

УДК 577.1

КАРБОАНГИДРАЗЫ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Обзор

© 2015 Н.Н. Руденко, Л.К. Игнатова,
Т.П. Федорчук, Б.Н. Иванов*

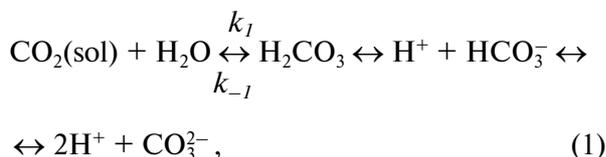
Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино; факс: +7(4967)330-532,
электронная почта: ivboni@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.01.15
После доработки 27.02.15

Представлены сведения о карбоангидразах – ферментах, катализирующих реакцию взаимопревращения углекислого газа и бикарбоната в водных растворах, описаны их семейства и рассмотрены данные о наличии представителей этих семейств в разных классах организмов, прежде всего, в высших растениях. Перечислены доказанные и предполагаемые функции карбоангидраз в организмах. Особое внимание обращено на функции фермента, обеспечивающие протекание реакций фотосинтеза, в частности, в водорослях. Обсуждаются сведения о возможных функциях карбоангидраз плазматической мембраны, митохондрий и стромы хлоропластов высших растений, а также о карбоангидразах тилакоидов хлоропластов, их количестве и возможном участии в фотосинтетических реакциях в этой структуре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карбоангидраза, семейства карбоангидраз, растения, фотосинтез, хлоропласты, тилакоиды.

Карбоангидразы катализируют реакцию обратимой гидратации углекислого газа:



которая в отсутствие карбоангидразы при 37° и нейтральных рН имеет константу скорости второго порядка k_1 , равную $0,0027 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, что соответствует константе псевдопервого порядка $0,15 \text{ c}^{-1}$; реакция дегидратации имеет константу k_{-1} , равную 50 c^{-1} . Эти константы обуславливают отношение $[\text{CO}_2] : [\text{H}_2\text{CO}_3]$ в водном растворе, равное 340 : 1. Угольная кислота H_2CO_3 в водном растворе диссоциирует с $\text{pK}_1 6,35$ и $\text{pK}_2 10,25$, т.е. при нейтральных рН преобладает бикарбонат ион HCO_3^- . Поэтому часто реакцию (1) записывают без угольной кислоты. Карбоангидразы сильно ускоряют обе реакции, особенно гидра-

тацию. Наиболее активные ферменты, карбоангидразы II человека, гидратируют CO_2 с k_{cat} , превышающей 10^6 c^{-1} , при том, что константа дегидратации возрастает до $2,5 \times 10^5 \text{ c}^{-1}$ [1]. Скорость реакции гидратации CO_2 , катализируемой данной КА, является одной из самых быстрых ферментативных реакций. КА растений имеют, как правило, более низкие величины констант соответствующих реакций; величина k_{cat} гидратации CO_2 растворимой КА гороха равна $4 \times 10^5 \text{ c}^{-1}$ [2].

СЕМЕЙСТВА КАРБОАНГИДРАЗ И НАЛИЧИЕ ИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ В ОРГАНИЗМАХ

Карбоангидраза впервые была найдена в красных кровяных тельцах в 1933 г. [3]. В дальнейшем многочисленные биохимические исследования КА позволили обнаружить ее во всех органах, тканях и клетках живых организмов, от прокариот до человека [4]. Согласно наличию консервативных последовательностей в генах, кодирующих КА, выделяют шесть эволюционно независимых семейств [5, 6], названных α , β , γ , δ , ϵ и ζ . Хотя эти ферменты негомологичны по структуре и имеют различия в строении актив-

Принятые сокращения: КА – карбоангидраза; Рубиско – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа; ФС1 и ФС2 – фотосистемы 1 и 2.

* Адресат для корреспонденции.

ного центра, все они были названы карбоангидразами, поскольку катализируют одну и ту же реакцию по схожим механизмам, отличающихся в деталях, связанных с особенностями окружения атома металла (чаще всего – цинка), присутствующего в активном центре всех КА. Как считается в настоящее время, КА возникли в ходе эволюции не один раз. Имеется яркий пример, когда в одном одноклеточном организме присутствуют представители четырех семейств: в диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* найдены две α -КА, четыре γ -КА, четыре δ -КА и одна ζ -КА [6].

α -КА. Представители семейства α -КА широко распространены и встречаются в эубактериях [7, 8], аскомицетах [9], водорослях [10, 11], высших растениях [12–14] и животных. Только α -КА присутствуют в тканях позвоночных животных; при этом представлены они 16 изоформами [15] и, несмотря на то, что принадлежат одному семейству, имеют различия в структуре активного центра, что определяет степень их активности.

Первыми α -КА, обнаруженными в клетках растений, были периплазматические КА водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*; эти КА были названы САН1 и САН2 [10, 11]. Несмотря на высокое структурное сходство, САН1 интенсивно экспрессируется при низкой концентрации CO_2 в воде, тогда как САН2 обладает невысоким уровнем экспрессии при любых условиях, повышающимся, напротив, при высокой концентрации углекислоты. Еще одна α -КА, мембрано-связанная форма фермента, САН3, была обнаружена в частицах ФС2, выделенных из *Ch. reinhardtii* [16].

В геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено восемь генов, кодирующих α -КА, и о местоположении только одной из них α -КА1 были получены убедительные данные. α -КА1 присутствует во всех органах растения, кроме корней [12]. Эта КА была найдена с помощью вестерн-блот анализа при исследовании недавно обнаруженного пути прохождения вновь синтезированных белков в хлоропласт через мембранную систему аппарата Гольджи [13]. О других α -КА *A. thaliana* имеются только отрывочные сведения. Ген, кодирующий α -КА2, экспрессировался в стебле и корнях, α -КА3 – в цветах и стручках [12]. Последняя была найдена при проведении протеомного анализа белков зрелой пыльцы [17, 18]. При проведении такого анализа белков тилакоидных мембран была обнаружена α -КА4 [19, 20].

Большинство α -КА представляют собой мономерные с мол. массой ~30 кДа, одним из немногих исключений является САН1 *Ch. reinhardtii* – гетеротетрамер, состоящий из двух субъединиц

с мол. массой 37 кДа и двух – 4 кДа [21]. Активный центр α -КА – коническая полость слегка искаженной тетраэдрической формы, на дне которой расположен Zn [22], координированный тремя гистидинами. Кроме взаимопревращения CO_2 и HCO_3^- , α -КА способны катализировать ряд других реакций, таких как гидратация альдегидов [23], гидролиз карбоксилированных эфиров [24] и различных производных галогенов [25].

β -КА. В 1939 г. Нейш [26] обнаружил КА в составе белков хлоропластов, но лишь спустя 50 лет, с появлением технологии секвенирования ДНК, было показано, что фермент не гомологичен известным на тот момент КА из тканей животных, и КА были разделены на два семейства – α -КА животных и β -КА растений [27]. Представители β -КА встречаются в клетках бактерий [28–31], грибах рода *Saccharomyces* [32], водорослях [33, 34], двудольных и однодольных высших растениях, как с С3-, так и с С4-типом фотосинтеза [35–37]. Ни одно другое семейство КА не обнаруживает такого широкого структурного разнообразия. Мол. масса β -КА варьирует от 45 до 200 кДа [38], и в структуре этих КА блоками являются димеры (или псевдодимеры), из которых формируются молекулы тетрамеров и октамеров, мономеров которых содержат один реакционный центр с атомом цинка, координированным двумя остатками цистеина и одним остатком гистидина [39].

В высших растениях (с С3-типом фотосинтеза) растворимая КА хлоропластов (фермент с высокой скоростью катализа) – самый распространенный (после Рубиско) белок в клетке и один из основных компонентов растворимого белка листьев (0,5–2,0% от общего количества) [40]. В тканях листа были обнаружены две изоформы растворимого фермента [41], и позже показана экспрессия двух разных генов β -КА в листьях арабидопсиса [37]. Долгое время эти две КА считались единственными в клетках С3-растений; данные указывали, что вторая КА расположена в цитоплазме [42]. Всего в геноме *A. thaliana* присутствуют шесть генов, кодирующих β -КА, и все эти гены экспрессируются [12]. Авторы работы [12] предложили нумерацию α - и β -карбоангидраз, которая теперь используется в литературе. Той же группой исследователей с использованием метода встраивания гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP-fusion) было подтверждено местонахождение двух самых активных КА, которые были названы β -КА1 (стромальная) и β -КА2 (цитоплазматическая). Также было показано расположение в клетках арабидопсиса еще нескольких β -КА: β -КА3 – в цитоплазме, β -КА4 – в плазмалемме, β -КА6 – в

матрикс митохондрий и β -КА5 – в хлоропластах. Более точное положение последней не было установлено.

γ -КА. Первый представитель семейства γ -КА был впервые открыт в архебактерии *Methanosarcina thermophila* [43] и, как теперь известно, γ -КА присутствуют в клетках не только бактерий, но и зеленых, и диатомовых водорослей [6]. В высших растениях γ -КА найдены в митохондриях. Строение γ -КА сильно отличается от строения α - и β -КА. Они функционируют как тримеры, состоящие из идентичных субъединиц, в которых превалируют β -складчатые структуры [44], и содержат один атом цинка на каждую субъединицу; в γ -КА в отличие от α - и β -КА, активный центр расположен между субъединицами. Активный центр γ -КА образован тремя остатками гистидина и H_2O , координирующими атом Zn, как и активный центр α -КА, но у γ -КА это – гистидины двух противоположных субъединиц [44].

δ -КА и ϵ -КА. Представители этих семейств, обнаруженные в клетках диатомовой водоросли *Thalassiosira weissfloggi* и бактерии *Thiobacillus neapolitanus*, соответственно, не имеют гомологии в аминокислотной последовательности с представителями других семейств КА, хотя строение их активного центра похоже на такое у представителей α -семейства [45–47].

ζ -КА. Эти КА встречаются у морских одноклеточных организмов, в частности, у диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* [6], и по своему строению сильно напоминают β -КА [48, 49]. Все ζ -КА, по-видимому, являются псевдотримерами с тремя немного отличающимися друг от друга каталитическими центрами [50], содержащими Cd^{2+} вместо Zn^{2+} . Считается, что в клетках диатомовых водорослей δ - и ζ -КА играют роль в фиксации CO_2 [50].

ФУНКЦИИ КАРБОАНГИДРАЗ

Наличие карбоангидраз во всех организмах обусловлено, вероятно, тем, что компоненты катализируемых ими реакций вовлечены практически во все метаболические процессы. По нашему мнению, основной причиной широкого распространения карбоангидраз в живой природе явилось присутствие бикарбонатного буфера в водной среде, а затем и цитоплазме на всех этапах эволюции живого; эти ферменты обеспечивают ускорение достижения необходимого рН, что важно для гомеостаза живой клетки. Роль карбоангидраз в ускорении конверсии форм неорганического углерода, вероятно, не была изначально их основной функцией, однако в нас-

тоящее время установлено, что данные ферменты критически важны как регуляторы обмена этих форм в ряде метаболических процессов.

Функции карбоангидраз в организме животных. Хотя основной целью обзора является рассмотрение экспериментальных данных и имеющихся представлений о роли карбоангидраз в высших растениях, нельзя не представить, хотя бы коротко, сведения об их функциях в животных, что исследовалось гораздо подробнее и известно достаточно хорошо. Сейчас установлено, что КА в организме животных обеспечивают быстрый доступ к «запасенному» бикарбонату, например, в легких, усиливают истечение метаболического CO_2 из хрусталика глаза [51], катализируют производство HCO_3^- как иона, участвующего в симпорте Na в секреторных тканях [52]. КА играет роль в установлении баланса электролитов и поддержании рН в клетках и тканях [53], в транспорте электролитов в клетках мальпигиевых сосудов *Drosophila malpighian* [54]. В митохондриях клеток позвоночных растворимая КА регулирует активность ферментов окислительного фосфорилирования: бикарбонат, преобразуемый с участием КА из CO_2 , освобождаемого в цикле Кребса, активирует растворимую аденилатциклазу, которая формирует цАМФ и запускает протеинкиназу, влияющую на работу всех митохондриальных комплексов [55]. Эти исследования показали, что механизмы восприятия концентрации CO_2 , HCO_3^- и/или рН в клетках позвоночных включают КА, а связь между хемовосприятием и сигналингом осуществляется через широко распространенные вторичные мессенджеры.

Функции карбоангидраз в водорослях. Связанные с фотосинтезом функции КА хорошо изучены в водных фотоавтотрофах, цианобактериях и водорослях. Несмотря на то, что концентрация углекислого газа в воде приблизительно такая же как в воздухе, скорость диффузии молекул CO_2 в воде в ~1000 раз меньше [56], и цианобактерии и водоросли при осуществлении фотосинтеза испытывали бы дефицит CO_2 вблизи Рубиско. В процессе эволюции у этих организмов возникли механизмы концентрирования CO_2 в клетках. Эти механизмы обязательно включают КА и состоят из системы активного транспорта неорганического углерода через плазматическую мембрану и/или хлоропластную оболочку и систем концентрирования CO_2 вблизи Рубиско. Роль КА в CO_2 -концентрирующем механизме в цианобактериях недавно всесторонне освещена в обзоре [57].

Схема функционирования CO_2 -концентрирующего механизма у одноклеточной водоросли *Ch. reinhardtii* схожа по своему строению с тако-

вой цианобактерий [58]. В клетках водорослей КА α -, β - и γ -семейств функционируют совместно в осуществлении концентрирования CO_2 . В *Ch. reinhardtii* обнаружено, по крайней мере, двенадцать КА, расположенных в различных клеточных компартментах [6, 58]. В поставку CO_2 в клетку, вероятно, вовлечены САН1, САН8 и САН9. Первая расположена в периплазматическом пространстве. Если активность этого белка подавлена ингибитором, который не проникает в клетку, фотосинтез при высоком рН среды, когда большая часть неорганического углерода находится в форме бикарбоната, существенно снижается [59], и это предполагает, что САН1 облегчает вход CO_2 в клетку. САН8 находится в плазматической мембране и также облегчает движение CO_2 через нее, ускоряя преобразование HCO_3^- в CO_2 на поверхности клетки [60]. САН9, по-видимому, способствует продвижению CO_2 в цитоплазме к хлоропласту. САН3, расположенная на люменальной стороне тилакоидной мембраны [16], предположительно катализирует преобразование HCO_3^- , поступающего в люмен, в CO_2 , т.е. помогает «генерации» CO_2 до большего уровня, чем в остальном объеме хлоропласта. Мутанты *Ch. reinhardtii*, в которых отсутствует САН3 или ее содержание сильно уменьшено, не могут расти при обычном уровне CO_2 в воздухе, хотя они могут выживать при повышенной концентрации CO_2 [16].

В харовых водорослях бикарбонат может поступать в клетку по механизму $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ симпорта, причем внеклеточная КА служит в качестве ловушки CO_2 [61, 62]. В этой связи следует также упомянуть водные покрытосеменные, которые «придумали» увеличивать потребление CO_2 , подавая протоны в периплазматическое пространство [63]. Этот процесс в присутствии расположенной там КА повышает внешнюю концентрацию CO_2 , вследствие чего усиливается его диффузия внутрь клетки.

Функции карбоангидраз в высших растениях.
Карбоангидраза плазматической мембраны (плазмалеммная КА). С помощью ингибиторного анализа одним из авторов обзора было показано наличие КА, расположенной в плазмалемме фотосинтезирующих клеток листьев гороха [64], и вскоре КА активность препаратов плазматической мембраны была зарегистрирована для ряда видов растений [65]. Позднее КА активность плазмалеммы как важная для транспорта неорганического углерода в клетку была подтверждена [66]. При этом было найдено, что КА активность интактных протопластов, защищенных при выделении от налипания КА разрушенных клеток, составляла в среднем 5% активности лизированных протопластов. Поскольку объем

плазмалеммы составляет всего 0,3% объема протопласта, плотность носителя КА активности в плазмалемме очень велика. Была определена величина $K_m(\text{CO}_2)$ интактных протопластов гороха [67], которая, в основном, отражает свойство плазмалеммной КА; ее величина, 104 мМ, оказалась существенно выше определенной в той же работе величины $K_m(\text{CO}_2)$, 20 мМ, растворимой КА. На основании экспериментов с протопластами гороха была предложена гипотеза функционирования плазмалеммной КА [68]. Суть ее состоит в том, что в реакции, катализируемой плазмалеммой КА, потребляется внутримембранный CO_2 , где его концентрация, в силу более высокой растворимости в липидах, существенно выше, чем в воде. Было предположено, что протоны, освобождающиеся в этой реакции, по концентрационному градиенту поступают в цитоплазму и с ними в симпорте поступает ион бикарбоната. Относительно недавно с помощью встраивания гена зеленого флуоресцирующего белка было показано, что с плазмалеммой связана одна из КА *A. thaliana*, а именно, β -КА4 [12].

Карбоангидразы цитоплазмы. Содержание КА цитоплазмы достаточно велико, в листьях картофеля оно составляет до 13% от общего содержания растворимых КА [42]. В цитоплазме *A. thaliana* обнаружены две КА β -семейства: β -КА2 и β -КА3 [12]. Уровень экспрессии одной из цитоплазматических КА, а именно, β -КА2 снижался при выращивании *A. thaliana* в условиях повышенной освещенности (Руденко, неопубликованные данные). Суммарная активность цитоплазматических КА гороха возрастала при действии абсцизовой и жасмоновой кислот, что позволяет отнести эти КА к ферментам, ответственным за ответ растений на стресс [69].

Помимо предположений о том, что цитоплазматические КА участвуют в транспорте неорганического углерода в хлоропласт и, по-видимому, смягчают резкие колебания кислотности при действии внешних факторов (см. подробнее в обзоре [70]) считается, что β -КА цитоплазмы мезофильных клеток растений с С4-путем фотосинтеза обеспечивает поставку бикарбоната фосфоенолпируват-карбоксилазе [71], способствуя протеканию первичной реакции связывания углерода при С4-фотосинтезе.

Карбоангидразы митохондрий. При встраивании в геном *E. coli* трех генов, кодирующих γ -КА *A. thaliana*, были получены три белковых продукта, способных встраиваться в митохондрии [72]. Затем в составе комплекса I митохондрий *A. thaliana* был открыт домен, состоящий из 5 γ -КА, который имел сферическую форму и прикреплялся к комплексу I с помощью тонкой

ножки, плотно соприкасаясь с дыхательным комплексом [73]; по мнению авторов, этот домен может быть связан с пороподобной структурой комплекса I, вовлеченной в передачу протона. Три КА этого домена, γ -КА1, γ -КА2 и γ -КА3, были гомологичны КА из *M. thermophila*, а две получили название γ -CAL1 и γ -CAL2 («gamma carbonic anhydrase like») [74]. Помимо мембраносвязанных КА, в матриксе митохондрий был обнаружен продукт экспрессии гена *AtIg58180* (β -КА6) [12].

При высокой скорости фиксации CO_2 его концентрация в хлоропластах значительно понижается, если по каким-то причинам (например, при закрытии устьиц) его приток из окружающего воздуха ограничен. Было предположено, что в хлоропласты может поступать CO_2 , высвобождающийся в митохондриях в реакциях цикла Кребса. Согласно этой гипотезе, экспортная система активного транспорта HCO_3^- из митохондрий в хлоропласты сформирована КА доменом и β -КА6 [75].

Карбоангидразы стромы хлоропласта. В высших СЗ-растениях, как уже было отмечено, основной является КА, расположенная в строме хлоропластов, β -КА1. В этом компартменте происходит включение неорганического углерода в органические соединения, осуществляемое с участием фермента Рубиско. Субстратом этой реакции выступает углекислый газ CO_2 при том, что основной формой неорганического углерода в слабощелочной среде стромы является бикарбонат. Поскольку, согласно расчетам, относительно медленная конверсия бикарбоната в CO_2 при значительной скорости потребления последнего в его реакции с рибулозобисфосфатом (т.н. фиксация CO_2) может лимитировать фотосинтез, не обеспечивая наблюдаемых экспериментально скоростей этого процесса, логичным казалось предположение об участии именно этой КА в ускорении указанной конверсии и поставке молекул CO_2 для их фиксации. Исследования *in vitro* с использованием частично очищенной Рубиско из пшеницы показали, что в присутствии КА снижается $K_m(\text{CO}_2)$ карбоксилазы [76]. В растениях, выращенных при повышенной концентрации CO_2 , происходило существенное падение активности и КА, и Рубиско [77]. В опытах с фасолью ингибирование добавленной извне КА приводило к подавлению карбоксилазной активности и возрастанию оксигеназной активности Рубиско [77]. Позже при изучении экспрессии генов КА в проростках хлопка было показано, что стационарные уровни транскриптов КА и Рубиско возрастают в ответ на снижение концентрации CO_2 , тогда как ферментные активности изменяются на пост-

ранскрипционном уровне после освещения проростков параллельно с развитием функциональных хлоропластов [78].

Несмотря на кажущуюся связь активности КА и Рубиско, в последующих работах участие стромальной КА непосредственно в фотосинтезе не было установлено. Прайс и соавт. [79] обнаружили, что в мутантных растениях *Nicotiana tabacum*, в которых уровень экспрессии стромальной КА был снижен путем создания анти-смысловой конструкции, направленной против мРНК, и в первичных трансформантах составлял всего лишь 2% от уровня экспрессии в растениях дикого типа, не наблюдалось существенных морфологических отличий. Несмотря на такое снижение содержания стромальной КА, не наблюдалось значительных изменений в активности Рубиско, содержании хлорофилла, проводимости устьиц, сухого веса листьев, а также в соотношении парциального давления CO_2 внутри клетки и в окружающей среде. Тем не менее изотопный состав углерода сухого вещества листьев изменялся в мутантных растениях, что соответствовало снижению парциального давления CO_2 в сайтах карбоксилирования на 15 μBar . Авторами был сделан вывод, что снижение активности стромальной КА даже на два порядка не оказывает существенного влияния на фотосинтез в условиях атмосферного CO_2 ; однако они предположили, что 100%-ная активность, вероятно, способствует облегчению переноса CO_2 в хлоропласт, делая тем самым фотосинтез СЗ-растений максимально эффективным.

Также в трансгенных растениях табака с подавленной на 99% активностью стромальной КА не наблюдали существенных изменений в поглощении CO_2 , но обнаружили повышение устьичной проницаемости и восприимчивости к водному стрессу [80]. Вестерн-блот анализ подтвердил отсутствие стромальной КА в трансгенных растениях, но общая КА активность листьев была только в 3,5 раза меньше, чем в растениях дикого типа. Очевидно, что в листьях присутствовали и другие КА, на что в то время не обращали внимания. По данным тех же авторов, в листьях трансгенных растений табака, гиперэкспрессированных по стромальной КА, также не происходило изменений в интенсивности поглощения CO_2 , но наблюдалось возрастание активности Рубиско.

Следующая попытка исследовать физиологическую роль β -КА1 была предпринята 14 лет спустя и связана с развитием методов создания мутантов, нокаутированных по нужному гену. При проращивании семян мутантных растений *A. thaliana*, нокаутированных по гену, кодирующему β -КА1, на стерильной искусственной среде при атмосферном уровне CO_2 наблюдали зна-

чительное снижение способности к прорастанию, которое восстанавливалось до уровня дикого типа при выращивании при повышенном уровне CO_2 (1500 $\mu\text{l/l}$) или при добавлении в среду сахарозы [81]. В семенах мутантных растений не было значимых отличий в белковом и жировом составе, а также в резервных компонентах для прорастания, и снижение светозависимой аккумуляции $^{14}\text{CO}_2$ в них наблюдалась только до момента формирования настоящих листьев. Ранее было установлено, что биосинтез этилена, необходимого для прорастания семян, является CO_2 -зависимым [82], и для нормального развития проростка необходимо быстро переводить HCO_3^- щелочной стромы в CO_2 . Возможно, данные работы [81] объясняются тем, что снижение внутриклеточной КА активности приводило к уменьшению выработки этилена, и поэтому замедлялись процессы, необходимые для нормального развития семян.

Накапливается все больше данных о том, что стромальная КА играет роль в защите растений от стресса. Экспрессия в дрожжах гена, кодирующего КА из люцерны, выявила, в частности, что продуцируемый белок обладает антиоксидантной активностью [32]. Установлено, что стромальная КА демонстрирует не только КА активность, но и способность связывать салициловую кислоту (СК), которая играет важную сигнальную роль в иницировании каскада реакций, вызывающих усиление экспрессии генов, а также увеличение активности на посттрансляционном уровне белков, участвующих в защите растений от окислительного стресса [83]. Было найдено, что в растениях картофеля, зараженных фитофторозом, в первые 12 ч после заражения происходила активация, а в следующие 24 ч — сильное подавление уровня экспрессии гена, кодирующего эту КА [84]; подобное наблюдалось в листьях томата, подвергшихся воздействию грибного токсина фузикокина [85], и в растениях арабидопсиса после обработки метилжасмонатом [86]. В растениях *Nicotiana benthamiana*, нокаутированных по гену, кодирующему стромальную КА, происходило ускоренное развитие фитофтороза [84]. Авторы выдвинули предположение, что роль стромальной КА в защите от стресса может быть связана с участием ее в биосинтезе жиров, так как было показано [78], что снижение количества КА приводит к подавлению биосинтеза жирных кислот и, как следствие, к уменьшению уровня экспрессии группы генов защиты растения от стресса, регуляция которых происходит с участием жасмоновой кислоты (ЖАК). Для биосинтеза последней необходимы омега-6-жирные кислоты, которые синтезируются в хлоропластах. По на-

шему мнению, такая интерпретация не учитывает, что ЖАК и СК являются антагонистами [87], и для активации ЖАК-пути необходимо связать СК, для чего и может быть нужна КА. Соответственно, неоднозначное поведение гена этой КА при проникновении фитофторы, сначала повышение, а затем снижение, может быть связано с необходимостью сначала активировать гены защиты по ЖАК-пути, за счет связывания СК, а затем, наоборот, активировать СК-путь. Также и подавление генов биосинтеза жирных кислот при снижении количества КА может происходить из-за того, что содержание КА недостаточно для связывания СК, ингибирующей ЖАК-путь, а не благодаря тому, что КА может поставлять CO_2 для синтеза жирных кислот.

Показано, что β -КА1 совместно с β -КА4 участвует в контроле газообмена между растением и атмосферой за счет регуляции движения устьиц [88]. Известно, что повышение концентрации углекислоты в атмосфере приводит к тому, что устьица растений находятся в закрытом состоянии, но неизвестны были CO_2 -связывающие белки, которые контролируют этот ответ. Нокаут гена *At3g01500*, кодирующего β -КА1, так же, как и гена *At1g70410*, кодирующего плазмалеммную β -КА4, не приводили к изменениям в работе устьичного аппарата арабидопсиса. Выраженные изменения проявляли, однако, так называемые, «двойные» мутанты, растения, нокаутированные одновременно по генам, кодирующим β -КА4 и β -КА1; эти растения демонстрировали ослабленную регуляцию движения устьиц и повышенную устьичную проницаемость. Обнаруженная функция, очевидно, относится именно к КА, расположенным в клетках устьиц. По данным тех же авторов, растения, гиперэкспрессированные по этим КА, демонстрировали высокую эффективность потребления воды, что привело к пониманию того, что, несмотря на чрезвычайно высокий уровень экспрессии гена *At3g01500*, содержание β -КА1 все же недостаточно для растений, во всяком случае, для сельскохозяйственных, и манипуляции с генами КА могут дать новый подход к созданию сортов растений с пониженной транспирационной потерей воды и, как следствие, повышенной продуктивностью.

Таким образом, разноплановые исследования β -КА1 показывают, что ее роль в метаболизме высших растений сложна, и функционирует этот фермент в тесной связи с другими КА. Результаты работ, проведенных разными группами исследователей, использовавших различные подходы к изучению функции данной КА, тем не менее, сходятся в том, что она не участвует в поставке CO_2 активному сайту Рубиско.

В работе [89] имеется ссылка на данные о том, что в мутантных растениях, нокаутированных по гену, кодирующему другую КА хлоропластов, α -КА1, происходило снижение фотосинтетической активности и способности к накоплению крахмала; такой факт мог бы свидетельствовать о значимости данной КА для фотосинтеза и о том, что, вероятно, именно она, а не β -КА1, участвует в передаче CO_2 Рубиско.

Карбоангидразы тилакоидов хлоропластов. Данные об участии КА в фотосинтезе водорослей и тот факт, что ключевой реакцией фотосинтеза является включение в состав органического вещества клетки одного из компонентов карбоангидразной реакции, молекулы CO_2 , продолжают стимулировать исследователей на поиски участия КА в фотосинтезе высших растений. В процессах, происходящих в тилакоидах, в которых расположена фотосинтетическая электрон-транспортная цепь, важнейшую роль играет протон, также компонент карбоангидразной реакции. Более того, процесс переноса электронов на участке этой цепи в акцепторной части ФС2 зависит от присутствия еще одного компонента этой реакции, неорганического углерода в форме бикарбоната. Функционирование КА в тилакоидах высших растений неоднократно предполагалось, но наличие их там долго оставалось предметом дискуссий.

Наличие специфических карбоангидраз в тилакоидах. Первые сведения о наличии КА активности тилакоидов высших растений были опубликованы в начале 1980-х гг. [90, 91], но многие годы эта активность считалась следствием загрязнения тилакоидов при выделении высокоактивной и значительной по количеству белка стромальной КА. Однако эксперименты свидетельствовали, что характеристики КА активности тилакоидов отличаются от таковых растворимой стромальной КА: КА активность тилакоидных мембран подавлялась диуроном и гидроксиламином, тогда как растворимая КА была к ним нечувствительна [91]; КА активность тилакоидов зависела от редокс потенциала среды [92]; ингибиторы КА, такие как ацетазоламид и азид, в субмикромольных концентрациях стимулировали КА активность тилакоидов, при том, что градуально подавляли активность растворимой КА [93]. Тилакоидная и растворимая КА активности характеризовались существенно разной величиной $K_m(\text{CO}_2)$, 9 и 20 мМ соответственно; их дегидратазные активности имели разные рН-зависимости — активность тилакоидной КА имела максимум при рН 6,8–7,0, тогда как активность растворимой КА не зависела от рН [67]. Наконец было показано с препаратами из гороха, что только с растворимой КА наблюда-

ется кросс-реакция с антителами против растворимой β -КА из шпината, при том, что с фракцией белков тилакоидов, имевшей такую же по величине КА активность, эта реакция не наблюдалась [94].

Гетерогенность носителей карбоангидразной активности тилакоидов. В начале 2000-х гг. стали появляться сведения о наличии в тилакоидных мембранах более чем одного носителя КА активности. Этой активностью обладали препараты тилакоидных мембран, обогащенные как ФС1 (ФС1-мембраны), так и ФС2 (ФС2-мембраны), но только с ФС2-мембранами наблюдали кросс-реакцию с антителами против САНЗ, карбоангидразы α -семейства из зеленой водоросли *Ch. reinhardtii* [95]. Вывод о присутствии в тилакоидах, свободных от загрязнения стромальной КА, по крайней мере, двух типов КА активности был сделан в работе [94], причем один из носителей этой активности легко удалялся из тилакоидов при обработке солями в высокой концентрации, а второй оставался прочно связанным с мембраной. Также найдено, что при инкубации тилакоидов гороха с Triton X-100 возникают два максимума КА активности при отношениях тритон/хлорофилл, равных 0,3 и 1,0 [96, 97]. Колоколообразное изменение активности при действии детергентов характерно именно для мембраносвязанных белков [98]. Наличие двух максимумов свидетельствовало о присутствии в тилакоидах, как минимум, двух носителей КА активности.

Карбоангидразная активность ФС2. При обработке тритоном ФС2-мембран гороха проявлялся всего один максимум КА активности при отношении тритон/хлорофилл, равном 1,0 [96, 97], при том, что не наблюдалось влияния детергента на активность фракции растворимых белков КА; последнее дополнительно свидетельствовало о специфической природе КА активности тилакоидов. Аналогичную стимуляцию КА активности при обработке этим детергентом наблюдали с ФС2-мембранами пшеницы [99] и арабидопсиса [100].

Лу и Стемлер [101] обнаружили два различающиеся по свойствам источника карбоангидразной активности не только в тилакоидах, но и в ФС2-мембранах из мезофилла кукурузы. Первый (названный авторами «внешняя КА»), переходил в раствор при действии солей в высокой концентрации и детергентов и был доступен для измерения КА активности в обоих направлениях, другой («внутренняя КА») оставался прочно связан с мембраной и проявлял только гидратазную активность. Однако ранее, на других объектах наблюдалась и дегидратазная КА активность подвергнутых обработке детергентами и солями препаратов ФС2 [102].

Присутствие двух источников КА активности, высокомолекулярного и низкомолекулярного, можно наблюдать в геле после неденатурирующего электрофореза ФС2-мембран гороха и специфического окрашивания геля на наличие КА активности [103]. Наличие КА активности в окрашиваемых полосах геля было подтверждено при измерении КА активности элюатов этих полос стандартным методом с помощью рН-метрии [103]. Аналогичное распределение КА активности наблюдали при электрофорезе ФС2-мембран арабидопсиса [100]. Было показано, что классический ингибитор КА ацетазоламид в концентрациях около 10^{-7} М стимулировал КА активность низкомолекулярной фракции, элюированной из соответствующей полосы геля, после электрофореза препаратов ФС2-мембран и гороха, и арабидопсиса [100, 103]. При этом специфический липофильный ингибитор КА этоксизоламид ингибировал КА активность низкомолекулярной фракции уже в наномолярной концентрации [103]. Стимулирующее действие ацетазоламида и азиды натрия в низких концентрациях на КА активность наблюдалось ранее в целых тилакоидах гороха [93]. На основании наличия необычного действия ацетазоламида на КА активность низкомолекулярного белка ФС2 мы предполагаем, что низкомолекулярная КА, расположенная в тесной связи или непосредственно в этой фотосистеме, принадлежит α -семейству, поскольку такая же стимуляция найдена у ферментов, принадлежащих α -семейству КА млекопитающих. Эта стимуляция КА активности рядом веществ, в частности азолами, к которым относится и ацетазоламид, определяется тем, что лимитирующей стадией КА реакции является отвод протона из реакционного центра [104], и азола в низкой концентрации способны играть роль протонного проводника [105].

КА активность высокомолекулярной фракции, элюированной из соответствующей окрашиваемой полосы геля, существенно подавлялась ацетазоламидом в концентрации 10^{-7} М, но была слабо чувствительна к этоксизоламиду (Игнатова, неопубликованные данные). Относительно природы высокомолекулярного носителя КА активности ФС2-мембран данных практически нет. В работах [99, 94] было убедительно показано, что КА активностью обладает кор-комплекс ФС2. В работе [99] было предположено, что компонент кор-комплекса, проявляющий КА активность, имеет активный металлосодержащий центр, структура которого напоминает структуру известных КА, но металл в этом центре не обязательно цинк. Было показано, что замена цинка на двухвалентное железо у γ -КА *M. thermophila* вызывала даже возрастание КА

активности в анаэробных условиях [39]. По мнению авторов работы [106], эта КА активность обусловлена комплексом CaMn_4 и его ближайшим окружением. Возможно, что высокомолекулярный носитель КА активности – не отдельный белок, а конструкция из аминокислот соседствующих белков по типу КА, принадлежащих γ -семейству, у которых активный центр образован аминокислотами разных белковых субъединиц. Разная природа двух носителей КА активности в ФС2 мембранах, белок и белковый комплекс, может быть причиной того, что при их обработке Triton X-100 наблюдался только один максимум этой активности (см. выше).

В работе [107] получены данные, свидетельствующие о том, что гидрофильные белки водоокисляющего комплекса, PsbO, PsbP, PsbQ, обладают КА активностью, которая у белка PsbO проявлялась только в присутствии Mn^{2+} . Поскольку обнаруженные источники КА активности проявляли свойства, не характерные для типичных КА, авторы предположили, что они представляют собой особый класс Mn-зависимых карбоангидраз, ассоциированных с ФС2. В этой же работе показано, что после удаления этих белков «ядерный» комплекс ФС2 сохранял некоторую КА активность, которая ингибировалась сульфамидами и, так же, как в случае гидрофильных белков, стимулировалась марганцем.

Карбоангидразная активность ФС1. КА активность ФС1-мембран высших растений была впервые обнаружена в работе [95]. КА активность ФС1-мембран была одинаково чувствительна к сульфамидам ацетазоламиду и этоксизоламиду с I_{50} , равной 10^{-6} М [103]. При действии Triton X-100 на препараты ФС1-мембран гороха и арабидопсиса КА активность в обоих случаях демонстрировала максимум при отношении тритон/хлорофилл, равном 0,3, что совпадало с одним из максимумов, наблюдавшихся при обработке Triton X-100 целых тилакоидов [97, 100]. Пока нет никаких указаний на то, какая КА связана с ФС1.

Растворимая карбоангидраза люмена тилакоидов. При разрушении изолированных тилакоидов гороха Triton X-100 в высоких концентрациях был обнаружен растворимый белок, обладавший КА активностью с характеристиками, отличными от характеристик описанных выше носителей КА активности тилакоидных мембран [97]. Масс-спектр этого белка соответствовал таковому КА β -семейства (Руденко, не опубликовано). Было предположено присутствие в люмене тилакоидов особой растворимой КА, что затем было подтверждено в опытах с тилакоидами арабидопсиса как дикого типа, так и мутантов с нокаутом гена *At3g01500*, кодирующего

стромальную β -КА1; последнее помогало получить тилакоиды, не загрязненные этим белком [108]. Карбоангидразу, присутствующую во фракции люменальных белков, удалось выделить в чистом виде; ее кажущаяся молекулярная масса, определенная с помощью нативного электрофореза, составляла 132 кДа. При том, что КА активность мембраносвязанных носителей подавлялась дитиотрейтолом, активность этой растворимой КА возрастала при его добавке, что характерно для КА β -семейства, имеющих в составе большое количество серусодержащих аминокислот [109]. Чувствительность к этоксизоламиду растворимой люменальной КА характеризовалась величиной I_{50} , равной 5×10^{-6} М [108], что также типично для КА β -семейства [110].

Заманчиво предположить, что обнаруженная в тилакоидах растворимая люменальная КА, по всей видимости, относящаяся к β -семейству КА, это β -КА5, которая идентифицирована как расположенная в хлоропластах [12]. Уровень экспрессии гена *At4g33580*, кодирующего β -КА5, на два-три порядка ниже, чем гена *At3g01500*, кодирующего стромальную β -КА1, однако нокаут по гену *At4g33580* приводит к значительному отставанию растений в росте (Дж. Морони, личное сообщение). β -КА5 является к настоящему моменту единственной карбоангидразой, отсутствие которой приводит к значительным изменениям в фенотипе арабидопсиса при нормальных условиях вегетации.

Предполагаемые функции тилакоидных карбоангидраз. На листовых дисках табака было показано, что этоксизоламид (ингибитор КА), проникающий через мембраны, понижал фотоактивный сигнал, связанный с поглощением CO_2 [111]. В работе [68] было найдено, что проникающий через мембраны ингибитор КА этоксизоламид существенно подавлял CO_2 зависимое выделение O_2 протопластами листьев гороха. Эти данные можно рассматривать как указания на важную роль внутриклеточной КА в фотосинтезе высших растений. Хотя нельзя полностью исключить действие этоксизоламида на растворимые КА как причину ингибирования фотосинтеза, тем не менее, принимая во внимание данные работ [79, 112, 113], а также то, что в работе [68] эффект этоксизоламида наблюдался при насыщающих концентрациях CO_2 , весьма вероятно, что он связан с ингибированием КА тилакоидов. Возможные функции тилакоидных КА были в свое время рассмотрены Стемлером [114]. Тогда еще не было данных о присутствии в тилакоидах нескольких КА. Поскольку до сих пор, к сожалению, ни одна физиологическая функция КА тилакоидов достоверно не установлена, для их описания мы вынуждены идти пу-

тем сопоставления реакции, катализируемой КА, места расположения фермента в тилакоидной мембране и того, какая стадия фотосинтеза осуществляется в этом месте. Мы предполагаем *a priori*, что функционирование КА тилакоидов, главной функцией которых является осуществление фотосинтеза, связано прямо или косвенно с этим процессом.

Наибольшее число экспериментальных данных и выдвигавшихся предположений о роли тилакоидных КА в реакциях фотосинтеза относится к процессам, протекающим в ФС2, где в связанном с этой фотосистемой водоокисляющем комплексе происходит окисление воды, и электрон, оторванный от воды, поступает к ее терминальным акцепторам, Q_A и Q_B . То, что функциональная активность ФС2 связана с функционированием КА следовало уже из первых данных о подавлении КА активности тилакоидов диуроном и гидроксиламином, ингибиторами ФС2 [91]. Эта связь была подтверждена тем, что специфические ингибиторы КА, сульфамидные соединения, и некоторые анионы, ингибирующие КА, подавляли активность ФС2 [115]. Нельзя исключить подавления активности ФС2 вследствие нарушения функционирования водоокисляющего комплекса. Было найдено, что характер зависимости кислородвыделяющей функции ФС2 из кукурузы и гороха от концентрации Cl^- и Ca^{2+} сходен с зависимостью от этих ионов ее КА активности [106]. Что касается природы такой связи, то в разных лабораториях были получены противоречивые результаты: дегидратазная КА активность значительно возрастала при удалении внешних белков водоокисляющего комплекса [94, 102]; КА активность ФС2-мембран снижалась при удалении белков этого комплекса [116]; довольно высокая КА активность ФС2-мембран была вариабельна, но после удаления белков водоокисляющего комплекса не наблюдалась ни в солюбилизованных белках, ни в кор-комплексе [117]. Неоднозначность экспериментальных данных может быть обусловлена как разными методами измерения КА активности, так и присутствием не одного источников КА активности даже в препаратах ФС2-мембран (см. выше).

Известно, что для физиологически требуемой скорости переноса электронов на акцепторной стороне ФС2 необходимо присутствие ионов бикарбоната [118]. В тилакоидах имеется два пула бикарбоната, связанного с мембраной [119]. Первый (меньший), связывающий один ион бикарбоната на 380–400 молекул хлорофилла, примерно равен количеству реакционных центров ФС2. Удаление этого бикарбоната приводит к более чем 90%-ному подавлению выде-

ления кислорода [119], которое полностью восстанавливалось при добавлении бикарбоната. В последние годы накопились данные в пользу того, что бикарбонат необходим каким-то образом и для нормального функционирования донорной стороны ФС2 [120, 121]. В обоих местах исследователи предполагают наличие КА, которая возможно участвует в обмене бикарбоната [96, 103, 126]. Присутствие КА позволяет в водной фазе ускорить появление или исчезновение не только бикарбоната, но и протонов, тогда как CO_2 может уходить в мембрану и резервироваться в ней, поскольку растворимость CO_2 в липиде в 3–8 раз выше, чем в воде [122]. Неясно, какой из продуктов КА реакции играет определяющую роль в реакциях на акцепторной и на донорной сторонах ФС2. На акцепторной стороне таким продуктом, скорее всего, является бикарбонат, обеспечивающий перенос электронов от Q_A на Q_B , контролируемый негемовым железом. В этом случае участие КА в протонировании пластохинона Q_B на данном участке, как это было предположено ранее рядом исследователей [123–125], может быть сопутствующей реакцией. Высокомолекулярная КА, описанная выше [100, 103], могла бы быть этой КА. На донорной стороне ФС2 отведение протонов, образующихся при разложении воды, может быть первично необходимой реакцией, которая обеспечивает предохранение фотосистемы от фотоингибирования. В этом случае именно связывание протонов является основной функцией КА, а бикарбонат играет роль удобного акцептора протонов. Аналогичная роль в зеленой водоросли *Ch. reinhardtii* предлагается для карбоангидразы САНЗ, принадлежащей α -семейству и связанной с тилакоидной мембраной на люменальной стороне; отсутствие этой КА сопровождалось снижением устойчивости водоросли к действию света высокой интенсивности [126]. Пока невозможно связать наблюдаемые в ФС2 КА активности с конкретными белками на донорной и акцепторной сторонах этой фотосистемы, а также с теми белками, которые по кодирующим их ДНК отнесены к КА и выявлены в хлоропластах.

Среди таких белков тилакоидных мембран была обнаружена α -КА4 [19]. Мы нашли, что в растениях арабидопсиса, нокаутированных по гену, кодирующему α -КА4, эффективный квантовый выход ФС2 при насыщающей интенсивности света и насыщающей концентрации CO_2 был выше, чем в растениях дикого типа экотипа *Columbia*, тогда как нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) было в них на 30–50% ниже [127]. Величина NPQ показывает степень развития изменений, приводящих к диссипации энергии в светособирающих комплексах в теп-

ло, и в условиях измерений было представлено тушением, зависящим от концентрации протонов в люмене тилакоидов. В развитии NPQ протоны играют двойную роль, вызывая конформационные изменения в белках светособирающей антенны, прежде всего, за счет протонирования белка PsbS [128, 129] и иницируя процесс деэпоксидации виолаксантина за счет активации виолаксантиндеэпоксидазы [130]. У мутантных растений наблюдалось также значительное накопление крахмала в хлоропластах, в 2–3 раза больше, чем у дикого типа [127]. Похоже, что отсутствие α -КА4 вызывает уменьшение поставки протонов для PsbS и виолаксантиндеэпоксидазы, что приводит к ускорению синтеза АТФ и, как следствие, к увеличению синтеза крахмала. Отсутствие α -КА4 в мутантных растениях сказалось и на том, что препараты ФС2-мембран из них можно было получить только при значительном увеличении (до 10 мМ) концентрации ионов Mg^{2+} в среде изоляции (Игнатова, не опубликовано); последнее предполагало нахождение α -КА4 в гранальных областях тилакоидной мембраны. Перечисленные экспериментальные данные указывают на участие этой КА в регуляции функциональной активности внешних светособирающих комплексов антенны ФС2.

Второй пул бикарбоната в тилакоидах, о котором упоминалось выше, количественно близок к концентрации хлорофилла, и может быть удален без потери активности ФС2 [119]. Возможно, что этот пул принимает участие в сопряженном с фотосинтетическим электронным транспортом поглощении тилакоидами протонов, поскольку их светозависимое поглощение увеличивалось при добавлении бикарбоната к тилакоидам; при этом ингибиторы КА ацетазоламид и этоксизоламид снижали количество протонов, поглощаемых на свету тилакоидами, уменьшая количество связанного бикарбоната и буферную емкость тилакоидов [131]. Эти же ингибиторы, как показано в той же группе, не влияя на скорость переноса электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи, существенно уменьшали скорость сопряженного с этим переносом фотофосфорилирования [132, 133]. Авторы предположили функционирование в люмене тилакоидов особой КА, что облегчало бы использование протонов бикарбонатного пула в фотофосфорилировании [132]. Существование люменальной КА было доказано в работе [108] (см. выше), авторы которой, в свою очередь, предположили, что она способствует стабилизации pH в люмене за счет ускорения отведения протонов от мест их поступления в люмен и их транспорта в нем. Оба предположения могут быть объединены, если представить,

что люменальная КА способствует ускорению поступления протонов к мембранным каналам АТФ-синтаз.

Функции КА, обнаруживаемой вблизи ФС1, не исследовались столь тщательно, как функции КА, расположенных вблизи ФС2. КА, одна или несколько, расположенные вблизи ФС1, должны, как и эта фотосистема, находиться в ламеллах стромы, и, таким образом, контактировать с компартментом, в котором содержится Рубиско. В 1984 г. в работе [134] была выдвинута плодотворная гипотеза о роли КА в поставке CO_2 к Рубиско за счет «кислого» люмена тилакоидов. По этой гипотезе мембранная КА, обращенная в люмен (тогда не было известно о нескольких КА в тилакоидах), ускоряет там конверсию бикарбоната в CO_2 , а CO_2 свободно диффундирует из люмена и используется Рубиско в строме. Однако такая схема требует дополнительных предположений о том, каким образом в люмен с необходимой для фотосинтеза скоростью поступает заряженная молекула HCO_3^- и как избежать немедленной конверсии CO_2 обратно в HCO_3^- в строме, где не только высокий рН, но и очень много β -КА1. Нами была предложена схема использования внутритилакоидных протонов для конверсии HCO_3^- в CO_2 [70], суть которой заключается в том, что в такой конверсии участвует КА, расположенная в тилакоидной мембране так, что она «сидит» на протонном канале и использует для этой реакции протоны, выходящие из люмена через этот канал, т.е. действует в этом смысле подобно АТФ-синтазе. Такое использование протонов люмена не приведет к их дефициту для синтеза АТФ, поскольку сопряженные с закачкой протонов линейный и циклический транспорт электронов способны легко подстраиваться для поддержания необходимой концентрации протонов в люмене при изменении их потока из него.

Чтобы ограничить возможность диффузии в объем стромы молекул CO_2 , появляющихся в местах расположения реакционных центров данной тилакоидной КА с ней должна контактировать Рубиско. Показано, что значительная часть молекул Рубиско входит в состав супрамо-

лекулярного комплекса, контактирующего с тилакоидной мембраной [135]. Ранее были получены экспериментальные результаты [113], согласующиеся с данной гипотезой и отчасти послужившие ее выдвижению, а именно, была показана подавляемая ингибитором КА стимуляция дегидратазной активности тилакоидов в условиях подкисления тилакоидного люмена на свету. В работе [136] было найдено подавление ингибитором КА ацетазоламидом выхода H_2O_2 из интактных тилакоидов в среду через аквапорины, а также показано наличие КА активности в оболочке хлоропласта, что позволило авторам предположить функциональную связь КА с аквапориновым каналом. В работе [137] было убедительно доказано наличие структурного взаимодействия как минимум двух расположенных поверхностно на клеточной мембране КА человека с трансмембранным транспортером анионов. Эти данные могут служить подтверждением возможности непосредственного контакта КА с каналами разного рода, что предполагает выдвинутая гипотеза.

Подводя итог рассмотрению возможных функций КА зеленых клеток растений, можно с сожалением констатировать, что, несмотря на большое число работ и высказанных гипотез, эти функции в конкретных физиологических процессах остаются пока не достаточно понятыми. Хорошие перспективы для выяснения этих функций открывает использование нокаутных мутантов по генам КА, но с учетом возможной кооперации нескольких КА в обеспечении того или иного процесса, как это имеет место в митохондриях, в ряде случаев может требоваться использование двойных и даже тройных мутантов. Доказанное присутствие в митохондриях *A. thaliana* шести КА дает основание полагать, что карбоангидразная система хлоропластов, и даже тилакоидов также может включать несколько КА, что подтверждается результатами исследований, рассмотренных в данном обзоре.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-32323 и 15-04-03883).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanyal, G., Pessah, N.I., and Maren, T.H. (1981) Kinetics and inhibition of membrane-bound carbonic anhydrase from canine renal cortex, *Biochim. Biophys. Acta*, **657**, 128–137.
2. Johansson, I.M., and Forsman, C. (1993) Kinetic studies of pea carbonic anhydrase, *Eur. Biochem.*, **218**, 439–446.
3. Meldrum, N.N., and Roughton, F.J. (1933) Carbonic anhydrase: its preparation and properties, *Nature*, **80**, 113–142.
4. Elleuche, S., and Poggeler, S. (2010) Evolution of carbonic anhydrases in fungi, *Microbiology*, **156**, 23–29.
5. Hewett-Emmett, D., and Tashian, R.E. (1996) Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **5**, 50–77.
6. Moroney, J.V., Ma, Y., Frey, W.D., Fusilier, K.A., Pham, T.T., Simms, T.A., Di Mario, R.J., Yang, J., and Mukherjee, B.

- (2011) The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles, *Photosynth. Res.*, **109**, 133–149.
7. 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, *Bacteriology*, **179**, 769–774.
 8. Elleby, B., Chirica, L.C., Tu, C., Zeppezauer, M., and Lindskog, S. (2001) Characterization of carbonic anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae*, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1613–1619.
 9. Elleuche, S., and Poggeler, S. (2009) Evolution of carbonic anhydrases in fungi, *Curr. Genet.*, **55**, 211–222.
 10. 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, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4383–4387.
 11. Fujiwara, S., Fukuzawa, H., Tachiki, A., and Miyachi, S. (1990) Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9779–9783.
 12. Fabre, N., Reiter, I.M., Becuwe-Linka, N., Genty, B., and Rumeau, D. (2007) Characterization and expression analysis of genes encoding alpha and beta carbonic anhydrases in *Arabidopsis*, *Plant Cell Environ.*, **30**, 617–629.
 13. 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 Biol.*, **7**, 1224–1231.
 14. Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroove, S., Dejardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J.C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., and Rokhsar, D. (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa*, *Science*, **313**, 1596–1604.
 15. 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.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 29–76.
 16. Karlsson, J., Clarke, A.K., Chen, Z.H.I., Huggins, S.Y., Park, Y.I., Husic, H.D., Moroney, J.V., and Samuelsson, G. (1998) A novel alpha-type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂, *EMBO J.*, **17**, 1208–1216.
 17. Holmes-Davis, R., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., and McCormick, S. (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*, *Proteomics*, **5**, 4864–4884.
 18. Noir, S., Brautigam, A., Colby, T., Schmidt, J., and Panstruga, R. (2005) A reference map of the *Arabidopsis thaliana* mature pollen proteome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337**, 1257–1266.
 19. Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.-B., Rudella, A., Sun, Q., and van Wijk, K.J. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database, *Plant Cell*, **16**, 478–499.
 20. Sun, Q., Zybaylov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinars P.D.B., and van Wijk, K.J. (2009) PPDB, The Plant Proteomics Database at Cornell, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 969–974.
 21. Kamo, T., Shimogawara, K., Fukuzawa, H., Muto, S., and Miyachi, S. (1990) Subunit constitution of carbonic anhydrase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur. J. Biochem.*, **192**, 557–562.
 22. Eriksson, A.E., Jones, T.A., and Liljas, A. (1988) Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution, *Proteins*, **4**, 274–282.
 23. Pocker, Y., and Meany, J.E. (1965) The catalytic versatility of carbonic anhydrase from erythrocytes. The enzyme-catalyzed hydration of acetaldehyde, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1809–1811.
 24. Pocker, Y., and Stone, J.T. (1965) The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5497–5498.
 25. Henkart, P., Guidotti, G., and Edsall, J.T. (1968) Catalysis of the hydrolysis of 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene by carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem.*, **243**, 2447–2449.
 26. Neish, A.C. (1939) Studies on chloroplasts. II. Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf, *Biochem. J.*, **33**, 300–308.
 27. Fawcett, T.W., Browse, J.A., Volokita, M., and Bartlett, S.G. (1990) Spinach carbonic anhydrase primary structure deduced from the sequence of a cDNA clone, *J. Biol. Chem.*, **265**, 5414–5417.
 28. Smith, K.S., and Ferry, J.G. (1999) A plant-type (beta-class) carbonic anhydrase in the thermophilic metanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *J. Bacteriol.*, **181**, 6247–6253.
 29. So, A.K., and Espie, G.S. (1998) Cloning, characterization and expression of carbonic anhydrase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803, *Plant Mol. Biol.*, **37**, 205–215.
 30. Smith, K.S., Jakubzick, C., Whittam, T.S., and Ferry, J.G. (1999) Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15184–15189.
 31. Sawaya, M.R., Cannon, G.C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E.B., Yeates, T.O., and Kerfeld, C.A. (2006) The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two, *J. Biol. Chem.*, **281**, 7546–7555.
 32. Gotz, R., Gnann, A., and Zimmermann, F.K. (1999) Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect, *Yeast*, **15**, 855–864.
 33. Eriksson, M., Karlsson, J., Ramazanov, Z., Gardstrom, P., and Samuelsson, G. (1996) Discovery of an algal mito-

- chondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and characterization of a low-CO₂-induced polypeptide in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12031–12034.
34. Mitsuhashi, S., Ohnishi, J., Hayashi, M., and Ikeda, M. (2004) A gene homologous to β -type carbonic anhydrase is essential for the growth of *Corynebacterium glutamicum* under atmospheric conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 592–601.
 35. Majeau, N., and Coleman, J.R. (1991) Isolation and characterization of a cDNA coding for pea chloroplastic carbonic anhydrase, *Plant Physiol.*, **95**, 264–268.
 36. Roeske, C.A., and Ogren, W.L. (1990) Nucleotide sequence of pea cDNA encoding chloroplast carbonic anhydrase, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 3413–3413.
 37. Fett, J.P., and Coleman, J.R. (1994) Characterization and expression of two cDNAs encoding carbonic anhydrase in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.*, **105**, 707–713.
 38. Rowlett, R.S. (2010) Structure and catalytic mechanism of the β -carbonic anhydrases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 362–373.
 39. Tripp, B.C., Smith, K., and Ferry, J.G. (2001) Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme, *J. Biol. Chem.*, **276**, 48615–48618.
 40. Badger, M.R., and Price, G.D. (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **45**, 369–392.
 41. Atkins, C.A., Patterson, B.D., and Graham, D. (1972) Plant carbonic anhydrases: I. Distribution of types among species, *Plant Physiol.*, **50**, 214–217.
 42. Rumeau, D., Cuine, S., Fina, L., Gault, N., Nicole, M., and Peltier, G. (1996) Subcellular distribution of carbonic anhydrase in *Solanum tuberosum* L. leaves: characterization of two compartment-specific isoforms, *Planta*, **199**, 79–88.
 43. Alber, B.E., and Ferry, J.G. (1994) A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6909–6913.
 44. 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*, *EMBO J.*, **15**, 2323–2330.
 45. Roberts, S.B., Lane, T.W., and Morel, F.M. (1997) Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (*Bacillariophyceae*), *J. Phycol.*, **33**, 845–850.
 46. 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 I, *Biochemistry*, **39**, 12128–12130.
 47. So, A.K., Espie, G.S., Williams, E.B., Shively, J.M., Heinhorst, S., and Cannon, G.C. (2004) A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell, *J. Bacteriol.*, **186**, 623–630.
 48. Lane, T.W., and Morel, F.M. (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4627–4631.
 49. Park, H., Song, B., and Morel, F.M. (2007) Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters, *Environ. Microbiol.*, **9**, 403–413.
 50. 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**, 56–61.
 51. Friedland, B.R., and Maren, T.H. (1981) The relation between carbonic anhydrase activity and ion transport in elasmobranch and rabbit lens, *Exp. Eye Res.*, **33**, 545–561.
 52. Maren, T.H. (1988) The kinetics of HCO₃⁻ synthesis related to fluid secretion, pH control, and CO₂ elimination, *Annu. Rev. Physiol.*, **50**, 695–717.
 53. Davies, D.D. (1973) Control of and by pH, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27**, 513–529.
 54. Wessing, A., Zierold, K., and Bertram, G. (1997) Carbonic anhydrase supports electrolyte transport in *Drosophila* Malpighian tubules. Evidence by X-ray microanalysis of cryosections, *J. Insect Physiol.*, **43**, 17–28.
 55. Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L.R., and Manfredi, G. (2009) Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation, *Cell Metab.*, **9**, 265–276.
 56. Walker, N.A. (1983) The uptake of inorganic carbon by freshwater plants, *Plant Cell Environ.*, **6**, 323–328.
 57. Kupriyanova, E.V., Sinetova, M.A., Cho, S.M., Park, Y.-I., Los, D.A., and Pronina, N.A. (2013) CO₂-concentrating mechanism in cyanobacterial photosynthesis: organization, physiological role, and evolutionary origin, *Photosynth. Res.*, **117**, 133–146.
 58. Moroney, J.V., and Ynalvez, R.A. (2007) Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot. Cell*, **6**, 1251–1259.
 59. Moroney, J.V., Husic, H.D., and Tolbert, N.E. (1985) Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **79**, 177–183.
 60. Ynalvez, R.A., Xiao, Y., Ward, A.S., Cunnusamy, K., and Moroney, J.V. (2008) Identification and characterization of two closely related beta-carbonic anhydrases from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physiol. Plant.*, **133**, 15–26.
 61. Lucas, W.J., and Berry, J.A. (1985) Inorganic carbon transport in aquatic photosynthetic organisms, *Physiol. Plant.*, **65**, 539–543.
 62. Price, G.D., Badger, M.R., Bassett, M.E., and Whitecross, M.I. (1985) Involvement of plasmalemmasomes and carbonic anhydrase in photosynthetic utilization of bicarbonate in *Chara corallina*, *Aust. J. Plant Physiol.*, **12**, 241–256.
 63. Prins, H.B.A., and Helder, R.J. (1984) HCO₃⁻ assimilation by *Potamogeton lucens*: polar cation transport and the role of H⁺ extrusion. In *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms* (Lucas, W.J., and Berry, J.A., eds.), Waverly Press, Baltimore, pp. 271–286.
 64. Игнатова Л.К., Романова А.К. (1992) Участие карбоангидразы в ингибировании фотосинтеза протопластов гороха избытком CO₂, *Физиология растений*, **39**, 711–717.
 65. Utsunomiya, E., and Muto, S. (1993) Carbonic anhydrase in the plasma membranes from C3 and C4 plants, *Physiol. Plant.*, **88**, 413–419.
 66. 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.
 67. Ignatova, L.K., Moskvina, O.V., Romanova, A.K., and Ivanov, B.N. (1998) Carbonic anhydrases in the C3-plant leaf cell, *Aust. J. Plant Physiol.*, **25**, 673–677.
 68. Игнатова Л.К., Москвина О.В., Иванов Б.Н. (2001) Влияние ингибиторов карбоангидразы на протонный обмен и фотосинтез протопластов гороха, *Физиология растений*, **48**, 545–550.
 69. Popova, L., Lasova, G.H., and Miteva, T.S. (1991) Abscisic acid, jasmonic and NaCl effect on carbonic anhydrase activity in barley leaves, *C.R. Acad. Bulg. Sci.*, **44**, 51–54.
 70. Иванов Б.Н., Игнатова Л.К., Романова А.К. (2007) Разнообразие форм и функций карбоангидраз в высших наземных растениях, *Физиология растений*, **54**, 165–185.
 71. Ku, M.S., Kano-Murakami, Y., and Matsuoka, M. (1996) Evolution and expression of C4 photosynthesis genes, *Plant Physiol.*, **111**, 949–957.

72. Parisi, G., Perales, M., Fornasari, M.S., Gonzalez-Schain, A.C.N., Gomez-Casati, D., Zimmermann, S., Brennicke, A., Araya, A., Ferry, J.G., Echave, J., and Zabaleta, E. (2004) Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria, *Plant Mol. Biol.*, **55**, 193–207.
73. Sunderhaus, S., Dudkina, N.V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E.J., and Braun, H.-P. (2006) Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants, *J. Biol. Chem.*, **281**, 6482–6488.
74. Perales, M., Parisi, G., Fornasari, M.S., Colaneri, A., Villarreal, F., Gonzalez-Schain, N., Gomez-Casati, D., Braun, H.P., Araya, A., Echave, J., and Zabaleta, E. (2004) Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I, *Plant Mol. Biol.*, **56**, 947–957.
75. Zabaleta, E., Martin, M.V., and Braun, H.P. (2012) A basal carbon concentrating mechanism in plants? *Plant Sci.*, **187**, 97–104.
76. Bird, I.F., Cornelius, M.J., and Keys, A.J. (1980) Effect of carbonic anhydrase on the activity of ribulose biphosphate carboxylase, *J. Exp. Bot.*, **31**, 365–369.
77. Porter, M.A., and Grodzinski, B. (1984) Acclimation to high CO₂ in bean. Carbonic anhydrase and ribulose biphosphate carboxylase, *Plant Physiol.*, **74**, 413–416.
78. Hoang, C.V., and Chapman, K.D. (2002) Biochemical and molecular inhibition of plastidial carbonic anhydrase reduces the incorporation of acetate into lipids in cotton embryos and tobacco cell suspensions and leaves, *Plant Physiol.*, **128**, 1417–1427.
79. 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.
80. Majeau, N., Arnoldo, M.A., and Coleman, J.R. (1994) Modification of carbonic anhydrase activity by antisense and over-expression constructs in transgenic tobacco, *Plant Mol. Biol.*, **25**, 377–385.
81. Ferreira, F.J., Guo, C., and Coleman, J.R. (2008) Reduction of plastid-localized carbonic anhydrase activity results in reduced Arabidopsis seedling survivorship, *Plant Physiol.*, **147**, 585–594.
82. Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**, 283–307.
83. Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B., and Klessig, D. (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11640–11645.
84. Restrepo, S., Myers, K.L., del Pozo, O., Martin, G.B., Hart, A.L., Buell, C.R., Fry, W.E., and Smart, C.D. (2005) Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **18**, 913–922.
85. Frick, U.B., and Schaller, A. (2002) cDNA microarray analysis of fusicoccin-induced changes in gene expression in tomato plants, *Planta*, **216**, 83–94.
86. Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11655–11660.
87. Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. (2012) Hormonal modulation of plant immunity, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **28**, 489–521.
88. Hu, H., Boisson-Dernier, A., Israelsson-Nordstrom, M., Bohmer, M., Xue, S., Ries, A., Godoski, J., Kuhn, J.M., and Schroeder, J.I. (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells, *Nature Cell Biol.*, **12**, 87–93.
89. Buren S. (2010) *Targeting and function of CAH1-Characterisation of a novel protein pathway to the plant cell chloroplast*. PhD Thesis, Umea University, Sweden.
90. Комарова Ю.М., Доман Н.Г., Шапошников Г.Л. (1982) Две формы карбоангидразы в хлоропластах бобов, *Биохимия*, **47**, 1027–1034.
91. Václínová, S.G., Goushtina, L.M., and Lazova, G.N. (1982) Carboanhydrase activity in chloroplasts and chloroplast fragments, *C.R. Acad. Bulg. Sci.*, **35**, 172–1724.
92. Moubarak-Milad, M., and Stemler, A. (1994) Oxidation-reduction potential dependence of photosystem II carbonic anhydrase in maize thylakoids, *Biochemistry*, **33**, 4432–4438.
93. Москвин О.В., Игнатова Л.К., Овчинникова В.И., Иванов Б.Н. (1995) Мембраносвязанная карбоангидраза тилакоидов гороха, *Биохимия*, **60**, 1130–1137.
94. 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. A photosystem II core complex-associated carbonic anhydrase, *Photosynth. Res.*, **79**, 93–100.
95. Пронина Н.А., Аллахвердиев С.И., Куприянова Е.В., Клячко-Гурвич Г.Л., Климов В.В. (2002) Локализация карбоангидразы в субхлоропластных частицах гороха, *Физиология растений*, **49**, 431–439.
96. Руденко Н.Н., Игнатова Л.К., Каморницкая В.Б., Иванов Б.Н. (2006) Присутствие нескольких карбоангидраз в тилакоидах листьев гороха, *Докл. АН*, **408**, 553–555.
97. Rudenko, N.N., Ignatova, L.K., and Ivanov, B.N. (2007) Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms, *Photosynth. Res.*, **91**, 81–89.
98. Гринштейн С.В., Кост О.А. (2001) Структурно-функциональные особенности мембранных белков, *Успехи биологической химии*, **41**, 77–104.
99. Khristin, M.S., Ignatova, L.K., Rudenko, N.N., Ivanov, B.N., and Klimov, V.V. (2004) Photosystem II associated carbonic anhydrase activity in higher plants is situated in core complex, *FEBS Lett.*, **577**, 305–308.
100. Ignatova, L.K., Rudenko, N.N., Mudrik, V.A., Fedorchuk, T.P., and Ivanov, B.N. (2011) Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII, *Photosynth. Res.*, **110**, 89–98.
101. Lu, Y.K., and Stemler, A.J. (2002) Extrinsic photosystem II carbonic anhydrase in maize mesophyll chloroplasts, *Plant Physiol.*, **128**, 643–649.
102. Moskvin, O.V., Razguljajeva, A.Y., Shutova, T.V., Khristin, M.S., Ivanov, B.N., Klimov, V.V. (1999) Carbonic anhydrase activity of different Photosystem II preparation. In *Photosynthesis: Mechanism and Effects*. vol. II (Garab, G., ed.), Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1201–1204.
103. Игнатова Л.К., Руденко Н.Н., Христин М.С., Иванов Б.Н. (2006) Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран, *Биохимия*, **71**, 651–659.
104. Silverman, D.N. (1991) The catalytic mechanism of carbonic anhydrase, *Can. J. Botany*, **69**, 1070–1078.
105. Ilies, M., Banciu, M.D., Ilies, M.A., Scozzafava, A., Caproiu, M.T., and Supuran, C.T. (2002) Carbonic anhydrase activators: Design of high affinity isozymes I, II, and

- IV activators, incorporating tri- and tetrasubstituted-pyridinium-azole moieties, *J. Med. Chem.*, **45**, 504–510.
106. Lu, Y.K., and Stemler, A.J. (2007) Differing responses of the two forms of photosystem II carbonic anhydrase to chloride, cations, and pH, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 633–638.
 107. Шитов А.В., Побегуц О.В., Смолова Т.Н., Аллахвердиев С.И., Климов В.В. (2009) Марганецзависимая карбоангидразная активность белков фотосистемы 2, *Биохимия*, **74**, 629–639.
 108. Fedorchuk, T.P., Rudenko, N.N., Ignatova, L.K., and Ivanov, B.N. (2014) The presence of soluble carbonic anhydrase in the thylakoid lumen of chloroplasts from *Arabidopsis* leaves, *J. Plant Physiol.*, **171**, 903–906.
 109. Bjorkbacka, H., Johansson, I.N., Skarfstad, E., and Forsman, C. (1997) The sulfhydryl groups of Cys 269 and Cys 272 are critical for the oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*, *Biochemistry*, **36**, 4287–4294.
 110. Atkins, C.A., Patterson, B.D., and Graham, D. (1972) Plant carbonic anhydrases: II. Preparation and some properties of monocotyledon and dicotyledon enzyme types, *Plant Physiol.*, **50**, 218–223.
 111. Reising, H., and Shreiber, U. (1994) Inhibition by ethoxycarbonylamide of a photoacoustic uptake signal in leaves: evidence for carbonic anhydrase catalyzed CO₂-solubilisation, *Photosynth. Res.*, **42**, 65–73.
 112. Moskvin, O.V., Ignatova, L.K., Ivanov, B.N. (1999) Uncoupler-sensitive light-induced stimulation of carbonic anhydrase activity of pea thylakoids. In *Photosynthesis: Mechanism and Effects. vol. II* (Garab, G., ed.), Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1205–1208.
 113. Moskvin, O.V., Ivanov, B.N., Ignatova, L.K., and Kollmeier, M.A. (2000) Light-induced stimulation of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids, *FEBS Lett.*, **470**, 375–377.
 114. Stemler, A. (1997) The case for chloroplast thylakoid carbonic anhydrase, *Physiol. Plant.*, **99**, 348–353.
 115. Stemler, A., and Jursinic, P. (1983) The effects of carbonic anhydrase inhibitors formate, bicarbonate, acetazolamide, and imidazole on photosystem II in maize chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **221**, 227–237.
 116. Dai, X.B., Yu, Y., Zhang, R.X., Yu, X.J., He, P.M., and Xu, C.H. (2001) Relationship among photosystem II carbonic anhydrase, extrinsic polypeptides and manganese cluster, *Chin. Sci. Bull.*, **46**, 406–408.
 117. McConnell, I.L., Badger, M.R., Wydrzynski, T., and Hillier, W. (2007) A quantitative assessment of the carbonic anhydrase activity in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 639–647.
 118. Wydrzynski, T., and Govindjee (1975) A new site of bicarbonate effect in photosystem II of photosynthesis: evidence from chlorophyll fluorescence transients in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 403–408.
 119. Stemler, A. (1977) The binding of bicarbonate ions to washed chloroplast grana, *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 511–522.
 120. Klimov, V.V., Hulsebosch, R.J., Allakhverdiev, S.I., Wincencjusz, Y., and van Gorkom, B. (1997) Bicarbonate may be required for ligation of manganese in the oxygen-evolving complex of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 16277–16281.
 121. Klimov, V.V., and Baranov, S.V. (2001) Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 187–196.
 122. Mitz, M.A. (1979) CO₂ Biodynamics: a new concept of cellular control, *J. Theor. Biol.*, **80**, 537–551.
 123. Stemler, A. (1979) A dynamic interaction between the bicarbonate ligand and photosystem II reaction center complexes in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **545**, 36–45.
 124. Van Rensen, J.J., Tonk, W.J.M., and Bruijn, S.M. (1988) Involvement of bicarbonate in the protonation of the secondary quinone electron acceptor of photosystem II via the non-haem iron of the quinone-iron acceptor complex, *FEBS Lett.*, **226**, 347–351.
 125. Govindjee, Xu, C., and van Rensen, J.J.S. (1997) On the requirement of bound bicarbonate for photosystem II activity, *Z. Naturforschung*, **52**, 24–32.
 126. Villarejo, A., Shutova, T., Moskvina, O., Forssen, M., Klimov, V.V., and Samuelsson, G. (2002) A photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution, *EMBO J.*, **21**, 1930–1938.
 127. Журикова Е.М., Игнатова Л.К., Семенова Г.А., Руденко Н.Н., Мудрик В.А., Иванов Б.Н. (2015) Влияние нокаута гена α -карбоангидразы 4 на фотосинтетические характеристики *Arabidopsis thaliana* и накопление крахмала в листьях, *Физиология растений*, **62** (в печати).
 128. Crouchman, S., Ruban, A., and Horton, P. (2006) PsbS enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin, *FEBS Lett.*, **580**, 2053–2058.
 129. Johnson, M.P., and Ruban, A.V. (2011) Restoration of rapidly reversible photoprotective energy dissipation in the absence of PsbS protein by enhanced Δ pH, *J. Biol. Chem.*, **286**, 19973–19981.
 130. Gilmore, A.M., and Yamamoto, H.Y. (1992) Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1899–1903.
 131. Подорванов В.В., Золотарева Е.К., Черноштан А.А. (2005) Роль гидрокарбоната в светозависимом поглощении протонов изолированными хлоропластами, *Физиология и биохимия культурных растений*, **37**, 326–332.
 132. Золотарева Е.К. (2008) *Протонна регуляція трансформації енергії в тилакоїдних мембранах*. Дис. докт. биол. наук. ХНУ, Харків.
 133. Онойко Е.Б., Полищук А.В., Золотарева Е.К. (2010) Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы, *Доп. НАН України*, **10**, 160–165.
 134. Пронина Н.А., Семененко В.Е. (1984) Локализация мембраносвязанной и растворимой форм карбоангидразы в клетке хлореллы, *Физиология растений*, **31**, 241–251.
 135. Jebanathirajah, J.A., and Coleman, J.R. (1998) Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*, *Planta*, **204**, 177–182.
 136. Borisova-Mubarakshina, M.M., Kozuleva, M.A., Rudenko, N.N., Naydov, I.A., Klenina, I.B., and Ivanov, B.N. (2012) Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1314–1321.
 137. Sterling, D., Alvarez, B.V., and Casey, J.R. (2002) The extracellular component of a transport metabolon. Extracellular loop 4 of the human AE1 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger binds carbonic anhydrase IV, *J. Biol. Chem.*, **277**, 25239–25246.

**CARBONIC ANHYDRASES OF HIGHER
PLANT PHOTOSYNTHETIC CELLS****N. N. Rudenko, L. K. Ignatova, T. P. Fedorchuk,
B. N. Ivanov***

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy
of Sciences, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia;
fax: +7(4967)330-532, E-mail: ivboni@rambler.ru*

Received January 13, 2015

Revision received February 27, 2015

This review presents data about carbonic anhydrases, the enzymes catalyzing the interconversion of carbon dioxide and bicarbonate in water solutions. Their gene families are described, and the presence of representatives of these families in different classes of organisms, especially in higher plants, is considered. The functions of carbonic anhydrases, proven and prospective, in organisms are listed. Special attention is drawn to the enzyme functions capable of providing the photosynthetic reactions. These functions in algae are briefly described. Data about possible functions of carbonic anhydrase in plasmalemma, mitochondria, and chloroplast stroma in the cell of higher plants are discussed. Information about carbonic anhydrases in chloroplast thylakoids of higher plants, their quantity, and possible participation in photosynthetic reactions in this structure are analyzed in detail.

Key words: carbonic anhydrase, carbonic anhydrase families, plants, photosynthesis, chloroplasts, thylakoids