

**Карбоангидразы
хлоропластов высших C_3
растений и их участие в
фотосинтезе**

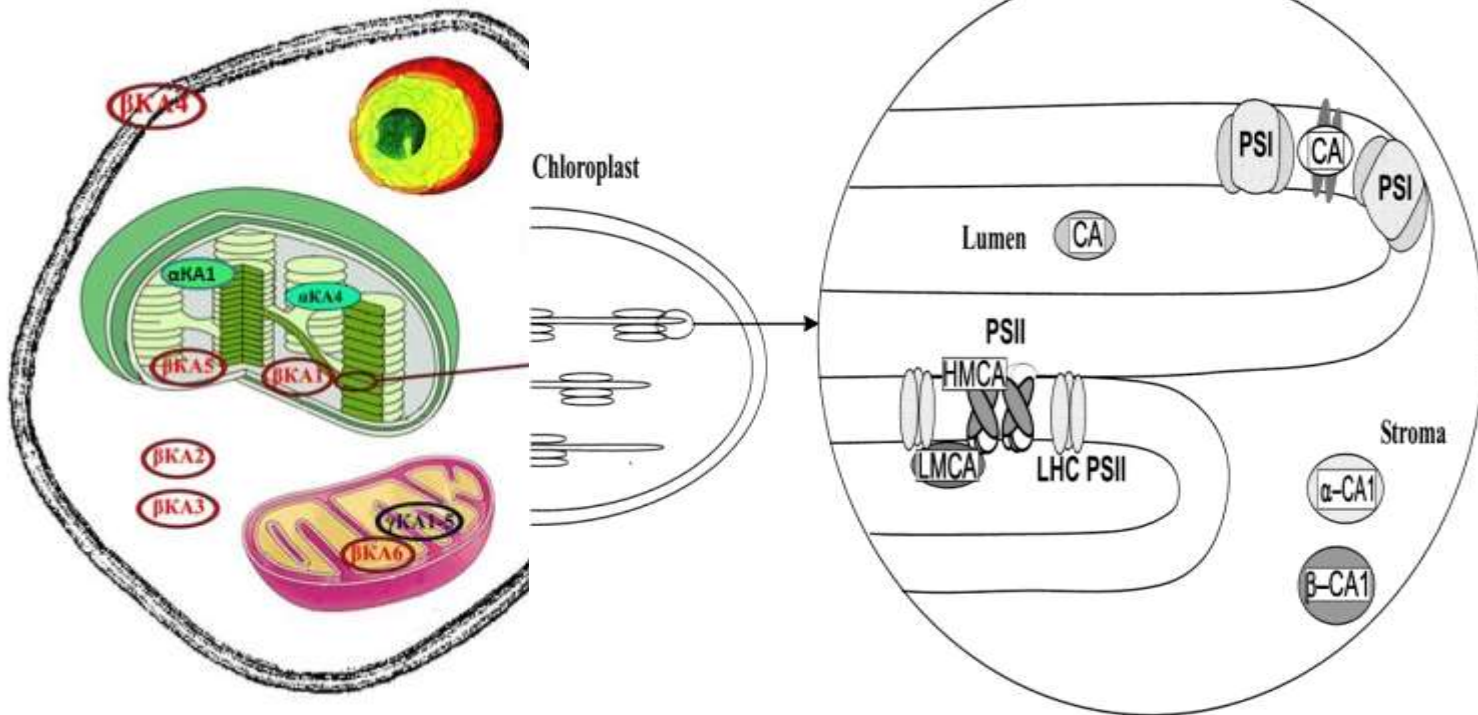
*Игнатова Л.К., Журикова Е.М.,
Руденко Н.Н., Федорчук Т.П.,
Иванов Б.Н.*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

Расположение карбоангидраз в клетке высших растений



У высшего растения *Arabidopsis thaliana* установлено присутствие 19 генов, кодирующих карбоангидразы (КА), принадлежащие к трем семействам: α -, β - и γ КА. Из них восемь α КА, шесть β КА и пять γ КА. Из представителей семейства α КА известно местонахождение только двух α КА1 и α КА4 и обе находятся в хлоропластах.



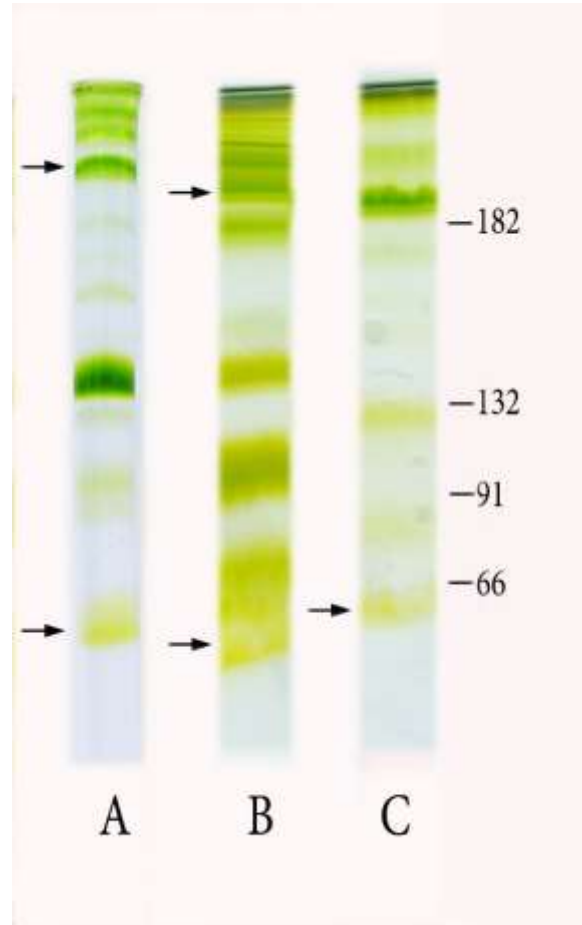
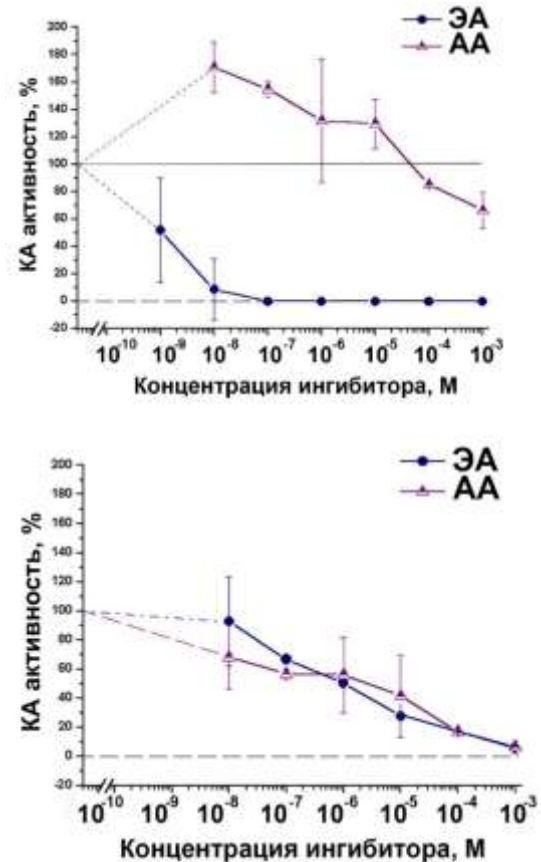
В хлоропластах высших растений обнаружены растворимые карбоангидразы в строме и люмене. В тилакоидах обнаружено несколько мембраносвязанных карбоангидраз, одна из них - α КА4 у *A. thaliana*. Точное местонахождение ее неизвестно. Два носителя КА активности найдены в ФСII-обогащенных мембранах (ФСII-мембраны) и в тилакоидных мембранах, обогащенных ФСI (ламеллярные мембраны). Природа этих КА не установлена.

Мембраносвязанные карбоангидразы хлоропластов

Гели после нативного электрофореза ФСII-мембран гороха (А), арабидопсиса (В) и ФСI-мембран арабидопсиса (С)

Во фрагментах ФСII-мембран, обнаружено два источника КА активности: низкомолекулярная КА и КА активность в компонентах кор-комплекса. В ФСI-мембранах также есть КА.

Действие 10^{-7} М ацетазоламида на КА активность элюатов из геля после нативного электрофореза ФСII-мембран *Arabidopsis thaliana* и *Pisum sativum*.

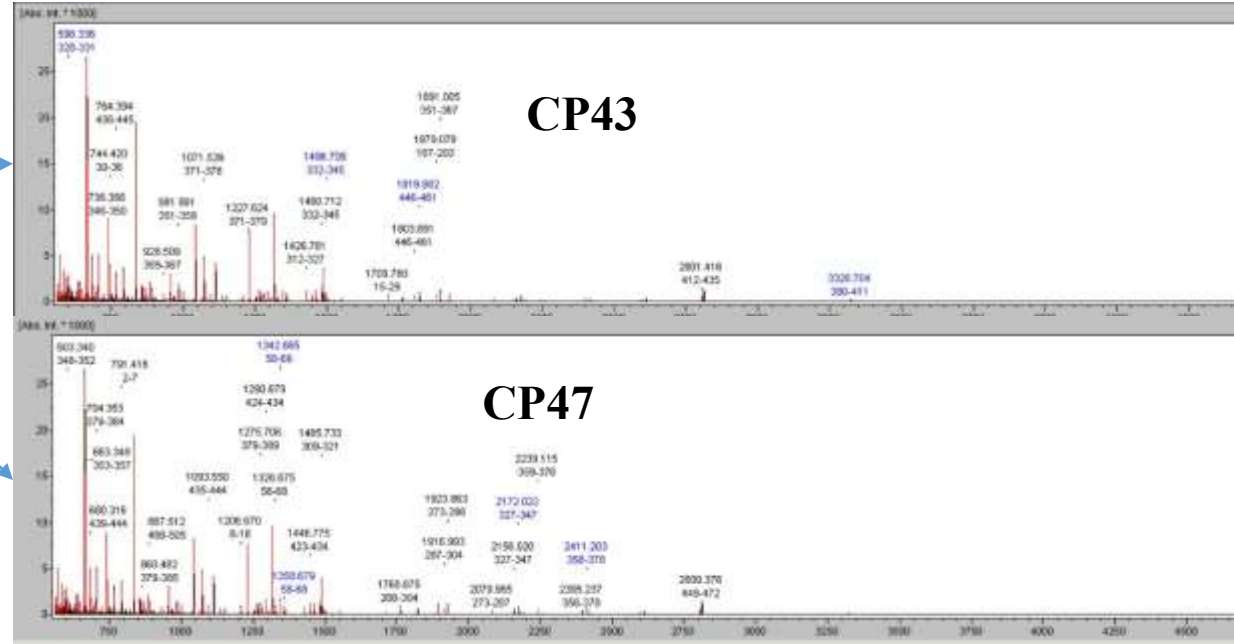


элюат	КА активность, %	
	арабидопсис	горох
высокомолекулярная полоса	18	0
низкомолекулярная полоса	313	322

За 100% принята КА активность полосы в отсутствие ингибитора.

Ignatova et al. (2011) Photosynth. Research

Масс-спектрометрический анализ полос геля, проявляющих КА активность после нативного электрофореза ФСII-мембран арабидопсиса

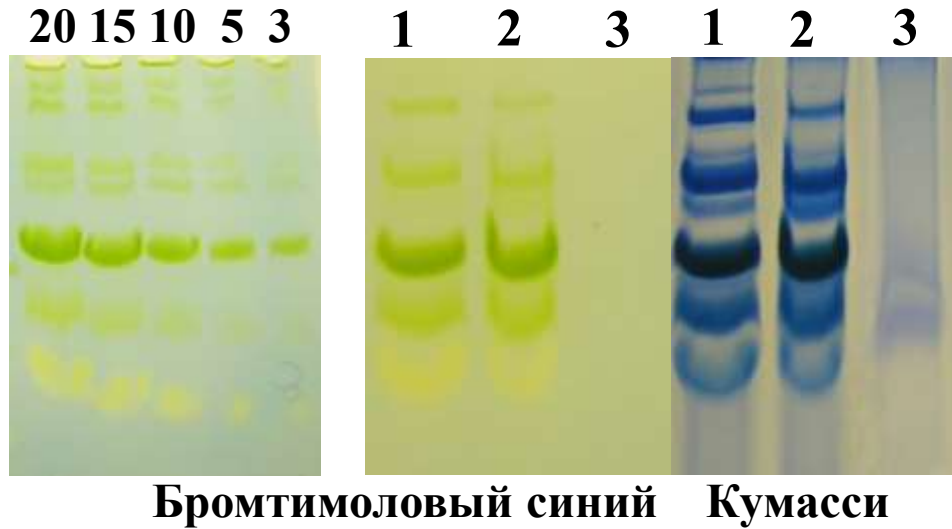


Белок 33 кДа PsbO

Высокомолекулярная КА ФСII-мембран чувствительна к ацетазоламиду, КА активность возрастала при удалении белков КВК. Двухвалентные катионы Mg^{2+} и Zn^{2+} подавляли её, а Ca^{2+} и Mn^{2+} увеличивали (*Moskvin et al. (2004) Photosynth. Research*)

Низкомолекулярная КА присутствовала в ФСII-мембранах из гороха, шпината и арабидопсиса.

Нативный электрофорез ФСII-мембран *Spinacia oleracea* и 33 кДа белка

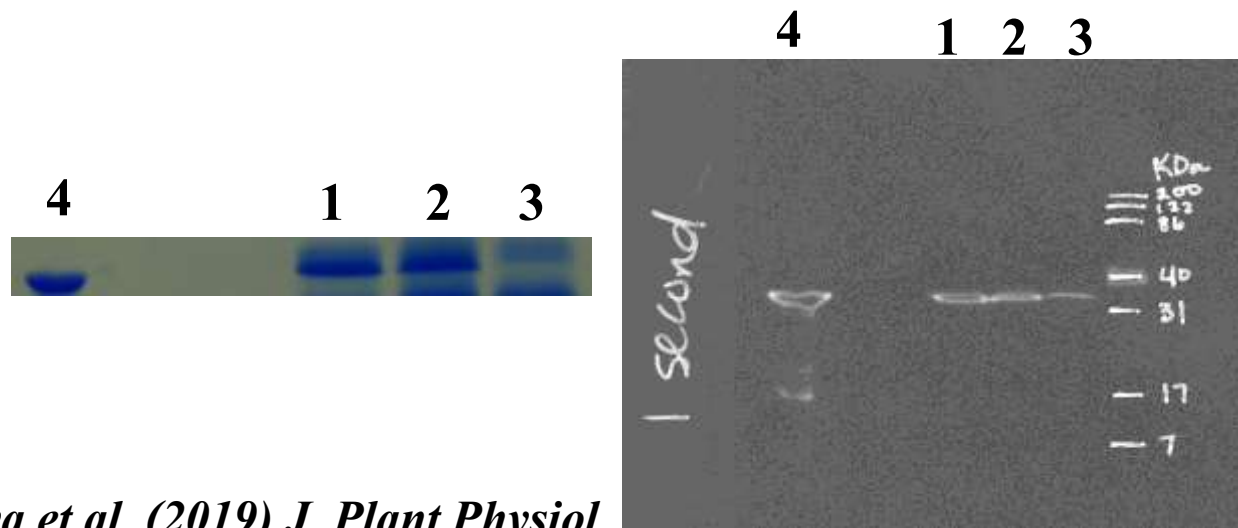


1 – ФСII-мембраны с удаленными 23 и 16 кДа белками КВК (PsbP, PsbQ)

2 - ФСII-мембраны с удаленными 33, 23 и 16 кДа белками (PsbO, PsbP, PsbQ)

3 – белок 33 кДа (PsbO)

SDS электрофорез и вестерн-блот анализ ФСII-мембран и 33 кДа белка



1 –ФСII-мембраны

2 – ФСII-мембраны с удаленными белками КВК (PsbP, PsbQ)

3 - ФСII-мембраны с удаленными белками КВК (PsbO, PsbP, PsbQ)

4 – белок PsbO

Среди белков тилакоидных мембран найдена α КА4 (Friso et al., 2004). КА активность ФСП-мембран из нокаутированных по гену *At4g20990*, кодирующему α КА4, растений не стимулировалась, а подавлялась ацетазоламидом (табл.)

Вариант	КА активность, μмоль Н⁺/мг Хл*мин	
	-AZ	+AZ (10⁻⁷М)
дикий тип	60,9 ± 10,7	70,0 ± 4,7
нокаут по αКА4	53,0 ± 11,6	21,6 ± 11,7

Характеристика мутантных растений, нокаутированных по гену *At2g28210*, кодирующему α КА2 и по гену *At4g20990*, кодирующему α КА4

Растения *Arabidopsis thaliana* мутантные по гену, кодирующему α КА2 и дикий тип



Alpha 2 (8-3)

Alpha 2 (9-11)

Columbia

Вес растений мутантных по α КА2 был ниже, чем у растений дикого типа на 25-30%, тогда как вес растений мутантных по гену *At4g20990*, кодирующему α КА4 превышал на 10-20% вес растений дикого типа. Особенностью этих мутантов является значительное в 2-3 раза более высокое, чем в диком типе, содержание крахмала.

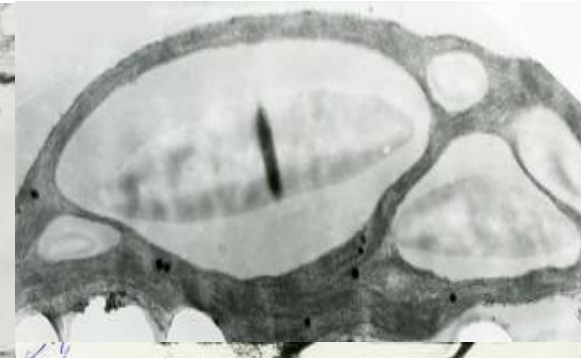
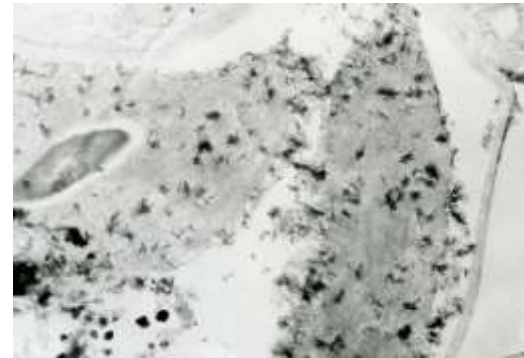


Columbia Нокаут по α КА4 (2 линии)

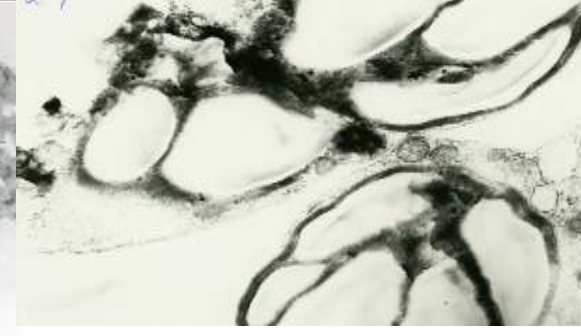
Содержание крахмала в листьях растений дикого типа и мутантных по α КА 2

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

Молодые листья

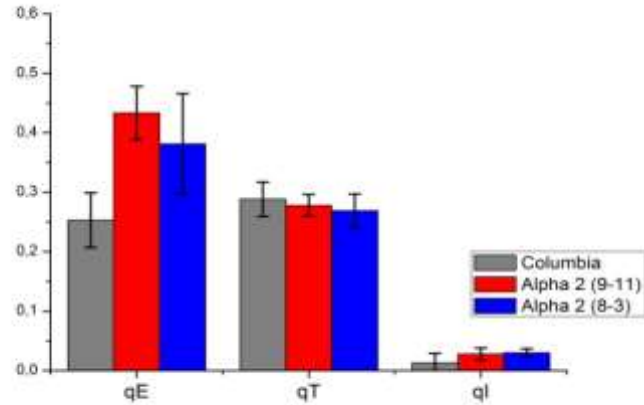


Зрелые листья

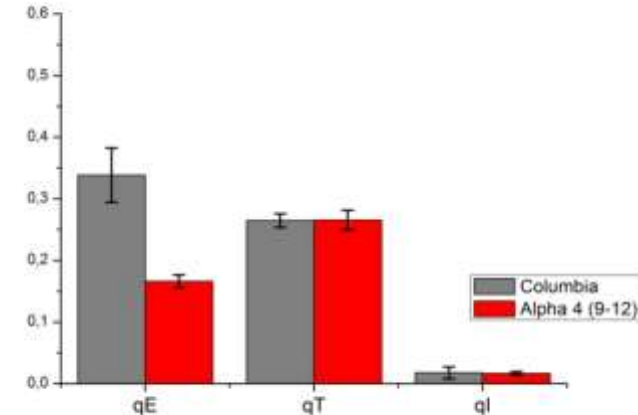


Сравнение компонентов нефотохимического тушения при стационарном фотосинтезе растений дикого типа и нокаутных мутантов по α КА2 и α КА4

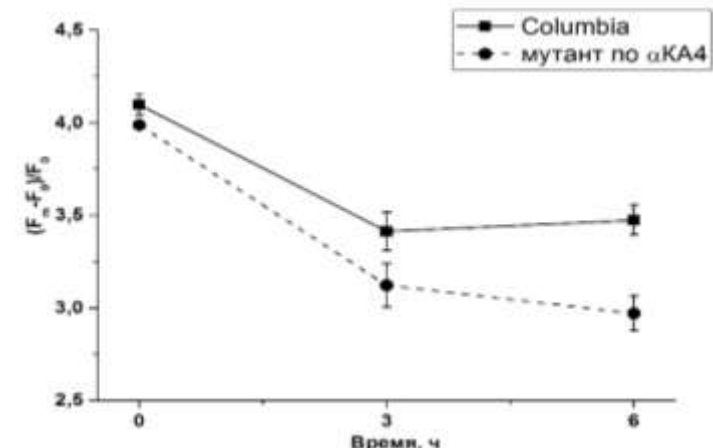
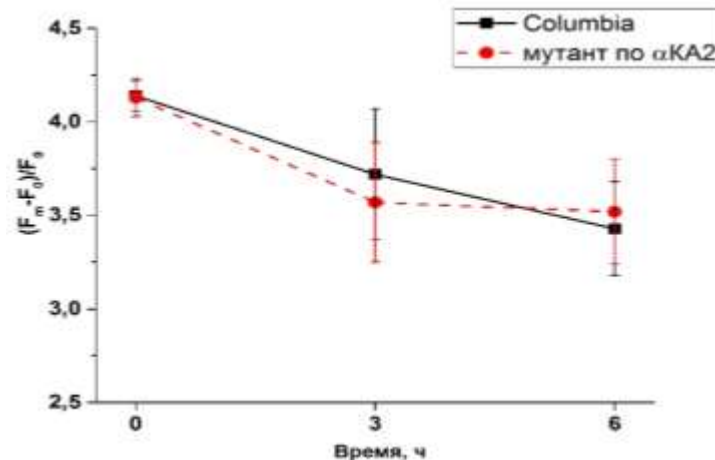
Мутант по α КА2



Мутант по α КА4



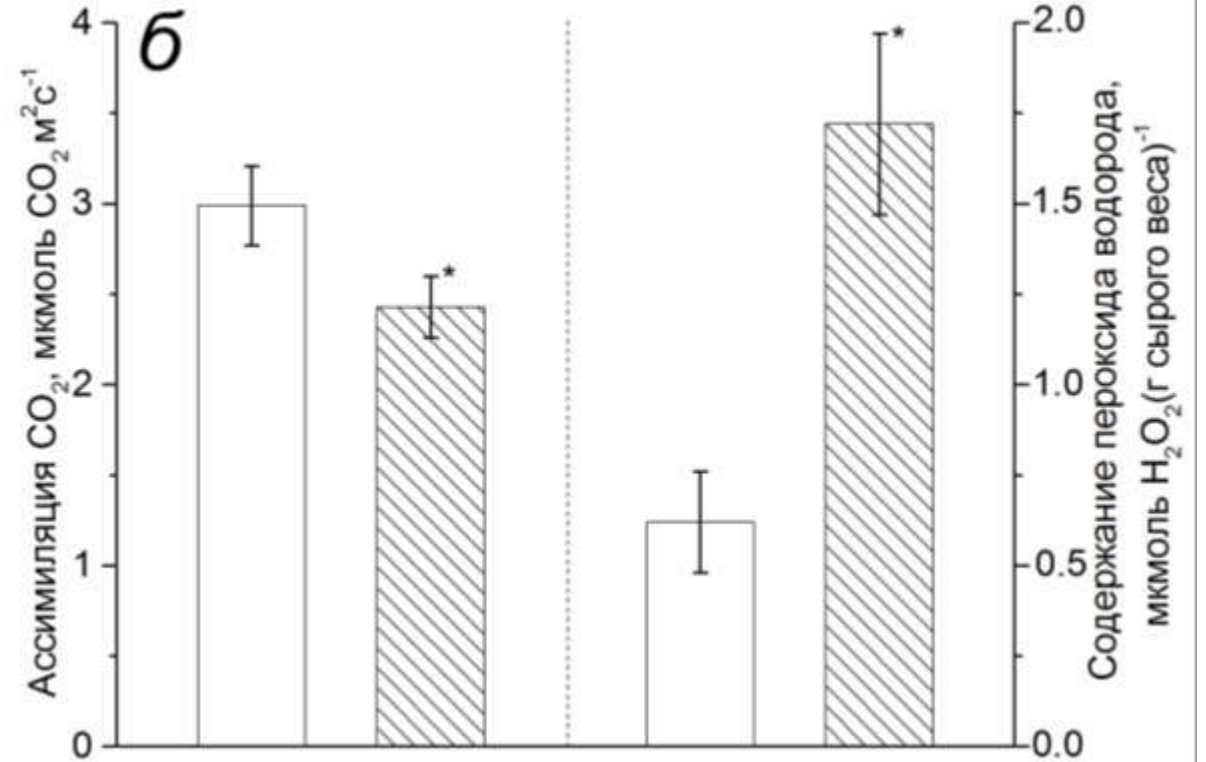
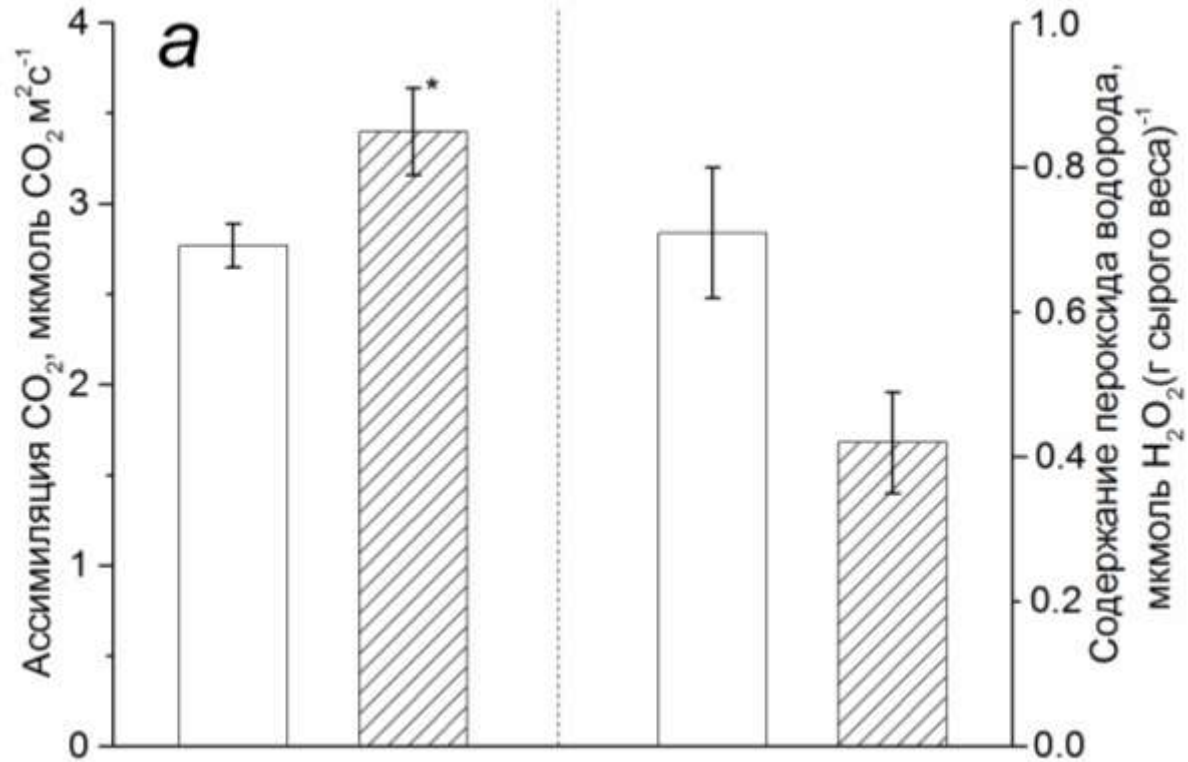
Различие между мутантами отчетливо выявилось при оптимальной концентрации CO_2 (800 ppm) и только в энергозависимом компоненте qE, обусловленном подкислением люмена. У мутантных растений по α КА2 qE значительно выше, чем у ДТ, а у мутантных растений по α КА4 ниже, чем у ДТ. Устойчивость ФСII к фотоингибированию у мутантов по α КА2, как у ДТ, тогда как у мутанта по α КА4 ниже ДТ.



Влияние нокаутов гена *At2g28210*, кодирующего α КА2 и гена *At4g20990*, кодирующего α КА4 на перераспределение потока электронов в ФЭТЦ

Мутант по α КА2

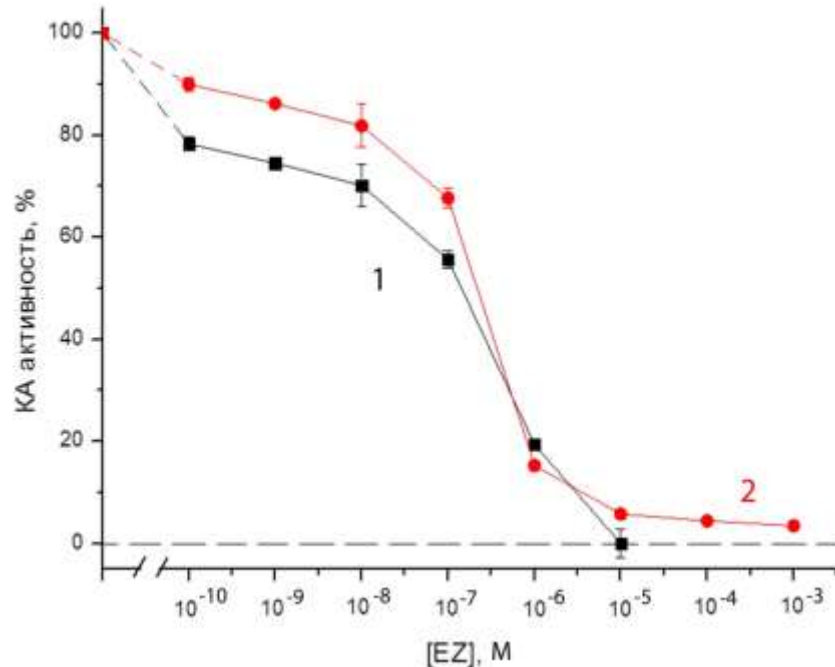
Мутант по α КА4



Скорость ассимиляции CO_2 и светоиндуцированное образование пероксида водорода в листьях. Белые столбики - растения ДТ, заштрихованные столбики - растения соответствующих мутантов. Интенсивность света, 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, концентрация CO_2 в воздухе, 700 ppm.

Растворимые карбоангидразы хлоропласта

В хлоропластах высших растений обнаружены растворимые карбоангидразы в строме и люмене. В люмене хлоропластов гороха и арабидопсиса обнаружена КА β семейства о чем свидетельствуют свойства очищенного белка:

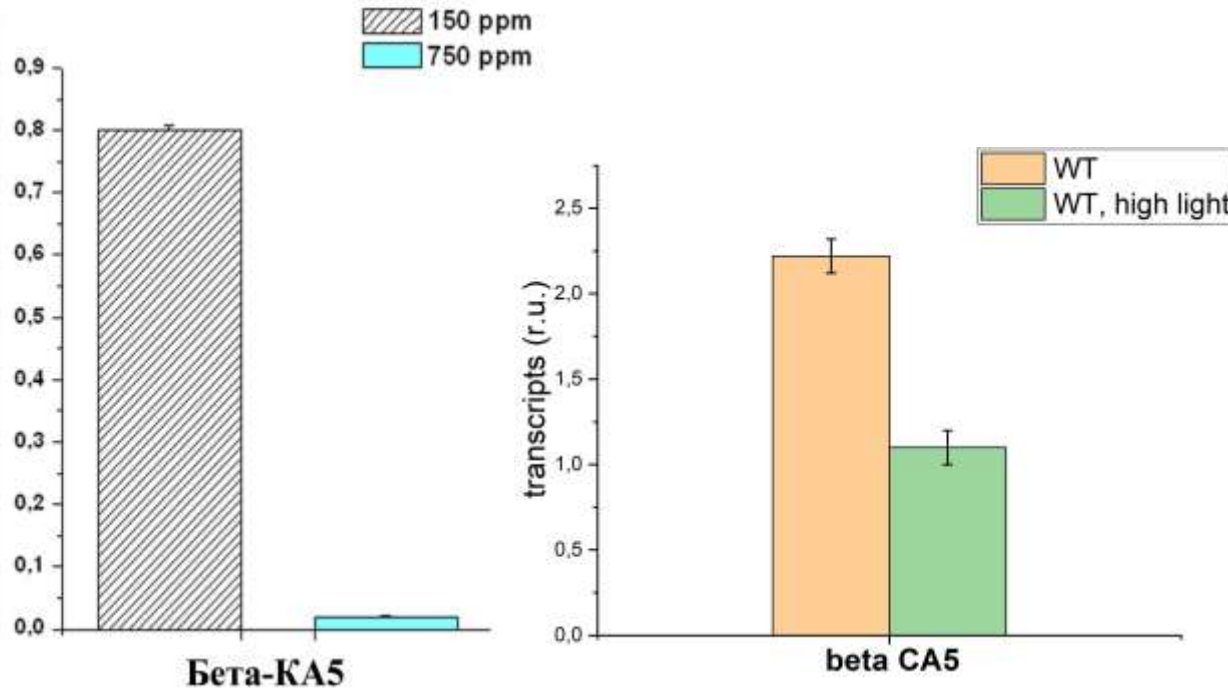


1-люменальная КА, 2- стромальная КА

- Зависимость от концентрации этоксизоламида (“F) характерная для представителей β семейства;
- Увеличение активности люменальной КА в присутствии дитиотрейтола, свидетельствующая о высоком содержании серусодержащих аминокислот;
- Кажущаяся молекулярная масса нативного белка 132 kDa, что свидетельствует об олигомерности белковой молекулы.

Fedorchuk et al., J. Plant Physiol. (2014)

Растения дикого типа



Нокаут *At4g33580* гена приводит к сильному отставанию в росте растений.

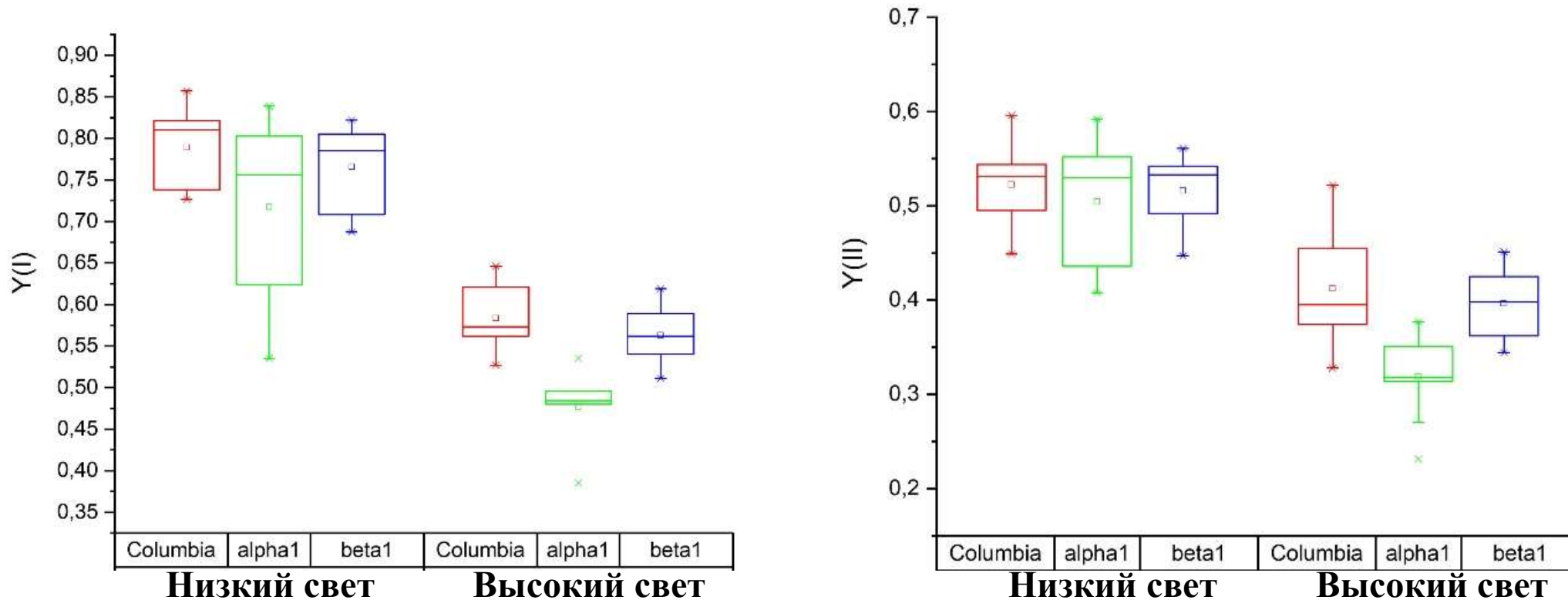
(фото предоставлено проф. Луизианского университета Д. Морони, США).

Растения арабидопсиса ДТ и мутанта по βКА5



При повышенной концентрации CO_2 в атмосфере (750 ppm) уровень экспрессии гена, кодирующего βКА5, значительно ниже такового в растениях, выращенных при пониженной концентрации CO_2 (150 ppm). Это практически единственная КА, уровень экспрессии которой снижается при выращивании растений ДТ при высокой интенсивности света.

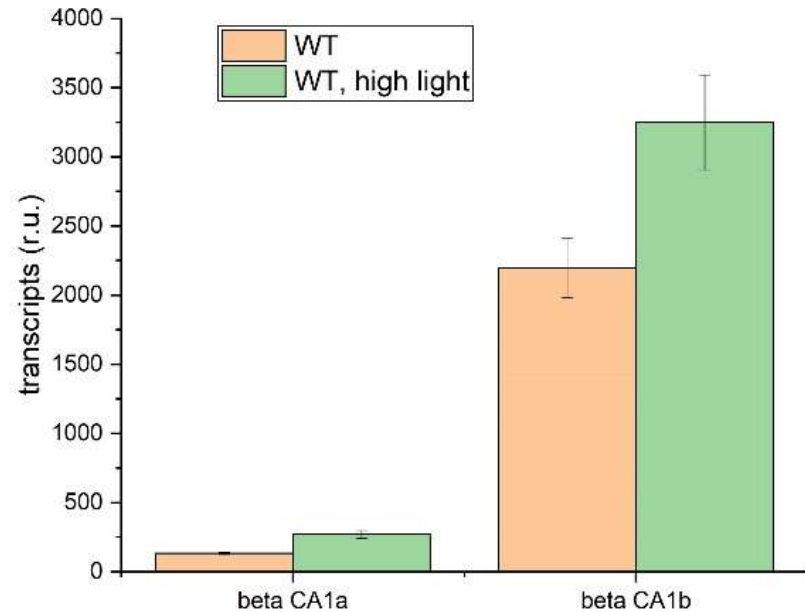
Квантовый выход ФСИ и ФСИИ растений ДТ и мутантов по генам, кодирующим стромальные КА: α КА1 и β КА1, выращенных при высокой интенсивности света ($400 \text{ мкмоль квантов/м}^2 \times \text{с}$)



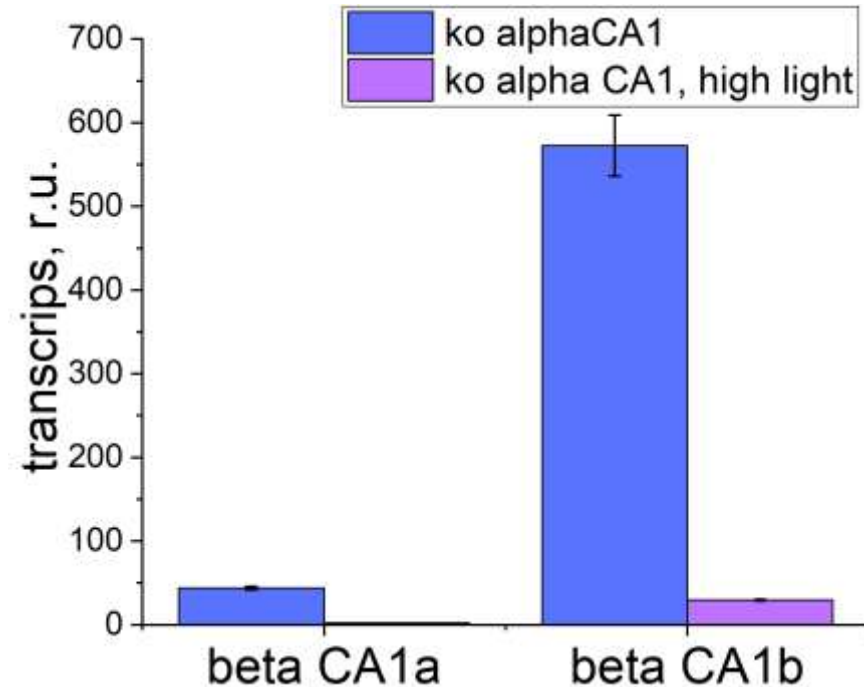
Растения с нокаутом по α КА1, выращенные при высокой интенсивности света имели более низкие эффективные квантовые выходы ФСИ ($Y(I)$) и ФСИИ ($Y(II)$), чем растения ДТ.

Уровень экспрессии гена β КА1 в ДТ и нокаутном мутанте по стромальной α КА1, выращенных при 400 мкмоль квантов/м²*с.

Уровень экспрессии гена β КА1 в ДТ



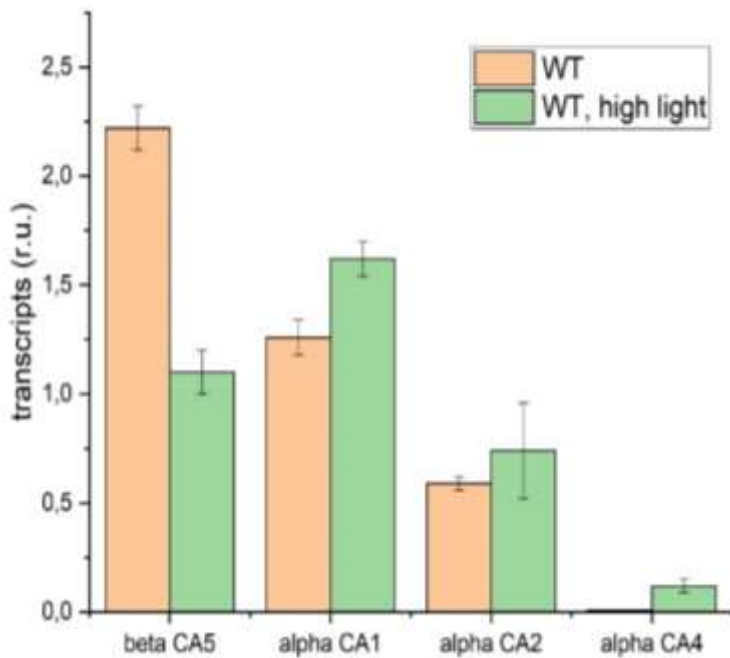
Уровень экспрессии гена β КА1 в мутанте по альфа КА1



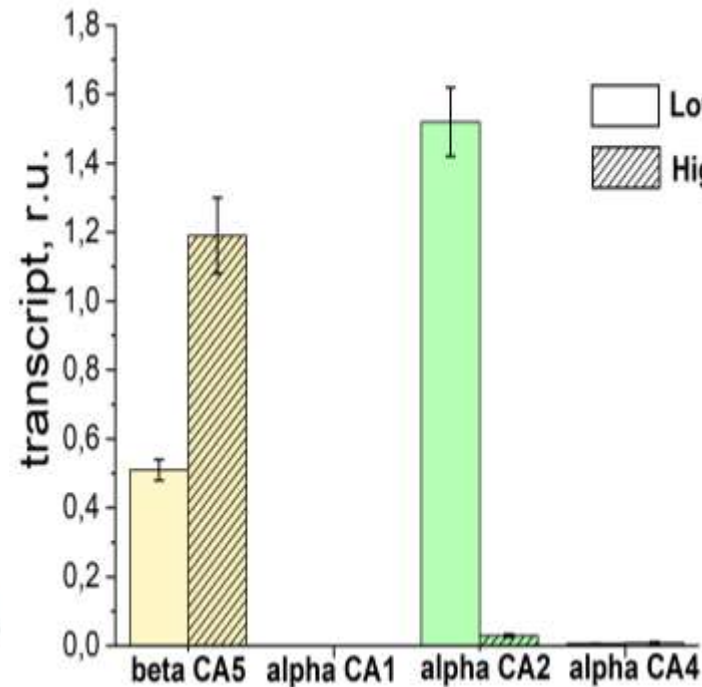
Существуют две изоформы β КА1: β КА1а и β КА1b (Руденко и др. (2017) Биохимия), различающиеся по количественному уровню транскриптов (сотни и тысячи усл. ед., соответственно). При высокой освещенности уровень экспрессии обеих изоформ β КА1 возрастал в ДТ, но снижался до 5% у нокаута по α КА1.

Уровень экспрессии генов, кодирующих хлоропластные КА, в ДТ и нокаутных мутантах по стромальным КА: α КА1 и β КА1, выращенных при 400 мкмоль квантов/м²*с.

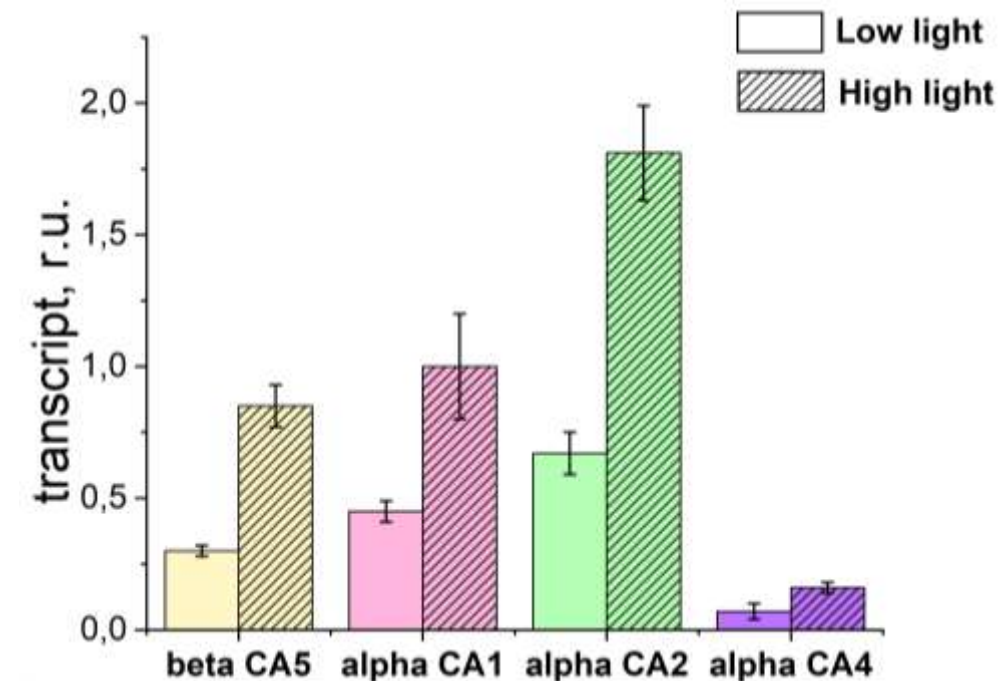
Дикий тип



Мутант по α КА1



Мутант по β КА1



В ДТ при высокой освещенности возрастает уровень экспрессии генов, кодирующих β КА1, α КА1 и α КА4. У мутантов по α КА1 возрастал уровень экспрессии гена, кодирующего β КА5, а β КА1 и α КА2 снижался значительно. У мутанта по гену, кодирующему β КА1 возрастал уровень экспрессии всех генов, кодирующих хлоропластные КА.

Содержание крахмала в листьях ДТ и нокаутных мутантов по стромальным КА α КА1 или β КА1.

Освещенность	Вариант	Содержание крахмала, мг/г сыр веса	
		3 недели	4 недели
50 мкмоль квантов/м ² ×с	Дикий тип	1,54 ± 0,05	1,28 ± 0,81
	Нокаут по α КА1	1,31 ± 0,21	0,47 ± 0,30
	Нокаут по β КА1	1,10 ± 0,25	0,18 ± 0,04
400 мкмоль квантов/м ² ×с	Дикий тип	2,70 ± 0,21	24,23 ± 1,98
	Нокаут по α КА1	6,21 ± 0,10	31,06 ± 1,20
	Нокаут по β КА1	4,39 ± 0,43	26,24 ± 2,41

При низкой освещенности содержание крахмала в листьях мутантных по стромальным КА растений ниже, чем у ДТ, тогда как при высокой освещенности наоборот, у мутантов намного выше, чем у ДТ и у мутантов при низкой освещенности. .

Вывод: все КА хлоропластов участвуют в адаптации к высокой освещенности (и, по видимому, к другим неблагоприятным факторам), однако существуют «связки» - совместно работающие КА, реализующие разные пути адаптации.



Спасибо за внимание!