ISSN 0868-854 (Print); ISSN 2413-5984 (Online). Algologia. 2021. 31(4): 337–352 https://doi.org/10.15407/alg31.04.337

Роль карбоангідраз у механізмах концентрування карбону водних фотоавтотрофів

Поліщук О.В.

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна mrpolishchuk@gmail.com

Надійшла до редакції 02.08.2021. Після доопрацювання 18.10.2021. Підписана до друку 19.10.2021. Опублікована 22.12.2021

Реферат. Розглядається декілька ролей карбоангідраз (КА) у засвоєнні неорганічного карбону (С_н) ціанобактеріями, мікроводоростями та макрофітами в умовах дефіциту С_н. Повільна дифузія С_н у водному середовищі зумовлює необхідність у механізмах концентрування карбону (МКК, т.з. механізмів концентрування СО2) у водних фотоавтотрофів для транспортування С_н проти градієнту та забезпечення постачання СО₂ для фотосинтезу. Існують спільні вимоги для ефективного функціонування МКК у ціанобактеріях, водоростях та водних судинних рослинах, які включають активний транспорт HCO₃⁻ до С_н-концентрувального компартменту та утворення CO₂ з пулу HCO₃⁻ у субкомпартменті, збагаченому Рубіско. Полегшуючи дифузію С_н у водних розчинах та крізь ліпідні бішари, КА відіграють істотну роль у МКК, які найкраще вивчені у ціанобактерій, зелених та діатомових водоростей. Роль карбоангідраз у МКК залежить від їх локалізації та включає полегшення активного трансмембранного поглинання C_{μ} шляхом його постачання на зовнішній поверхні (Роль 1) та видалення на внутрішній поверхні (Роль 2), а також прискорення утворення СО₂ з НСО₃- поблизу Рубіско (Роль 3) у спеціальному герметичному для CO2 компартменті – карбоксисомі у ціанобактеріях або піреноїді у мікроводоростях. Компартменталізація КА має вирішальне значення, оскільки їх активність у НСО3-концентрувальному компартменті легко може зняти градієнт С_н, створений МКК.

Ключові слова: мікроводорості, ціанобактерії, макрофіти, фотосинтез, піреноїд, карбоксисома, неорганічний карбон, механізми концентрування карбону, карбоангідраза

Вступ

Після різкого зниження концентрації CO₂ в атмосфері приблизно в 20 разів, починаючи з 350 млн років тому і до кайнозойської ери (65 млн років тому,

© Поліщук О.В., 2021

Berner, 2006), пасивна дифузія CO₂ зі спонтанним перетворенням CO₂/HCO₃⁻ не могла задовольнити потребу фотосинтезу та забезпечити виживання фотосинтезуючих рослин. Виникла потреба у ферменполегшенні транспортування та концентрування тативному CO_2 . Оскільки більшість груп фотосинтетичних організмів на той час вже були диверсифіковані, у них в процесі еволюції почали виникати різноманітні механізми концентрування карбону (МКК), що є яскравим прикладом конвергентної еволюції (Kenrick, Crane, 1997; Giordano et al., 2005; Price et al., 2008; Vats et al., 2011; Zabaleta et al., 2012). Існування МКК вперше було виявлено у Anabaena variabilis Kütz. та Chlamydomonas reinhardtii P.A.Dang. (Badger et al., 1978). К. Айзава та С. Міячі вперше запровадили та обгрунтували термін "механізм концентрування СО₂", тобто механізм, що забезпечує накопичення великої кількості CO₂ та HCO₃⁻ (разом – неорганічного карбону, C_{μ}) всередині клітин за умов дефіциту C_{μ} (Aizawa, Miyachi, 1986).

Термін "механізм концентрування CO₂" використовується переважно стосовно мікроводоростей та ціанобактерій (Badger et al., 1992; Kaplan, Reinhold, 1999; Badger, 2003), хоча його також відносять до C₄- та CAM-метаболізму у вищих рослин (Berry, Farquhar, 1978; Hatch, 1987; Badger et al., 1998). Також Е. Zabaleta зі співавт. (2012) припустили існування "базального МКК", в якому мітохондріальні карбоангідрази (КА) використовуються для реасиміляції CO₂, що утворюється при диханні. Такий механізм, ймовірно, функціонує у багатьох групах фотосинтезуючих організмів, включаючи наземні рослини з C₃-фотосинтезом.

Карбоангідрази відіграють ключову роль в організації та функціонуванні МКК водних рослин завдяки здатності полегшувати транспортування та доставку $C_{\rm H}$ до Рубіско – ферменту, що фіксує CO₂ (Aizawa, Miyachi, 1986; Badger et al., 1992; Coleman, 2000; Badger, 2003; von Caemmerer et al., 2004; Price et al., 2008).

Як правило, МКК включають три етапи: (i) активне поглинання $HCO_3^$ або пасивне pH-залежне поглинання CO_2 клітинами, (ii) накопичення $C_{\rm H}$ у концентрувальному компартменті (цитоплазма у прокаріотів або строма хлоропласту в еукаріотів), переважно у формі HCO_3^- та (iii) утворення CO_2 з HCO_3^- у герметичному для CO_2 субкомпартменті, що містить Рубіско (карбоксисома у ціанобактеріях або піреноїд у мікроводоростях) для поповнення CO_2 , спожитого Рубіско.

На першому етапі КА виконують дві важливі ролі:

Роль 1 включає полегшення дифузії $C_{\rm H}$ з навколишнього середовища та швидке поповнення пулу HCO₃⁻ шляхом гідратації CO₂ на поверхні клітини у разі активного поглинання HCO₃⁻;

Роль 2 – видалення CO₂ на внутрішній поверхні клітинної мембрани та запобігання його витоку шляхом перетворення в HCO₃⁻, оскільки ліпідні мембрани непроникні для HCO₃⁻.

Другий етап вимагає відсутності КА у С_н-концентрувальному компартменті для забезпечення утримання С_н, отже строга компартменталізація КА є життєво необхідною для ефективної роботи МКК.

На третьому етапі КА грають Роль 3, каталізуючи утворення CO₂ з HCO₃⁻ для забезпечення ефективної роботи Рубіско та беручи участь у структурній організації герметичного для CO₂ компартменту.

Біохімічна характеристика карбоангідраз рослин

Карбоангідрази (карбонат гідроліаза, КФ 4.2.1.1) – це металоферменти, що містяться у всіх живих організмах і каталізують взаємоперетворення CO₂ та HCO₃. Усі КА належать до восьми родин білків – α, β, γ, δ, ζ, η, θ та ι, які еволюціонували з різних джерел, що є чудовим прикладом конвергентної еволюції (Polishchuk, 2021). Усіх їх, крім ηКА, було виявлено в рослинах. α-, β- та γКА виявлено у судинних рослинах, де вони добре представлені у більшості органів, тканин та клітинних компартментах. Крім цих родин δ-, ι- та ζКА виявили у морських діатомових водоростях, тоді як θ- та к КА також були знайдені в інших групах водоростей та ціанобактерій (DiMario et al., 2018; Jensen et al., 2019; Hirakawa et al., 2021). Різні родини КА подібні за структурою своїх активних центрів, хоча мають низьку гомологію за амінокислотними послідовностями. Архітектура активного центру КА, як правило, передбачає Zn²⁺, оточений тетраедром лігандів – три амінокислотні залишки та молекула води або гідроксид-іон як четвертий ліганд. γ-, δ- та ζКА є камбіалістичними, тобто можуть містити Cd²⁺, Co²⁺ і навіть Fe²⁺ замість Zn^{2+} в активному центрі (Jensen et al., 2020). б- та (КА широко розповсюджені в океанічних видах, що пов'язано із глобальним дефіцитом Zn^{2+} у поверхневому шарі океану (Morel et al., 2020). З тієї ж причини іКА, що містять Mn²⁺ в активному центрі, присутні у морських видах фітопланктону (Jensen et al., 2020). Карбоангідрази рослин можна розділити на α- та β-подібні за амінокислотним складом металкоординаційної сфери (Polishchuk, 2021). α-подібні КА включають α-, γ- та δКА з формулою Zn(His)₃(X). β-подібні КА включають β-, ζ- та θКА. Йоном металу в СКА зазвичай є Cd²⁺. Нещодавно було охарактеризовано нову безметалеву КА у ціанобактерії Anabaena sp. РСС7120 та хлорарахніофітової водорості Bigelowiella natans Moestrup, яка є окремим різновидом кКА (Hirakawa et al., 2021). Такі КА, ймовірно, експресуються у багатьох бактеріях та водоростях і мають активні центри з унікальною конусоподібною структурою бочки $\alpha + \beta$ (Hirakawa et al., 2021).

Головною рисою КА є каталіз взаємоперетворення CO2 та HCO3, а отже полегшення дифузії С_н та Н⁺ всередині клітинних компартментів та між ними (Tholen, Zhu, 2011), що можна назвати транспортною функцією КА. Крім того, деякі КА мають регуляторні функції, взаємодіючи з сигнальними каскадами. Наприклад, деякі ВКА зв'язують саліцилову кислоту та білки її сигнального шляху (Medina-Puche et al., 2017). ВКА можуть зазнавати таких посттрансляційних модифікацій, як S-нітрозилування, нітрування, фосфорилювання та відновлення-окиснення тіолових груп, які впливають на ферментативну активність і можуть бути важливими для участі в регуляції метаболічних шляхів (Polishchuk, 2021). Завдяки різним біохімічним властивостям КА можуть брати участь у багатьох фізіологічних процесах у рослинах, переважно пов'язаних з фотосинтезом. Такі процеси включають МКК, провідність мезофілу для СО₂, дихання та фотодихання, транспорт електронів у хлоропластах, а також регуляцію закриття продихів та засвоєння бікарбонату у наземних рослинах. Крім того, КА можуть брати участь у таких нефотосинтетичних процесах, як біосинтез ліпідів та амінокислот, диференціація клітин, антиоксидантний захист, сигнальні шляхи фітогормонів, реакції на біотичні та абіотичні стреси.

Ціанобактерії

У ціанобактерій МКК складаються з систем транспортування $C_{\rm H}$ та карбоксисом (рис. 1). Карбоксисоми – це унікальні мікрокомпоненти, які містять Рубіско, білкову оболонку з низькою проникністю для CO₂ та KA, що забезпечує локальне збільшення концентрації CO₂. За механізмами поглинання та фіксації CO₂, структурою та еволюційним походженням карбоксисом існує 2 групи – α - та β -ціанобактерії, які містять, відповідно, α - та β -карбоксисоми. Екологічні характеристики організмів також пов'язані з наявністю певного типу карбоксисом: α - та β -ціанобактерії є переважно океанічними та прісноводними відповідно.

<u>Позаклітинні КА та постачання CO₂ на поверхню клітини.</u> Виникнення позаклітинних α - та β KA в утворюючих мати ціанобактеріях із лужних озер може бути пов'язане з підвищеною лужністю водного середовища. Коли середовище є більш лужним, ніж цитоплазма, C_н захоплюється іззовні у вигляді HCO₃⁻, який не може проникати крізь мембрану. Рівноважна концентрація CO₂ у цитоплазмі за таких умов вища за позаклітинну, що сприяє витоку CO₂. Зовнішні КА можуть зменшити цю втрату, негайно перетворюючи його на HCO₃⁻ поблизу мембранно-локалізованих специфічних транспортерів HCO₃⁻ (Роль 1).

Позаклітинна КА активність у *Microcoleus chthonoplastes* Thuret ex Gomont стимулювалася інкубацією при лужному pH, що підтверджує це припущення (Kupriyanova et al., 2007, 2011). Ця активність була пов'язана з передбачуваною αКА (Cah-3-подібним ферментом) у глікокаліксі та βКА у

периплазматичному просторі (CahB1, Kupriyanova et al., 2011). Так само дефіцит С_н стимулював активність периплазматичної α KA ecaA y *Cyanothece* sp., ймовірно, завдяки трансляційній регуляції (Kupriyanova et al., 2019).



Рис. 1. Схематичне зображення участі карбоангідраз у механізмах концентрування карбону у ціанобактерій. Тут і в наступних рисунках: ППП – периплазматичний простір, Цит – цитоплазма, Тил – тилакоїди, Карб – карбоксисома

У *Phormidium kuetzingianum* (Kirchner ex Hansgirg) Anagnostidis & Komárek активність позаклітинної КА обернено залежала від зовнішньої концентрації HCO₃, а гідрофільний інгібітор КА ацетазоламід, не здатний проникати крізь біологічні мембрани, зменшував фотосинтетичну активність (Li et al., 2018). У сукупності ці дані свідчать про те, що позаклітинна активність КА бере участь у МКК і необхідна для ефективного фотосинтезу.

Полегшення поглинання CO_2 шляхом видалення на внутрішній поверхні мембрани. Через широкий спектр умов існування ціанобактерії можуть активно поглинати як CO_2 , так і HCO_3^- для використання у фотосинтезі. У ціанобактеріях було ідентифіковано п'ять систем поглинання $C_{\rm H}$, три з яких пов'язані з активним транспортом HCO_3^- крізь плазматичну мембрану (один $AT\Phi$ -залежний та два Na^+ -залежні HCO_3^- транспортери), і дві – засновані на пасивному надходженні CO_2 за градієнтом концентрації та його повторному захопленні в клітині (Price та ін., 2008). Останні залежать від пасивної дифузії CO_2 з наступною гідратацією в лужних доменах тилакоїдної мембрани (Tchernov et al., 2001). Насправді, ці механізми перехоплюють CO_2 , що надходить не тільки ззовні, але й утворюється всередині клітини під час дихання. CO_2 добре розчинний у біомембранах, тому легко надходить у клітину шляхом дифузії. Потім він перетворюється на HCO_3^- , у 1000 разів менш розчинний

у ліпідах, з участю КА-подібних доменів комплексу NDH-1 на тилакоїдних та цитоплазматичних мембранах, завдяки чому затримується у клітині. Комплекси NDH-1 ціанобактерій та хлоропластів, ймовірно, належать до окремого підкласу родини ферментів Комплексу 1. Ціанобактерії містять кілька ізоформ комплексу NDH-1, які беруть участь у різних процесах: диханні, циклічному та нециклічному фотофосфорилюванні (Battchikova, 2011). Їхня локалізація добре узгоджується з функціями: NDH-1₄ конститутивно присутній переважно на мембрані тилакоїдів, рідше – на цитоплазматичній мембрані (Xu et al., 2008) і має низьку спорідненість до CO₂, а NDH-1₃ індукується низьким вмістом С_н, локалізований на тилакоїдній мембрані і має високу спорідненість до CO₂. КА-подібні домени цих комплексів ChpX (CupB, що входить до складу NDH-1₄) та СhpY (CupA, частина NDH-1₃), а також зв'язана з ними β KA EcaB (Sun et al., 2019), розташовані в кишенях, які зазнають локального підлуження внаслідок векторного перенесення електронів та протонів, що сприяє перетворенню CO_2 на HCO_3^- та забезпечує виконання Ролі 2 (Maeda et al., 2002; Han et al., 2017).

Експресія CupA та EcaB стимулюється низьким рівнем C_н, високим pH та високою інтенсивністю освітлення (Sun et al., 2019). Як правило, КА каталізують pH-залежне врівноваження CO₂/HCO₃, однак у цих системах КА активність спрямовано використовується для накопичення НСО3⁻ та підтримання його нерівноважної концентрації відносно до СО₂. Функція СирВ пов'язана з циклічним транспортуванням електронів навколо фотосистеми 1, а СирА – з лінійним транспортуванням електронів (від H₂O до NADP⁺) (Maeda et al., 2002). Точний механізм участі КА у поглинанні C_{μ} ще досліджується, але припускають, що вони чітко скоординовані з транспортом протонів (Tchernov et al., 2001; Hagemann, Kaplan, 2020; Schuller et al., 2020). Білки СирА і СирВ мають вирішальне значення для виживання ціанобактерій за рН нижче 7,0 (Han et al., 2017), коли концентрація НСО3 у рідкому середовищі дуже низька і фотосинтез відбувається в основному за рахунок поглинання CO₂. Білки CupA і CupB не тільки виконують функцію КА, допомагаючи концентрувати С_н у клітині, але й координують процеси гідратації CO_2 та транспортування електронів у ціанобактеріях, тобто за відсутності цих білків або низької концентрації СО₂ інгібується транспортування протонів крізь тилакоїдну мембрану, що зумовлює розвиток фотоінгібування (Han et al., 2017).

<u>Структурна та функціональна роль в карбоксисомах.</u> КА є конститутивними структурними елементами карбоксисом, де вони, ймовірно, відіграють Роль 3, забезпечуючи постачання CO₂ до Рубіско. В αкарбоксисомах функцію КА виконує білок CsoS3 (55–65 кДа, CsoSCA, Kimber, 2014), який за кристалічною будовою подібний до β KA, хоча за амінокислотною послідовністю має настільки низький ступінь гомології, **342** що спочатку був віднесений до нового класу – єКА (Sawaya et al., 2006; Кітвег, 2014). У β-карбоксисомах N-кінцевий домен білка СстМ (55-70 кДа) є функціональним гомологом уКА з архебактерій (Peña et al., 2010), а С-кінцевий домен містить малу субодиницю Рубіско, що свідчить про поєднання функціональних (КА) та структурних (частина Рубіско) ролей. Це припущення також підкріплюється тим, що у багатьох ціанобактерій білок СстМ є єдиним кандидатом на роль КА у кластері карбоксисомних генів (Cannon et al., 2010). У деяких ціанобактеріях β-карбоксисоми містять βКА CcaA (Yu et al., 1992; Kerfeld, Melnicki, 2016). Як СстМ, так і СсаА мають унікальні структурні особливості та підтверджену КА активність, що є важливою передумовою для функціонування МКК (Kimber, 2014). Для виконання функції і запобігання короткому замиканню МКК активність цих КА має суворо контролюватися під час їх збирання, оскільки потрібна лише у карбоксисомі і не бажана у цитоплазмі. Іхня активація в карбоксисомі може контролюватися окисно-відновним потенціалом, pH або білок-білковою взаємодією за участю унікальних для КА доменів.

Мікроводорості

Chlamydomonas reinhardtii

У багатьох дослідженнях було показано, що активність КА та експресія аКА САН1, β KA1, β KA2 і мітохондріальної КА індукуються дефіцитом С_н (Polishchuk, 2021). Хоча в основному активність КА у вирощених в атмосфері повітря клітинах *С. reinhardtii* забезпечується САН1, було показано, що для МКК важливі різні КА, поза- і внутрішньоклітинні (Moroney et al., 1985). аКА САН1 була виявлена у периплазматичному просторі, β KA САН8 – у плазматичній мембрані, α KA САН3 – у тилакоїдах, θ KA LCIB та LCIC – у стромі хлоропластів та β KA САН6 – у джгутиках (рис. 2).

<u>Позаклітинні/периплазматичні КА та поглинання CO₂</u>. Серед позаклітинних КА найбільш доведеною є участь у МКК САН1, оскільки стимуляція КА-активності у культурі *C. reinhardtii* за умов дефіциту CO₂ в основному зумовлена індукцією цієї КА. Експерименти з використанням гідрофільного інгібітора КА ацетазоламіду та аналізу експресії САН1 показали сильну кореляцію експресії та активності САН1 з фотосинтетичною фіксацією CO₂ в умовах дефіциту C_H. САН8 у плазматичній мембрані може брати участь у МКК у кооперації з САН1 та частково дублюючи її функцію (Ynalvez et al., 2008). Інша позаклітинна КА, САН6, розташована у джгутиках, може відігравати особливу роль в отриманні C_H клітинами, будучи залученою у сприйнятті концентрації C_H та хемотаксисі (Mackinder et al., 2017).

<u>КА в структурі та функції піреноїду.</u> Було встановлено, що САНЗ допомагає Рубіско, забезпечуючи постачання CO_2 у піреноїд зі стромального пулу HCO_3^- , граючи Роль 3 у МКК (Moroney, Ynalvez, 2007). Після САН1 САНЗ є другою за ступенем вивченості КА у *C. reinhardtii* і, ймовірно, у водоростей. При достатній кількості CO_2 вона має низьку активність і зв'язана з донорним боком фотосистеми ІІ у всьому об'ємі хлоропласту. Однак за низького вмісту CO_2 вона фосфорилюється, значно



Рис. 2. Схематичне зображення участі карбоангідраз у двох режимах роботи механізму концентрування карбону у *Chlamydomonas reinhardtii*. На цьому і наступних рисунках: Пір – піреноїд, Хлп – хлоропласт

активується та зосереджується в піреноїді для участі в МКК (Blanco-Rivero et al., 2012). Важливість ӨКА LCIB та LCIC для МКК підтверджена великою кількістю доказів (Mackinder, 2018), хоча їх активність не було виявлено у C. reinhardtii (Jin et al., 2016). Ймовірно, що МКК у C. reinhardtii функціонує у двох режимах, активованих за різних рівнів С_н. При дуже низькій зовнішній концентрації CO₂ (< 0,03%) активується режим, який передбачає активне поглинання НСО3⁻ як через плазматичну мембрану, так і через оболонку хлоропласта. За цих умов LCIB локалізується на периферії піреноїду і відіграє незначну роль, запобігаючи витоку CO₂ (Wang, Spalding, 2014). При низькій зовнішній концентрації СО₂ (0,03–0,5%) LCIB розосереджується по стромі і полегшує дифузію СО₂ та рН-залежне накопичення HCO₃⁻ на світлі (Yamano et al., 2010; Wang, Spalding, 2014). Такі переміщення та зміни активності LCIB та САНЗ можуть бути потрібні для швидкої адаптації до коливань освітленості або доступності С_н, оскільки не потребують енергетично затратного і тривалого синтезу та деградації білків.

Діатомові водорості

Через вторинне ендосимбіотичне походження діатомові водорості мають найскладнішу систему клітинних компартментів. МКК залучають 344

декілька компартментів, в яких КА відіграють різну роль. Тому найбільш складні та різноманітні МКК зустрічаються у діатомових водоростей. Наприклад, два модельні види, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin i *Thalassiosira pseudonana* Cleve, значно відрізняються за участю КА у МКК (рис. 3).

<u>Phaeodactylum tricornutum.</u> МКК у *P. tricornutum* характеризується відсутністю позаклітинних КА, що не характерно для діатомових водоростей (Martin, Tortell, 2008). У цитоплазмі також не виявлено КА.



Рис. 3. Схематичне зображення участі карбоангідраз у механізмах концентрування карбону у *Phaeodactylum tricornutum* і *Thalassiosira pseudonana*. На цьому і наступних рисунках: XEC – хлоропластна ендоплазматична сітка, ППК – перипластидний компартмент

Натомість КА локалізуються в хлоропластній ендоплазматичній сітці (аКА САП, САVI та CAVII) та перипластидному просторі (аКА САІ та CAII), що походять від периплазматичного простору і цитоплазматичної мембрани, та цитоплазми еукаріотичного ендосимбіонту відповідно. Ці КА по обидві сторони перипластидної мембрани, ймовірно, полегшують активне поглинання НСО₃, відіграючи тим самим модифіковані Ролі 1 і 2, за аналогією з позаклітинними та цитоплазматичними КА C. reinhardtii. Можна припустити, що С_н надходить у цитоплазму за допомогою активного транспорту. У хлоропласті КА розташовані у піреноїді (ВКА PtCA1, PtCA2 і θKA Pt43233) і відсутні у стромі (Hopkinson et al., 2016), що відповідає умовам ефективного функціонування МКК. Було доведено, що Рt43233 відіграє Роль 3 у піреноїді, оскільки в нокаутних мутантів порівняно з диким типом спорідненість фотосинтезу до С_н різко знижувалась, а ріст сповільнювався (Kikutani et al., 2016). PtCA1 та PtCA2 також можуть грати Роль 3, але це ще не доведено (Hopkinson et al., 2016). Цікаво, що PtCA1 та PtCA2 активуються відновленими тіоредоксинами, що свідчить про можливість окисно-відновної регуляції МКК світлом.

Thalassiosira pseudonana Hasle & Heimdal. Ha Bigminy Big P. tricornutum, МКК pseudonana, ймовірно, задіяні y Τ. периплазматичні цитоплазматичні КА (бКА1+ζКА1 та уКА2 відповідно), експресія яких стимулюється низьким вмістом CO₂ (Samukawa et al., 2014). Ще одна КА, індукована низьким вмістом CO₂ – δКАЗ, розташована у перипластидному просторі. Докази чутливості стромальної αΚΑ1 до рівня СО₂ суперечливі (Tachibana et al., 2011; Samukawa et al., 2014). Нещодавно Jensen зі співавт. (2019) показали, що білок LCIP63 – це Mn²⁺-вмісна КА, що належить до нової родини кКА, розташована в хлоропластній ендоплазматичній сітці *Т. pseudonana* та індукується за низького вмісту CO₂. Надекспресія LCIP63 збільшувала спорідненість фотосинтезу до С_н. Загалом ці дані свідчать про те, що білок LCIP63 важливий для МКК. Оскільки хлоропластна ендоплазматична сітка є колишнім периплазматичним простором еукаріотичного ендосимбіонту, ми припускаємо, що LCIP63 відіграє Роль δКА1 та ζКА1 також можуть грати Роль 1, полегшуючи трансмембранне поглинання HCO₃, а γKA2, ймовірно, полегшує дифузію CO₂ у цитоплазмі. Функція аКА1 залишається нез'ясованою. Вона сильно експресується і чітко асоційована з областю хлоропластів, що свідчить про роль у фотосинтезі, а отже в МКК. За допомогою аналізу сигнальних пептидів було передбачено локалізацію цієї КА в перипластидному просторі (Tachibana et al., 2011).

Однак спираючись на дані конфокальної мікроскопії, автори припустили, що α KA1 рівномірно розсіяна по стромі (Тасһіbana et al., 2011), що є суперечливим, оскільки може призводити до короткого замикання МКК. Samukawa зі співавт. (2014) припустили, що у *T. pseudonana* ця KA перехоплює CO₂, що витікає зі строми. У такому випадку її локалізація має бути обмежена периферією хлоропласту або перипластидним компартментом. Ми вважаємо, що дані конфокальної мікроскопії Тасһіbana зі співавт. (2011) не виключають такої можливості. Наразі у *T. pseudonana* не було охарактеризовано жодної тилакоїднолюмінальної KA, але можна припустити, що θ KA, подібна до Pt43233 у *P. tricornutum*, може бути експресована і грати Роль 3 у піреноїді *T. pseudonana* (Kikutani et al., 2016).

Макрофіти

Наявних у науковій літературі даних щодо МКК у водних судинних рослин небагато. На підставі фізіологічних експериментів було висунуто припущення, що позаклітинна КА-активність необхідна для поглинання $C_{\rm H}$ багатьма морськими травами (Poschenrieder et al., 2018) та прісноводною покритонасінною рослиною *Ottelia alismoides* (Huang et al., 2020), оскільки гідрофільний інгібітор КА ацетазоламід знижував спорідненість фотосинтезу до $C_{\rm H}$ у цих видів. У *O. alismoides* передбачувана периплазматична аКА1, ймовірно, грає Роль 1, забезпечуючи швидке попов-

нення CO_2 на поверхні плазматичної мембрани шляхом дегідратації HCO_3^- . Крім того, було показано, що відповідна зворотна реакція потрібна для поглинання HCO_3^- аніонообмінним транспортером SLC4, зв'язаним з плазматичною мембраною. Незважаючи на постійний високий рівень конститутивної експресії, активність цієї КА стимулювалася за низького вмісту CO_2 (Huang et al., 2020).

Висновки

Завдяки здатності каталізувати взаємоперетворення CO_2 та HCO_3^- , КА диверсифікують шляхи та знижують дифузійні бар'єри для неорганічного транспорту карбону від зовнішнього середовища до місця фіксації CO_2 Рубіско, тим самим збільшуючи спорідненість фотосинтезу до $C_{\rm H}$. Кількість та внесок різних форм $C_{\rm H}$ істотно змінюються залежно від pH водного середовища, але КА ефективно стабілізують надходження $C_{\rm H}$ до поверхні клітини. Основним обгрунтуванням ролі КА є те, що оскільки HCO_3^- нерозчинний у біомембранах, його слід перетворити на CO_2 для пасивного надходження у клітину або її компартменти. Разом з тим, з'являється все більше доказів, які свідчать про участь КА у метаболонах транспорту $C_{\rm H}$, а також метаболоні фіксації CO_2 , які є частиною МКК.

Список літератури

- Aizawa K., Miyachi S. 1986. Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 39(3): 215–233. https://doi.org/ 10.1111/j.1574-6968.1986.tb01860.x
- Badger M. 2003. The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO₂ concentrating mechanisms. *Photosynth. Res.* 77(2–3): 83–94. https://doi.org/10.1023/A:1025821717773
- Badger M.R., Price G.D. 1992. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. *Physiol. Plant.* 84(4): 606–615. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04711.x
- Badger M.R., Kaplan A., Berry J.A. 1978. A mechanism for concentrating CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Anabaena variabilis* and its role in photosynthetic CO₂ fixation. *Carnegie Inst. Yearbook.* 77: 251–261.
- Badger M.R., Andrews T.J., Whitney S.M., Ludwig M., Yellowlees D.C., Leggat W., Price G.D. 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂-concentrating mechanisms in algae. *Can. J. Bot.* 76(6): 1052–1071. https://doi.org/10.1139/b98-074
- Battchikova N., Eisenhut M., Aro E.-M. 2011. Cyanobacterial NDH-1 complexes: novel insights and remaining puzzles. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*. 1807(8): 935–944. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.10.017
- Berner R.A. 2006. GEOCARBSULF: a combined model for Phanerozoic atmospheric O₂ and CO₂. Geochim. Cosmochim. Acta. 70(23): 5653–5664. https://doi.org/10.1016/ j.gca.2005.11.032

- Berry J., Farquhar G. 1978. The CO₂ concentrating function of C₄ photosynthesis. A biochemical model: *Proc. 4th Int. Congr. on Photosynthesis* (Reading, England, 1977). London: Biochem. Soc. Pp. 119–131.
- Blanco-Rivero A., Shutova T., Román M.J., Villarejo A., Martinez F. 2012. Phosphorylation controls the localization and activation of the lumenal carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE*. 7(11): e49063. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049063
- Cannon G.C., Heinhorst S., Kerfeld C.A. 2010. Carboxysomal carbonic anhydrases: structure and role in microbial CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics.* 1804(2): 382–392. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.026
- Coleman J.R. 2000. In: *Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol. 9. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. Pp. 353–367. https://doi.org/10.1007/0-306-48137-5 15
- DiMario R.J., Machingura M.C., Waldrop G.L., Moroney J.V. 2018. The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms. *Plant Sci.* 268: 11–17. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.12.002
- Giordano M., Beardall J., Raven J.A. 2005. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 99–131. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052
- Hagemann M., Kaplan A. 2020. Is the structure of the CO₂-hydrating complex I compatible with the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism ? *Plant Physiol.* 183(2): 460–463. https://doi.org/10.1104/pp.20.00220
- Han X., Sun N., Xu M., Mi H. 2017. Co-ordination of NDH and cup proteins in CO₂ uptake in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Exp. Bot.* 68(14): 3869–3877. https://doi.org/10.1093/jxb/erx129
- Hatch M.D. 1987. C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta.* 895(2): 81–106. https://doi.org/10.1016/S0304-4173(87)80009-5
- Hirakawa Y., Senda M., Fukuda K., Yu H.Y., Ishida M., Taira M., Kinbara K., Senda T. 2021. Characterization of a novel type of carbonic anhydrase that acts without metal cofactors. *BMC Biol.* 19: 105. doi: 10.1186/s12915-021-01039-8
- Hopkinson B.M., Dupont C.L., Matsuda Y. 2016. The physiology and genetics of CO₂ concentrating mechanisms in model diatoms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 31: 51–57. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.013
- Huang W., Han S., Jiang H., Gu S., Li W., Gontero B., Maberly S.C. 2020. External α-carbonic anhydrase and solute carrier 4 are required for bicarbonate uptake in a freshwater angiosperm. J. Exp. Bot. 71(19): 6004–6014. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa351
- Jensen E.L., Maberly S.C., Gontero B. 2020. Insights on the functions and ecophysiological relevance of the diverse carbonic anhydrases in microalgae. *Int. J. Mol. Sci.* 21(8): 2922. https://doi.org/10.3390/ijms21082922
- Jensen E.L., Clement R., Kosta A., Maberly S.C., Gontero B. 2019. A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton. *ISME J.* 13(8): 2094–2106. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0426-8
- 348

- Jin S., Sun J., Wunder T., Tang D., Cousins A.B., Sze S.K., Mueller-Cajar O., Gao Y.-G. 2016. Structural insights into the LCIB protein family reveals a new group of β-carbonic anhydrases. *Proc. Nat Acad. Sci.* 113(51): 14716–14721. https://doi.org/10.1073/pnas.1616294113.
- Kaplan A., Reinhold L. 1999. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50(1): 539–570. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.539
- Kenrick P., Crane P.R. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature*. 389(6646): 33–39. https://doi.org/10.1038/37918
- Kerfeld C.A., Melnicki M.R. 2016. Assembly, function and evolution of cyanobacterial carboxysomes. Curr. Opin. Plant Biol. 31: 66–75. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.009
- Kikutani S., Nakajima K., Nagasato C., Tsuji Y., Miyatake A., Matsuda Y. 2016. Thylakoid luminal θ-carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum. Proc. Nat. Acad. Sci.* 113(35): 9828–9833. https://doi.org/10.1073/pnas.1603112113
- Kimber M.S. 2014. In: Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. Dordrecht: Springer Netherlands. Pp. 89–103. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7359-2_6
- Kupriyanova E., Villarejo A., Markelova A., Gerasimenko L., Zavarzin G., Samuelsson G., Los D.A., Pronina N. 2007. Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. *Microbiology*. 153(4): 1149–1156. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003905-0
- Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Markelova A.G., Allakhverdiev S.I., Los D.A., Pronina N.A. 2011. Extracellular β-class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 103(1): 78–86. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.01.021
- Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Mironov K.S., Novikova G.V., Dykman L.A., Rodionova M.V., Gabrielyan D.A., Los D.A. 2019. Highly active extracellular α-class carbonic anhydrase of *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *Biochimie*. 160: 200–209. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.03.009
- Li T., Sharp C.E., Ataeian M., Strous M., de Beer D. 2018. Role of extracellular carbonic anhydrase in dissolved inorganic carbon uptake in alkaliphilic phototrophic biofilm. *Front. Microbiol.* 9: 2490. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02490
- Mackinder L.C.M. 2018. The *Chlamydomonas* CO₂-concentrating mechanism and its potential for engineering photosynthesis in plants. *New Phytologist.* 217(1): 54–61. https://doi.org/10.1111/nph.14749
- Mackinder L.C.M., Chen C., Leib R.D., Patena W., Blum S.R., Rodman M., Ramundo S., Adams C.M., Jonikas M.C. 2017. A spatial interactome reveals the protein organization of the algal CO₂-concentrating mechanism. *Cell*. 171(1): 133–147.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.044
- Maeda S., Badger M.R., Price G.D. 2002. Novel gene products associated with NdhD3/D4containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration in the

cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942: mechanism of CO₂ uptake in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 43(2): 425–435. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02753.x

- Martin C.L., Tortell P.D. 2008. Bicarbonate transport and extracellular carbonic anhydrase in marine diatoms. *Physiol. Plant.* 133(1): 106–116. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01054.x
- Medina-Puche L., Castelló M.J., Canet J.V., Lamilla J., Colombo M.L., Tornero P. 2017. βcarbonic anhydrases play a role in salicylic acid perception in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*. 12(7): e0181820. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181820
- Morel F.M.M., Lam P.J., Saito M.A. 2020. Trace metal substitution in marine phytoplankton. Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 48: 491–517. https://doi.org/10.1146/annurev-earth-053018-060108
- Moroney J.V., Ynalvez R.A. 2007. Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas Reinhardtii. Eukaryot. Cell.* 6(8): 1251–1259. https://doi.org/10.1128/EC.00064-07
- Moroney J.V., Husic H.D., Tolbert N.E. 1985. Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant Physiol*. 79(1): 177– 183. https://doi.org/10.1104/pp.79.1.177
- Peña K.L., Castel S.E., de Araujo C., Espie G.S., Kimber M.S. 2010. Structural basis of the oxidative activation of the carboxysomal γ-carbonic anhydrase, CcmM. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 107(6): 2455–2460. https://doi.org/10.1073/pnas.0910866107
- Polishchuk O.V. 2021. Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases. *Planta*. 253(2): 58. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03553-5
- Poschenrieder C., Fernández J.A., Rubio L., Pérez L., Terés J., Barceló J. 2018. Transport and use of bicarbonate in plants: current knowledge and challenges ahead. *Int. J. Mol. Sci.* 19(5): 1352. https://doi.org/10.3390/ijms19051352
- Price G.D., Badger M.R., Woodger F.J., Long B.M. 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, C_i transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J. Exp. Bot.* 59(7): 1441–1461. https://doi.org/10.1093/jxb/erm112
- Samukawa M., Shen C., Hopkinson B.M., Matsuda Y. 2014. Localization of putative carbonic anhydrases in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*. *Photosynth. Res.* 121(2–3): 235–249. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9967-x
- Sawaya M.R., Cannon G.C., Heinhorst S., Tanaka S., Williams E.B., Yeates T.O., Kerfeld C.A. 2006. The structure of β-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *J. Biol. Chem.* 281(11): 7546–7555. https://doi.org/10.1074/jbc.M510464200
- Schuller J.M., Saura P., Thiemann J., Schuller S.K., Gamiz-Hernandez A.P., Kurisu G., Nowaczyk M.M., Kaila V.R.I. 2020. Redox-coupled proton pumping drives carbon concentration in the photosynthetic complex I. *Nat. Commun.* 11(1): 494. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14347-4
- Sun N., Han X., Xu M., Kaplan A., Espie G.S., Mi H. 2019. A thylakoid located carbonic anhydrase regulates CO₂ uptake in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *New Phytol.* 222(1): 206–217. https://doi.org/10.1111/nph.15575

- Tachibana M., Allen A.E., Kikutani S., Endo Y., Bowler C., Matsuda Y. 2011. Localization of putative carbonic anhydrases in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. *Photosynth. Res.* 109(1–3): 205–221. https://doi.org/10.1007/s11120-011-9634-4
- Tchernov D., Helman Y., Keren N., Luz B., Ohad I., Reinhold L., Ogawa T., Kaplan A. 2001. Passive entry of CO_2 and its energy-dependent intracellular conversion to HCO_3^- in cyanobacteria are driven by a Photosystem I-generated $\Delta \mu H^+$. *J. Biol. Chem.* 276(26): 23450–23455. https://doi.org/10.1074/jbc.M101973200
- Tholen D., Zhu X.-G. 2011. The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO₂ diffusion. *Plant Physiol.* 156(1): 90–105. https://doi.org/10.1104/pp.111.172346
- Vats S.K., Kumar S., Ahuja P.S. 2011. CO₂ sequestration in plants: lesson from divergent strategies. *Photosynthetica*. 49(4): 481–496. https://doi.org/10.1007/s11099-011-0078-z
- von Caemmerer S., Quinn V., Hancock N.C., Price G.D., Furbank R.T., Ludwig M. 2004. Carbonic anhydrase and C₄ photosynthesis: a transgenic analysis. *Plant, Cell Environ.* 27(6): 697–703. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2003.01157.x
- Wang Y., Spalding M.H. 2014. Acclimation to very low CO₂ : contribution of limiting CO₂ inducible proteins, LCIB and LCIA, to inorganic carbon uptake in *Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiol.* 166(4): 2040–2050. https://doi.org/10.1104/pp.114.248294
- Xu M., Ogawa T., Pakrasi H.B., Mi H. 2008. Identification and localization of the CupB protein involved in constitutive CO₂ uptake in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 49(6): 994–997. https://doi.org/10.1093/pcp/pcn074
- Yamano T., Tsujikawa T., Hatano K., Ozawa S., Takahashi Y., Fukuzawa H. 2010. Light and low-CO₂-dependent LCIB–LCIC complex localization in the chloroplast supports the carbonconcentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol*. 51(9): 1453– 1468. https://doi.org/10.1093/pcp/pcq105
- Ynalvez R.A., Xiao Y., Ward A.S., Cunnusamy K., Moroney J.V. 2008. Identification and characterization of two closely related β-carbonic anhydrases from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant.* 133(1): 15–26. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01043.x
- Yu J.-W., Price G.D., Song L., Badger M.R. 1992. Isolation of a putative carboxysomal carbonic anhydrase gene from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol*. 100(2): 794–800. https://doi.org/10.1104/pp.100.2.794
- Zabaleta E., Martin M.V., Braun H.-P. 2012. A basal carbon concentrating mechanism in plants? *Plant Sci.* 187: 97–104. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.02.001

Підписала до друку О.К. Золотарьова

Polishchuk O.V. 2021. The roles of carbonic anhydrases in carbon concentrating mechanisms of aquatic photoautotrophs. *Algologia*. 31(4): 337–352

M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2 Tereschenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

The article surveys multiple roles of carbonic anhydrases (CAs) in inorganic carbon (C_i) acquisition by cyanobacteria, microalgae, and macrophytes under C_i limiting conditions. Slow C_i diffusion in aquatic environments imposes the need for carbon concentrating mechanisms (also named CO₂ concentrating mechanisms, CCMs) in aquatic photoautotrophs to transport C_i against the gradient and ensure CO₂ supply to photosynthesis. There are common requirements for efficient CCM functioning in cyanobacteria, algae, and aquatic angiosperms, including active transport of HCO₃⁻ to the C_i-concentrating compartment and CO₂ generation from the HCO₃⁻ pool in the Rubisco-enriched subcompartment. Facilitating C_i diffusion in aqueous solutions and across lipid bilayers, CAs play essential roles in CCMs that are best studied in cyanobacteria, green algae, and diatoms. Roles of CAs in CCMs depend on their localization and include facilitation of active transmembrane C_i uptake by its supplying at the outer surface (Role 1) and removal at the inner surface (Role 2), as well as the acceleration of CO₂ production from HCO₃⁻ near Rubisco (Role 3) in a special CO₂-tight compartment, carboxysome in cyanobacteria or pyrenoid in microalgae. The compartmentalization of CAs is also critical because, if activated in the HCO₃⁻ –concentrating compartment, they can easily eliminate the C_i gradient created by CCMs.

K e y w o r d s : microalgae, cyanobacteria, macrophytes, photosynthesis, pyrenoid, carboxysome, inorganic carbon, carbon concentrating mechanisms, carbonic anhydrase