АА(10^{-7} М)
ДТ	$65,0 \pm 8,1$	$75,4 \pm 3,6$
мутант по α КА4, линия 9-12	$53,0 \pm 4,6$	$21,6 \pm 3,7$
мутант по α КА4, линия 8-8	$78,5 \pm 7,8$	$74,4 \pm 10,6$
ДТ	$36,5 \pm 7,3$	$45,3 \pm 8,7$
мутант по α КА2, линия 9-11	$35,1 \pm 8,2$	$42,4 \pm 6,5$
мутант по α КА2, линия 8-3	$39,3 \pm 5,6$	$65,5 \pm 5,6$

В препаратах ФС1-мембран из обоих мутантов присутствовала КА активность, стимулируемая ацетазоламидом (Табл. 16).

Таблица 16. Влияние ацетазоламида (АА) (10^{-7} М) на КА активность ФС1-мембран растений дикого типа и растений мутантных по α КА4 или по α КА2

Вариант	КА активность, μ моль H^+ /мг Хл мин	
	-АА	+ АА(10^{-7} М)
ДТ	$25,0 \pm 4,2$	$29,2 \pm 1,8$
мутант по α КА4, линия 9-12	$42,9 \pm 8,4$	$48,8 \pm 3,3$
мутант по α КА4, линия 8-8	$50,4 \pm 6,3$	$59,7 \pm 5,6$
ДТ	$15,6 \pm 3,8$	$20,8 \pm 4,4$
мутант по α КА2, линия 9-11	$35,1 \pm 8,9$	$42,4 \pm 6,5$
мутант по α КА2, линия 8-3	$25,0 \pm 5,6$	$33,4 \pm 5,6$

С учетом данных литературы о присутствии α КА4 среди белков тилакоидных мембран наличие ацетазоламид-стимулируемой КА активности в ФС1-мембранах из мутантов по α КА4, свидетельствует о наличии в этих мембранах ещё одной КА α -семейства. Местонахождение α КА2 до нашей работы не было неизвестно. Стимуляции КА активности ацетазоламидом в ФС-1 мембранах из мутантов по α КА4 является важным дополнительным аргументом в пользу того, что α КА2 находится в тилакоидной мембране.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В целом, полученные в работе результаты представляют собой первые в мировой литературе данные о том, что КА высших растений принимают участие в реакциях, составляющих процесс фотосинтеза, и указывают, какие это реакции. Уже изменение экспрессии генов двух исследованных КАз под влиянием факторов среды, имеющих определяющее значение для скорости фотосинтеза, - интенсивности света и концентрации CO_2 в воздухе (Рис.13 и 14), - свидетельствовало о возможно важной роли, которую $\alpha\text{KA}2$ и $\alpha\text{KA}4$ играют в процессе фотосинтеза. При этом экспрессия генов этих двух КА зависела от концентрации CO_2 противоположно, – экспрессия $\alpha\text{KA}4$ увеличивалась при повышенном содержании CO_2 в воздухе, а экспрессия $\alpha\text{KA}2$ увеличивалась при низком содержании CO_2 , - что предполагало их участие в регуляции одной и той же реакции путем разнонаправленного действия. Такой принцип регуляции очень широко представлен в метаболизме живых организмов. Поиск регулируемой реакции и роль каждой из КА был осуществлен с использованием растений мутантных по соответствующим генам.

Сравнение морфофизиологических показателей растений, нокаутированных по генам *At4g20990* и *At2g28210*, кодирующим $\alpha\text{KA}4$ и $\alpha\text{KA}2$, соответственно, с растениями ДТ подтвердило, что данные КА участвуют в метаболизме растений. При этом морфофизиологические показатели, по которым мутантные растения отличались от ДТ, - вес розетки листьев, содержание крахмала и пероксида водорода в листьях, скорость ассимиляции CO_2 листом, устойчивость к действию света, - либо прямо отражали (скорость ассимиляции CO_2), либо в большей или меньшей степени были связаны с изменениями протекания фотосинтеза. Вновь наблюдали, что исследованные показатели отличались в мутантах по $\alpha\text{KA}2$ или $\alpha\text{KA}4$ от таковых в ДТ в противоположные стороны. У мутантов по $\alpha\text{KA}2$ сырой вес

розетки листьев и содержание крахмала были несколько ниже (Табл. 1 и 4), а скорость ассимиляции CO_2 листом была значительно выше (на 30-40%) (Табл. 6), а у мутантов по αKA4 сырой вес розетки листьев и содержание крахмала были выше (Табл. 1 и 2), а скорость ассимиляции CO_2 листом была ниже, чем у ДТ (Табл. 5).

Особо обращало на себя внимание такое наглядное отличие мутанта по αKA4 от ДТ как значительно большее, в 2-3 раза (Табл. 2), содержание крахмала в этом мутанте по сравнению с содержанием крахмала в листьях растений ДТ. Электронная микроскопия подтвердила существенное различие в накоплении крахмала в листьях: в растениях мутантных по αKA4 было больше крахмальных зерен, и они имели заметно больший размер (Рис. 17). Было установлено, что большее количество крахмала в листьях мутанта было результатом его накопления на свету (Табл. 3). При этом оказалось, что существенное превышение в мутанте содержания крахмала после 8-часового освещения светом $100 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$ исчезало после ночного периода, и к началу нового дня содержание крахмала становилось даже несколько меньше, чем в листьях ДТ (Табл. 3). Последнее могло быть результатом того, что в ответ на повышенный биосинтез крахмала активировалась и система его деградации, чтобы не допустить его сверхнакопления, что ухудшает фотосинтез.

Что касается причины увеличения скорости биосинтеза крахмала, то, во-первых, известно, что крахмал в листьях C_3 -растений накапливается, когда высока скорость продукции АТФ. Показана также стимуляция активности ключевого фермента биосинтеза крахмала, АДФ-глюкозо-пирофосфорилазы, при возрастании продукции АТФ (Loef et al., 2001). По-видимому, в растениях без αKA4 избыточное накопление крахмала на свету происходит вследствие избыточного относительно скорости образования НАДФН синтеза АТФ. Причиной этого может быть, как увеличение,

например, циклического электронного транспорта вокруг ФС1, так и более высокий поток электронов к O_2 в этом мутанте, что увеличивает отношение АТФ/НАДФН в хлоропластах. Измерения увеличения содержания H_2O_2 в листьях после пяти минут освещения, - что, учитывая время этого освещения, отражает именно распределение потоков электронов в ФЭТЦ, - показали, что в мутанте по α КА4 светоиндуцированный прирост H_2O_2 значительно больше, чем в ДТ (Рис. 30). Таким образом, скорее всего, именно увеличенный поток электронов к кислороду, стимулирующий протекание «водно-водного цикла», в котором поток электронов, не направленный на восстановление НАДФ⁺, вдвое превышает поток электронов к O_2 , приводит к избыточному образованию АТФ, что и вызывает увеличение биосинтеза крахмала на свету, наблюдаемое у мутантов по α КА4 (Табл. 3). В мутанте по α КА2 прирост содержания H_2O_2 был на 30-40% меньше, чем в ДТ (Рис. 31).

Изменение морфофизиологических показателей, точнее, их различие в ДТ и мутантах, не позволяет установить процесс, включающий карбоангидразную реакцию, в катализе которой участвует та или иная КА. Поиск этого процесса с использованием мутантов по соответствующим КАзам был осуществлен путем сравнения характеристик фотосинтеза, измеренных с помощью регистрации флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений ДТ и мутантов.

Показатели флуоресценции, измеренные при низкой интенсивности света и трех концентрациях CO_2 , почти не отличались у мутантов по обеим КА и у растений ДТ (Рис. 18). Одинаковая величина НФХТ флуоресценции при низкой интенсивности света, вероятно, следствие того, что нет необходимости регуляции диссипации поглощенной энергии света в тепло, и эта энергия, поглощенная ССК2, эффективно используется для транспорта электронов. При высокой интенсивности света и концентрации CO_2 100 ppm величина НФХТ в мутантах также не отличалась от его

величины в растениях ДТ (Рис. 21). Высокие значения q_N при 100 ppm CO_2 , когда фотосинтез невелик вследствие ограниченной поставки субстрата для Рубиско, объясняются незначительным потреблением протонов при синтезе АТФ и, соответственно, их высокой концентрацией в люмене, а сходство величин энергозависимого компонента q_E (q_{N1}) в ДТ и мутанте, очевидно, отражает тот факт, что концентрация протонов в люмене достигает в таких условиях величины, близкой к насыщению.

При увеличении концентрации CO_2 до 800 и 1500 ppm скорость обращения цикла Кальвина увеличивается, и АТФ активно потребляется, поэтому количество протонов в люмене, способных стимулировать НФХТ, уменьшается. В этих условиях, т.е. при высокой интенсивности света и высоких концентрациях CO_2 , уровень НФХТ в мутанте по $\alpha KA4$ оказался ниже, чем в ДТ, причем эта разница была обусловлена энергозависимым компонентом НФХТ, q_E (q_{N1}) (Рис. 21). В настоящее время принимается, что величина q_E характеризует степень протонирования PsbS белка (Ruban, 2016), и меньшее значение параметра q_E у мутанта по $\alpha KA4$ может свидетельствовать о том, что в отсутствие этой КА происходит «недопротонирование» этого белка. Ещё одним доводом в пользу нарушения в этом мутанте протонирования именно PsbS белка является более медленная активация NPQ у мутанта в первую минуту освещения, особенно при оптимальной и высокой концентрациях CO_2 (Рис. 20): в литературе имеются данные об участии PsbS в развитии НФХТ именно в первую минуту освещения (Ikeuchi et al. 2014).

В тех же условиях в мутантных растениях по $\alpha KA2$ уровень НФХТ был выше, чем в растениях ДТ (Рис. 24). Разложение нефотохимического тушения флуоресценции на компоненты выявило, что компонент НФХТ q_{N1} (q_E), обусловленный накоплением протонов в люмене тилакоидов, у

мутанта по α КА2 на 40-50% выше, чем этот компонент в растениях ДТ (Рис. 25).

Второй компонент НФХТ, измерявшийся в данной работе как релаксирующий в интервале времени от 1-ой до 15-ой минуты после выключения действующего света, $qN15$, ранее рассматривался как показатель возврата мобильной части ССК2 к ФС2 от ФС1, куда эта часть ССК2 мигрировала на свету, - процесс, обозначаемый как state transitions (Quick and Stitt, 1989). Однако, в настоящее время установлено, что при высокой интенсивности света, компонент, релаксирующий в данном временном диапазоне, является частью энергозависимого НФХТ и обусловлен функционированием виолаксантинового цикла, который активируется протонированием фермента виолаксантиндеэпоксидазы, т.е. также зависит от концентрации протонов в люмене; было показано, что эпоксидация зеаксантина может занимать до десятков минут (Nilkens et al., 2010). Коэффициент $qN15$ у мутантов по α КА4 или α КА2 не отличался от такового у ДТ (Рис. 21 и 25).

Важным отличием мутантов по α КА4 от растений ДТ было то, что после шести часов освещения светом высокой интенсивности фотоингибирование ФС2 в нем было больше, чем в ДТ (Рис. 26). В соответствии с этими данными, описанное выше участие α КА4 в стимуляции энергозависимого тушения, которое отражает диссипацию поглощенной энергии света, позволяет рассматривать этот фермент как часть системы защиты фотосинтетического аппарата от фотоингибирования, что вероятно, и является функцией α КА4 в фотосинтезе. В мутанте по α КА2 фотоингибирование ФС2 мало отличалось от развивавшегося в растениях ДТ (Рис. 27), но можно было заметить тенденцию к тому, что оно было меньше, чем в ДТ; последнее можно сопоставить с более высокой величиной НФХТ флуоресценции хлорофилла в этом мутанте.

Квантовый выход флуоресценции хлорофилла *a* листьев в адаптированных к темноте растений [не отличался в обоих мутантах от такового в растениях ДТ (Табл. 8 и 9). В сопоставлении с влиянием мутации по генам *At4g20990* и *At2g28210*, кодирующим α КА4 и α КА2, соответственно, на величину эффективного квантового выхода на свету, Υ , этот факт свидетельствует, что отсутствие исследованных КА не влияет на организацию формирующейся в онтогенезе ФС2. Различия в величинах Υ подтверждает, что эти КА участвуют в протекании реакций в ФЭТЦ, когда эта цепь функционирует при освещении. Сам по себе эффективный квантовый выход, который при умножении на интенсивность поглощенного света дает скорость потока электронов по ФЭТЦ, не позволяет, в отличие от величины НФХТ флуоресценции, строить предположения о механизмах функционирования КА в хлоропластах, поскольку величина Υ зависит от процессов подачи электронов к акцепторам ФС2 и оттока электронов от них, и может изменяться при изменении любого из них. Однако, сопоставление влияния мутаций на эффективный квантовый выход с влиянием на другие характеристики растений может расширить представление об участии исследованных КА3 в фотосинтезе.

У мутантов по α КА2 эффективный квантовый выход после пяти минут освещения был ниже, чем у ДТ (Рис. 23). Снижение эффективного квантового выхода в значительной степени результат более высокого уровня диссипации поглощенной энергии в тепло в этом мутанте. У мутантов по α КА4 эффективный квантовый выход после пяти минут освещения был выше, чем у растений ДТ (Рис. 19), что, в свою очередь, может быть сопоставлено с более низким уровнем диссипации поглощенной энергии в тепло в этом мутанте. Таким образом, при высокой интенсивности света и оптимальной концентрации CO_2 , уменьшение по сравнению с ДТ эффективного квантового выхода в мутанте по α КА2, и его увеличение в

мутанте по α КА4 вступали в противоречие с тем, что скорость ассимиляции CO_2 в первом мутанте была выше (Табл. 6), а во втором – ниже (Табл. 5), чем в растениях ДТ. Такое видимое противоречие проще всего объяснить изменениями альтернативного потока электронов в ФЭТЦ у мутантных растений. Эффективный квантовый выход ФС2 отражает все электронные потоки в ФЭТЦ к целому ряду акцепторов, а скорость ассимиляции CO_2 – только поток электронов к НАДФ⁺, восстановленная форма которого необходима для ассимиляции CO_2 . Основным альтернативным потоком электронов в ФЭТЦ является перенос электронов к кислороду; принято считать, что этот поток электронов может составлять от 5 до 30% от общего потока электронов (Ivanov et al., 2012 и ссылки там). Измерения накопления H_2O_2 в листьях на свету, как уже было рассмотрено, показали, что это накопление ниже в мутантах по α КА2 (Рис. 31), но выше в мутантах по α КА4 (Рис. 30), т.е. изменение в накоплении H_2O_2 совпадало с изменениями в величине эффективного квантового выхода ФС2. На первый взгляд это выглядит довольно странно, учитывая, что перенос электронов к O_2 существенно более медленный процесс, чем восстановление НАДФ⁺. В настоящее время у нас нет данных, чтобы предполагать, что в арабидопсисе поток электронов к O_2 настолько велик, что именно его изменения определяют общий поток электронов по ФЭТЦ. Однако, в литературе есть указания на то, что, например, в тилакоидах овса при создании оптимальных условий для восстановления НАДФ⁺ поток электронов к O_2 достигал 80% (Шмелева и др., 1984). Исследования с использованием тилакоидов арабидопсиса затруднены из-за трудностей выделения полностью интактных мембран из мутанта по α КА4 (см. Результаты, раздел 3.8.1), но проверка указанного предположения будет проведена в дальнейшей работе.

Для установления местонахождения исследованных КАЗ в тилакоидной мембране были выделены тилакоиды, из них – фрагменты тилакоидных

мембран, обогащенные или ФС2 или ФС1, ФС2-мембраны и ФС1-мембраны (Результаты, раздел 3.8). При получении из тилакоидов растений мутантных по α КА4 мембран, обогащенных ФС2, возникли сложности, и решение этой проблемы с помощью повышения концентрации магния (Табл. 13) при выделении мембран дало дополнительное косвенное свидетельство связи этой КА с PsbS белком. В работе (Kiss et al., 2008) было показано, что PsbS увеличивает ассоциацию ССК2 с ФС2 в тилакоидной мембране при увеличении концентрации Mg^{2+} . Если α КА4 располагается вблизи ФС2 и активирует PsbS белок, то ее отсутствие могло повлиять на способность PsbS белка увеличивать степень взаимодействия ССК2 и ФС2, что и приводило к неудачному выделению ФС2-мембран при более низких концентрациях магния. В мутантах по α КА2 присутствует α КА4, и проблем с выделением ФС2-мембран не возникало.

Используя довольно необычное свойство карбоангидраз α -семейства (Pies et al., 2004) увеличивать активность в присутствии микромолярных концентраций веществ, при более высоких концентрациях, действующих как ингибиторы, в частности, ацетазоламида, мы показали, что α КА4 расположена вблизи ФС2 (Результаты, раздел 3.8.2). Это хорошо соответствует выводам, сделанным выше о ее связи с PsbS белком, который располагается среди хлорофилл-связывающих белков антенны ФС2. КА-активность ФС2-мембран из мутанта по α 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. Используя это же свойство карбоангидраз α -семейства получены данные, которые позволяют предполагать, что α КА2 расположена на стромальной стороне тилакоидов (Результаты, раздел 3.8.2).

В таблице 17 представлено изменение исследованных свойств мутантов по генам *At4g20990* и *At2g28210*, кодирующим α КА4 и α КА2, относительно свойств растений ДТ. Видно, что отсутствие одной из этих КАз приводило к фенотипу, отличающемуся от ДТ в противоположную сторону по сравнению с фенотипом мутанта по другой КА.

Таблица 17. Сравнение свойств растений мутантных по генам *At4g20990* и *At2g28210*, кодирующим α КА4 и α КА2.

Свойства	Мутант по α КА2	Мутант по α КА4
Вес мутантных растений % от ДТ	~70	110-120
Содержание крахмала % от ДТ	80-90	180-250
Эффективный квантовый выход ФС2	При всех [CO ₂] ниже, чем у ДТ	Зависит от содержания CO ₂ , при оптимальной [CO ₂] выше ДТ
Энергозависимый компонент НФХТ, qE	Выше, чем у ДТ при оптимальной [CO ₂]	Ниже, чем у ДТ при оптимальной [CO ₂]
Оносительный уровень восстановления пула пластохинона	Ниже, чем у ДТ	Выше, чем у ДТ
Устойчивость ФС2 к фотоингибированию	Как у ДТ	Ниже, чем у ДТ
Квантовый выход ФС1	Выше, чем у ДТ	Ниже, чем у ДТ
Скорость ассимиляции CO ₂	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

Таким образом, основным результатом проведенного исследования состоит в том, что установлено участие α КА4 и α КА2 в метаболизме высшего растения *Arabidopsis 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, - α КА4 способствует усилению этой диссипации, а α КА2 – ее уменьшению. Такое разнонаправленное действие этих ферментов обеспечивает оперативную настройку фотосинтетического аппарата растений необходимую для оптимального функционирования в конкретных условиях окружающей среды.

С учетом обнаруженного влияния мутаций по α КА4 и α КА2, т.е. отсутствия этих КА в растении, 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 КА3 в тилакоидах предлагается предварительная схема их включения в процессы, протекающие в ФЭТЦ на свету (Рис. 32). Мы считаем, что α 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, α КА4 позволяет обеспечить PsbS белок протонами даже при активном синтезе АТФ. Стимуляция карбоангидразной реакции в направлении высвобождения протонов происходит именно на свету, когда концентрация бикарбоната в люменальном пространстве уменьшается при закачке протонов в люмен при функционировании ФЭТЦ. Последняя реакция катализируется люменальной КА3ой (Fedorchuk et al., 2014).

ВЫВОДЫ

1. Найдено, что гены, кодирующие карбоангидразы α КА4 и α КА2, экспрессируются в листьях растений *Arabidopsis thaliana* (var. Columbia), причем уровень их экспрессии зависит от освещения и концентрации CO_2 в воздухе. При увеличении освещенности растений увеличивалась экспрессия обоих генов. При концентрации CO_2 750 ppm экспрессия гена *At2g28210*, кодирующего α КА2, была ниже, а экспрессия гена *At4g20990*, кодирующего α КА4, - выше, чем при концентрации 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 α КА2 скорость ассимиляции CO_2 листьями была выше, а образование H_2O_2 на свету и содержание крахмала в листьях были ниже, чем в листьях растений дикого типа. В противоположность этому, в мутанте по α КА4 скорость ассимиляции CO_2 листьями была ниже, а образование H_2O_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 α КА4 было результатом изменения скорости его накопления на свету.

3. Влияние нокаута гена, кодирующего α КА4, на нефотохимическое тушение флуоресценции, и отсутствие во фрагментах тилакоидных мембран, обогащенных фотосистемой 2, из мутантов по α КА4, характерной для карбоангидраз α -семейства стимуляции ацетазоламидом в субмикромольной концентрации карбоангидразной активности свидетельствуют о расположении этой карбоангидразы в тилакоидной мембране вблизи фотосистемы 2. Влияние нокаута гена, кодирующего α КА2, на нефотохимическое тушение флуоресценции, и отсутствие стимуляции ацетазоламидом карбоангидразной активности целых тилакоидов, выделенных из растений, мутантных по α КА2, но наличие таковой в

тилакоидах из мутантов по α КА4, предполагают расположении этой карбоангидразы на стромальной стороне тилакоидной мембраны.

4. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* листьев растений, нокаутированных по гену *At4g20990*, кодирующего α КА4, было на 30-40% меньше, чем в растениях дикого типа, а у растений, нокаутированных по гену *At2g28210*, кодирующего α 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 α 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 α КА2 и α 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutteri, R., and Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase. *Nature*, 370, 25.
2. Adams III, W. W., Muller, O., Cohu, C. M., and Demmig-Adams, B. (2013). May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynthesis Research*, 117(1-3), 31-44.
3. Alber, B. E., and Ferry, J. G. (1994). A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 6909-6913.
4. Alterio, V., Langella, E., De Simone, G., and Monti, S. M. (2015). Cadmium-containing carbonic anhydrase CDCA1 in marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Marine drugs*, 13(4), 1688-1697.
5. Amerongen, H., and Croce, R. (2013). Light harvesting in photosystem II. *Photosynthesis Research*, 116(2-3), 251-263.
6. Amunts, A., Drory, O., Nelson, N. (2007). The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature*, 447, 58 – 63.
7. Arnoux, P., Morosinotto, T., Saga, G., Bassi, R., and Pignol, D. (2009). A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(7), 2036-2044.
8. Badger, M. R., and Price, G. D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 45(1), 369-392.
9. Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J. D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433(7028), 892-895.
10. Bendall, D. S., and Howe, C. J. (2016). The Interaction between cytochrome *f* and plastocyanin or cytochrome *c*₆. In: *Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling* (pp. 631-655). Springer Netherlands.
11. Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(14), 4352-4356.
12. Benz, J. P., Lintala, M., Soll, J., Mulo, P., and Bölder, B. (2010). A new concept for ferredoxin–NADP (H) oxidoreductase binding to plant thylakoids. *Trends in plant science*, 15(11), 608-613.

13. Bird, I. F., Cornelius, M. J., and Keys, A. J. (1980). Effect of carbonic anhydrase on the activity of ribulose biphosphate carboxylase. *Journal of Experimental Botany*, 31(2), 365-369.
14. Bonente, G., Howes, B. D., Caffarri, S., Smulevich, G., and Bassi, R. (2008). Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8434-8445.
15. Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A., and Camara, B. (1996). Xanthophyll biosynthesis cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of β -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 28861-28867.
16. Bradfield, J. R. G. (1947). Plant carbonic anhydrase. *Nature*, 159(4040), 467-467.
17. Braun, H. P., and Zabaleta, E. (2007). Carbonic anhydrase subunits of the mitochondrial NADH dehydrogenase complex (complex I) in plants. *Physiologia Plantarum*, 129(1), 114-122.
18. Burén, S. (2010). Targeting and function of CAH1-characterisation of a novel protein pathway to the plant cell chloroplast. PhD. *Thesis*, Umea University, Sweden.
19. Burnell, J. N., Gibbs, M. J., and Mason, J. G. (1990). Spinach chloroplastic carbonic anhydrase nucleotide sequence analysis of cDNA. *Plant Physiology*, 92(1), 37-40.
20. Cabiscol, E., and Levine, R. L. (1996). The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 4170-4174.
21. Caffarri, S., Kouřil, R., Kerešiče, S., Boekema, E. J., and Croce, R. (2009). Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *The EMBO journal*, 28(19), 3052-3063.
22. Chegwiddden, W. R., and Carter, N. D. (2000). Introduction to the carbonic anhydrases. In: *The Carbonic Anhydrases* (pp. 13-28). Birkhäuser Basel.
23. Chegwiddden, W. R., Tashian, R. E., and Wiebauer, K. E. (1996). CA IB: a second gene for human carbonic anhydrase I. *Isozyme Bull*, 28, 36.
24. Christianson, D. W., and Cox, J. D. (1999). Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 33-57.
25. Correa-Galvis, V., Redekop, P., Guan, K., Griess, A., Truong, T. B., Wakao, S., Niyogi K.K. and Jahns, P. (2016). Photosystem II subunit PsbS is involved in the induction of

- LHCSR protein-dependent energy dissipation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(33), 17478-17487.
26. Cox, E. H., McLendon, G. L., Morel, F. M., Lane, T. W., Prince, R. C., Pickering, I. J., and George, G. N. (2000). The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase 1. *Biochemistry*, 39(40), 12128-12130.
 27. Cramer, W. A., Hasan, S. S., and Yamashita, E. (2011). The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(7), 788-802.
 28. Cramer, W. A., Savikhin, S., Yan, J., and Yamashita, E. (2010). The enigmatic chlorophyll a molecule in the cytochrome b 6 f complex. In: *The Chloroplast* (pp. 89-94). Springer Netherlands.
 29. Cronk, J. D., Endrizzi, J. A., Cronk, M. R., O'Neill, J. W., and Zhang, K. Y. (2001). Crystal structure of *E. coli* β -carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. *Protein Science*, 10(5), 911-922.
 30. Dall'Osto, L., Caffarri, S., and Bassi, R. (2005). A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *The Plant Cell*, 17(4), 1217-1232.
 31. Dall'Osto, L., Holt, N. E., Kaligotla, S., Fuciman, M., Cazzaniga, S., Carbonera, D., Frank, H.A., Alric, J., and Bassi, R. (2012). Zeaxanthin protects plant photosynthesis by modulating chlorophyll triplet yield in specific light-harvesting antenna subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41820-41834.
 32. Davis, R. A., Innocenti, A., Poulsen, S. A., and Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. Identification of selective inhibitors of the human mitochondrial isozymes VA and VB over the cytosolic isozymes I and II from a natural product-based phenolic library. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 18(1), 14-18.
 33. Di Fiore, A., Pedone, C., D'Ambrosio, K., Scozzafava, A., De Simone, G., and Supuran, C. T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors: valdecoxib binds to a different active site region of the human isoform II as compared to the structurally related cyclooxygenase II 'selective' inhibitor celecoxib. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 16(2), 437-442.
 34. Di Mario, R. J., Quebedeaux, J. C., Longstreth, D., Dassanayake, M., Hartman, M. M., and Moroney, J. V. (2016). The cytoplasmic carbonic anhydrases β CA2 and β CA4 are required for optimal plant growth at low CO₂. *Plant Physiology*, 171(1), 280.

35. Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., and Bassi, R. (2002). Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22750-22758.
36. Düser, M. G., Zarrabi, N., Cipriano, D. J., Ernst, S., Glick, G. D., Dunn, S. D., and Börsch, M. (2009). 36° step size of proton-driven c-ring rotation in FoF1-ATP synthase. *The EMBO journal*, 28(18), 2689-2696.
37. Elleby, B., Chirica, L. C., Tu, C., Zeppezauer, M., and Lindskog, S. (2001). Characterization of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*. *European Journal of Biochemistry*, 268(6), 1613-1619.
38. Eriksson, A. E., Jones, T. A., and Liljas, A. (1988). Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 4(4), 274-282.
39. Eriksson, M., Karlsson, J., Ramazanov, Z., Gardeström, P., and Samuelsson, G. (1996). Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and characterization of a low-CO₂-induced polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 12031-12034.
40. Fabre, N., Reiter, I. M., Becuwe-Linka, N., Genty, B., and Rumeau, D. (2007). Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, 30(5), 617-629.
41. Falkowski, P. G., and Raven, J. A. (2013). *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press.
42. Fan, M., Li, M., Liu, Z., Cao, P., Pan, X., Zhang, H., Zhao, X., Zhang, J., and Chang, W. (2015). Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(9), 729-735.
43. Fedorchuk, T. Y., Rudenko, N., Ignatova, L., and Ivanov, B. (2014). The presence of soluble carbonic anhydrase in the thylakoid lumen of chloroplasts from Arabidopsis leaves. *Journal of Plant Physiology*, 171(11), 903-906.
44. Ferreira, F. J., Guo, C., and Coleman, J. R. (2008). Reduction of plastid-localized carbonic anhydrase activity results in reduced Arabidopsis seedling survivorship. *Plant Physiology*, 147(2), 585-594.
45. Fett, J. P., and Coleman, J. R. (1994). Characterization and expression of two cDNAs encoding carbonic anhydrase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 105(2), 707-713.

46. Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., Rudella, A., Sun, Q., and van Wijk, K. J. (2004). In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *The Plant Cell*, 16(2), 478-499.
47. Fufezan, C., Simionato, D., and Morosinotto, T. (2012). Identification of key residues for pH dependent activation of violaxanthin de-epoxidase from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one*, 7(4), e35669.
48. Fujiwara, S., Fukuzawa, H., Tachiki, A., and Miyachi, S. (1990). Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9779-9783.
49. Fukuzawa, H., Fujiwara, S., Yamamoto, Y., Dionisio-Sese, M. L., and Miyachi, S. (1990). cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: regulation by environmental CO₂ concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(11), 4383-4387.
50. Genty, B., Briantais, J. M., and Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990(1), 87-92.
51. Gerotto, C., Franchin, C., Arrigoni, G., and Morosinotto, T. (2015). *In vivo* identification of photosystem II light harvesting complexes interacting with Photosystem II subunit S. *Plant Physiology*, 168(4), 1747-1761.
52. Golden, S. S. (1995). Light-responsive gene expression in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 177(7), 1651.
53. Gilmore, A. M., and Yamamoto, H. Y. (1991). Zeaxanthin formation and energy-dependent fluorescence quenching in pea chloroplasts under artificially mediated linear and cyclic electron transport. *Plant Physiology*, 96(2), 635-643.
54. Giordano, M., Norici, A., Forssen, M., Eriksson, M., and Raven, J. A. (2003). An anaplerotic role for mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 132(4), 2126-2134.
55. Goral, T. K., Johnson, M. P., Duffy, C. D., Brain, A. P., Ruban, A. V., and Mullineaux, C. W. (2012). Light-harvesting antenna composition controls the macrostructure and dynamics of thylakoid membranes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69(2), 289-301.
56. Govindjee (1995). Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22, 131-160.

57. Hager, A. (1969). Lichtbedingte pH-erniedrigung in einem chloroplasten-kompartiment als ursache der enzymatischen violaxanthin→ zeaxanthin-umwandlung; Beziehungen zur photophosphorylierung. *Planta*, 89(3), 224-243.
58. Haldrup, A., Naver, H., and Scheller, H. V. (1999). The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic Arabidopsis plants lacking the PSI-N subunit of photosystem. *The Plant Journal*, 17(6), 689-698.
59. Hanke, G. U. Y., and Mulo, P. (2013). Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant, Cell and Environment*, 36(6), 1071-1084.
60. Härtel, H., Lokstein, H., Grimm, B., and Rank, B. (1996). Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves: Influence of Antenna Size and Relations to Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching. *Plant Physiology*, 471-482.
61. Hatch, M. D., and Burnell, J. N. (1990). Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C₄ photosynthesis. *Plant Physiology*, 93(2), 825-828.
62. Havaux, M., and Niyogi, K. K. (1999). The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8762-8767.
63. Heldt H.W. (2005) Plant biochemistry, 3rd edn. *Elsevier Academic Press*, London
64. Hewett-Emmett, D. (2000). Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families, in *The Carbonic Anhydrases: New Horizons* (Chegwidden, W. R., Carter, N. D., and Edwards, Y. H., eds.) BirkhauserVerlag, Basel, 29-76.
65. Hieber, D. A., Bugos, R. C., Verhoeven, A. S., and Yamamoto, H. Y. (2002). Overexpression of violaxanthin de-epoxidase: properties of C-terminal deletions on activity and pH-dependent lipid binding. *Planta*, 214(3), 476-483.
66. Hoang, C. V., and Chapman, K. D. (2002). Biochemical and molecular inhibition of plastidial carbonic anhydrase reduces the incorporation of acetate into lipids in cotton embryos and tobacco cell suspensions and leaves. *Plant Physiology*, 128(4), 1417-1427.
67. Horton, P., Ruban, A. V., and Wentworth, M. (2000). Allosteric regulation of the light-harvesting system of photosystem II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355(1402), 1361-1370.
68. Horton, P., Wentworth, M., and Ruban, A. (2005). Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *Febs Letters*, 579(20), 4201-4206.

69. Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordström, M., Böhmer, M., Xue, S., Ries, A., Godoski J., Kuhn J.M., and Schroeder, J. I. (2010). Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology*, 12(1), 87-93.
70. Hu, H., Rappel, W. J., Occhipinti, R., Ries, A., Böhmer, M., You, L., Xiao, C., Engineer C. B., Boron W. F., and Schroeder, J. I. (2015). Distinct cellular locations of carbonic anhydrases mediate carbon dioxide control of stomatal movements. *Plant Physiology*, 169(2), 1168-1178.
71. Ignatova, L. K. and Ivanov, B. N. (2016) Carbonic anhydrases of higher plant thylakoids and their participation in photosynthesis. In: *Handbook of Photosynthesis*, (Mohammad Pessaraki ed.) The University of Arizona, Tucson, Arizona, USA, 193-200.
72. Ignatova, L. K., Moskvina, O. V., Ivanov, B. N., and Romanova, A. K. (1993) The effect of CO₂ uptake by pea protoplasts on O₂ evolution rate and parameters of chlorophyll fluorescence quenching, *Plant Physiol. Biochem.*, 31, 295-301.
73. Ignatova, L. K., Moskvina, O. V., Romanova, A. K., and Ivanov, B. N. (1998). Carbonic anhydrases in the C₃-plant leaf cell. *Functional Plant Biology*, 25(6), 673-677.
74. Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Khristin, M. S., and Ivanov, B. N. (2006). Heterogeneous origin of carbonic anhydrase activity of thylakoid membranes. *Biochemistry (Moscow)*, 71(5), 525-532.
75. Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Mudrik, V. A., and Ivanov, B. N. (2011). Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII. *Photosynthesis Research*, 110(2), 89-98.
76. Ilies, M., Scozzafava, A., and Supuran, C. T. (2004). In: *Carbonic anhydrase activators*, CRC Press: Boca Raton (FL), USA, 317-352.
77. Iino, R., and Noji, H. (2012). Rotary catalysis of the stator ring of F₁-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(10), 1732-1739.
78. Ikeuchi, M., Uebayashi, N., Sato, F., and Endo, T. (2014). Physiological functions of PsbS-dependent and PsbS-independent NPQ under naturally fluctuating light conditions. *Plant and Cell Physiology*, 55(7), 1286-1295.
79. Ivanov, B. N. (1993). Stoichiometry of proton uptake by thylakoids during electron transport in chloroplasts. In *Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity*, Springer Netherlands, 109-128.

80. Ivanov B., Kozuleva M., and Mubarakshina M. (2012) Oxygen metabolism in chloroplast, in: *Cell metabolism-cell homeostasis and stress response*, (Bubulya P., ed.) In Tech, 39–72.
81. Jahns, P., Latowski, D., and Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(1), 3-14.
82. Jansen, M. A., Mattoo, A. K., and Edelman, M. (1999). D1-D2 protein degradation in the chloroplast. *European Journal of Biochemistry*, 260(2), 527-532.
83. Jiang, C., Tholen, D., Xu, J. M., Xin, C., Zhang, H., Zhu, X., and Zhao, Y. (2014). Increased expression of mitochondria-localized carbonic anhydrase activity resulted in an increased biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 57(6), 366-374.
84. Johnson, M. P., Havaux, M., Triantaphylidès, C., Ksas, B., Pascal, A. A., Robert, B., Davison, P. A., Ruban, A. V., and Horton, P. (2007). Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII enhances the resistance of *Arabidopsis* to photooxidative stress by a lipid-protective, antioxidant mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22605-22618.
85. Johnson, M. P., Davison, P. A., Ruban, A. V., and Horton, P. (2008). The xanthophyll cycle pool size controls the kinetics of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 582(2), 262-266.
86. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411(6840), 909-917.
87. Kachru, R. B., and Anderson, L. E. (1974). Chloroplast and cytoplasmic enzymes. *Planta*, 118(3), 235-240..
88. Kamo, T., Shimogawara, K., Fukuzawa, H., Muto, S., and Miyachi, S. (1990). Subunit constitution of carbonic anhydrase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 192(2), 557-562.
89. Kaplan, F., Zhao, W., Richards, J. T., Wheeler, R. M., Guy, C. L., and Levine, L. H. (2012). Transcriptional and metabolic insights into the differential physiological responses of *Arabidopsis* to optimal and supraoptimal atmospheric CO₂. *PLoS One*, 7(8), e43583.

90. Kerešiče, S., Kiss, A. Z., Kouřil, R., Boekema, E. J., and Horton, P. (2010). The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS letters*, 584(4), 759-764.
91. Keren, N., and Krieger-Liszkay, A. (2011). Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. *Physiologia Plantarum*, 142(1), 1-5.
92. Kim, H. J., and Bartlett, S. G. (1996) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing carbonic anhydrase in the antisense orientation can not grow on MS media without sucrose. *Plant Physiol*, 111(2), 358-358.
93. Kimber, M. S. and Pai, E. F. (2000). The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases. *The EMBO journal*, 19(7), 1407-1418.
94. Kirchhoff, H., Horstmann, S., and Weis, E. (2000). Control of the photosynthetic electron transport by PQ diffusion microdomains in thylakoids of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1459(1), 148-168.
95. Kirchhoff H (2014). Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837 (4): 495–502.
96. Kiss, A. Z., Ruban, A. V., and Horton, P. (2008). The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 3972-3978.
97. Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B. E., Ferry, J. G., and Rees, D. C. (1996). A left-hand beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *The EMBO journal*, 15(10), 2323-2330.
98. Kok, B., Forbush, B., and McGloin, M. (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O₂ evolution—I. A linear four step mechanism. *Photochemistry and Photobiology*, 11(6), 457-475.
99. Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J. B., Croce, R., and Boekema, E. J. (2013). High-light vs. low-light: effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(3), 411-419.
100. Koziol, A. G., Borza, T., Ishida, K. I., Keeling, P., Lee, R. W., and Durnford, D. G. (2007). Tracing the evolution of the light-harvesting antennae in chlorophyll a/b-containing organisms. *Plant Physiology*, 143(4), 1802-1816.

101. Khristin, M. S., Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Ivanov, B. N., and Klimov, V. V. (2004). Photosystem II associated carbonic anhydrase activity in higher plants is situated in core complex. *FEBS letters*, 577(1-2), 305-308.
102. Kruk, J., and Karpinski, S. (2006). An HPLC-based method of estimation of the total redox state of plastoquinone in chloroplasts, the size of the photochemically active plastoquinone-pool and its redox state in thylakoids of Arabidopsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(12), 1669-1675.
103. Kyle, D. J., Ohad, I., and Arntzen, C. J. (1984). Membrane protein damage and repair: Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(13), 4070-4074.
104. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003). Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, 302(5647), 1009-1014.
105. Lau, W. C., and Rubinstein, J. L. (2012). Subnanometre-resolution structure of the intact *Thermus thermophilus* H⁺-driven ATP synthase. *Nature*, 481(7380), 214-218.
106. Li, X. P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 403(6768), 391-395.
107. Li, X. P., Müller-Moulé, P., Gilmore, A. M., and Niyogi, K. K. (2002). PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 15222-15227.
108. Lichtenthaler, H. K. (2007). Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research*, 92(2), 163-179.
109. Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., and Knapp, M. (2005). How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43(3), 379-393.
110. Liljas, A., Kannan, K. K., Bergsten, P. C., Waara, I., Fridborg, K., Strandberg, B., Carlsson, U., Jarup, L. and Petef, M. (1972). Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nature: New biology*, 235(57), 131-137.
111. Lindskog, S., and Silverman, D. N. (2000). The catalytic mechanism of mammalian carbonicanhydrases. In: *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*,

- (Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., eds.) BirkhäuserVerlag, Basel, Switzerland, 175–195.
112. Loef, I., Stitt, M., and Geigenberger, P. (2001). Increased levels of adenine nucleotides modify the interaction between starch synthesis and respiration when adenine is supplied to discs from growing potato tubers. *Planta*, 212(5-6), 782-79..
 113. Lonergan, T. A., and Sargent, M. L. (1978). Effects of acetazolamide (Diamox), ethoxzolamide and high levels of CO₂ on carbonic anhydrase, photosystem activity, and oxygen evolution in *Euglena gracilis*. *Physiologia Plantarum*, 43(1), 55-61.
 114. Lu Y.K., Stemler A.J. (2002). Extrinsic photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts. *Plant Physiology*. 266, 16746-16754.
 115. Majeau, N., and Coleman, J. R. (1992). Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding tobacco chloroplastic carbonic anhydrase. *Plant Physiology*, 100(2), 1077.
 116. Majeau, N., and Coleman, J. R. (1994). Correlation of carbonic anhydrase and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea. *Plant Physiology*, 104(4), 1393-1399.
 117. Majeau, N., and Coleman, J. R. (1996). Effect of CO₂ concentration on carbonic anhydrase and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea. *Plant Physiology*, 112(2), 569-574.
 118. Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N. B., Poulsen, S. A., Scozzafava, A., Quinn R.J., and Supuran, C. T. (2009). Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: Coumarins are a new class of suicide inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 131(8), 3057-3062.
 119. Martin, V., Villarreal, F., Miras, I., Navaza, A., Haouz, A., González-Lebrero, R. M., Kaufman, S.B., and Zabaleta, E. (2009). Recombinant plant gamma carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon. *FEBS letters*, 583(21), 3425-3430.
 120. McCauley, S. W., and Melis, A. (1986). Quantitation of plastoquinone photoreduction in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 8(1), 3-16.
 121. Meldrum, N. U., and Roughton, F. J. W. (1933). Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *The Journal of Physiology*, 80(2), 113.
 122. Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology*, 62(2), 327-367.

123. Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Tatzuo U., Shigetoh M., and Tsukihara, T. (2000). X-ray structure of β -carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5521-5526.
124. Moroney, J. V., Bartlett, S. G., and Samuelsson, G. (2001). Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell and Environment*, 24(2), 141-153.
125. Moroney, J. V., Ma, Y., Frey, W. D., Fusilier, K. A., Pham, T. T., Simms, T. A., and Mukherjee, B. (2011). The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynthesis Research*, 109(1-3), 133-149.
126. Moskvin, O. V., Ovchinnikova, V. I., and Ivanov, B. N. (1996). Effect of light on the carbonic anhydrase activity of pea thylakoids. *Biophysics*, 5(41), 1067-1072.
127. Moskvin, O. V., Shutova, T. V., Khristin, M. S., Ignatova, L. K., Villarejo, A., Samuelsson, G., Klimov, V.V., and Ivanov, B. N. (2004). Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids. *Photosynthesis research*, 79(1), 93-100.
128. Mubarakshina, M., Khorobrykh, S., and Ivanov, B. (2006). Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(11), 1496-1503.
129. Müller, P., Li, X. P., and Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125(4), 1558-1566.
130. Mulo, P., Sicora, C., and Aro, E. M. (2009). Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(23), 3697-3710.
131. Murchie, E. H., and Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983.
132. Nair, S. K., Ludwig, P. A., and Christianson, D. W. (1994). Two-site binding of phenol in the active site of human carbonic anhydrase II: structural implications for substrate association. *Journal of the American Chemical Society*, 116(8), 3659-3660.
133. Neri, D., and Supuran, C. T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(10), 767-777.
134. Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., and Jahns, P. (2010). Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent

- component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(4), 466-475.
135. Okabe, K., Yang, S. Y., Tsuzuki, M., and Miyachi, S. (1984). Carbonic anhydrase: its content in spinach leaves and its taxonomic diversity studied with anti-spinach leaf carbonic anhydrase antibody. *Plant Science Letters*, 33(2), 145-153.
136. Pagliano, C., Nield, J., Marsano, F., Pape, T., Barera, S., Saracco, G., and Barber, J. (2014). Proteomic characterization and three-dimensional electron microscopy study of PSII–LHCII supercomplexes from higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(9), 1454-1462.
137. Peltier, G., and Cournac, L. (2002). Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 523-550.
138. Perales, M., Eubel, H., Heinemeyer, J., Colaneri, A., Zabaleta, E., and Braun, H. P. (2005). Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I+III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*. *Journal of molecular biology*, 350(2), 263-277.
139. Porter, M. A., and Grodzinski, B. (1984). Acclimation to high CO₂ in bean carbonic anhydrase and ribulose biphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, 74(2), 413-416.
140. Price, G. D., von Caemmerer, S., Evans, J. R., Yu, J. W., Lloyd, J., Oja, V., Kell, P., Harrison, K., Gallagher, A., and Badger, M. R. (1994). Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO₂ assimilation. *Planta*, 193, 331-340.
141. Quick, W. P., and Stitt, M. (1989). An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 977(3), 287-296.
142. Raven, J. A. (2011). The cost of photoinhibition. *Physiologia Plantarum*, 142(1), 87-104.
143. Raven, J. A., and Newman, J. R. (1994). Requirement for carbonic anhydrase activity in processes other than photosynthetic inorganic carbon assimilation. *Plant, Cell and Environment*, 17(2), 123-130.

144. Roberts, S. B., Lane, T. W., and Morel, F. M. (1997). Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira Weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 33(5), 845-850.
145. Rochaix, J. D. (2011). Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(3), 375-383.
146. Roeske, C. A., and Ogren, W. L. (1990). Nucleotide sequence of pea cDNA encoding chloroplast carbonic anhydrase. *Nucleic Acids Research*, 18(11), 3413.
147. Rowlett, R. S. (2010). Structure and catalytic mechanism of the β -carbonic anhydrases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 362-373.
148. Rowlett, R. S. (2014). Structure and catalytic mechanism of β -carbonic anhydrases. In *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, Springer Netherlands, 53-76.
149. Ruban, A. V., and Johnson, M. P. (2009). Dynamics of higher plant photosystem cross-section associated with state transitions. *Photosynthesis research*, 99(3), 173-183.
150. Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiology*, 170(4), 1903-1916.
151. Rudenko N.N, Ignatova L.K. and Ivanov B.N. (2007). Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms. *Photosynthesis Research*. 91, 81–89.
152. Rumeau, D., Cuiné, S., Fina, L., Gault, N., Nicole, M., and Peltier, G. (1996). Subcellular distribution of carbonic anhydrase in *Solanum tuberosum* L. leaves. *Planta*, 199(1), 79-88.
153. Saga, G., Giorgetti, A., Fufezan, C., Giacometti, G. M., Bassi, R., and Morosinotto, T. (2010). Mutation analysis of violaxanthin de-epoxidase identifies substrate-binding sites and residues involved in catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 23763-23770.
154. Saroussi, S., Schushan, M., Ben-Tal, N., Junge, W., and Nelson, N. (2012). Structure and flexibility of the C-ring in the electromotor of rotary $F_0 F_1$ -ATPase of pea chloroplasts. *PLoS One*, 7(9), e43045.
155. Sawaya, M. R., Cannon, G. C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E. B., Yeates, T. O., and Kerfeld, C. A. (2006). The structure of β -carbonic anhydrase from the

- carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7546-7555.
156. Shen, J. R. (2015). The structure of photosystem II and the mechanism of water oxidation in photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 23-48.
 157. Shi, L. X., and Schröder, W. P. (2004). The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1608(2), 75-96.
 158. Shi, L. X., Hall, M., Funk, C., and Schröder, W. P. (2012). Photosystem II, a growing complex: updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 13-25.
 159. Shutova, T., Kenneweg, H., Buchta, J., Nikitina, J., Terentyev, V., Chernyshov, S., Andersson, B., Allakhverdiev, S.I., Klimov, V.V., Dau, H., Junge, W., and Samuelsson, G. (2008) The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal, *The EMBO journal*, 27(5), 782-791.
 160. Silverman, D. N., McKenna, R. (2007). Solvent-mediated proton transfer in catalysis by carbonic anhydrase. *Accounts of Chemical Research*, 40(8), 669-675.
 161. Silverman, D. N. (1991). The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Canadian Journal of Botany*, 69(5), 1070-1078.
 162. Sly, W. S., and Hu, P. Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 375-401.
 163. Slaymaker, D. H., Navarre, D. A., Clark, D., delPozo, O., Martin, G. B., and Klessig, D. F. (2002). The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11640-11645.
 164. Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T. S., and Ferry, J. G. (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15184-15189.
 165. So, A. K. C., Espie, G. S., Williams, E. B., Shively, J. M., Heinhorst, S., and Cannon, G. C. (2004). A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (ϵ class) is a component of the carboxysome shell. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 623-630.

166. Soltes-Rak, E., Mulligan, M. E., and Coleman, J. R. (1997). Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 769-774.
167. Stemler, A. (1979). A dynamic interaction between the bicarbonate ligand and photosystem II reaction center complexes in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 545(1), 36-45.
168. Stemler, A. (1986). Carbonic anhydrase associated with thylakoids and photosystem II particles from maize. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 850(1), 97-107.
169. Stemler, A. J. (1997). The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase. *Physiologia Plantarum*, 99(2), 348-353.
170. Stemler, A., and Murphy, J. (1983). Determination of the binding constant of H_2CO_3 to the photosystem II complex in maize chloroplasts: effects of inhibitors and light. *Photochemistry and Photobiology*, 38(6), 701-707.
171. Stirbet, A., Riznichenko, G. Y., and Rubin, A. B. (2014). Modeling chlorophyll a fluorescence transient: relation to photosynthesis. *Biochemistry (Moscow)*, 79(4), 291-323.
172. Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286(5445), 1700-1705.
173. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L., and Picot, D. (2003). An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature*, 426(6965), 413-418.
174. Sun, M. K., and Alkon, D. L. (2002). Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(2), 83-89.
175. Sunderhaus, S., Dudkina, N. V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta E., Boekema E., and Braun, H. P. (2006). Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6482-6488.
176. Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 168-181.
177. Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(12), 3467-3474.
178. Swader, J. A., and Jacobson, B. S. (1972). Acetazolamide inhibition of photosystem II in isolated spinach chloroplasts. *Phytochemistry*, 11(1), 65-70.

179. Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., and Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrase activators: Kinetic and X-ray crystallographic study for the interaction of d- and l-tryptophan with the mammalian isoforms I–XIV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(18), 8373-8378.
180. Thornton, L. E., Roose, J. L., Pakrasi, H. B., and Ikeuchi, M. (2005). The low molecular weight proteins of photosystem II. In: *Photosystem II*. Springer Netherlands, 121-137
181. Tikhonov, A. N. (2013). pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 116(2-3), 511-534.
182. Tikkanen, M., Mekala, N. R., and Aro, E. M. (2014). Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(1), 210-215.
183. Tripp, B. C., Bell, C. B., Cruz, F., Krebs, C., and Ferry, J. G. (2004). A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6683-6687.
184. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., and Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473(7345), 55-60.
185. Utsunomiya, E., and Muto, S. (1993). Carbonic anhydrase in the plasma membranes from leaves of C3 and C4 plants. *Physiologia Plantarum*, 88(3), 413-419..
186. Vainonen, J. P., Hansson, M., and Vener, A. V. (2005). STN8 protein kinase in *Arabidopsis thaliana* is specific in phosphorylation of photosystem II core proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33679-33686.
187. Vaklinova, S. G., Goushtina, L. M., and Lazova, G. N. (1982). Carboanhydrase activity in chloroplasts and chloroplast fragments. *Acad. bulg. sci*, 35(12), 1721-1724.
188. Veitch, F., and Blankenship, L. (1963). Carbonic anhydrase in bacteria. *Nature*, 197, 76.
189. 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. *The EMBO journal*, 21(8), 1930-1938..
190. Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., DeJardin, A., Monne, M., Rudhe, Ch., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L., and Samuelsson, G. (2005). Evidence for a protein transported through the secretory pathway *en route* to the higher plant chloroplast, *Nature Cell Biology*, 7(12), 1224-1231.

191. Vinyard, D. J., Gimpel, J., Ananyev, G. M., Cornejo, M. A., Golden, S. S., Mayfield, S. P., and Dismukes, G. C. (2013). Natural variants of photosystem II subunit D1 tune photochemical fitness to solar intensity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5451-5462.
192. Viparelli, F., Monti, S. M., De Simone, G., Innocenti, A., Scozzafava, A., Xu, Y., Morel, M. M., and Supuran, C. T. (2010). Inhibition of the R1 fragment of the cadmium-containing ζ -class carbonic anhydrase from the diatom *Thalassiosira weissflogii* with anions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(16), 4745-4748.
193. Zabaleta, E., Martin, M. V., and Braun, H. P. (2012). A basal carbon concentrating mechanism in plants?. *Plant Science*, 187, 97-104.
194. Wang, X., Suzawa, T., Ohtsuka, H., Zhao, B., Miyamoto, Y., Miyauchi T., Nishimira, R., Inoue T., Nakamura, M., Baba, K., and Kamijo, R. (2010). Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 225(3), 709-719.
195. Winterman, J. F. G., and De Mots, A. (1965). Absorption spectra of chlorophyll a and b in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta*, 109, 448-453.
196. Wraight, C. A., and Crofts, A. R. (1970). Energy-dependent quenching of chlorophyll *a* fluorescence in isolated chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 17(2), 319-327.
197. Xia, D., Esser, L., Tang, W. K., Zhou, F., Zhou, Y., Yu, L., and Yu, C. A. (2013). Structural analysis of cytochrome *bc1* complexes: implications to the mechanism of function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(11), 1278-1294.
198. Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P. D., Shi, Y., and Morel, F. M. (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452(7183), 56-61.
199. Yamamoto, H. Y., Wang, Y., and Kamite, L. (1971). A chloroplast absorbance change from violaxanthin de-epoxidation. A possible component of 515 nm changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 42(1), 37-42.
200. Yamamoto, H. Y. (1979). Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure and Applied Chemistry*, 51(3), 639-648.
201. Yano, J., Kern, J., Yachandra, V. K., Nilsson, H., Koroidov, S., and Messinger, J. (2015). Light-dependent production of dioxygen in photosynthesis. In *Sustaining Life on*

- Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxygen and Other Chewy Gases*, Springer International Publishing, 13-43.
202. Zimmerman, S. A., and Ferry, J. G. (2008). The β and γ classes of carbonic anhydrase. *Current pharmaceutical design*, 14(7), 716-721.
203. Борисова-Мубаракшина М. М., Ветошкина Д. В., Руденко Н. Н., Ширшикова Г. Н., Федорчук Т. П., Найдов И. А., Иванов Б. Н. (2014). Размер светособирающей антенны фотосистемы 2 высших растений при изменении освещенности регулируется на уровне транскрипции генов антенных белков. *Биохимия*, 79(6), 661–665.
204. Иванов Б. Н., Игнатова Л. К., Романова А. К. (2007). Разнообразие форм и функций карбоангидразы высших наземных растений. *Физиология растений*, 54(2), 165–185.
205. Игнатова Л. К., Романова А. К. (1992). Участие карбоангидразы в ингибировании фотосинтеза протопластов гороха избытком CO₂. *Физиология растений*. 39(4), 711-717.
206. Комарова Ю. М., Доман Н. Г., Шапошникова Г. Л. (1982). Две формы карбоангидразы в хлоропластах бобов. *Биохимия*. 47(6), 1027-1034.
207. Корнеев Д. Ю. (2002). Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. *К. Альтерпрес*.
208. Москвин О. В., Игнатова Л. К., Овчинникова В. И., Иванов Б. Н. (1995). Мембраносвязанная карбоангидраза тилакоидов гороха. *Биохимия*. 60, 1130-1137.
209. Пронина Н. А., Семененко В. Е. (1984). Локализация мембраносвязанной и растворимой форм карбоангидразы в клетке хлореллы. *Физиология растений*. 31(2), 241-251.
210. Пронина Н. А., Аллахвердиев С. И., Куприянова Е. В., Клячко-Гурвич Г. Л., Климов В. В. (2002). Локализация карбоангидразы в субхлоропластных частицах гороха. *Физиология растений*, 49(3), 341-349.
211. Пронина Н. А., Семененко В. Е. (1988). Локализация связанной карбоангидразы в мембранах клеток хлореллы. *Физиология растений* 35(1), 51-61.
212. Руденко Н. Н., Игнатова Л. К., Каморницкая В. Б., Иванов Б. Н. (2006). Присутствие нескольких карбоангидраз в тилакоидах листьев гороха, *Доклады Академии Наук*, 408(4), 1-4

213. Семененко В. Е., Аврамова С., Георгиев Д., Пронина Н. А. (1977). Сравнительное изучение активности и локализации карбоангидразы в клетках *Chlorella* и *Scenedesmus*. *Физиология растений*, 24(5), 1055.
214. Семенова Г. А., Романова А. К. (2011). «Кристаллы» в листьях сахарной свеклы *Beta vulgaris L.* *Цитология*, 53, 90-97.
215. Шитов А.В., Побегуц О.В., Смолова Т. Н., Аллахвердиев С. И., Климов В. В. (2009). Марганецзависимая карбоангидразная активность белков фотосистемы 2. *Биохимия*. 74(5), 629 – 639.
216. Шмелева В.Л., Иванов Б.Н., Пигулевская Т.К., Чернавина И.А. (1984). Электронный транспорт и фотофосфорилирование в хлоропластах растений овса при избытке цинка в среде выращивания. *Физиология и биохимия культурных растений*, 16, 31-37.