



<https://doi.org/10.15407/ukrbotj82.03.242>

RESEARCH ARTICLE

Світлозалежні зміни карбоангідразної активності листків *Crassula ovata* (Crassulaceae)

Наталія М. ТОПЧІЙ * , Олена К. ЗОЛОТАРЬОВА ,
Вікторія В. ДАДИКА, Ольга М. ФЕДЮК , Олена Б. ОНОЙКО 

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

* Автор для листування: ntopchiy@ukr.net

Реферат. Карбоангідраза (Carbonic anhydrase, CA, EC 4.2.1.1) — другий за кількістю білок у листках вищих рослин після рибулозо-1,5-біс-фосфаткарбоксилази/оксигенази (РБФК/О), представлений трьома різними родинами. СА відіграє вирішальну роль у постачанні CO_2 до РБФК/О і полегшенні гідратації CO_2 з утворенням HCO_3^- , який потім використовується як субстрат для фосфоенолпіруваткарбоксилази у C_4 - і САМ-рослинах. Незважаючи на ключову роль СА у САМ-фотосинтезі, дані щодо її ізоформ, активності та локалізації у САМ-рослин залишаються дуже обмеженими. Метою даного дослідження було виявити та охарактеризувати форми СА, а також визначити рівень і розподіл СА активності серед розчинних білків листків модельної САМ-рослини *Crassula ovata*, адаптованої до темряви та світла. Величина СА активності у фракції розчинних білків варіювала від 30 до 85 WAU/мг білка залежно від часу доби, коли були зібрані зразки листків. Значне зниження СА активності у загальній листовій фракції розчинних білків спостерігалось при переході від темряви до світла. В екстракті із "світлових" листків *C. ovata* за допомогою електрофоретичного розділення в присутності додецилсульфату натрію і візуалізації СА активності методом протонографії була ідентифікована єдина ізоформа ферменту з молекулярною масою 29 кДа. У "світлових" і "темнових" листках, методами нативного електрофорезу і протонографії виявлено два високомолекулярні білкові комплекси, які мають СА активність. Гідратазна активність цих комплексів у адаптованих до темряви листках рослин була значно нижчою порівняно зі "світловими" листками. Отримані дані свідчать про світлозалежну зміну активності СА та її локалізацію в листках *C. ovata* протягом циклу "день-ніч".

Ключові слова: САМ-фотосинтез, *Crassula ovata*, карбоангідраза, протонографія

Вступ

У рослинному світі існує три основні типи фотосинтезу: C_3 , C_4 і САМ-кислотний метаболізм товстолистових (Crassulaceae). Рослини, які вико-

ристовують САМ-метаболізм, пристосовані до життя в сухому кліматі завдяки тому, що фіксація неорганічного карбону (C_n) у вигляді CO_2 відбувається у дві стадії, розділені в часі. У нічний час CO_2 дифундує в листки через відкриті

ARTICLE HISTORY. Submitted 07 October 2024. Revised 06 May 2025. Published 26 June 2025

CITATION. Topchiy N.M., Zolotareva O.K., Dadyka V.V., Fediuk O.M., Onoiko O.B. 2025. The light-dependent alteration in carbonic anhydrase activity in leaves of *Crassula ovata* (Crassulaceae). *Ukrainian Botanical Journal*, 82(3): 242–251. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj82.03.242>

© M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine, 2025

© Publisher PH "Akademperiodyka" of the NAS of Ukraine, 2025

This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

продихи, перетворюється за участю активної карбоангідрази (Carbonic anhydrase, CA) у цитоплазмі на бікарбонат (HCO_3^-), який з'єднується з фосфоенолпіруватом з утворенням оксалоацетату і далі яблучної кислоти. Малат акумулюється у вакуолях завдяки активності тонопластної H^+ -АТФ-ази та малат-селективного аніонного каналу (Heyduk, 2022). Вдень у САМ-рослин продихи закриті, яблучна кислота транспортується у цитоплазму шляхом пасивної дифузії, декарбоксилюється з утворенням CO_2 , який рефіксується у фотосинтетичному циклі відновлення карбону (циклі Кальвіна), як і у C_3 -рослин (Lüttge, 2004; van Tongerlo, 2021). Таким чином, більша частина фотосинтетичної фіксації C_n відбувається у САМ-рослин при закритих продихах, що дозволяє зменшити втрату води з листків без обмеження фотосинтезу. Згідно з С. Osmond (1978), протягом доби рівень газообміну та ступінь розкриття продихів у САМ-рослин поділяються на чотири фази: фаза I — поглинання CO_2 у темряві, фаза II — поглинання CO_2 рано вранці, фаза III — закриття продихів у середині дня та фаза IV — повторне поглинання CO_2 у другій половині дня. Під час фази III, коли продихи щільно закриті, відбувається декарбоксилювання утвореного в темряві малату та рефіксація CO_2 за допомогою рибулозо-1,5-біс-фосфаткарбоксилази/оксигенази (РБФК/О). Після завершення фази декарбоксилювання продихи можуть відкритися в другій половині дня (фаза IV) і рослина розпочинає звичайний C_3 -фотосинтез, який спостерігається у багатьох видів САМ-рослин (Winter, Smith, 2022). Високий рівень CO_2 , накопичений у фазі III, очевидно, є важливим для регулювання процесу, в якому центральну роль відіграє СА, що підтримує рН-залежну рівновагу $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ у цитоплазмі та стромі хлоропласту, а також забезпечує постачання субстрату (CO_2) до РБФК/О.

Карбоангідрази (Carbonic anhydrases, CAs) — найпоширеніші металоферменти, що містять цинкові ліганди, які каталізують взаємоперетворення CO_2 і HCO_3^- . Рослини мають три типи карбоангідраз: α -, β - і γ -, які експресуються у різних тканинах і клітинних компартментах (DiMario et al., 2017). У рослинах CAs знаходяться в цитоплазмі, стромі хлоропластів та мітохондріях. Ці ферменти відіграють ключову роль у багатьох фізіологічних процесах,

включаючи фотосинтез, дихання, транспорт CO_2 та секрецію електролітів (DiMario et al., 2017; Zolotareva et al., 2023). Вони належать до найефективніших ферментів у дуже широкому спектрі кислотності. Встановлено, що CAs беруть участь у регуляції рН хлоропластів і захищають ферменти строми від денатурації під час швидких та різких змін умов освітлення (Maren, 1988). Найбільш ґрунтовне дослідження було присвячене участі β -СА у механізмі концентрування карбону, який підвищує рівень CO_2 у безпосередній близькості до РБФК/О і, як наслідок, знижує фотодихання (Moroney et al., 2013).

Незважаючи на важливу роль СА у функціонуванні САМ-фотосинтезу, дані щодо її ізоформ, активності та локалізації у САМ-рослин залишаються дуже обмеженими і представлені лише в одному дослідженні (Tsuzuki et al., 1982), присвяченому карбоангідразам різноманітних САМ-видів. Проте вивчення рівня, регуляції та локалізації СА активності у цієї групи рослин не проводилося дотепер.

Об'єктом дослідження був модельний вид САМ-рослин — *Crassula ovata* (Mill.) Druce. Це вічнозелений сукулент родини *Crassulaceae*, що походить із південної та південно-східної Африки, широко відомий як декоративна рослина для вирощування у закритому та відкритому ґрунті. Рослини *C. ovata* толерантні до широкого діапазону температур і вологості, і навіть можуть витримувати невеликі заморозки. *Crassula ovata* є важливим модельним видом для вивчення регуляції САМ-фотосинтезу та відкриття продихів, що підтверджується численними дослідженнями (Loucks, Ownby, 1978; Rustin et al., 1988; Kawamitsu et al., 2002; Males, Griffiths, 2017, etc.).

Метою роботи було виявити та охарактеризувати ізоформи СА, а також визначити рівень та розподіл СА активності серед розчинних білків листків модельної САМ-рослини *C. ovata*, адаптованої до темряви та світла.

Матеріали та методи

Рослинний матеріал та умови вирощування. Рослини *C. ovata* вирощували у горщиках при температурі +23 °C, вологості повітря 60%, густині потоку фотонів 200 мкмоль $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ та фотоперіоду 14/10 год. "Світлові" листки для дослідження відбирали в середині дня (фаза III),

коли продихи закриті, "темнові" — в 6.00 ранку (фаза I), після 10-годинної темної інкубації.

Екстракція розчинних білків. Розчинні білки загальної фракції "світлових" і "темнових" листків екстрагували згідно з А. Makino зі співавт. (1992). Концентрацію білка в екстрактах визначали на спектрофотометрі за М. Bradford (1976).

Визначення фотосинтетичних пігментів. Екстракцію пігментів проводили у темряві диметилсульфоксидом до знебарвлення листків протягом 7 год при 65 °C згідно з М. Tait та D. Nik (2003). Концентрацію хлорофілів (Chl) та каротиноїдів (Car) розраховували за рівняннями згідно з А. Wellburn (1994). Вміст пігментів виражали в мг на одиницю сухої маси.

Вимірювання титрованої кислотності. Титровану кислотність у зразках листків вимірювали методом кислотно-лужного титрування за S. von Caemmerer та H. Griffiths (2009). Зразки листків після зважування кип'ятили у дистильованій воді протягом 5 хв та охолоджували до кімнатної температури. Екстракти титрували 0,01 М NaOH (pH 7) до появи рожевого забарвлення індикатора фенолфталеїну (20 мкл у розведенні 1 : 5). Кількість накопиченої в листках кислоти визначали за кількістю використаного на титрування NaOH.

Оцінка гідратазної СА активності. Гідратазну СА активність визначали згідно з С. Capasso зі співавт. (2012). Аналіз ґрунтується на моніторингу зміни pH розчину при каталітичному перетворенні CO_2 на HCO_3^- при 0 °C. У дві пробірки, поміщені у крижану баню, вносили по 0,5 мл 25 мМ Tris (pH 8,3) з додаванням розчину pH-індикатора бромтимолового синього (БТС) до отримання видимого синього забарвлення. В одну з пробірок вносили від 10 до 50 мкл фракції розчинних білків *C. ovata*, а в другу пробірку (контроль) — еквівалентний об'єм буфера. Потім дуже швидко додавали 0,5 мл води, насиченої CO_2 , і реєстрували час, необхідний для зміни кольору розчину з синього на жовтий. Швидкість реакції розраховували в одиницях Вілбура-Андерсона (WAU) як $(T_0 - T)/T$, де T_0 і T — час у секундах, необхідний для зміни забарвлення розчину в некаталітичній та каталітичній реакціях, відповідно.

Нативний електрофорез розчинних білків. Неденатурувальний електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) розчинних білків

загальної фракції "світлових" і "темнових" листків проводили за методикою L. Ornstein та B. Davis (1964) у камері Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-RAD) при 75 мА (180 В) за температури 0 °C протягом 1,5 год.

Візуалізація СА у ПААГ. Гідратазну активність СА у ПААГ візуалізували за L. Edwards та R. Patton (1966). Гелі інкубували 30 хв при 0 °C у 50 мМ вероналовому буфері (pH 8,1) з додаванням розчину БТС до появи темно-синього забарвлення. Зафарбовані гелі поміщали у воду, насичену CO_2 . У місцях локалізації білків, які проявляють СА активність, відбувалося утворення жовтих смуг через зміну кольору БТС з синього (лужний pH) на жовтий (кислий pH).

Аналіз СА активності у ДДС-Na-ПААГ (метод протонографії). Розчинні білки "світлових" і "темнових" листків *C. ovata* аналізували методом ДДС-Na-ПААГ-електрофорезу згідно U. Laemmli (1970), у невідновлювальних умовах (без 2-меркаптоетанолу та кип'ятіння зразків) за V. De Luca зі співавт. (2015) для збереження ферментативної активності СА. Електрофорез проводили у 12%-му розділяючому гелі (0,375 М Tris-HCl, pH 8,8). Концентруючий гель містив 4%-ний акриламід у 0,125 М Tris-HCl (pH 6,8). Tris-гліциновий буфер (25 мМ Tris-HCl, 192 мМ гліцин) використовували як верхній і нижній робочий буфер. До обох гелів та верхнього робочого буфера додавали ДДС-Na до кінцевої концентрації 0,1%. У кожну лунку вносили 20 мкг білка. Для ДДС-Na-ПААГ використовували білкові маркери III (6,5–200 кДа) (PanReacApplisam). Після електрофорезу частину гелів фарбували Кумассі блакитним G-250, інші замочували в 2,5% Triton X-100 (для відновлення заінгібованої ДДС-Na гідратазної активності СА) протягом 1 год при постійному перемішуванні, а потім двічі промивали 100 мМ Tris-HCl (pH 8,2), який містив 10%-вий ізопропанол, протягом 10 хв. Для візуалізації гідратазної активності СА в гелях їх забарвлювали БТС у концентрації 0,1% у 100 мМ Tris-HCl (pH 8,2) протягом 30 хв, а потім занурювали у воду, насичену CO_2 . Протони водню, що утворюються під час каталізованої реакції, відповідають за зміну кольору БТС з синього на жовтий у зонах локалізації СА.

Статистична обробка результатів. Дослідження проводили у трьох біологічних і п'яти аналітичних повторях. Результати наведені як середні величини зі стандартним відхиленням.

Вірогідність різниці вибірок визначено за допомогою *t*-критерія Стьюдента за $p \leq 0,05$. Аналіз проводили за допомогою програми Statistix v. 10.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

Результати та обговорення

Вміст Chl у сукулентних рослин зазвичай є невисоким і залежить від рівня освітлення та водопостачання. За умов нашого експерименту рослини *C. ovata* вирощували за помірного освітлення та регулярного поливу. У "світлових" листках *C. ovata* (табл. 1) співвідношення Chl *a* та Chl *b* становило близько 2,07, що характерно для тіньовитривалих рослин, які зростають у затінку (Syvash et al., 2018). При цьому істотної різниці у вмісті фотосинтетичних пігментів між "світловими" і "темновими" листками (дані не приводяться) не відмічено.

Фотосинтетична фіксація C_3 за участю як фосфоенолпіруваткарбоксилази (субстрат HCO_3^-), так і РБФК/О (субстрат CO_2) потребує каталітичного прискорення взаємоперетворення $CO_2 \leftrightarrow HCO_3^-$ через те, що спонтанна реакція є занадто повільною (DiMario et al., 2017) і не може підтримувати належну швидкість метаболічних процесів. Оскільки ФЕПК активна у темряві, а РБФК/О — на світлі (переважно у фазі III) доцільно було встановити, як змінюється СА активність на цих етапах САМ-циклу.

На першому етапі нічного карбоксилювання (фаза I) при САМ-фотосинтезі CO_2 перетворюється на HCO_3^- за участю β -СА. Рівень СА активності визначали у загальній фракції розчинних білків, ізольованій з листків після 10 год темнотної експозиції *C. ovata* (фаза I), і порівнювали з результатами визначення ензиматичної активності в екстракті листків, зібраних після освітлення рослин впродовж 10 год (фаза III). Величина СА активності у фракції розчинних білків варіювала від 30 до 85 WAU/мг білка залежно від часу доби, коли були зібрані зразки листків. Значне зниження СА активності спостерігалось при переході від темряви до світла (рис. 1). Показано, що гідратазна активність СА у "світлових" листках *C. ovata* значно поступалася СА активності "темнових" листків. Істотна різниця у рівнях ферментативної активності білків, екстрагованих із "світлових" та "темнових" листків, свідчить про ключову роль СА в первинній нічній фіксації CO_2 (Cushman et al.,

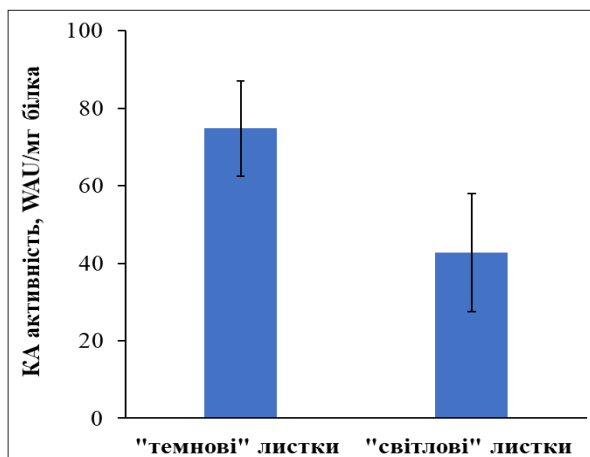


Рис. 1. Добові коливання гідратазної активності СА розчинних білків, ізольованих з листків *Crassula ovata*

Fig. 1. Daily fluctuations of hydratase activity of CA of soluble proteins isolated from leaves of *Crassula ovata*

2008) і значне зниження її активності в денній фазі циклу (фаза III). Ці результати узгоджуються із сформульованим у попередніх роботах уявленням про β -СА як основного фермента, який бере участь у перетворенні атмосферного CO_2 в HCO_3^- у C_4 - і САМ-рослинах (Borland et al., 2014; Ming et al., 2015; DiMario et al., 2017). Пізніше була показана висока експресія гену β -СА на першому етапі нічного карбоксилювання для таких облігатних САМ-рослин, як ананас і каланхое (Wai et al., 2019).

Для виявлення СА активності серед розчинних білків *C. ovata* і визначення молекулярної маси (ММ) ензиму був проведений ДДС-На-ПА-АГ-електрофорез із візуалізацією гідратазної активності методом протонографії згідно до V. De Luca зі співавт. (2015). За даними, представленими на рис. 2, фракція розчинних білків "світлових" листків *C. ovata* містила лише одну ізоформу ферменту. Оскільки маркерні білки містять α -СА з ММ 29 кДа, при візуалізації гідратазної активності в гелі, в якому одночасно розділялися маркерні білки і розчинні білки *C. ovata*, її положення чітко виявляється (рис. 2, B1) і збігається

Таблиця 1. Вміст фотосинтетичних пігментів (мг/г сухої маси) у "світлових" листках *Crassula ovata*
Table 1. The content of photosynthetic pigments (mg/g dry weight) in "light" leaves of *Crassula ovata*

Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a</i> + <i>b</i>	Car
7,95 ± 1,02	3,83 ± 1,00	11,78 ± 2,1	1,46 ± 0,14

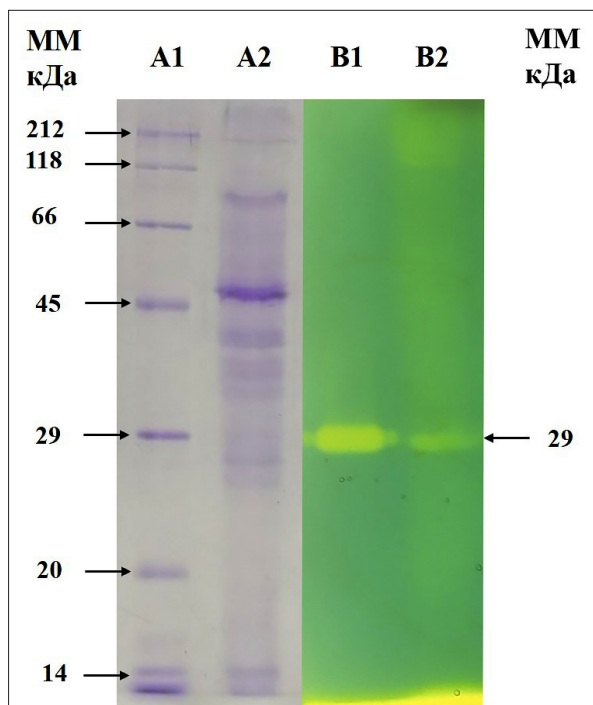


Рис. 2. ДДС-Na-електрофорез розчинних білків (А), виділених із "світлових" листків *Crassula ovata*: А1, А2 — електрофореграми, пофарбовані Кумассі блакитним G-250, де А1 — білкові маркери з позначками їхніх молекулярних мас, А2 — розчинні білки, екстраговані зі "світлових" листків *C. ovata*. Протонограми (В): В1 — білкові маркери, які містять СА (29 кДа), активну за гідратазною реакцією, В2 — розчинні білки, екстраговані зі "світлових" листків *C. ovata*

Fig. 2. SDS-electrophoresis of soluble proteins (A), isolated from "light" leaves of *Crassula ovata*: A1, A2 — electrophoregrams, stained with Coomassie blue G-250, A1 — protein markers with their MW indicated, A2 — soluble proteins isolated from "light" leaves. Protonograms (B): B1 — protein markers, including CA (29 kDa), active in the hydratase reaction, B2 — soluble proteins isolated from "light" leaves of *C. ovata*

із зоною СА активності розчинних білків (рис. 2, В2). Це дозволяє зробити висновок, що ММ мономерної форми СА становить 29 кДа. На відміну від ізоферментів СА тварин, які переважно належать до α -типу і є мономерами, рослинні СА представлені α -, β - і γ -типами та олігомерними формами. Переважною формою рослинних СА_s є СА β -типу, що виявляє каталітичну активність лише в олігомерному стані. Функціональною одиницею β -СА є димер, хоча найпоширенішою ізоформою β -СА є тетрамер (DiMario et al., 2017). Типовими ізоформами β -СА є також гексамери

та октамери (Kimber, Pai, 2000). Зважаючи на те, що в мономерному стані поліпептиди β -СА не виявляють каталітичної активності у розчині і здатні каталізувати взаємоперетворення форм вугільної кислоти лише при олігомеризації, на протонограмі білків *C. ovata* (рис. 2) ми спостерігаємо виразне жовте забарвлення в зоні, яка відповідає мономеру 29 кДа, що свідчить про активне каталітичне перетворення CO_2 з утворенням протонів. Тобто, після видалення ДДС-Na із гелю мономери, що сконцентровані у відповідній білковій зоні, можуть спонтанно формувати каталітично активні олігомери. Такий самий висновок був зроблений раніше V. Del Prete зі співавт. (2015, 2016) при аналізі протонограм бактеріальних СА β - або γ -типів.

Бікарбонат, який утворюється на першій фазі нічного карбоксилування, фіксується за участю цитозольного ферменту фосфоенолпіруваткарбоксилази з утворенням оксалоацетату, який негайно відновлюється до малату. Останній із цитоплазми транспортується у велику центральну вакуоль клітин мезофілу внаслідок електрохімічного градієнта, який генерується активним закачуванням H^+ вакуолярною V-АТФ-азою (Huang et al., 2021; Heyduk, 2022). У результаті відбувається вакуолярне накопичення ЯК, оскільки, як показано (Ceusters et al., 2021; Winter, Smith, 2022), кожен моль накопиченого малату врівноважується 2 молями H^+ . Таким чином, зростання загальної кислотності протягом ночі свідчить про активність САМ-фотосинтезу і може бути легко виявлена при титруванні екстрактів із листків. У нашому дослідженні загальна кількість кислоти, накопичена за ніч клітинами *C. ovata*, складала 58,2 мкмоль H^+ /кг сирої маси, що добре узгоджується із даними, отриманими раніше (Tsuzuki et al., 1982). Натомість, у денний час титрована кислотність знижувалася і складала лише 15,27 мкмоль H^+ /кг сирої маси. Зменшення внутрішньоклітинної титрованої кислотності вдень відбувається внаслідок декарбоксилування малату з наступною рефіксацією CO_2 у циклі Кальвіна. Вдень, під час основної фази декарбоксилування яблучної кислоти у цитоплазмі, вміст CO_2 зростає до високих внутрішніх концентрацій і рефіксується РБФК/О у циклі Кальвіна. При цьому концентрація CO_2 навколо РБФК/О досягає 1%, а загальна кислотність САМ-клітин знижується (Tsuzuki et al., 1982).

Різницю між активністю та її розподілом серед розчинних білків листків у темряві і на світлі вивчали також шляхом електрофоретичного розділення білків і візуалізації СА активності у ПААГ при збереженні нативного стану білків. За умов неденатурувального електрофорезу виявилися дві чіткі зони СА активності, які відповідають поліпептидам з ММ у межах 440–880 кДа (рис. 3). Ці смуги мали різний рівень ферментативної активності, про що свідчить неодночасна поява жовтого забарвлення в цих ділянках під час їхньої візуалізації. У "світлових" і "темнових" листках методами нативного електрофорезу і протонографії було виявлено два високомолекулярні білкові комплекси, які мають СА активність (рис. 3). Гідратазна активність даних комплексів у адаптованих до темряви листках рослин була значно нижчою порівняно зі "світловими". Отримані дані свідчать про світлозалежну зміну активності СА в листках *C. ovata* протягом циклу "день-ніч". Ключові ферменти САМ-циклу демонструють підвищену експресію мРНК та білків і зростання ензиматичної активності. Крім СА, відмічалася посилена експресія фосфоенолпіруваткарбоксилази (перетворює фосфоенолпіруват на оксалоацетат) і малатдегідрогенази (перетворює оксалоацетат на малат) (Cushman et al., 2008).

Участь цитоплазматичної СА у забезпеченні поглинання CO_2 у темряві і первинній стадії карбоксилювання САМ-циклу не викликає жодних сумнівів. При цьому роль СА у фіксації CO_2 в хлоропластах у світловій фазі циклу не визначена. За результатами даної роботи (рис. 3) в листках *C. ovata* як при освітленні, так і в темряві, виявлені високомолекулярні комплекси, які включають СА. За численними дослідженнями (Sainis, Harris 1986; Gontero et al., 1993; Jebanathirajah, Coleman, 1998; Anderson et al., 2009; Babadzhanova et al., 2010; Semeni-hin, Zolotareva, 2015), подібні мультиферментні комплекси (МФК), які включають від двох до восьми ензиматичних компонентів, виявлені в хлоропластах. Було виділено кілька МФК, які беруть участь у циклі Кальвіна-Бенсона. Зокрема, в хлоропластах шпинату виявлений комплекс, що включає рибозофосфат ізомеразу, фосфорибулокіназу і РБФК/О (Sainis, Harris, 1986). У стромальній фракції хлоропластів гороху був ідентифікований мультибілковий комплекс, що включає гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу,

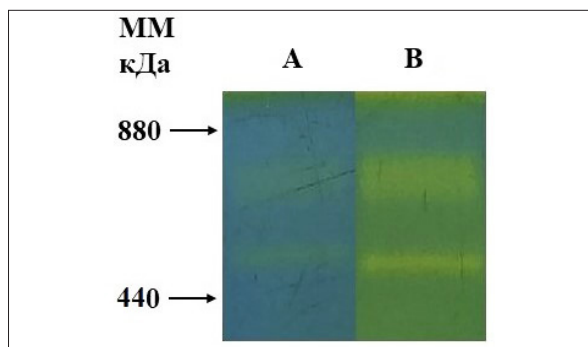


Рис. 3. Протонограми розчинних білків листків *Crassula ovata* після нативного електрофорезу з позначками положення білкових маркерів із зазначенням їхніх молекулярних мас. А — розчинні білки листків після 10 год експозиції рослини *C. ovata* у темряві. В — розчинні білки листків після 10 год експозиції рослини *C. ovata* на світлі. В якості білкових маркерів використано мономер (440 кДа) і димер (880 кДа) феритину

Fig. 3. Protonograms of soluble proteins of leaves of *Crassula ovata* after native electrophoresis, with marks of the positions of protein markers indicating their MW. A — soluble proteins of leaves after 10 hours of exposure of *C. ovata* plant in the dark. B — soluble proteins of leaves after 10 hours of exposure of *C. ovata* plant in the light. Ferritin monomer (440 kDa) and dimer (880 kDa) were used as protein markers

фосфорибулокіназу, і невеликий білок CP12 (Nicholson et al., 1987). Із стромальної фракції хлоропластів тютюну (*Nicotiana tabacum*) був ізольований комплекс з молекулярною масою 600 кДа (Jebanathirajah, Coleman, 1998). Окрім рибозофосфат ізомераз, фосфорибулокінази і РБФК/О, він містив четвертий компонент мультиферментного комплексу — карбоангідразу.

СА, асоційована з РБФК/О у піреноїді мікроводоростей (DiMario et al., 2017), відіграє безпосередню роль у забезпеченні постачання субстрату карбоксилазної реакції — CO_2 . РБФК/О — один із найважливіших ферментів у природі, оскільки виконує головну функцію в механізмі надходження C_n у біологічний кругообіг. Необхідність прямого постачання CO_2 до РБФК/О обумовлена природою цього ензиму, який каталізує приєднання CO_2 до рибозо-1,5-біс-фосфату на першій стадії циклу Кальвіна, а також забезпечує реакцію окиснення рибозо-біс-фосфату на першій стадії процесу фотодихання. Реакція карбоксилювання, яку каталізує РБФК/О, протікає відносно повільно зі швидкістю лише кілька молекул CO_2 за секунду

і є лімітуючою стадією всього циклу Кальвіна. Карбоксилазна і оксигеназна реакції конкурують за активний центр цього ферменту і швидкість кожної з них залежить від співвідношення CO_2/O_2 . Константа Міхаеліса для карбоксилазної реакції РБФК/О дорівнює 10 ± 4 мкМ CO_2 , для оксигеназної — 0,5 мМ O_2 (Sharkey, 2019). Через таку високу різницю між константами Міхаеліса оксигеназна реакція активується при зниженні концентрації CO_2 і, відповідно, процес зсувається у напрямку фотодихання.

РБФК/О зазвичай активна лише вдень, оскільки рибулозо-1,5-*bis*-фосфат не регенерується у темряві. Існує кілька способів координації активності РБФК/О з активністю інших ферментів циклу Кальвіна. Так, злагодженій роботі ферментів, що належать до одного метаболічного шляху, а також регуляції метаболізму рослин загалом, можна досягти завдяки їхній асоціації. Завдяки зближенню макромолекул ферментів в єдиному комплексі нівелюються дифузійні обмеження на перенесення метаболітів між послідовними реакціями циклу. Мультиферментні асоціати можуть утворюватися і розпадатися залежно від швидкості ензиматичних реакцій, об'єднаних в процесі. Вільні форми ферментів і різні форми їхньої надмолекулярної організації перебувають у динамічній рівновазі одна з одною, до того ж їхнє співвідношення залежить від виду організму, типу клітини та її функціонального стану (Mattia, Otto, 2015).

Існування асоціації СА і РБФК/О у хлоропластів С3-рослин було показано J. Jebanathirajah та Coleman (1998) для рослин тютюну і G. Lazova та A. Stemler (2008) — для гороху. Після додавання ДДС-Na комплекс СА і РБФК/О розщеплювався і виявляли мономерну форму СА (Lazova, Stemler, 2008). Такий самий ефект ДДС-Na ми спостерігали і у нашому дослідженні (рис. 2). При цьому було показано, що єдиною ізоформою СА в листках *C. ovata* є поліпептид 29 кДа. Отже можна припустити, що при освітленні цей поліпептид приєднується до деяких ензимів циклу Кальвіна, формуючи комплекс, за участю якого може бути досягнуто пришвидшення реакції карбоксилювання CO_2 .

Висновки

Механізми регуляції САМ-метаболізму, який забезпечує адаптацію та виживання рослин в умовах екстремального клімату, привертають все більшу увагу через зростаючу аридизацію клімату. При вивченні модельної САМ-рослини *Crassula ovata* було показано, що СА активність, яку визначали у загальній фракції розчинних білків листків, мала добові коливання. На первинному етапі САМ-циклу у темряві, при відкритих продихах СА активність загальної фракції білків зростала, що свідчить про участь цього ферменту у поглинанні CO_2 і його конвертації до бікарбонату — субстрату фосфоенолпіруваткарбоксилази. У денний час активність ферменту значно знижувалася і реєструвалося формування високомолекулярних комплексів з СА активністю. Це може вказувати на залучення СА в світлову фазу САМ-циклу і постачання субстрату до РБФК/О. Отримані дані свідчать про світлозалежну варіацію активності СА та зміну внутрішньоклітинної локалізації ензиму в листках *C. ovata* протягом циклу "день-ніч".

Подяки

Рукопис містить результати досліджень, проведених в рамках науково-дослідної роботи 0121U114515 "Поліферментні комплекси і метаболони в забезпеченні фотосинтетичної асиміляції неорганічного вуглецю в хлоропластах" (2022–2026 рр.) за підтримки Національної академії наук України.

ДОТРИМАННЯ ЕТИЧНИХ НОРМ

Автори повідомляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

ORCID

Н.М. Топчий:  <https://orcid.org/0000-0003-4694-5707>

О.К. Золотарьова:  <https://orcid.org/0000-0001-7399-2213>

О.М. Федюк:  <https://orcid.org/0000-0003-4225-7202>

О.Б. Онойко:  <https://orcid.org/0000-0003-4902-0937>

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Anderson L.E., Gatla N., Carol A.A. 2009. Co-localization of P-glycerate kinase, P-ribulokinase, ADP-glucose pyrophosphorylase and Rubisco activase with CF1 in pea leaf chloroplasts. *Plant Science*, 177(2): 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.04.008>
- Babadzhanova M.A., Mirzorakhimov A.K., Babadzhanova M.P., Esanalieva S.A. 2010. Developmental pattern in the formation of various multienzyme complexes associated with Benson-Calvin cycle in cotton leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(2): 175–180. <https://doi.org/10.1134/S1021443710020032>
- Borland A.M., Hartwell J., Weston D.J., Schlauch K.A., Tschaplinski T.J., Tuskan, G.A., Yang X., Cushman J.C. 2014. Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends in Plant Science*, 19(5): 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.006>
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2): 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Capasso C., De Luca V., Carginale V., Cannio R., Rossi M. 2012. Biochemical properties of a novel and highly thermostable bacterial α -carbonic anhydrase from *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(6): 892–897. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.703185>
- Ceusters N., Borland A.M., Ceusters J. 2021. How to resolve the enigma of diurnal malate remobilization from the vacuole in plants with crassulacean acid metabolism? *New Phytologist*, 229: 3116–3124. <https://doi.org/10.1111/nph.17070>
- Cushman J.C., Tillett R.L., Wood J.A., Branco J.A., Schlauch K.A. 2008. Large-scale mRNA expression profiling in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, performing C_3 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism (CAM). *Journal of Experimental Botany*, 59: 1875–1894. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern008>
- De Luca V., Del Prete S., Supuran C.T., Capasso C. 2015. Protonography, a new technique for the analysis of carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(2): 277–282. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.917085>
- Del Prete S., De Luca V., Iandolo E., Supuran C.T., Capasso C. 2015. Protonography, a powerful tool for analyzing the activity and the oligomeric state of the γ -carbonic anhydrase identified in the genome of *Porphyromonas gingivalis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(13): 3747–3750. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.080>
- Del Prete S., Vullo D., De Luca V., Carginale V., Osman S.M., AlOthman Z., Capasso C. 2016. Comparison of the sulfonamide inhibition profiles of the α -, β - and γ -carbonic anhydrases from the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(8): 1941–1946. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.014>
- DiMario R.J., Clayton H., Mukherjee A., Ludwig M., Moroney J.V. 2017. Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles. *Molecular Plant*, 10: 30–46. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.001>
- Edwards L.J., Patton R.L. 1966. Visualization of carbonic anhydrase activity in polyacrilamide gel. *Stain Technology*, 41: 333–334. <https://doi.org/10.3109/10520296609116335>
- Gontero B., Mulliert G., Rault M., Giudici-Orticoni M.T., Ricard J. 1993. Structural and functional properties of a multi-enzyme complex from spinach chloroplasts: 2. Modulation of the kinetic properties of enzymes in the aggregated state. *European Journal of Biochemistry*, 217(3): 1075–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18339.x>
- Heyduk K. 2022. Evolution of Crassulacean acid metabolism in response to the environment: past, present, and future. *Plant Physiology*, 190: 19–30. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac303>
- Huang X., Wang C., Zhao Y., Sun C., Hu D. 2021. Mechanisms and regulation of organic acid accumulation in plant vacuoles. *Horticulture Research*, 8: 227. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00702-z>
- Jebanathirajah J.A., Coleman J.R. 1998. Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 204: 177–182. <https://doi.org/10.1007/s004250050244>
- Kawamitsu Y., Kosaka K., Abe S., Nose A., Buah J.N. 2002. Regulation of photosynthesis during the light period in CAM plants — evaluation by a gas-phase O_2 electrode and a compensating infrared CO_2 analysis system. *Environment Control in Biology*, 40(4): 355–364. <https://doi.org/10.2525/ecb1963.40.355>
- Kimber M.S., Pai E.F. 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* betacarboxylic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases. *EMBO Journal*, 19(7): 1407–1418. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1407>
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lazova G.N., Stemler A.J. 2008. A 160 kDa protein with carbonic anhydrase activity is complexed with rubisco on the outer surface of thylakoids. *Cell Biology International*, 32(6): 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.01.010>
- Loucks M., Ownby J.D. 1978. Effect of pH and metabolic inhibitors on stomatal opening in *Crassula argentea*. *Botanical Gazette*, 139(4): 381–384. <https://doi.org/10.1086/337014>
- Lüttge U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, 93(6): 629–652. <https://doi.org/10.1093/aob/mch087>
- Makino A., Sakashita H., Hidema J., Mae T., Ojima K., Osmond B. 1992. Distinctive responses of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and carbonic anhydrase in wheat leaves to nitrogen nutrition and their possible relationships to CO_2 -transfer resistance. *Plant Physiology*, 100(4): 1737–1743. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.1737>

- Males J., Griffiths H. 2017. Stomatal biology of CAM plants. *Plant Physiology*, 174(2): 550–560. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00114>
- Maren T.H. 1988. The kinetics of HCO_3^- synthesis related to fluid secretion, pH control, and CO_2 elimination. *Annual Review of Physiology*, 50: 695–717. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.50.030188.003403>
- Mattia E., Otto S. 2015. Supramolecular systems chemistry. *Nature Nanotechnology*, 10(2): 111–119. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.337>
- Ming R.R., VanBuren R., Wai C.M., Tang H., Schatz M.C., Bowers J.E., ... [63 others] ..., Paull R.E., Yu Q. 2015. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature Genetics*, 47: 1435–1442. <https://doi.org/10.1038/ng.3435>
- Moroney J.V., Jungnick N., DiMario R.J., Longstreth D. 2013. Photorespiration and carbon concentrating mechanisms: two adaptations to high O_2 , low CO_2 conditions. *Photosynthesis Research*, 117: 121–131. <https://doi.org/10.1007/s11220-013-9865-7>
- Nicholson S., Easterby J.S., Powls R. 1987. Properties of a multimeric protein complex from chloroplasts possessing potential activities of NADPH-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase. *European Journal of Biochemistry*, 162(2): 423–431. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10619.x>
- Ornstein L., Davis B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 404–427. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>
- Osmond C.B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1): 379–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002115>
- Rustin P., Meyer C., Wedding R. 1988. The effect of adenine nucleotides on purified phosphoenolpyruvate carboxylase from the CAM plant *Crassula argentea*. *Plant Physiology*, 88(1): 153–157. <https://doi.org/10.1104/pp.88.1.153>
- Sainis J.K., Harris G.C. 1986. The association of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase with phosphoriboisomerase and phosphoribulokinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139(3): 947–954. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(86\)80269-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(86)80269-8)
- Semenihin A.V., Zolotareva O.K. 2015. Carbonic anhydrase activity of integral-functional complexes of thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 87(3): 47–56. <https://doi.org/10.15407/ubj87.03.047>
- Sharkey T.D. 2019. Discovery of the canonical Calvin–Benson cycle. *Photosynthesis Research*, 140(2): 235–252. <https://doi.org/10.1007/s11220-018-0600-2>
- Syvash O.O., Mykhaylenko N.F., Zolotareva E.K. 2018. Variation of chlorophyll a to b ratio at adaptation of plants to external factors. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, 3(45): 49–73. [Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф., Золотарьова О.К. 2018. Варіація співвідношення вмісту хлорофілів а і b при адаптації рослин до зовнішніх чинників. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. 3(45): 49–73.]
- Tait M.A., Hick D.S. 2003. Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions? *Photosynthesis Research*, 78: 87–91. <https://doi.org/10.1023/A:1026045624155>
- Tsuzuki M., Miyachi S., Winter K., Edwards G.E. 1982. Localization of carbonic anhydrase in crassulacean acid metabolism plants. *Plant Science Letters*, 24(2): 211–218. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(82\)90194-8](https://doi.org/10.1016/0304-4211(82)90194-8)
- van Tongerlo E., Trouwborst G., Hogewoning S.W., van Ieperen W., Dieleman J.A., Marcelis L.F.M. 2021. Crassulacean acid metabolism species differ in the contribution of C_3 and C_4 carboxylation to end of day CO_2 fixation. *Physiologia Plantarum*, 172(1): 134–145. <https://doi.org/10.1111/ppl.13312>
- von Caemmerer S., Griffiths H. 2009. Stomatal responses to CO_2 during a diel Crassulacean acid metabolism cycle in *Kalanchoe daigremontiana* and *Kalanchoe pinnata*. *Plant, Cell & Environment*, 32(5): 567–576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01951.x>
- Wai C.M., Weise S.E., Ozersky P., Mockler T.C., Michael T. P., VanBuren R. 2019. Time of day and network reprogramming during drought induced CAM photosynthesis in *Sedum album*. *PLoS Genetics*, 15(6): e1008209. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008209>
- Wellburn A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3): 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Winter K., Smith J.A.C. 2022. CAM photosynthesis: the acid test. *New Phytologist*, 233(2): 599–609. <https://doi.org/10.1111/nph.17790>
- Zolotareva O.K., Topchiiy N.M., Fediuk O.M. 2023. Biocatalytic carbon dioxide capture promoted by carbonic anhydrase. *Biotechnologia Acta*, 16(5): 5–21. <https://doi.org/10.15407/biotech16.05.005>

The light-dependent alteration in carbonic anhydrase activity in leaves of *Crassula ovata* (Crassulaceae)

N.M. TOPCHIIY, O.K. ZOLOTAREVA, V.V. DADYKA,

O.M. FEDIUK, O.B. ONOIKO

M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,

2 Tereschenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

Abstract. Carbonic anhydrase, CA (EC 4.2.1.1), is the second most abundant protein in leaves of higher plants after ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO), which is represented by three different families. CA plays a pivotal role in supplying CO₂ to RuBisCO and facilitating the hydration of CO₂ to form HCO₃⁻, which is then utilized as a substrate for phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in C₄- and CAM-plants. Despite the pivotal role of CA in CAM-photosynthesis, there is a paucity of data on its isoforms, activity, and localization in CAM-plants. The objective of this study was to identify and characterize the forms of CA and to determine the level and distribution of CA activity among the soluble proteins of leaves in model CAM-plant *Crassula ovata* adapted to darkness and light. The level of CA activity in the fraction of soluble proteins varied from 30 to 85 WAU/mg protein depending on the time of day when leaf samples were collected. A notable decline in CA activity in the total leaf fraction of soluble proteins was observed during the transition from the dark to the light phase. A single isoform of the enzyme with a molecular mass of 29 kDa was identified in the extract from leaves of "light" *C. ovata* using electrophoretic separation in the presence of sodium dodecyl sulfate after visualization of CA activity by protonography. Two high molecular weight protein complexes exhibiting CA activity were detected in "light" and "dark" leaves by native electrophoresis and protonography methods. The hydratase activity of these complexes in dark-adapted leaves was significantly lower, compared to light-adapted ones. The data obtained indicate a light-dependent alteration in CA activity and its localisation in leaves of *C. ovata* during the "day-night" cycle.

Keywords: CAM-photosynthesis, carbonic anhydrase, *Crassula ovata*, protonography