

*На правах рукописи*



Шукшина Анна Константиновна

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЛЮМЕНАЛЬНОЙ КАРБОАНГИДРАЗЫ САНЗ В  
ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 *Chlamydomonas reinhardtii***

1.5.21. – Физиология и биохимия растений

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории фотосинтетического окисления воды Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

**НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:**

кандидат биологических наук Терентьев Василий Валерьевич

**НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:**

доктор биологических наук Савченко Татьяна Викторовна

**ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:**

**Мамедов Махир Джафар оглы**

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории электрогенных фотопроцессов отдела фотобиофизики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Войцеховская Ольга Владимировна**

Кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной и экологической физиологии Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук.

**ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:**

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород

Защита состоится «18» октября 2022 г. в 11-00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – «Физиология и биохимия растений» (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Телефон: +7 (499) 678-54-20; e-mail: [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, и на сайте <https://ippras.ru/>.

Автореферат разослан «    »                      2022 г.

Ученый секретарь совета  
по защите докторских  
и кандидатских диссертаций,  
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Карбоангидразы (КА) (ЕС 4.2.1.1) являются широко распространенными в природе металло-ферментами, катализирующими обратимую реакцию гидратации  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ). Они участвуют во многих физиологических процессах практически во всех известных организмах (Rudenko et al., 2015; Aspatwar et al., 2018), в том числе, большое количество работ указывает на участие КА или КА-активности в функционировании фотосистемы 2 (ФС2) (Stemler, 1986; Пронина с соавт., 1990; Moskvina et al., 2001; Villarejo et al., 2002; Shutova et al., 2008; Shitov et al., 2018). Несмотря на это, мембранно-связанная люменальная  $\alpha$ -КА САНЗ из зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* на данный момент является единственной идентифицированной КА, ассоциированной с ФС2, которая оказывает влияние на активность водоокисляющего комплекса (ВОК) ФС2 (Karlsson et al., 1998; Park et al., 1999; Villarejo et al., 2002; Shutova et al., 2008).

Первоначально предполагалось, что функциональная роль САНЗ заключается в ускорении дегидратазного направления реакции ( $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ) в тилакоидах, пронизывающих пиреноид хлоропласта *C. reinhardtii*, где образующийся  $\text{CO}_2$  может свободно диффундировать из люмена через тилакоидную мембрану к ферменту рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилазе-оксигеназе (Рубиско) (ЕС 4.1.1.3) (Sinetova et al., 2012; Markelova et al., 2009). Однако практически одновременно с этим были получены данные, свидетельствующие о присутствии значительного количества белка САНЗ в мембранных препаратах, обогащенных ФС2, а также о необходимости КА-активности САНЗ для оптимального функционирования ФС2 так же за счет ускорения дегидратазного направления реакции (Villarejo et al., 2002).

Получение рекомбинантного белка САНЗ (Shutova et al., 2008), а также использование препаратов ФС2, изолированных из мутанта *C. reinhardtii cia3*, с отсутствующей САНЗ в люмене тилакоидов (Karlsson et al., 1998), дало возможность провести эксперименты, результаты которых показали значительное стимулирование активности ( $> 40\%$ ) ВОК ФС2 из *cia3* при pH 5,5 (т.е., в условиях максимально возможного обеднения среды по  $\text{HCO}_3^-$ ) в присутствии стехиометрически эквивалентного количества рекомбинантного САНЗ и добавлении микромолярных ( $< 250$  мкМ) концентраций  $\text{HCO}_3^-$ , а также блокирование этого эффекта в присутствии 0,2 мкМ этоксизоламида (ЭА) – известного ингибитора КА (Shutova et al., 2008). На основе полученных данных была предположена гипотеза участия САНЗ в стимулировании отвода протонов от активного центра ВОК за счет ускорения реакции взаимодействия  $\text{HCO}_3^-$  с  $\text{H}^+$  (дегидратазное направление) в люмене в непосредственной близости от ВОК (Shutova et al., 2008). В подтверждение этого выступали результаты о повышенной чувствительности препаратов ФС2 из *cia3* к освещению. При pH 5,5 в обедненной по  $\text{HCO}_3^-$  среде свет интенсивностью 200 мкмоль фотонов  $\text{m}^{-1} \text{s}^{-1}$  снижал  $\text{O}_2$ -выделяющую активность препаратов ФС2 из *cia3* наполовину уже через 17 с, что

полностью предотвращалось в присутствии рекомбинантного белка САНЗ и 50 мкМ  $\text{HCO}_3^-$  (Shutova et al., 2008). При адаптации к свету интенсивностью 200 мкмоль фотонов  $\text{м}^{-1} \text{с}^{-1}$  в клетках *cia3*, в отличие от дикого типа (ДТ), было отмечено индуцирование изменения морфологии хлоропласта, что выступало в качестве одного из защитных механизмов ФС2 от фотоингибирования и способствовало поддержанию ее максимальной фотосинтетической активности, сохраняющейся на уровне ДТ (Terentyev, 2021).

Таким образом, белок САНЗ является важным участником фотосинтетического аппарата *C. reinhardtii* и оказывает значительное влияние на ФС2, поддерживая ее максимальную фотосинтетическую активность. Однако имеющиеся на сегодняшний день данные о роли САНЗ в функционировании ФС2 остаются неполными и требуют дополнительных исследований.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы: изучить роль люменальной карбоангидразы САНЗ в функционировании ФС2 из *C. reinhardtii*. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Исследовать биохимические характеристики мембранных препаратов, обогащенных ФС2, изолированных из ДТ и из мутанта *cia3* с отсутствующей в тилакоидах карбоангидразой САНЗ;
2. Изучить влияние КА-активности САНЗ на фотосинтетическую активность ФС2;
3. Изучить роль белка САНЗ в стабилизации структурной организации ВОК ФС2;
4. Получить данные об уровне экспрессии генов, кодирующих белки ФС2, а также САНЗ, в ДТ и мутанте *cia3*.

**Научная новизна работы.** В ходе выполнения работы впервые были получены комплексные данные об основных биохимических характеристиках мембранных препаратов, обогащенных ФС2, из ДТ и мутанта *cia3 C. reinhardtii*. Было обнаружено незначительное влияние отсутствия САНЗ на эти показатели, в том числе на такие, как пигментный состав, содержание белков ФС2, количество молекул хлорофилла (Хл) и атомов Mn на один реакционный центр (РЦ) ФС2, в отличие от показанного ранее (Villarejo et al., 2002), что объяснялось оптимальными условиями выращивания культуры водорослей (~100 мкмоль фотонов  $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ , 5%  $\text{CO}_2$  и др.). При этом впервые показано, что КА-активность САНЗ поддерживает фотосинтетическую активность ФС2 при pH от 6,5 (оптимального для функционирования ВОК) до 7,0 и снижает уровень необратимого ингибирования ВОК при pH выше 7,25.

Подтверждена важная роль ускорения дегидратазного направления реакции карбоангидразой САНЗ в поддержании активности ФС2.

Впервые получены данные о распределении редокс-форм цитохрома *b559* (белка корового комплекса ФС2) в препаратах ФС2 из *C. reinhardtii*. Обнаружено повышенное содержание низкопотенциальной формы за счет снижения доли среднепотенциальной

формы у препаратов ФС2 из *cia3*, что указывает на возможность структурных изменений в ВОК в отсутствие САНЗ.

Впервые показано снижение конформационной стабильности ВОК в отсутствие белка САНЗ (не зависимо от его КА-активности), в том числе более затрудненное удаление белка PsbP при повышении NaCl, как результат возможного формирования дополнительных гидрофобных и электростатических связей между белками ВОК в отсутствие САНЗ.

Показано подавление экспрессии генов, кодирующих белки ВОК и стимулирование экспрессии гена, кодирующего белок РЦ (D1) в клетках мутанта *cia3*, выращенных в оптимальных (не стрессовых) условиях, по сравнению с клетками ДТ.

**Научно-практическая значимость.** Полученные данные описывают биохимические и функциональные характеристики мембранных препаратов, обогащенных ФС2, выделенных из классического объекта исследования фотосинтеза – зеленой микроводоросли *C. reinhardtii*. При этом они позволяют оценить влияние белка САНЗ и его КА-активности на функционирование ФС2, ее устойчивость и структурную стабильность ВОК, что вносит существенный вклад в фундаментальные знания о роли КА тилакоидного люмена, в том числе, предполагаемых и для высших растений, в функционировании фотосинтетического аппарата в эукариотических фотосинтезирующих организмах. В дальнейшем, эти знания могут помочь в использовании влияния КА-активности на ФС2 для повышения продуктивности как культур микроводорослей, так и сельскохозяйственных культур.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Изученные биохимические характеристики препаратов ФС2, выделенных из клеток *C. reinhardtii* ДТ и мутанта *cia3* в основном схожи, за исключением повышенного содержания каротиноидов (Кар) виолоксантинового цикла и низкопотенциальной окислительно-восстановительной формы цитохрома *b559* в препаратах ФС2 из мутанта *cia3*.

2. Сохранению высокой фотосинтетической активности ФС2 в *C. reinhardtii* при смещении рН от оптимального для ВОК 6,5 в щелочную сторону способствует дегидратазная КА-активность САНЗ.

3. Белок САНЗ независимо от КА-активности оказывает влияние на структурную организацию ВОК. Отсутствие белка САНЗ в ФС2 из мутанта *cia3* повышает степень ассоциации с ВОК легко отмываемого белка PsbP.

4. Уровень экспрессии гена *psbA*, кодирующего белок D1 выше в клетках мутанта *cia3*, в то время как уровни экспрессии генов, кодирующих белки ВОК, в основном, снижены. Уровень экспрессии гена *Cah3* одинаков в обоих штаммах.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на 7 российских и международных конференциях: «Биология – наука XXI века», Пущино, 2018; «Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability», Санкт-Петербург, 2019; IX съезд общества физиологов растений России «Физиология растений – основа

создания растений будущего», Казань, 2019; «Биология – наука XXI века», Пушкино, 2020; IX съезд российского фотобиологического общества «Современные проблемы фотобиологии», Шепси, 2021; годовое собрание общества физиологов растений России «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее», Москва, 2021; «Биология – наука XXI века», Пушкино, 2022.

**Связь с научными программами.** Диссертация выполнена в лаборатории фотосинтетического окисления воды Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН в рамках госзадания: АААА-А17-117030110136-8, 121040600140-3 при поддержке гранта РФФИ «Аспиранты» № 19-34-90056.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работах, из которых 3 статьи в рецензируемых изданиях, включенных в перечень ВАК.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания объектов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, выводов и списка литературы, который состоит из 94 источников, в том числе 5 на русском и 89 на английском языке. Работа изложена на 99 страницах, включает в себя 36 рисунков и 9 таблиц.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Объектами исследования были мембранные препараты, обогащенные ФС2, изолированные из ДТ и мутанта *cia3* зеленой микроводоросли *C. reinhardtii*. В качестве ДТ использовали мутант без клеточной стенки СС-503 cw92 mt+, и двойной мутант *cia3* без клеточной стенки лишенный также КА САНЗ в люмене тилакоидов. Оба штамма выращивали фотоавтотрофно в бедной среде в одинаковых условиях при 25 °С и аэрации воздухом, обогащенным 5%-ным СО<sub>2</sub>. Непрерывное освещение культуры холодным белым светом (интенсивность 90–100 мкМ фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>) обеспечивалось люминесцентными лампами. Клетки собирали в середине экспоненциальной фазы роста на 4–5 сутки.

Для изолирования мембранных препаратов, обогащенных ФС2, применяли методику, описанную в (Terentyev et al, 2020). Осажденные при 3000 g (10 мин) клетки ресуспендировали в охлажденном буфере А (50 мМ Hepes-NaOH, pH 7,8, 100 мМ NaCl, 2 мМ EDTA) и разрушали с помощью механического гомогенизатора типа Beadbeater («BioSpec», США) с использованием 0,5 мм циркониевых бус (zirconia/silica, «BioSpec»). Непосредственно перед разрушением в буфер А добавляли аскорбат Na до конечной концентрации 1 мМ. Разрушенные клетки центрифугировали при 7000g 30 мин для осаждения фракции, содержащей тилакоидные мембраны. Осадок ресуспендировали в охлажденном буфере В (50 мМ Hepes, pH 7,8, 3 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мМ сахарозы, 2 мМ EDTA) с добавлением аскорбата Na до конечной концентрации 1 мМ и центрифугировали при 7000g 30 мин. Осадок ресуспендировали в охлажденном буфере С (20 мМ Mes, pH 6,5, 15 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 300 мМ сахарозы) до концентрации Хл ~3–4 мг/мл. К тилакоидным мембранам добавляли

Triton X-100 (20%-ный водный раствор (w/w)) до соотношения Triton X-100 : Хл (w/w) как 20 : 1. Препараты солибилизировали при медленном перемешивании 25–30 мин на льду в темноте. Мембранные препараты, обогащённые ФС2, осаждали при 40000g 35 мин и ресуспендировали в охлажденном буфере С. Препараты дважды пересаждали в буфере С для полной отмывки от Triton X-100. При финальной отмывке препараты ресуспендировали в растворе С до концентрации Хл ~3–4 мг/мл и гомогенизировали с 10% глицерином. Полученные образцы хранили при -70 °С.

Общую концентрацию Хл, а также распределение между формами *a* и *b* и общую концентрацию Кар определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра «Shimadzu UV-1800» после экстракции пигментов 80 %-ным ацетоном согласно (Porra et al., 1989; Lichtenthaler et al., 1987).

Скорость фотосинтетического выделения O<sub>2</sub> измеряли при 25 °С с помощью электрода Кларка в 1-мл ячейке («Hansatech», Великобритания) в среде, содержащей 20 мМ MES-NaOH (рН 6,5 или 7,0), 35 мМ NaCl и 400 мМ сахарозы. При необходимости концентрацию NaCl в среде измерения варьировали от 0 до 500 мМ в зависимости от эксперимента. В качестве акцепторов электронов использовали 1 мМ феррицианид К и 0,2 мМ 2,6-дихлоро-*p*-бензохинон. Интенсивность насыщающего света ( $\lambda > 600$  нм) составляла 1950 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Концентрация Хл в ячейке во время измерений была 10 мкг/мл.

Переменную флуоресценцию Хл измеряли с помощью ХЕ-РАМ-флуориметра («Walz», Германия) в 1-см кварцевой кювете при постоянном перемешивании в той же среде и при той же концентрации Хл, что и при измерении скорости выделения O<sub>2</sub>.

Скорость фотоиндуцированного переноса электронов в ФС2 от воды к 2,6-дихлорфенолиндофенолу (ДХФИФ) измеряли спектроскопически по уменьшению поглощения при 600 нм в результате восстановления ДХФИФ. Анализ проводили в той же среде и при той же концентрации Хл, что и при измерении скорости выделения O<sub>2</sub>. Коэффициенты экстинкции для 50 мкмоль ДХФИФ были определены для рН 6,5 и 7,0 (см. п. 3.2.6 диссертации) из-за зависимости физико-химических свойств ДХФИФ от рН.

КА-активность измеряли по скорости снижения рН в результате гидратации CO<sub>2</sub> (Wilbur et al., 1948) (гидратазное направление реакции  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ) с использованием электрода «Mettler Toledo InLab 413 рН» и измерителя рН/ионов срХ-2 (Институт биологических приборов РАН, Пущино).

Разделение белков препаратов ФС2 проводили с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 12,5% полиакриламидном геле (Laemmli et al., 1970) с использованием камеры Mini PROTEAN 3 (BioRad). Образцы загружали при равном содержании Хл (1 мкг Хл/трек). Для вестерн-блот-анализа белки после электрофореза переносили с геля на PVDF-мембрану (Immun-Blot PVDF Membrane, 0,2 мкм BioRad) с использованием системы мокрого блоттинга Mini Trans-Blot Cell (BioRad). Мембрану инкубировали в течение ночи при 4 °С с первичными антителами против белков D1,

PsbO, PsbP и САНЗ (производства «Agriser», Швеция) в разведении 1:2000–5000. В качестве вторичных использовали антитела, меченные пероксидазой хрена (GE «Healthcare»), в разведении 1:5000. Детекцию проводили с помощью набора для вестерн-блот-анализа Pierce ECL Plus («Thermo Scientific») и системы гелевой документации ChemiDoc (BioRad). Количественная оценка полос белков проводилась с помощью программного обеспечения ImageJ.

Получение полного «восстановленный минус окисленный» дифференциального спектра поглощения цитохрома *b559* в области 559 нм достигалось за счет окисления цитохрома *b559* феррицианидом К (50 мкМ) с последующим восстановлением дитионитом (неск. крупинок). Последовательное восстановление окисленного цитохрома *b559* с помощью гидрохинона (5 мМ), аскорбата Na (5 мМ) и затем дитионита позволяло оценить содержание, соответственно, высоко-, средне- и низкопотенциальных редокс-форм. Использование коэффициента экстинкции для полного «восстановленный минус окисленный» дифференциального спектра поглощения цитохрома *b559*, равного  $25,1 \pm 0,5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  (Kaminskaya et al., 2005) позволило определить количество реакционных центров (РЦ) в препаратах и рассчитать соотношение молекул Хл/РЦ.

Содержание Mn в препаратах ФС2 определяли с помощью пламенного атомно-абсорбционного спектрометра Квант-2 А (Cortec, Москва, Россия) при 279,5 нм.

Анализ пигментов проводили методом ВЭЖХ на колонке Agilent Zorbax SBC18 5 мкм 4,6 x 250 мм (Agilent, США) с помощью программы LC-solution (Shimadzu, Япония). Кар были идентифицированы по времени их удержания и спектрам поглощения. Количественная оценка каждого Кар была выполнена путем сравнения площади его пика в области 360–800 нм с общей суммой площадей всех пиков Кар, принятой за 100%. Расчет площадей был выполнен в программе Origin.

Для определения экспрессии генов проводили количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР) с помощью qPCRmix-HS SYBR (Evrogen) и пар праймеров, специфичных для генов, кодирующих белки РЦ ФС2, ВОК и САНЗ на амплификаторе LightCycler 96 (RocheDiagnostics GmbH.). Данные кПЦР были нормализованы по референсному гену  $\beta$ -тубулина *TUB2*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Сравнение биохимических характеристик препаратов фотосистемы 2 из дикого типа и мутанта *cia3*

**Пигментный состав** мембранных частиц, обогащенных ФС2, изолированных из клеток ДТ и *cia3* определяли спектрофотометрически в ацетоновых экстрактах. Полученные результаты приведены в таблице 1. Между препаратами, выделенными из двух штаммов, не было обнаружено существенных различий в содержании Хл *a* и Хл *b*. Однако незначительная разница была отмечена в содержании Кар, оно было выше в препаратах из ДТ. Различия в соотношениях Хл *a*/Хл *b*, а также Хл/Кар показали более



статистически значимые различия, при этом оба значения были выше в случае ФС2 из *cia3*.

*Таблица 1.* Пигментный состав препаратов ФС2 в пересчете на 1 мг общего Хл. Представлено среднее значение по меньшей мере 3 отдельных экспериментов  $\pm$  SD. Надстрочные буквы обозначают статистически значимую разницу между значениями при  $p < 0,05$ .

	Хл <i>a</i> , мкг	Хл <i>b</i> , мкг	Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>	Кар, мкг	Хл/Кар
ДТ	714,3 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	285,6 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>	2,5 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	208,7 $\pm$ 1,1 <sup>e</sup>	3,4 $\pm$ 0,02 <sup>g</sup>
<i>cia3</i>	722,6 $\pm$ 11,7 <sup>a</sup>	276,7 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>	2,6 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	201,9 $\pm$ 3,3 <sup>f</sup>	3,6 $\pm$ 0,01 <sup>h</sup>

Состав Кар в препаратах ФС2 анализировали с помощью метода ВЭЖХ. Полученные данные представлены в таблице 2. А-каротин был обнаружен в наименьшем количестве, и его содержание в препаратах из *cia3* было в 1,5 раза ниже по сравнению с препаратами из ДТ. Лютеин составлял ~30–37 % от общего содержания Кар, однако препараты из *cia3* содержали меньше лютеина по сравнению с препаратами из ДТ, что может быть связано с изначально меньшим количеством  $\alpha$ -каротина в случае *cia3*. Суммарное содержание неоксантина и лороксантина было одинаковым в препаратах ФС2 из ДТ и *cia3*. Содержание  $\beta$ -каротина в препаратах было близко к 36–38 % от общего содержания Кар и было незначительно выше в *cia3*. Кар виолаксантинового цикла (виолаксантин + антраксантин + зеаксантин) были в основном представлены виолаксантином, который был в ~1,5 раза выше в препаратах из *cia3* по сравнению с препаратами из ДТ. Суммарное содержание Кар виолаксантинового цикла составляло ~13,2% и ~17,9% для препаратов ФС2 выделенных, соответственно, из ДТ и *cia3*, что косвенно указывало на большую фотозащиту ФС2 из *cia3*.

*Таблица 2.* Распределение различных Кар в % от общего содержания в препаратах ФС2. Нео – неоксантин, Лор – лороксантин, Вио – виолаксантин, Ант – антраксантин, Лют – лютеин, Зеа – зеаксантин,  $\alpha$ -К –  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -К –  $\beta$ -каротин. Представлены средние значения по меньшей мере 3-х отдельных экспериментов  $\pm$  SD. Надстрочные буквы обозначают статистически значимую разницу между значениями при  $p < 0,05$ .

	Нео+Лор	Вио	Ант	Лют	Зеа	$\alpha$ -К	$\beta$ -К
ДТ	11,5 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	10,1 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	2,1 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	37,6 $\pm$ 0,8 <sup>e</sup>	1,0 $\pm$ 0,06 <sup>g</sup>	2,3 $\pm$ 0,06 <sup>i</sup>	35,5 $\pm$ 1,0 <sup>k</sup>
<i>cia3</i>	12,3 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	14,7 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>	1,9 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>	30,1 $\pm$ 0,6 <sup>f</sup>	1,3 $\pm$ 0,07 <sup>h</sup>	1,4 $\pm$ 0,05 <sup>j</sup>	37,7 $\pm$ 1,4 <sup>e,k</sup>

**Белковый состав** мембранных частиц, обогащенных ФС2, анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Наблюдаемые полосы соответствовали основным белкам корового комплекса ФС2 (D1, D2, CP26, CP29, PsbE), светособирающего комплекса (тип I, II, IV) и ВОК (PsbO, PsbP, PsbQ и PsbR) (рис. 1А). Схожие интенсивности полос указывали на одинаковое содержание белков в препаратах ФС2 из ДТ и *cia3*. Вестерн-блот-анализ также показал, что препараты, выделенные из ДТ и *cia3*, содержали одинаковое количество основных белков ФС2 при

одинаковой концентрации Хл (рис. 1Б). САНЗ, как и ожидалось, детектировалась только в препаратах из ДТ и полностью отсутствовала в препаратах ФС2 из *cia3*.

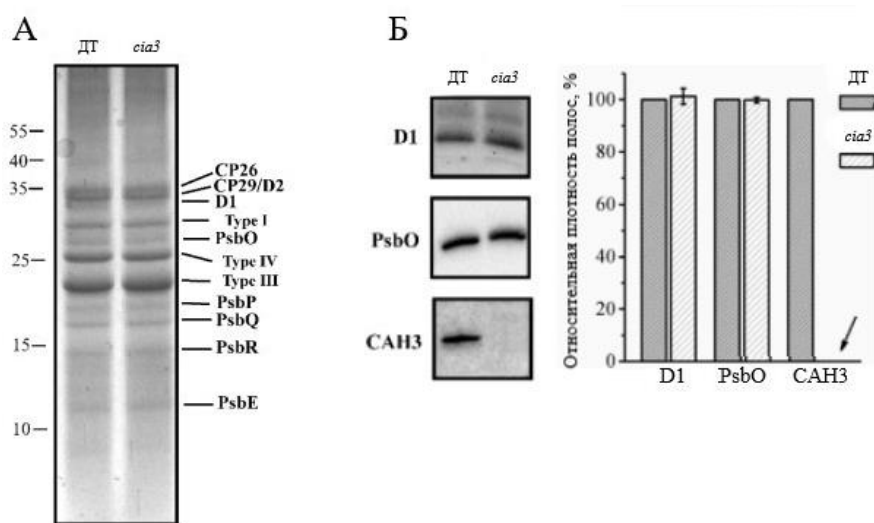


Рисунок 1. Результаты электрофореза в денатурирующих условиях (А) и вестерн-блот-анализа (Б) мембранных частиц, обогащенных ФС2, выделенных из ДТ и *cia3*. Столбцы представляют собой количественные оценки относительной плотности полос. Результаты были нормализованы к ДТ в каждой полосе.

Стрелка указывает на отсутствие сигнала при детекции блета. Образцы были загружены на гель в пересчете на одинаковое количество Хл (1 мкг Хл/трек).

**Анализ редокс-форм цитохрома *b559*.** Цитохром *b559* является субъединицей корового комплекса ФС2 и связан с ним в соотношении 1 : 1 (Umena et al., 2011). Схожие амплитуды полных «восстановленный минус окисленный» дифференциальных спектров поглощения препаратов ФС2, выделенных из ДТ и *cia3* (рис. 2А), свидетельствовали об одинаковом количестве цитохрома *b559*. Т.е., на одинаковое количество Хл препараты из ДТ и *cia3* содержали схожее количество коровых комплексов ФС2, что полностью согласуется с результатами электрофореза и вестерн-блот-анализа.

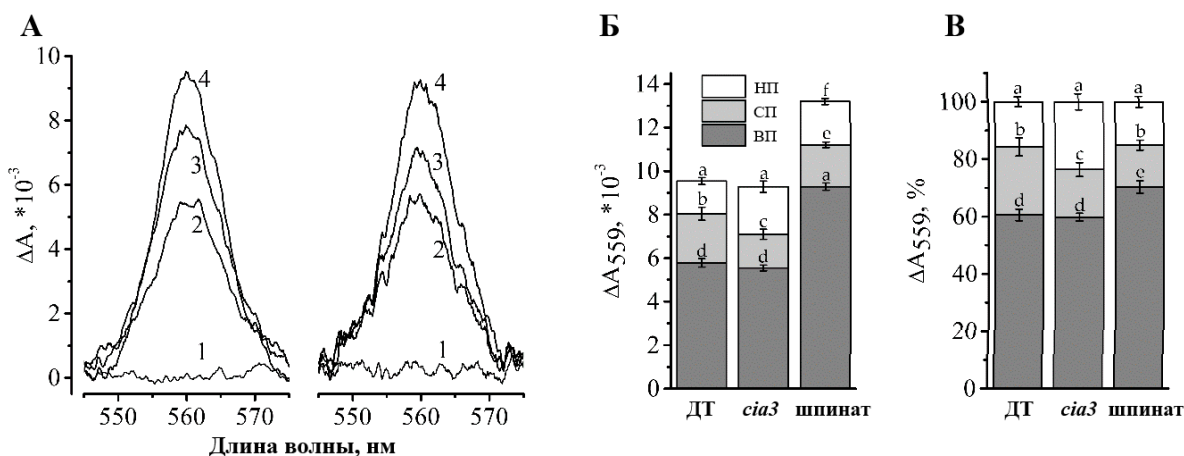


Рисунок 2. Дифференциальные спектры поглощения, окисленный минус восстановленный, полученные для препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* (А) при полном окислении цитохрома *b559* добавлением 50 мкМ феррицианид К (1) и последующем его восстановлении путем поэтапного добавления 5 мМ гидрохинона (2), 5 мМ аскорбата Na (3) и дитионита Na (4) для выявления, соответственно, высоко- (ВП), средне- (СП) и низкочастотных редокс-форм. Соотношения различных редокс-форм цитохрома *b559* представлены в абсолютной (Б) и нормированной (В) шкале для препаратов из ДТ и *cia3*, а также из шпината. Представлены средние значения по

меньшей мере 3-х отдельных экспериментов  $\pm$  SD. Буквы обозначают статистически значимую разницу между значениями при  $p < 0,05$ .

Так же было изучено распределение между окислительно-восстановительными формами цитохрома *b559* в результате ступенчатого редокс-титрования. Как показано на рисунке 2, препараты ФС2 из *cia3* содержали большую долю низко потенциальной формы цитохрома *b559* по сравнению с препаратами из ДТ. Согласно литературным данным, это могло отражать наличие некоторого структурного нарушения ВОК (Nishimura et al., 2016), которое могло быть вызвано отсутствием белка САНЗ. Следует отметить, что доля высоко потенциальной формы цитохрома *b559* была одинаковой в препаратах ФС2 из обоих штаммов.

**Содержание хлорофилла на реакционный центр и состояние  $Mn_4CaO_5$ -кластера.** Используя коэффициент экстинкции для цитохрома *b559* (Kaminskaya et al., 2005), было рассчитано отношение молекул Хл/РЦ. Оно было одинаковым для препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* и составляло  $\sim 300$  Хл/РЦ (табл. 3).

Для изучения состояния  $Mn_4CaO_5$ -кластера ВОК в препаратах ФС2 было определено общее содержание Mn, а затем, используя полученное соотношение Хл/РЦ, было рассчитано соотношение Mn/РЦ, которое также оказалось одинаковым в препаратах ФС2 из ДТ и *cia3*.

	ДТ	<i>cia3</i>	Шпинат
Хл/РЦ	295 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	303 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	212 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
Mn/РЦ	3,52 $\pm$ 0,29 <sup>c</sup>	3,36 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>	

Таблица 3. Соотношения Хл и Mn к РЦ в препаратах фотосистемы 2 из ДТ и мутанта *cia3*. Представлены средние значения по меньшей мере 3-х

отдельных экспериментов  $\pm$  SD. Надстрочные буквы обозначают статистически значимую разницу между значениями при  $p < 0,05$ .

**Карбоангидразная активность.** Согласно полученным данным, КА-активность в препаратах ФС2 из ДТ составила  $\sim 31$  WAU (мг Хл)<sup>-1</sup>. При этом, она полностью подавлялась (табл. 4) в присутствии сверхнизких концентраций (0,5 мкМ) трех различающихся по своим физико-химическим свойствам ингибиторов КА: липофильного этоксизоламида (ЭА), водорастворимых ацетазоламида (АА) и трифторометансульфонамида (ТФМСА). В препаратах ФС2 из *cia3* КА-активность отсутствовала полностью, что согласуется с результатами вестерн-блот-анализа, свидетельствующими об отсутствии белка САНЗ в них (рис. 1Б), а также совпадает с ранее опубликованными результатами (Villarejo et al., 2002).

Добавки	ДТ	<i>cia3</i>
нет	31 $\pm$ 0,5	0
0,5 мкМ ЭА	0	-
0,5 мкМ АА	0	-
0,5 мкМ ТФМСА	0	-

Таблица 4. Значение КА-активности мембранных препаратов, обогащенных ФС2, выраженной в WAU (мг Хл)<sup>-1</sup>. ЭА – этоксизоламид, АА – ацетазоламид, ТФМСА – трифлуорометансульфонамид. Представлены средние значения по меньшей мере 3-х (9-ти для ДТ в отсутствие ингибиторов) отдельных экспериментов  $\pm$  SD.

**Фотосинтетическая активность.** Максимальная скорость выделения  $O_2$  в мембранных препаратах, обогащенных ФС2, составила 280–290 мкмоль  $O_2$  (мг Хл ч)<sup>-1</sup> как в случае ДТ, так и *cia3* (табл. 5). Фотовосстановление ДХФИФ в отсутствие экзогенных доноров, отражающее перенос электронов от воды, тоже показало одинаковую скорость для препаратов ФС2 как из ДТ, так и из *cia3* со значением ~37 мкМ ДХФИФ (мг Хл ч)<sup>-1</sup> (табл. 5). Оценка максимального квантового выхода флуоресценции ФС2 ( $F_v/F_m$ ), отражающего максимально возможную фотохимическую эффективность ФС2, также показала схожие значения для препаратов из ДТ и *cia3*, близкие к 0,65. Таким образом, отсутствие белка САНЗ не влияло на фотосинтетическую активность ФС2 в оптимальных для ее функционирования условиях.

Фотосинтетическая активность	ДТ	<i>cia3</i>
Скорость выделения $O_2$ , (мкмоль (мг Хл ч) <sup>-1</sup> )	280±4	279±3
Скорость фотовосстановления ДХФИВ, (мкмоль (мг Хл ч) <sup>-1</sup> )	37,3±1	37,0±2
$F_v/F_m$	0,64±3	0,65±2

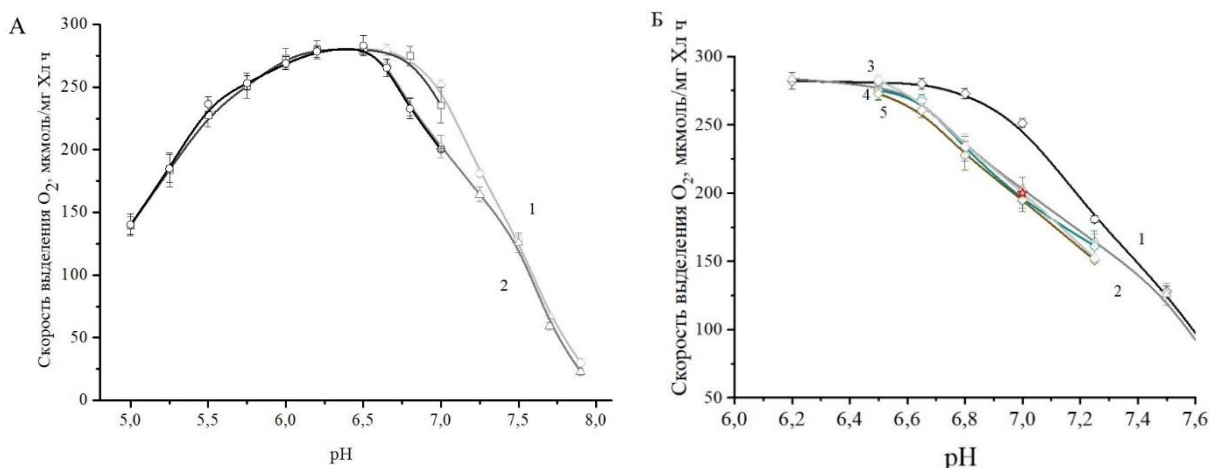
Таблица 5. Значения фотосинтетических активностей препаратов ФС2 из ДТ и мутанта *cia3*. Представлены средние значения по меньшей мере 3-х отдельных экспериментов ± SD.

## 2. Влияние карбоангидразной активности САНЗ на фотосинтетическую активность фотосистемы 2

**Зависимость  $O_2$ -выделяющей активности от рН.** Мембранные препараты, обогащенные ФС2, показывали сильную зависимость  $O_2$ -выделяющей активности от рН среды измерения. Полученные кривые имели оптимум-плато в интервале рН 6,2–6,5, что полностью согласуется с литературными данными (Schiller et al., 2000), где препараты ФС2 из ДТ и *cia3* показывали одинаковую скорость выделения  $O_2$ , равную ~280 мкмоль  $O_2$  (мг Хл ч)<sup>-1</sup>. При снижении рН в кислую сторону от 6,5 до 5,0 не было обнаружено существенной разницы между кривыми (рис. 3А). При повышении рН, напротив, значительные различия наблюдались уже при рН 6,65 (рис. 3) –  $O_2$ -выделяющая активность препаратов ФС2 из *cia3* подавлялась сильнее чем у препаратов из ДТ. При рН 7,0 наблюдалась максимальная разница в скоростях выделения  $O_2$ . В этом случае  $O_2$ -выделяющая активность в препаратах ФС2 из ДТ подавлялась на ~10%, а в препаратах из *cia3* – на ~30%, по сравнению с наблюдаемым при рН 6,5, т. е. разница между значениями, полученными для ДТ и *cia3*, составляла около 20%.

Чтобы подтвердить участие КА-активности САНЗ в наблюдаемых различиях было исследовано влияние ингибиторов КА. В присутствии 0,5 мкМ ЭА, АА или ТФМСА  $O_2$ -выделяющая активность препаратов ФС2 из ДТ при повышении рН действительно ингибировалась сильнее по сравнению с тем, как это наблюдалось в отсутствие ингибиторов КА (рис. 3Б). При этом, полученные кривые зависимости скорости выделения  $O_2$  от рН в присутствии ингибиторов КА полностью соответствовали кривой, наблюдаемой для ФС2 из *cia3*. Полученные результаты

подтверждают предположение о том, что именно КА-активность САНЗ поддерживает функцию ВОК в ФС2 из ДТ при повышении рН.



**Рисунок 3.** А. Зависимость O<sub>2</sub>-выделяющей активности от рН. Кривая 1 (отмеченная квадратами (MES-NaOH) и ромбами (MOPS)) – препараты ФС2 из ДТ, кривая 2 (отмеченная кругами (MES-NaOH) и треугольниками (MOPS)) – препараты из *cia3*. Измерения проводили в среде, содержащей 20 мМ MES-NaOH (рН 5,0–7,0) или MOPS (рН 6,5–7,9), 35 мМ NaCl и 400 мМ сахарозы. Б. Ингибирование скорости выделения O<sub>2</sub> препаратами ФС2 из ДТ при повышении рН среды в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 0,5 мкМ ЭА (кривая 3), 0,5 мкМ АА (кривая 4) и 0,5 мкМ ТФМСА (кривая 5). Кривая 1 и точка 6 (отмечена красной звездой) – препараты ФС2 из *cia3* в отсутствие добавок и в присутствии 0,5 мкМ ЭА, соответственно. Каждая точка на кривых представляет собой среднее значение по меньшей мере 3 отдельных экспериментов (по меньшей мере 5-ти отдельных экспериментов были проведены для рН 6,5–7,0) ± SD.

**Стимулирование бикарбонатом скорости выделения O<sub>2</sub> препаратами фотосистемы 2 из *cia3* при рН 7,0.** Предполагается, что роль САНЗ на донорной стороне ФС2 заключается в ее дегидратазной КА-активности, т.е. ускорении реакции между HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, присутствующем в люмене тилакоидов, и протонами, образующимися в ВОК в результате фотосинтетического окисления воды (Park et al., 1999; Villarejo et al., 2002; Shutova et al., 2008). Поскольку HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> является субстратом реакции, то в отсутствие САНЗ (в случае *cia3*) спонтанное взаимодействие HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> с H<sup>+</sup> может быть значительно ускорено добавлением избытка бикарбоната. Если данное предположение о роли САНЗ верное, то это, в свою очередь, должно стимулировать активность ВОК в препаратах ФС2 из *cia3*. Добавление HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> к препаратам ФС2 из *cia3* при рН 7,0 действительно влияло на скорость выделения O<sub>2</sub>. Стимулирование отмечалось при концентрации добавленного бикарбоната ~100 мкМ, и достигало максимального эффекта при 500 мкМ бикарбоната, где скорость выделения O<sub>2</sub> практически достигла уровня, наблюдаемого в случае препаратов ФС2 из ДТ (рис. 4). Эти результаты подтверждают необходимость КА-активности САНЗ вблизи ФС2 для ускорения реакции взаимодействия HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> с H<sup>+</sup>, что предотвращает ингибирующее локальное закисление около активного центра ВОК за счет эффективного отвода протонов в люмен.

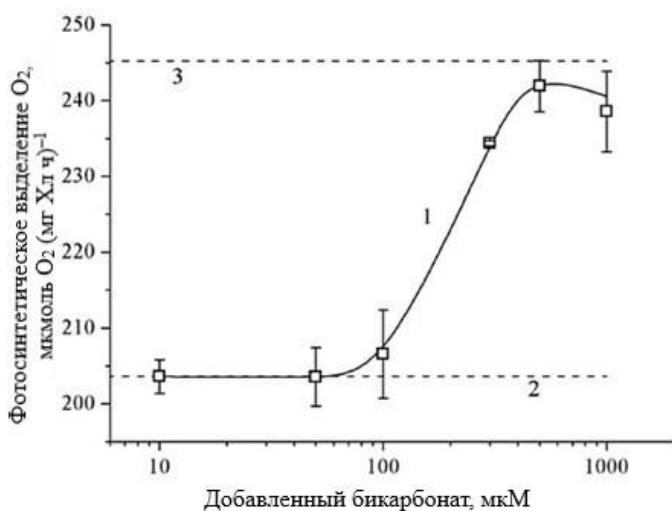


Рисунок 4. Зависимость O<sub>2</sub>-выделяющей активности препаратов ФС2 из *cia3* при pH 7,0 от концентрации добавленного NaHCO<sub>3</sub> (кривая 1). Линии 2 и 3 представляют собой скорость выделения O<sub>2</sub> препаратами из *cia3* и ДТ, соответственно, в отсутствие добавок. Измерения проводились в среде, содержащей 20 мМ MOPS (pH 7,0), 35 мМ NaCl и 400 мМ сахарозы. Каждая точка на кривой представляет собой

среднее значение по меньшей мере 3 отдельных экспериментов ± SD.

**Обратимость ингибирования O<sub>2</sub>-выделяющей активности при повышении pH.** Известно, что pH люмена тилакоидов может изменяться в диапазоне от 7,0 в темноте до 5,8–5,5 на свету (Kramer et al., 2003; Tikhonov et al., 2013), который можно считать «физиологическим». Исходя из этого, наблюдаемое подавление скорости выделения O<sub>2</sub> при сдвиге pH от 6,5 в щелочную сторону (рис. 3А) как минимум до 7,0 должно быть полностью обратимо.

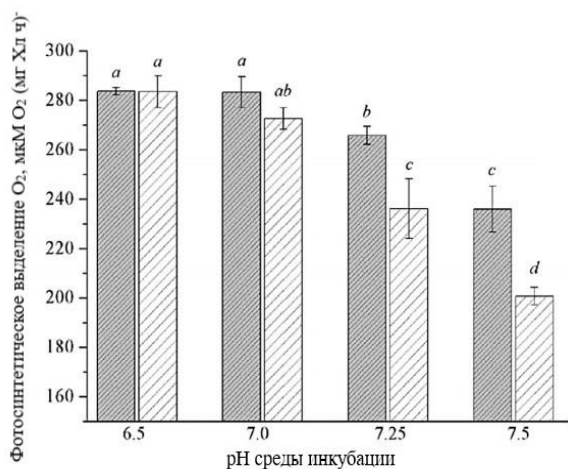
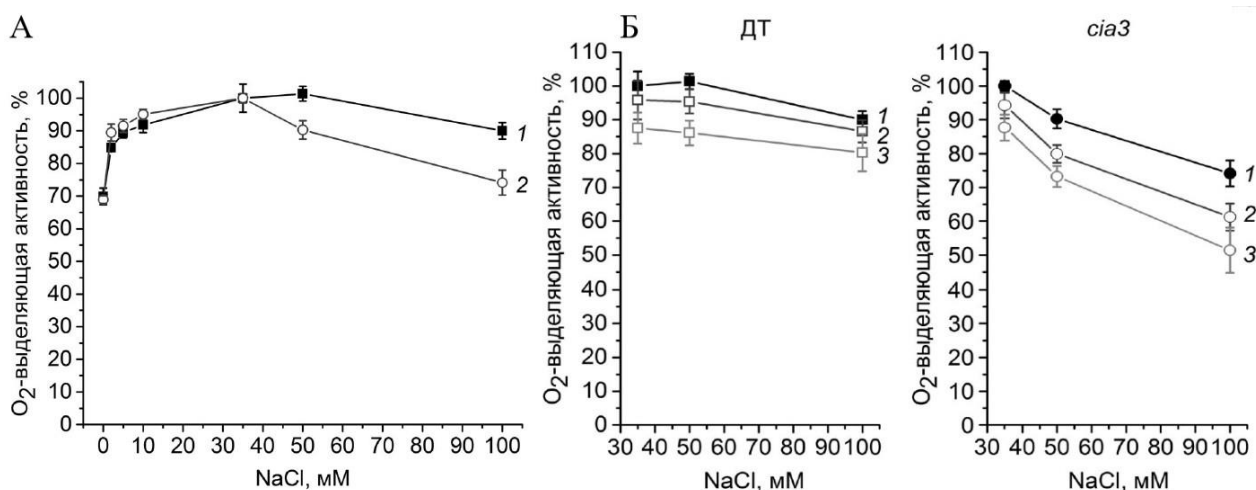


Рисунок 5. Обратимость инактивации O<sub>2</sub>-выделяющей активности при инкубации препаратов ФС2 из ДТ (серые колонки) и *cia3* (белые колонки) в среде при pH 6,5, 7,0, 7,25 и 7,5. Перед измерением скорости выделения O<sub>2</sub> образцы ресуспендировали в буфере, содержащем 20 мМ MOPS (pH 6,5), 35 мМ NaCl и 400 мМ сахарозы. Представлены средние значения по меньшей мере 3-4-х отдельных экспериментов ± SD. Буквы над столбцами указывают на статистически значимую разницу между значениями при p < 0,05.

Результаты инкубации препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* в буферах с повышенным pH с последующим их осаждением и ресуспендированием в буфере с оптимальным для ВОК pH 6,5 показали, что необратимое ингибирование функции ВОК практически полностью отсутствует при значениях pH до 7,0 (рис. 5). При дальнейшем повышении pH наблюдалось появление фракции ФС2 с необратимо ингибированными ВОК в препаратах ФС2 как из ДТ, так и из *cia3*, при чем количество таких ФС2 возрастало с увеличением pH. Стоит отметить, что при этом препараты ФС2 из *cia3* были сильнее подвержены необратимой потере функции ВОК.

### 3. Участие белка САНЗ в стабилизации структуры водоокисляющего комплекса

**Влияние ионной силы среды на фотосинтетическую активность фотосистемы 2.** Было проведено изучение скорости выделения  $O_2$  препаратами ФС2 в широком диапазоне концентраций NaCl при оптимальном для функционирования ВОК pH 6,5 (рис. 6А). Препараты ФС2 из ДТ и мутанта *cia3* показали практически схожую зависимость  $O_2$ -выделяющей активности от концентрации NaCl в диапазоне 0–35 мМ, с достижением максимальных значений активности при 35 мМ. Повышение концентрации NaCl до 50 мМ не оказывало влияния на скорость выделения  $O_2$  препаратами ФС2 из ДТ и снижало ее до ~90% только при 100 мМ NaCl. В случае ФС2 из *cia3* подавление  $O_2$ -выделяющей активности до ~90% наблюдалось уже при 50 мМ NaCl, а при 100 мМ NaCl уже до ~75%. При этом дополнительное инкубирование препаратов значительно увеличивало разницу подавления  $O_2$ -выделяющей активности между препаратами ФС2 из ДТ и *cia3* (рис. 6Б). Если через 30 мин дополнительной инкубации при 100 мМ NaCl препараты ФС2 из ДТ теряли только ~10% своей  $O_2$ -выделяющей активности, то в случае ФС2 из мутанта *cia3* наблюдалась потеря до 50% активности относительно показателей в отсутствие инкубации.



**Рисунок 6.** А. Зависимость скорости выделения  $O_2$  препаратами ФС2 из ДТ (1) и *cia3* (2) от концентрации NaCl в среде измерения при оптимальном для активности ВОК pH 6,5. Б. Зависимость  $O_2$ -выделяющей активности ФС2 из ДТ и *cia3* при разных концентрациях NaCl в среде измерения от времени инкубации при 25 °С. 1 – Без дополнительной инкубации, 2 – 15 мин инкубации, 3 – 30 мин инкубации. Данные нормированы к значениям, полученным при 35 мМ NaCl. Представлены средние значения по меньшей мере 3-х отдельных экспериментов  $\pm$  SD.

Повышение концентрации NaCl, т.е. увеличение ионной силы среды, должно вызывать конформационные изменения белков, в том числе и белков ВОК, которое в свою очередь должно оказывать негативное влияние на функцию  $Mn_4CaO_5$ -кластера. Наблюдаемые различия между препаратами из ДТ и *cia3* могут свидетельствовать о присутствии изначально неких нарушений в нативной структуре ВОК ФС2 из *cia3*.

Значение максимального квантового выхода флуоресценции Хл (Fv/Fm) практически не отличалось у препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* при 35, 50 и 100 мМ NaCl

(рис. 7). Результаты явно указывали на независимость фотоиндуцированного переноса электрона в ФС2 от присутствия или отсутствия белка САНЗ.

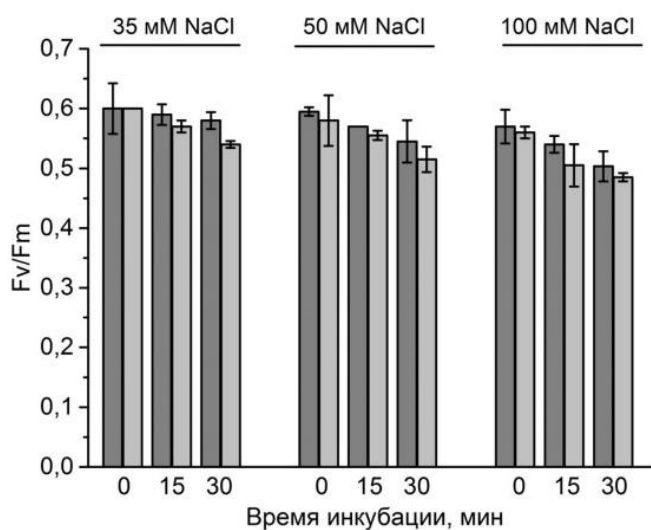


Рисунок 7. Эффективность преобразования поглощенной световой энергии в ФС2 из ДТ и *cia3* при разных концентрациях NaCl в среде измерения (35, 50 и 100 mM), и в зависимости от времени дополнительной инкубации, указанного под колонками. Представлены средние значения по меньшей мере 3-х отдельных экспериментов  $\pm$  SD.

**Действие ингибитора карбоангидраз.** Для того, чтобы оценить вклад КА-активности САНЗ в наблюдаемые при повышении концентрации NaCl эффекты были проведены эксперименты в присутствии 0,5 мкМ ЭА. Полученные результаты свидетельствовали о полном отсутствии влияния ЭА на O<sub>2</sub>-выделяющую активность ФС2 из ДТ (а также и из *cia3*), измеренную при разных концентрациях NaCl (рис. 8). Это явно указывало на то, что наблюдаемые отличия в скорости выделения O<sub>2</sub> в ФС2 из ДТ и *cia3* при концентрациях NaCl выше 35 mM (рис. 6) не были обусловлены КА-активностью САНЗ, а скорее всего являются следствием отсутствия самого белка САНЗ, что позволяет более масштабные конформационные изменения белков ВОК. Т.е., наличие белка САНЗ может быть необходимо для формирования корректной организации белков ВОК в *S. reinhardtii*, а его отсутствие в составе ВОК ФС2 из *cia3* вызывает некие структурные изменения в самом ВОК, делающие его более «рыхлым».

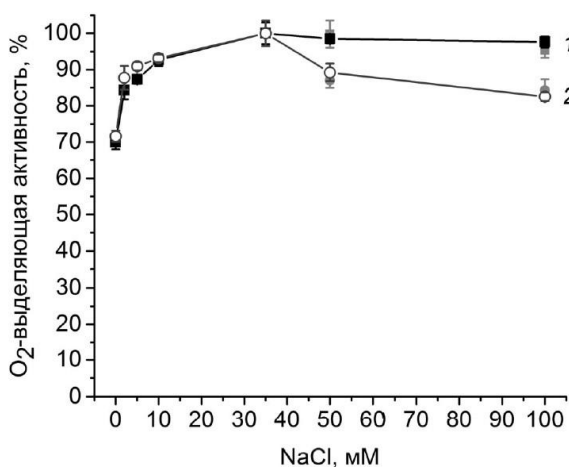


Рисунок 8. Влияние ингибитора КА на скорость фотосинтетического выделения O<sub>2</sub> препаратами ФС2 из ДТ (1) и *cia3* (2) при разных концентрациях NaCl в среде измерения. Каждое измерение проводили в присутствии 0,5 мкМ ЭА в ячейке. Значения O<sub>2</sub>-выделяющей активности ФС2 из ДТ и *cia3*, полученные при отсутствии ЭА, показаны серыми квадратами и кружками при 50 и 100 mM NaCl, соответственно. Представлены средние значения по меньшей мере 3-х отдельных экспериментов  $\pm$  SD.

**Удаление белков водоокисляющего комплекса повышенными концентрациями NaCl.** Был проведен вестерн-блот-анализ образцов, отобранных из ячейки после измерения скорости выделения O<sub>2</sub> в экспериментах по влиянию



повышения ионной силы среды. Анализ проводили с использованием первичных антител против мажорного белка РЦ ФС2 – D1, и на белки ВОК ФС2 – PsbO и PsbP. Получаемые результаты нормировались к данным по D1 чтобы исключить ошибки, возникающие при отборе образцов из ячейки после измерения скорости выделения O<sub>2</sub> и осаждении мембранных препаратов. Было показано, что содержание белка ВОК PsbO не изменялось в препаратах ФС2, как из ДТ, так и из мутанта *cia3* при повышении концентрации NaCl до 500 мМ, а также дополнительной инкубации (рис. 9А). При этом содержание другого белка ВОК – PsbP в препаратах ФС2 при повышении концентрации NaCl, напротив, уменьшалось, и к удивлению, это было более выражено в случае ФС2 из ДТ. Так, в препаратах ФС2 из ДТ, при 100 мМ NaCl терялось уже ~30% этого белка, а при 500 мМ оставалось только ~10% PsbP. В то время как у *cia3* при 100 мМ NaCl PsbP практически не удалялся, а при 500 мМ сохранялось до 30% этого белка (рис. 9Б).

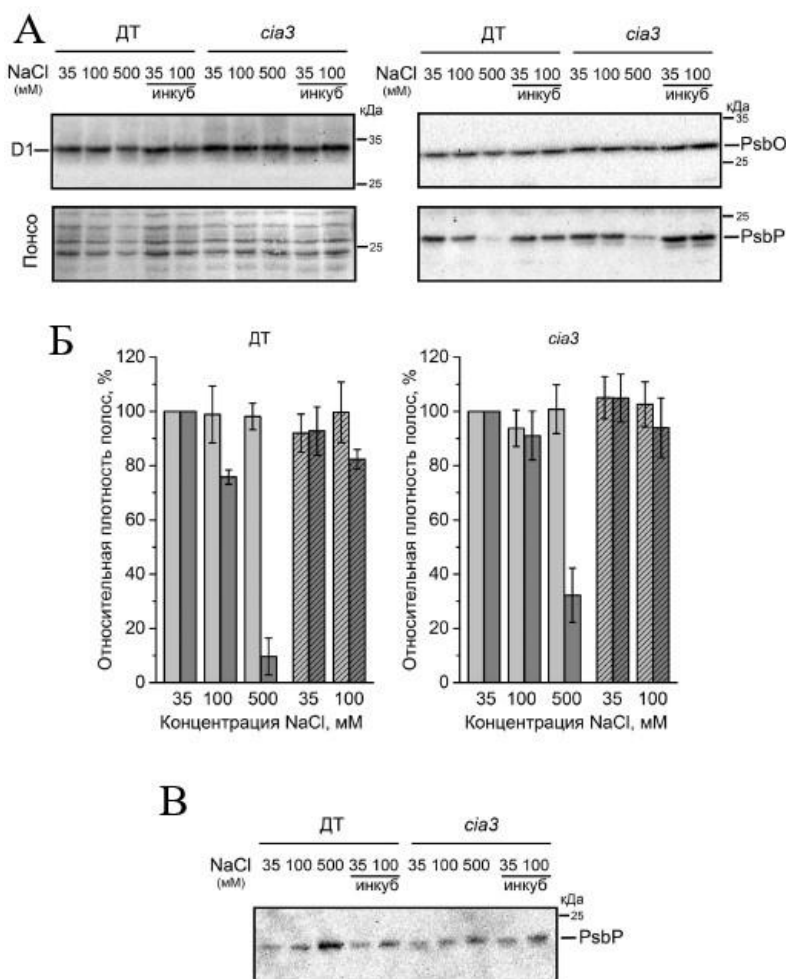


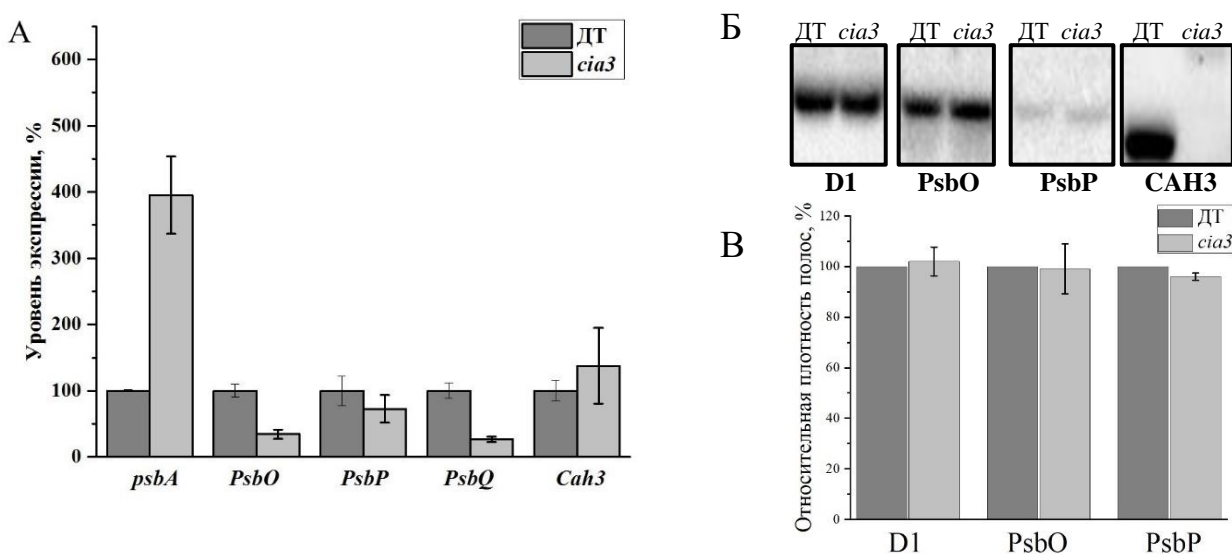
Рисунок 9. Вестерн-блот-анализ препаратов ФС2 из ДТ и *cia3*, отобранных после экспериментов, представленных на рис. 6. А – Вестерн-блоты осажденных из образцов мембранных препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* с использованием первичных антител против белков D1, PsbO и PsbP, а также PVDF-мембрана, окрашенная Понсо. Б – Относительная плотность полос белков PsbO (светло-серые колонки) и PsbP (темно-серые колонки). Заштрихованные колонки – препараты, инкубированные в темноте 30 мин. Значения, полученные при 35 мМ NaCl для PsbO и PsbP, были приняты за 100% на каждом вестерн-блоте отдельно для ФС2 из ДТ и *cia3*. Представлены средние значения по меньшей мере

3-х отдельных экспериментов ± SD. В – Вестерн-блот-анализ белков, осажденных из супернатантов после удаления мембранной фракции ФС2, проанализированной в (А), с использованием первичных антител против белка PsbP.

Для того, чтобы показать, что происходило действительно отмывание белка PsbP, с помощью трихлоруксусной кислоты были осаждены растворимые белки из супернатантов, оставшихся после осаждения мембранной фракции, содержащей ФС2,

которые также анализировали с помощью вестерн-блот-анализа. Полученные результаты полностью согласовались с данными вестерн-блот-анализа мембранной фракции, содержащей ФС2 (рис. 9В). Эти данные позволяют предполагать появление дополнительных гидрофобных или электростатических взаимодействий между белком PsbP и другими белками ФС2 при отсутствии белка САНЗ в месте своей локализации вблизи ВОК, что может быть причиной более затрудненного удаления PsbP из ВОК при повышении NaCl в случае ФС2 из *cia3*.

**4. Изучение уровней экспрессии генов, кодирующих белки фотосистемы 2 и САНЗ.** Были определены уровни экспрессии генов, кодирующих белки РЦ ФС2 (D1 (PsbA)), ВОК ФС2 (PsbO, PsbP и PsbQ) и САНЗ. Согласно полученным результатам, уровень экспрессии гена *Cah3* был одинаков в клетках ДТ и мутанта *cia3* (рис. 10А). Однако вестерн-блот-анализ не показал присутствия белка в клетках *cia3* (рис. 10Б), по-видимому, из-за быстрой деградации незрелого белка в строме хлоропласта. Уровень экспрессии гена *psbA*, кодирующего белок РЦ D1, был в 3,5–4,5 раза выше в клетках *cia3*, при этом уровни экспрессии генов, кодирующих белки ВОК ФС2 – PsbO и PsbQ, наоборот, были в 2–3 раза ниже в клетках *cia3* по сравнению с клетками ДТ. Интенсивность экспрессии гена, кодирующего белок ВОК PsbP, была чрезвычайно низка в клетках *C. reinhardtii* как ДТ, так и мутанта *cia3* и была примерно равной в обоих штаммах. Интересно, что при этом содержание белков D1, PsbO и PsbP согласно вестерн-блот-анализу было схожим в клетках ДТ и мутанта *cia3*.



**Рисунок 10.** А. Уровень экспрессии генов, кодирующих белки ФС2: РЦ (D1), ВОК (PsbO, PsbP и PsbQ) и САНЗ при оптимальных условиях выращивания культуры клеток *C. reinhardtii*. Б. Вестерн-блот-анализ клеток ДТ и мутанта *cia3*. В. Относительная плотность полос белков D1, PsbO, PsbP и САНЗ.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что мембранные препараты, обогащенные ФС2, выделенные из клеток зеленой микроводоросли *C. reinhardtii* ДТ и мутанта *cia3*, с отсутствующей КА САНЗ в люмене тилакоидов, практически не отличаются по

основным биохимическим характеристикам. При этом фотосинтетические активности их ФС2 при оптимальном для ВОК рН 6,5 также показывают схожие значения, а эксперименты в присутствии трех разных ингибиторов КА – отсутствие влияния САНЗ. Однако при смещении рН в щелочную сторону, КА-активность САНЗ значительно поддерживает активность ВОК и снижает его необратимую инактивацию. Данные экспериментов указывают на важную роль ускорения ферментом дегидратазного направления реакции.

Независимо от КА-активности белок САНЗ участвует в структурной стабилизации ВОК, поскольку в его отсутствие в ФС2 из мутанта *cia3* наблюдается значительное подавление активности ВОК при повышении ионной силы среды, по-видимому, за счет более сильных конформационных изменений белков ВОК, что согласуется, в частности, с данными о повышенном содержании низкопотенциальной окислительно-восстановительной формы цитохрома *b559*. Так же наблюдается более затрудненное удаление легко отмываемого белка PsbP из ВОК повышенными концентрациями NaCl в препаратах ФС2 из *cia3*, что можно объяснить формированием дополнительных гидрофобных и электростатических связей между PsbP и белками ВОК в отсутствие белка САНЗ.

Уровни экспрессии генов, кодирующих белки ФС2, в том числе ВОК, отличаются в клетках *C. reinhardtii* ДТ и мутанта *cia3*. Уровень экспрессии гена *psbA*, кодирующего белок РЦ D1 выше, а генов *PsbO*, *PsbQ*, кодирующих белки ВОК PsbO и PsbQ, соответственно, ниже в клетках мутанта *cia3* по сравнению с клетками ДТ. При этом анализ содержания этих белков в клетках водорослей обоих штаммов не показывает отличий, за исключением белка САНЗ, который наблюдался только в клетках ДТ.

Таким образом белок САНЗ является важным участником фотосинтетического аппарата зеленой микроводоросли *C. reinhardtii*, вовлеченным в поддержание максимальной фотосинтетической активности ФС2.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что основные биохимические характеристики мембранных препаратов, обогащенных ФС2, выделенных из клеток *C. reinhardtii* ДТ и мутанта *cia3*, выращенных в оптимальных условиях, схожи. Хотя в препаратах из мутанта *cia3* было обнаружено повышенное содержание каротиноидов виолоксантинового цикла и низкопотенциальной формы цитохрома *b559*, что указывало на большую фотозащиту ФС2 и возможное структурное нарушение в ВОК ФС2 в отсутствие белка САНЗ, соответственно.

2. Обнаружено, что дегидратазная КА-активность САНЗ способствует поддержанию высокой фотосинтетической активности ФС2 в препаратах из *C. reinhardtii* при сдвиге рН от оптимального для активности ВОК, равного 6,5, в щелочную сторону. При рН выше 7,25 КА-активность САНЗ снижает степень необратимого ингибирования функции ВОК.

3. Обнаружено участие белка САНЗ в стабилизации структурной организации ВОК, не зависящее от его КА-активности. Отсутствие белка САНЗ в препаратах ФС2 из мутанта *cia3* снижало устойчивость функции ВОК к повышению ионной силы среды и повышало степень ассоциации белка PsbP с ФС2. Подобная роль в структурной стабилизации белкового комплекса белком КА ранее не была показана.

4. Выявлено, что уровень экспрессии гена *psbA*, кодирующего белок D1, являющийся мажорным белком РЦ ФС2, повышен в мутанте *cia3*, в то время как уровни экспрессии генов, кодирующих белки ВОК, в основном снижены. При этом анализ содержания белков D1, PsbO и PsbP в клетках двух штаммов не показал отличий. Уровень экспрессии гена *САНЗ* при этом одинаков в клетках ДТ и мутанта *cia3*, в то время как белок САНЗ наблюдался только в клетках ДТ.

## СПИСОК РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах:

1. Шукшина А.К., Терентьев В.В. (2021) Участие карбоангидразы САНЗ в структурно-функциональной стабилизации водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 из *Chlamydomonas reinhardtii*. *Биохимия*, **86** (7), 867-877.

2. Terentyev V.V., Shukshina A.K., Ashikhmin A.A., Tikhonov K.G., Shitov A.V. (2020) The Main Structural and Functional Characteristics of Photosystem-II-Enriched Membranes Isolated from Wild Type and *cia3* Mutant *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life*, **10** (5), 63.

3. Terentyev V.V., Shukshina A.K., Shitov A.V. (2019) Carbonic anhydrase САНЗ supports the activity of photosystem II under increased pH. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1860** (7), 582-590.

### Тезисы докладов:

1. Шукшина А.К., Терентьев В.В. (2022) Влияние карбоангидразы САНЗ на структуру и функциональную активность водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 из *Chlamydomonas reinhardtii*. В сб.: *Тезисы докладов 25 Международной Пушчинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века»*, Пушино, с. 354.

2. Терентьев В.В., Шукшина А.К. (2021) Участие карбоангидразы САНЗ в функционировании фотосинтетического аппарата *Chlamydomonas reinhardtii*. В материалах: Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее», Москва, с. 346.

3. Шукшина А.К., Терентьев В.В. (2021) Влияние карбоангидразы САНЗ на стабильность водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 из *Chlamydomonas reinhardtii*. В материалах: *Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее»*, Москва, с. 61.

4. Терентьев В.В., Шукшина А.К. (2021) Участие люменальной карбоангидразы САНЗ в сохранении высокой активности фотосистемы 2 в *Chlamydomonas reinhardtii*. В материалах: *Материалы IX съезд Российского фотобиологического общества*, пос. Шепси, с. 69.

5. Шукшина А.К., Терентьев В.В. (2021) Влияние белка карбоангидразы САНЗ на структурно-функциональное состояние водоокисляющего комплекса фотосистемы

2 из *Chlamydomonas reinhardtii*. В материалах: *Материалы IX съезд Российского фотобиологического общества*, пос. Шепси, с. 72.

6. Четверкина А.А., Шукшина А.К., Савченко Т.В. (2020) Сравнительный биоинформационный анализ карбоангидраз у одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. В материалах: *Материалы Всероссийской конференции с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2020»*, Тула, с. 162.

7. Шукшина А.К., Терентьев В.В. (2020) Участие белка САН3 в стабилизации структурно-функциональной организации водоокисляющего комплекса фотосистемы 2. В сб.: *Тезисы докладов 24 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века»*, Пущино, с. 161.

8. Четверкина А.А., Шукшина А.К., Терентьев В.В. (2019) Влияние люменальной карбоангидразы САН3 на фотосинтетическую активность ФС2 *Chlamydomonas reinhardtii* при высоких концентрациях ионов Cl<sup>-</sup>. В материалах: *Материалы Всероссийской конференции с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2019»*, Тула, с. 145-147.

9. Шитов А.В., Терентьев В.В., Шукшина А.К. (2019) Влияние ингибиторов карбоангидраз на первоначальные светозависимые этапы переноса электрона в фотосистеме 2. В сб.: *Тезисы докладов IX Съезда общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»*. Казань, с. 483.

10. Терентьев В.В., Шукшина А.К., Шитов А.В. (2019) Влияние карбоангидразы САН3 на активность фотосистемы 2 из *Chlamydomonas reinhardtii* при повышении pH. В сб.: *Тезисы докладов IX Съезда общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»*. Казань, с. 429.

11. Шукшина А.К., Терентьев В.В. (2019) Роль люменальной карбоангидразы САН3 во влиянии ионов Cl<sup>-</sup> на активность фотосистемы 2 *Chlamydomonas reinhardtii*. В сб.: *Тезисы докладов IX Съезда общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего»*. Казань, с. 489.

12. Terentyev V., Shukshina A., Shitov A. (2019) Carbonic anhydrase САН3 supports the activity of photosystem II under increased pH. В сб.: *International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability*, Saint-Petersburg, p. 144.

13. Shitov A., Terentyev V., Shukshina A. Bicarbonate degidration activity of Photosystem II, is it a myth or a reality. В сб.: *International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability*, Saint-Petersburg, p. 70.

14. Shukshina A., Terentyev V. (2019) The influence of Cl<sup>-</sup> ions on the photosynthetic activity of photosystem II from *C. reinhardtii* in the presence and in the absence of carbonic anhydrase САН3. В сб.: *International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability*, Saint-Petersburg, p. 140.

15. Шукшина А.К., Терентьев В.В., Шитов А.В. (2018) Протектирующее действие карбоангидразы САН3 на фотосинтетическую активность фотосистемы 2 в условиях защелачивания среды люмена. В сб.: *Тезисы докладов 22 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века»*, Пущино, с. 270.