

УДК 581.17:577.154

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕМБРАНОСВЯЗАННОЙ И РАСТВОРИМОЙ ФОРМ КАРБОАНГИДРАЗЫ В КЛЕТКЕ ХЛОРЕЛЛЫ

Н. А. ПРОНИНА, В. Е. СЕМЕНЕНКО

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР, Москва

Показано, что две формы карбоангидразы (КА), обнаруженные в клетках хлореллы (мембраносвязанная и растворимая), различаются по локализации в клеточных компартментах. Осуществлено препаративное выделение фрагментов хлоропластов из хлореллы и показано, что мембраносвязанная форма КА локализована в мембранах хлоропласта. По своим свойствам КА хлоропласта хлореллы относится к внутренним интегральным белкам фотосинтетических мембран и не солюбилизируется при действии таких детергентов неионного и ионного типа, как тритон X-100, дигитонин, додецилсульфат натрия. Методом ингибиторного анализа установлено, что CO_2 -зависимая растворимая форма КА синтезируется при углекислотном голодании *de novo* на 80 S рибосомах и локализована в цитоплазме клеток хлореллы. Обсуждается участие различных форм КА в транспорте и регуляции первичных процессов ассимиляции углекислоты. Приводится схема возможных механизмов действия карбоангидразной системы в фотосинтезирующей клетке, учитывающая локализацию разных форм КА в клетке, регуляторное действие градиента pH в разных компартментах, а также топологию мембраносвязанной формы КА в тилакоидных мембранах хлоропласта.

Карбоангидраза — локализация в клеточных компартментах — физиологическая роль — фотосинтез.

Ранее нами было показано существование двух форм карбоангидразы (карбонатгидролизаза, К.Ф. 4.2.1.1.) в клетке хлореллы: мембраносвязанной и растворимой [1—3]. Мембраносвязанная карбоангидраза (мсКА) обнаружена в некоторых органах и тканях животных организмов [4—6], тогда как существование ее в растительных клетках было установлено нами впервые [1] и позднее подтверждено другими исследователями [7].

Показано, что мсКА обнаруживается в клетках хлореллы при любых условиях культивирования и является единственной формой фермента при выращивании водорослей в условиях насыщающих концентраций CO_2 [1, 3]. Активность этой формы КА существенно зависит от интенсивности света [8]. Растворимая форма карбоангидразы (рКА) появляется в клетке хлореллы только при снижении концентрации CO_2 ниже насыщающих фотосинтез и активность ее увеличивается с уменьшением содержания углекислоты в газовой смеси [2, 9].

Обнаружение разных форм фермента, отличающихся внутриклеточным состоянием (мембраносвязанная и растворимая) и особенностями адаптивных реакций, свидетельствует о существовании в фотосинтезирующих клетках карбоангидразной системы. Это подчеркивает необходимость дифференцированного изучения отдельных форм КА и исключает возможность интерпретации роли этого фермента в фотосинтезирующих клетках на основе анализа суммарной карбоангидразной активности в бесклеточных гомогенатах. Учитывая зависимость реакции гидратации — дегидратации углекислоты, которую катализирует КА, от pH, очевидно, что вклад фермента в регуляцию фотосинтетического и дыхательного метаболизма в значительной мере определяется локали-

защей и топологией его молекул в клеточных компартментах, имеющих различное значение рН. Следует при этом иметь в виду также то, что тип организации карбоангидразной системы может отличаться у разных видов и экотипов растений. На это указывают, например, обнаруженные нами различия в соотношении и характере адаптивных перестроек мсКА и рКА у хлореллы и сценедесмуса при изменении концентрации CO_2 и освещенности [3].

Целью настоящей работы являлось исследование локализации мсКА и рКА в фотосинтезирующих клетках на примере хлореллы.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали культуру *Chlorella sp. K*. Водоросли культивировали в стерильных условиях на среде Тамия с нитратным азотом при оптимальной температуре и постоянном барботировании газовой смеси с 2% CO_2 или воздухом с естественной концентрацией CO_2 (0,03%).

Дезинтеграцию клеток и фракционирование клеточных компонентов проводили в фосфатном буфере (рН 8,0), как описано ранее [1]. Выделение фрагментов хлоропластов проводили посредством центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы по схеме, представленной на рис. 1. Хлоропласты выделяли в сахарозо-фосфатном буфере, содержащем 0,06 М Na_2HPO_4 , 5 мМ цистеина, 1 мМ ЭДТА, 0,3 М сахарозы (рН 8,0).

В качестве критерия чистоты фракции хлоропластов использовали микроскопический контроль окрашенных фуксином препаратов [10] и соотношение хлорофилл/белок [11]. Тестом на отсутствие целых клеток и фрагментов клеточных стенок во фракции хлоропластов служила окраска препаратов специфическим флуоресцирующим красителем клеточной оболочки калькофлуором. Окрашивание фракций и фотографирование препаратов под флуоресцентным микроскопом проводили по методике, описанной Владимировой и Маркеловой [12]. Флуоресценцию калькофлуора возбуждали с помощью комбинации фильтров В233+U204 при запирающих фильтрах G243 или G245. Целые клетки, взятые в качестве контроля, обрабатывали, окрашивали и фотографировали тем же способом.

Солюбилизацию мсКА проводили с помощью детергентов: додецилсульфата натрия, тритона X-100 и дигитонина. После инкубации нерастворимый в детергентах осадок отделяли центрифугированием в течение 1 ч при 18 тыс. g.

Активность КА определяли электродметрическим методом, по скорости изменения рН в диапазоне от 7,8 до 7,4 в реакции гидратации углекислоты: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Активность фермента рассчитывали в единицах Вильбура—Андерсена на мг белка или на содержание хлорофилла по формуле $E_A = 10(T_0/T - 1)$, где T_0 — время изменения рН неэнзиматической реакции, T — время изменения рН энзиматической реакции [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выяснения локализации мембраносвязанной КА нами был разработан метод выделения фрагментов хлоропластов из клеток хлореллы (рис. 1).

Водоросли выращивали в условиях насыщающих концентраций CO_2 (2%), когда клетки содержат только мсКА [1]. Выделение фракции целых хлоропластов из хлореллы затрудняется прежде всего необходимостью жесткого воздействия на достаточно прочную оболочку клеток для ее разрушения при использовании методов механической дезинтеграции, что приводит к нарушению нативности хлоропластов. Учитывая эти сложности, а также тот факт, что мсКА прочно связана с мембранами клетки [2], разрабатывая способ получения фракции хлоропластов, не загрязненных мембранами цитоплазмы, мы могли пренебречь целостностью хлоропластов и ограничиться выделением фрагментов хлоропластов.

Клетки водорослей дезинтегрировали в гомогенизаторе со стеклянными бусами по методу [14], используя щадящие режимы разрушения (7 тыс. об/мин — 5 мин, 1,5 тыс. об/мин — 10 мин). Гомогенат, содержащий целые клетки, хлоропласты и их фрагменты, а также другие мембраны клеток и фрагменты клеточных стенок, центрифугировали в ступенчатом градиенте плотности сахарозы при 113 тыс. g в течение 60 мин. Использовали следующий градиент плотности сахарозы: 1,0; 1,5; 2,0;

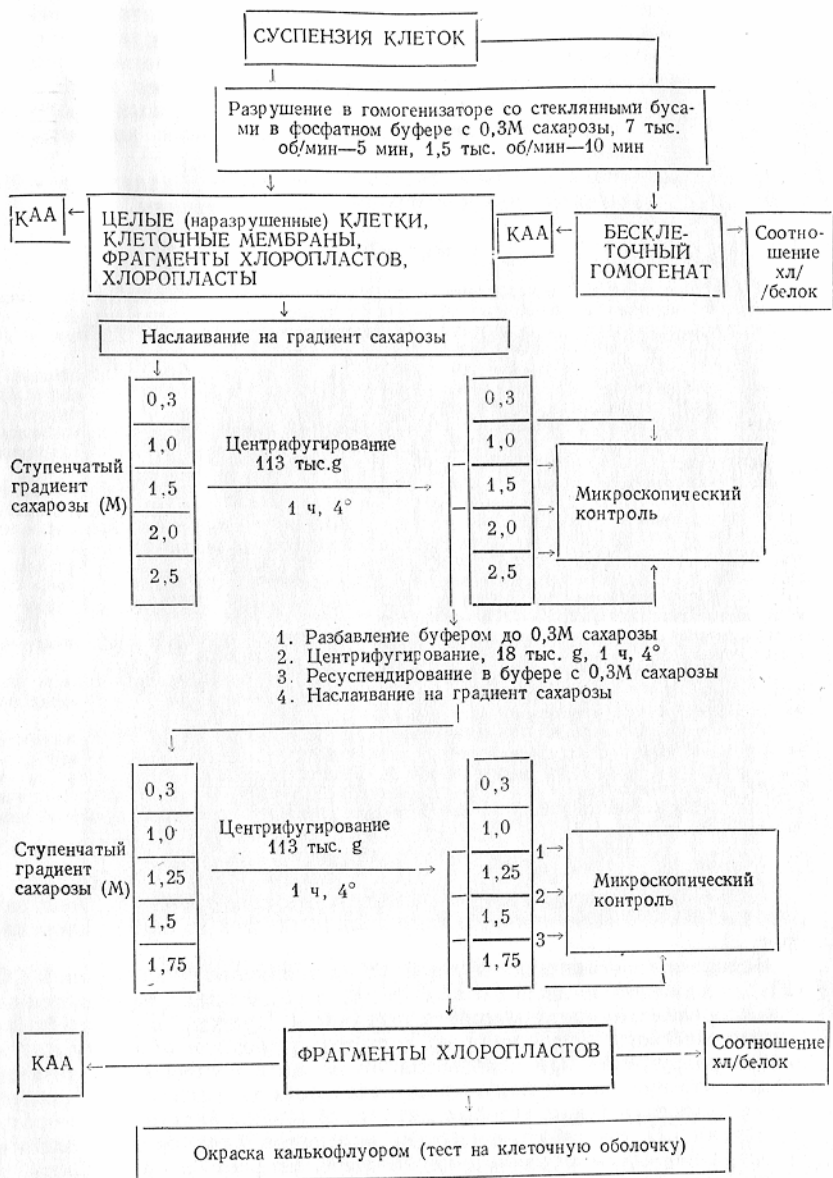


Рис. 1. Схема выделения фрагментов хлоропластов из клеток *Chlorella*
КАА — карбоангидразная активность

2,5 М. После центрифугирования получали пять слоев в градиенте, которые отбирали и анализировали в световом микроскопе посредством окрашивания препаратов эти фракций 0,1%-ным раствором фуксина основного. Фуксин не проникает через клеточную оболочку и таким образом окрашивает в розовый цвет только фрагменты хлоропластов и

Карбоангидразная активность во фракциях фрагментов хлоропластов, выделенных из клеток *Chlorella*

Фракция	Положение в градиенте, М сахарозы	Содержание хлорофилла, отн. ед.	Содержание белка, мг/мл	Отношение хлорофилл/белок	Активность карбоангидразы	
					в расчете на мг белка	в расчете на ед. хлорофилла
Гомогенат	—	15,3	0,24	1,0	43,2	1,0
1	1,0—1,25	13,1	0,12	1,7	64,2	1,7
2	1,25—1,5	5,4	0,06	1,4	55,0	0,9
3	1,5—1,75	66,2	0,20	5,1	58,0	0,9

клетки с нарушенной оболочкой [10]. Кроме того, в качестве контроля, позволяющего отбросить фракции, содержащие целые клетки, служило распределение в градиенте сахарозы нитактных неразрушенных клеток хлореллы, которые центрифугировали тем же способом.

Далее фракции, содержащие фрагменты хлоропластов, отбирали и осаждали при 18 тыс. g в течение 60 мин. Для более полного осаждения плотность сахарозы снижали разведением этих фракций фосфатным буфером до 0,3 М содержания сахарозы. Полученный осадок ресуспендировали в исходном сахарозо-фосфатном буфере и повторно центрифугировали в том же режиме в ступенчатом градиенте плотности сахарозы следующего состава: 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 М. В результате второго центрифугирования в более дробном градиенте сахарозы также получали пять слоев, которые тестировали сначала визуально, как после первого центрифугирования, отбрасывая фракции, загрязненные целыми клетками. Освобождение фракций хлоропластов от целых клеток и клеточных оболочек являлось особенно важной задачей, поскольку последние могут содержать ферментативную КА-активность [3].

В качестве основного критерия чистоты фракции хлоропластов от загрязнения их фрагментами клеточных оболочек и целыми клетками использовали окрашивание препаратов 1%-ным раствором калькофлуора — специфическим красителем клеточной оболочки, способным давать яркую голубую флуоресценцию при возбуждении УФ-светом [12]. Как видно из рис. 2, А, флуоресценция красителя в полученных фракциях хлоропластов не обнаруживается. В поле зрения видна только одна клетка, тогда как при микроскопировании в видимой области и в области возбуждения флуоресценции хлорофилла обнаруживается достаточно большое количество фрагментов, не окрашиваемых калькофлуором. Необходимо подчеркнуть, что флуоресцирующие клетки во фракции хлоропластов встречаются крайне редко и приведены на рис. 2, А, 3 в качестве доказательства действия красителя на данный препарат. На рис. 2, Б для сравнения представлены окрашенные калькофлуором целые клетки. Как видно из рис. 2, Б, 3 все они дают яркую флуоресценцию при возбуждении УФ-светом, что свидетельствует о наличии клеточной оболочки.

В качестве критерия чистоты фракции хлоропластов кроме микроскопического контроля использовали также соотношение величин хлорофилл/белок [11], которое увеличивается в этих фракциях по сравнению с целыми клетками в результате освобождения хлоропластов от цитоплазматических и стромальных белков в процессе выделения. Как видно из табл. 1, соотношение хлорофилл/белок в полученных фракциях увеличивается по сравнению с общим гомогенатом, что свидетельствует об их хлоропластном происхождении.

Примененная система критериев показывает, таким образом, что выделенные фрагменты имеют хлоропластное происхождение и не загрязнены фракцией целых клеток и клеточных оболочек.

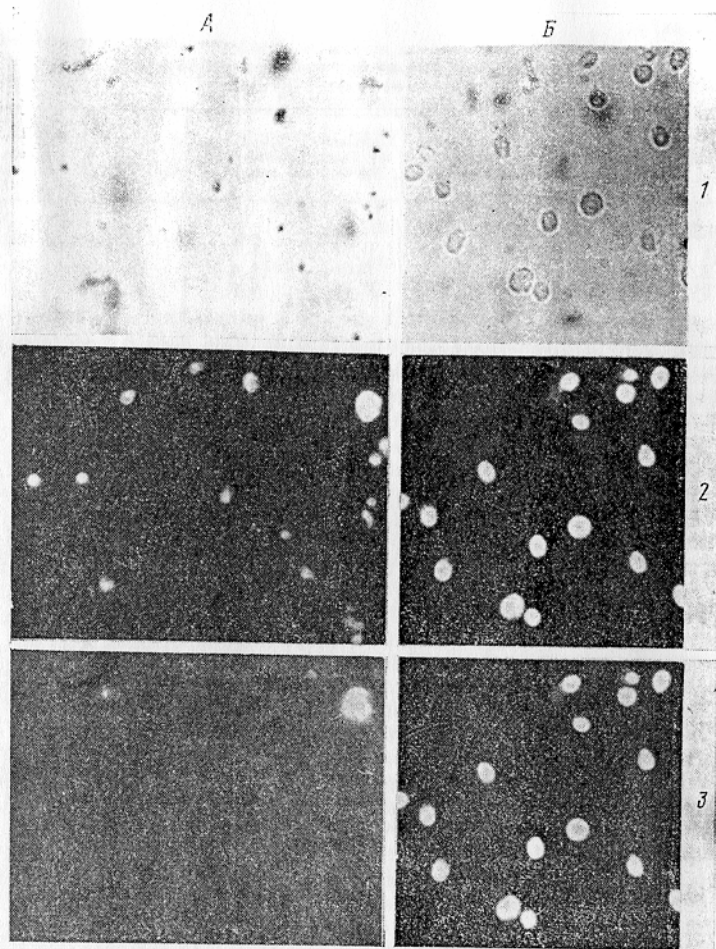


Рис. 2. Цитофлуоресцентная характеристика хлоропластов и их фрагментов из клеток *Chlorella*

А — фракция хлоропластов и их фрагментов, Б — целые клетки до разрушения (контроль); 1 — общий вид, 2 — прижизненная флуоресценция хлорофилла, 3 — флуоресценция калькофлуора

Как видно из табл. 1, все полученные фракции фрагментов хлоропластов обладают КА-активностью. Существенно при этом, что рассчитываемая на единицу хлорофилла активность фермента в хлоропластных фрагментах сопоставима с активностью КА, измеренной в суммарном бесклеточном гомогенате. Эти данные свидетельствуют о локализации мКА в хлоропласте клеток хлореллы и хорошо согласуются с результатами многих исследований, полученными для водорослей [15, 16] и C_3 -растений [17].

Оказалось, что КА хлоропласта очень прочно связана с мембранной системой и фермент не переходит в раствор при достаточно жестких воздействиях на мембраны. Как видно из табл. 2, мКА не солибилизируются

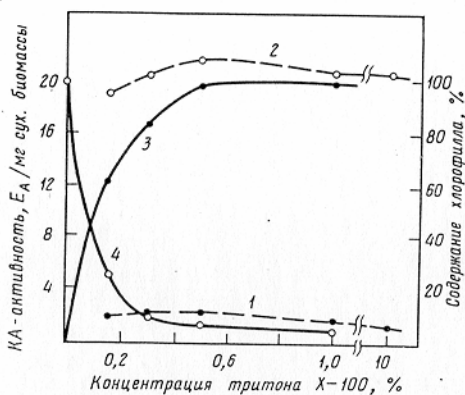


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость распределения КА-активности и хлорофилл-белкового комплекса между супернатантом и нерастворимыми клеточными компонентами от концентрации детергента

КА-активность в единицах Вильбура — Андерсена: 1 — супернатант, 2 — нерастворимые клеточные компоненты; содержание хлорофилла: 3 — супернатант, 4 — нерастворимые клеточные компоненты

Рис. 4. Влияние циклогексида и хлорамфеникола на индукцию КА-активности *Chlorella* при адаптации клеток к 0,03% CO_2

Черные столбики — контроль, ЦГ — циклогексимид, ХФ — хлорамфеникол

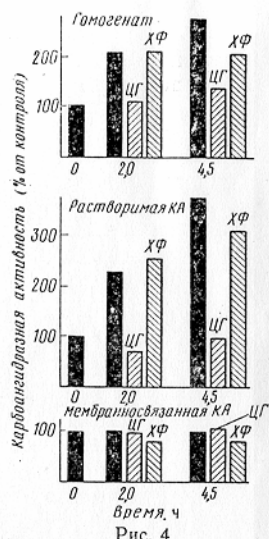


Рис. 4

ется при действии детергентов как неионного (третон X-100, дигитонин), так и анионного (додецилсульфат натрия) типа. Активность связанного фермента полностью подавляется ингибитором КА — диамоксом (ацетазоламидом) и теряется при прогревании при 100° в течение 5 мин реакционной смеси, содержащей фермент. Все это указывает на то, что ускорение реакции гидратации CO_2 в присутствии фотосинтетических мембран хлореллы обусловлено энзиматическим действием мсКА.

Изменение условий инкубации с использованными детергентами (время, температура, концентрация детергента) также не приводит к солиubilизации мсКА. Как видно из рис. 3, при увеличении концентрации третона X-100 до концентраций, при которых полностью выходит в раствор хлорофилл-белковый комплекс, активность КА остается в мембранной фракции хлоропласта.

Таким образом, мсКА клеток хлореллы локализована в хлоропласте и достаточно прочно связана с его мембранной системой. Можно предположить, что эта форма КА образует комплексы с компонентами мембран, что является определяющим фактором устойчивости этого комплекса к действию испытанных детергентов. Очевидно, мсКА хлоропластов клеток хлореллы отличается высокой степенью гидрофобности и для солиubilизации этого фермента необходимо применение специальных методов извлечения внутренних интегральных мембранных белков, требующих полного разрушения мембраны. В связи с этим представляют интерес данные о наличии прочносвязанной КА в животных тканях, активность которой составляет от 3—5% [4], а в некоторых случаях до 100% от общей клеточной активности. Показано, что фермент не солиubilизируется многими детергентами [6].

Распределение карбоангидразной активности во фракциях растворимых и нерастворимых клеточных компонентов после действия детергентов

Фракция	КА-активность, % от активности гомогената					
	контроль	дигитонин, 0,3%	тритон X-100, 0,6%	ДСН, 0,6%	прогрев при 100°, 5 мин	диамокс, 0,1%
Гомогенат	100	94	95	100	0	0,9
Растворимый белок	4	0	12	5,4	—	1,1
Нерастворимый компонент клетки	96	104	109	78	8	0

Для выяснения локализации в клетке *Chlorella* CO₂-зависимой растворимой формы КА был использован ингибиторный анализ с применением органеллспецифических ингибиторов белкового синтеза — хлорамфеникола и циклогексимида. Ингибиторы добавляли в момент перевода культуры к низкой концентрации CO₂, когда наблюдается, как было показано [3, 5], индукция активности рКА. Как видно из рис. 4, циклогексимид, не затрагивая активность мсКА, полностью подавляет возрастание активного фермента в гомогенате и во фракции растворимого белка при снижении содержания CO₂ с 2 до 0,03%. В то же время хлорамфеникол не оказывает заметного влияния на активность КА этих фракций (гомогенат, растворимый белок). Активность мсКА при действии хлорамфеникола в сопоставимых условиях несколько уменьшается. Такие результаты свидетельствуют, что увеличение активности CO₂-зависимой растворимой формы КА в клетке хлореллы при углекислотном голодании связано с синтезом фермента *de novo* на 80 S рибосомах в цитоплазме. Этот установленный нами ранее [2, 9] и подтвержденный в дальнейшем исследованиями других авторов [18] факт позволяет предполагать, что растворимая, индуцированная низкими концентрациями CO₂ форма КА локализована в цитоплазме. Некоторое снижение активности мембраносвязанного фермента при действии хлорамфеникола (ингибитора белкового синтеза на 70 S рибосомах) указывает, что эта форма КА синтезируется в хлоропласте и кодируется, по-видимому, в хлоропластном геноме. Это хорошо согласуется с данными, представленными выше о локализации мсКА в хлоропласте.

Японские исследователи [15] методом выделения хлоропластов в безводные среды показали, что КА клеток *Chlorella* 11h локализована в хлоропласте. На основании этих данных авторы предполагают, что фермент, синтезируемый в цитоплазме при недостатке CO₂ [18], транспортируется затем в хлоропласт и участвует в концентрировании CO₂ в зонах карбоксилирования. Однако эти данные были получены при исследовании только растворимой фракции белка, без учета возможного распределения КА у этого вида водорослей по фракциям гомогената и установленного факта о существовании наряду с растворимыми также и мембраносвязанных форм КА, как это было показано нами для 4 видов рода *Chlorella* [1]. Обнаружение мембраносвязанной и растворимой форм КА в клетках хлореллы, как мы уже подчеркивали, делает необходимым дифференцированный учет активности отдельных форм фермента при исследовании его локализации и синтеза, а также исключает возможность выяснения функциональной роли КА на основании учета интегральных показателей активности фермента в суммарном гомогенате.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных, опубликованных ранее и рассмотренных в настоящей работе, можно заключить, что обнаруженные в клетках хлореллы формы КА различаются: 1) внутриклеточным распределением

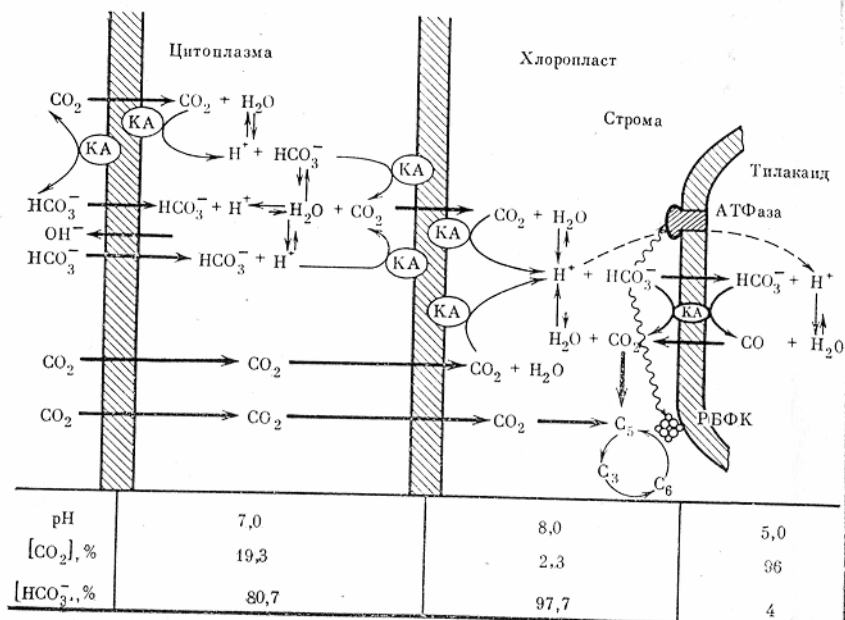


Рис. 5. Возможные механизмы действия карбоангидразной системы в фотосинтезирующей клетке

В таблице указаны равновесные концентрации CO_2 и HCO_3^- в соответствующих компартаментах клетки при температуре 25° и физиологических значениях pH

(мембраносвязанная, растворимая), 2) природой факторов, вызывающих индукцию ферментативной активности (свет, углекислота), 3) локализацией в клеточных компартаментах (хлоропласт, цитоплазма). Учитывая эти различия, а также принимая во внимание, что функции фермента необходимо рассматривать с учетом его внутриклеточной локализации, можно предполагать, что мембраносвязанная и растворимая формы КА отличаются и по их функциональной роли в клетке. Схема возможных механизмов действия карбоангидразной системы в фотосинтезирующей клетке в общем виде опубликована ранее [3] и представлена на рис. 5.

Функции рКА, индукция синтеза которой наблюдается в цитоплазме при низких концентрациях CO_2 , могут заключаться в участии этой формы фермента в облегченной диффузии CO_2 в хлоропласт. В пользу этого предположения свидетельствуют экспериментальные данные, рассмотренные ранее [3, 9], а также полученные в настоящей работе результаты о локализации растворимой формы КА в цитоплазме клеток хлореллы.

Механизм транспорта углекислоты с участием КА основывается на взаимобратимости ферментативной реакции гидратации — дегидратации углекислоты, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$, равновесие которой определяется значением pH в клеточных компартаментах. Условия же кислотности в клетке (рис. 5), особенно на свету, обеспечивают поддержание достаточной крутизны градиента CO_2 в компартаментах клетки и векторность ее транспорта к хлоропласту.

Таким образом, в качестве движущей силы транспорта углекислоты с участием КА в предложенной нами схеме рассматривается гетерогенность pH в клетке (рис. 5), который выполняет важную регуляторную

функцию. Вследствие этого транспорт углекислоты с участием КА можно рассматривать не только как результат облегченной диффузии CO_2 , но и как энергозависимый процесс, для осуществления которого требуется создание градиента концентрации водородных ионов в фотосинтезирующей клетке. Действие такого механизма приводит к увеличению суммарного потока неорганического углерода к центрам карбоксилирования наряду с прямой диффузией CO_2 и к образованию бикарбонатного пула в клетке. Именно с этих позиций можно объяснить имеющиеся в литературе данные о действии концентрирующего механизма, накапливающего неорганический углерод в клетках водорослей, выращенных в условиях низких концентраций углекислоты в среде [19, 20]. Следствием действия механизма, концентрирующего углерод, является снижение у этого типа клеток полнасыщающих фотосинтез концентраций CO_2 , углекислотного компенсационного пункта и увеличение скорости фотосинтеза [19—23].

Функции светозависимой мсКА хлоропласта, в строме которого рН на свету достигает высоких значений (рис. 5), могут заключаться в создании пула бикарбоната в строме. Этот пул HCO_3^- , выполняя, с одной стороны, важную роль буфера CO_2 , участвует, очевидно, с другой стороны, в регуляции многих внутрихлоропластных процессов. Известно, что бикарбонат оказывает активизирующее влияние на РБФ-карбоксилазу, АТФазу, увеличивает скорость потока электронов в ЭТЦ хлоропласта, стимулирует фотофосфорилирование и реакцию Хилла [24—27]. Кроме того, протон, возникающий в результате гидратации CO_2 , может быть использован для создания светоиндуцированного градиента H^+ в тилакоидах [28].

Мембраносвязанная КА может участвовать также в регуляции скорости карбоксилирования путем увеличения концентрации молекулярной CO_2 в зоне карбоксилирования (рис. 6). КА, являясь одним из самых активных ферментов, обнаруженных в растительных тканях, может быстро увеличивать концентрацию CO_2 в хлоропласте, дегидратируя бикарбонат в области кислых значений рН, где равновесие гидратации углекислоты сдвинуто в сторону образования CO_2 .

В качестве одного из механизмов в этом случае рассматривается образование CO_2 из бикарбонатного пула в строме, которое может происходить в результате локального подкисления микрокомпартамента в зоне карбоксилирования, что обусловлено кислотной природой первичных продуктов фиксации CO_2 (29) (рис. 6, А).

Другим механизмом концентрирования CO_2 в зоне карбоксилирования может быть дегидратация бикарбоната в тилаконде при свойственном этому компартменту хлоропласта кислому значению рН (рис. 6, Б).

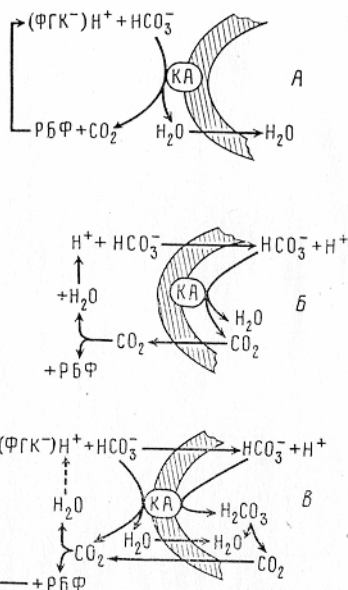


Рис. 6. Схема возможных механизмов концентрирования молекулярной CO_2 в зонах карбоксилирования с участием мембраносвязанной формы карбоангидразы в зависимости от топологии фермента

Очевидно, что вклад этого механизма прежде всего определяется способностью HCO_3^- -иона проникать через тилакоидную мембрану. В этой связи особый интерес представляют недавно полученные данные о высокой проникающей способности этого иона для тилакоидных мембран [30].

В связи с этим для понимания роли КА в хлоропласте решающее значение приобретает вопрос об ориентации (топологии) молекулы этого фермента в мембране тилакоида и кооперировании его действия с АТФазой и РБФ-карбоксилазой. Молекула КА может быть локализована (рис. 6) на наружной стороне мембраны тилакоида, на внутренней стороне или пронизывать эту мембрану, и в зависимости от ее ориентации будет осуществляться тот или иной механизм концентрирования молекулярной CO_2 . Учитывая высокую прочность связи КА с мембранами тилакоидов, можно представить себе при определенной ориентации молекулы КА относительно компартментов с различным значением рН участие КА в энергозависимом процессе концентрирования CO_2 в зонах карбоксилирования рибулозодифосфата (рис. 6, Б, В).

Все эти механизмы основываются на взаимодействии между КА, РБФ-карбоксилазой и АТФазой и предполагают, таким образом, существование в хлоропласте тесной кооперации действия этих ферментов, что представляет большой интерес для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семеновко В. Е., Аврамова С., Георгиев Д., Пронина Н. А. Сравнительное изучение активности и локализации карбоангидразы в клетках *Chlorella* и *Scenedesmus*.— Физиол. растений, 1977, т. 24, вып. 5, с. 1055.
2. Семеновко В. Е., Пронина Н. А., Кулцова Е. С. Две формы карбоангидразы в клетках *Chlorella* и действие 2-дезоксид-Д-глюкозы на их синтез.— В кн.: Тезисы IV Всесоюз. биохим. съезда, 1979, т. 1, с. 273.
3. Пронина Н. А., Аврамова М., Георгиев Д., Семеновко В. Е. Динамика карбоангидразной активности *Chlorella* и *Scenedesmus* при адаптации клеток к свету высокой интенсивности и к низкой концентрации CO_2 .— Физиол. растений, 1981, т. 27, вып. 1, с. 43.
4. Храмов А. В., Оттесен Б. В. Распределение карбоангидразы, К-АТФазы и К-фосфатазы в субклеточных фракциях слизистой оболочки желудка.— Биохимия, 1979, т. 44, № 5, с. 781.
5. Wistrand P. J. Cytoplasmic and membrane-bound carbonic anhydrase.— Uppsala J. Med. Sci., 1977, v. 82, № 4, p. 278.
6. Turbeek B., Foder B. Studies on a carbonic anhydrase from the midgut epithelium of larvae of lepidoptera.— Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 212, p. 139.
7. Комарова Ю. М., Доман Н. Г., Шапошников Г. Л. Две формы карбоангидразы в хлоропластах бобов.— Биохимия, 1982, т. 47, № 6, с. 1027.
8. Семеновко В. Е., Аврамова С., Георгиев Д., Пронина Н. А. О световой зависимости карбоангидразной активности клеток *Chlorella* и *Scenedesmus*.— Физиол. растений, 1979, т. 26, вып. 5, с. 1069.
9. Пронина Н. А., Рамазанов З. М., Семеновко В. Е. Зависимость карбоангидразной активности клеток *Chlorella* от концентрации CO_2 .— Физиол. растений, 1981, т. 28, вып. 3, с. 494.
10. Лихачева Л. И. Получение протопластов хлореллы.— Молек. биол., 1979, т. 23, № 1, с. 72.
11. Филиппова Л. А. О методах выделения хлоропластов в неводную среду.— Физиол. растений, 1967, т. 14, вып. 6, с. 1107.
12. Владимировичева М. Г., Маркелова А. Г. Автотрофный рост лишнего клеточной стенки мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях интенсивной культуры.— Физиол. растений, 1980, т. 27, вып. 6, с. 1180.
13. Rickli E. E., Ghazanfar A. S., Gibbon B. H., Edsall L. T. Carbonic anhydrase from human erythrocytes.— J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 4, p. 1065.
14. Семеновко В. Е., Касаткина Т. И. Изучение процесса разрушения клеток хлореллы в дезинтеграторе со стеклянными бусами для количественного извлечения нативных белков.— Физиол. растений, 1972, т. 19, вып. 6, с. 1169.
15. Hogestu D., Miyachi S. Role of carbonic anhydrase in photosynthetic CO_2 fixation in *Chlorella*.— Plant and Cell Physiol., 1979, v. 20, № 4, p. 747.
16. Aiken D. G., Romanovic D. K. Ultrastructural demonstration of carbonic anhydrase in the chloroplast of *Chlorella vulgaris*.— G. Cell Biol., 1980, v. 87, № 2, p. 187.
17. Everson R. G., Slack S. R. Distribution of carbonic anhydrase in relation to the C_4 -pathway of photosynthesis.— Phytochemistry, 1968, v. 7, № 4, p. 581.

18. Shiraiwa Y., Fakler J., Miyachi S. Factors controlling carbonic anhydrase activity in *Chlorella vulgaris* 11h.— In: Photosynthesis IV. Regulation of carbon metabolism. Philadelphia, Balaban Internat. Sci. Services, 1981, p. 493.
19. Badger M. R., Kaplan A., Berry A. J. Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*.— Plant Physiol. 1980, v. 66, № 3, p. 407.
20. Kaplam A., Badger M. R., Berry J. A. Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon pool in the blue green *Anabaena variabilis*: response to external CO₂ concentration.— Planta, 1980, v. 149, № 3, p. 219.
21. Hogestu D., Miyachi S. Effect of CO₂ concentration during growth on subsequent photosynthetic CO₂ fixation in *Chlorella*.— Plant and Cell Physiol., 1977, v. 18, № 2, p. 347.
22. Findenegg G. R., Fischer K. Apparent photorespiration of *Scenedesmus obliquus* decrease during adaptation to low CO₂ level.— Z. Pflanzenphysiol., 1978, v. 89, № 2, p. 363.
23. Tsuzuki M., Miyachi S. Effects of CO₂ concentration during growth and of ethoxycarbonyl amide on CO₂ compensation point in *Chlorella*.— FEBS Lett., 1979, v. 109, № 2, p. 221.
24. Laing W. A., Ogren W. Z., Hogetsu R. H. Bicarbonate stabilization of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase.— Biochemistry, 1975, v. 14, p. 32269.
25. Vermaas W. F., Govindjee. Unique role of carbon dioxide and bicarbonate in the photosynthetic electron transport system.— Proc. Indian Nat. Sci. Acad., 1981, v. 47, № 4, p. 581.
26. Stemler A. Form dissolved carbon dioxide required for photosystem II activity in chloroplast membranes.— Plant Physiol., 1980, v. 65, № 6, p. 1160.
27. Sarojini G., Govindjee. On the species in bicarbonate stimulation of Hill reaction in thylakoid membranes.— Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 634, № 2, p. 340.
28. Graham D., Atkins C. A., Reed M. L., Patterson B. D., Smillie R. M. Carbonic anhydrase, photosynthesis and light-induced pH changes.— In: Photosynthesis and photorespiration. New York, 1971, p. 267.
29. Werdan K., Heldt H. W. Accumulation of bicarbonate in intact chloroplasts following a pH gradient.— Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 283, № 3, p. 430.
30. Молотковский Ю. Г., Яковлева Г. А. Анионная проницаемость тилакоидных мембран.— Физиол. растений, 1980, т. 27, вып. 3, с. 453.

Поступила в редакцию
10.II.1983

LOCALIZATION OF MEMBRANE-BOUND AND SOLUBLE FORMS OF CARBOANHYDRASE IN *CHLORELLA* CELLS

N. A. PRONINA, V. E. SEMENENKO

K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Two carboanhydrase (CA) forms, membrane-bound and soluble, observed in *Chlorella*, have been shown to be localized in different cell compartments. A preparative isolation of chloroplast fragments from *Chlorella* indicates that the membrane-bound CA form is localized in chloroplast membranes. According to its properties, this CA form can be related to the internal integral proteins of photosynthetic membranes and is not solubilized under the action of detergents, of both nonionic and ionic types, such as triton X-100, digitonin, or sodium dodecylsulfate. As has been stated by using inhibitors, the CO₂-dependent soluble CA form is synthesized de-novo on 80 S ribosomes under conditions of CO₂ starvation and thus is localized in cytoplasm. The involvement of these CA forms in CO₂ transport and the regulation of the initial steps of CO₂ assimilation is discussed. A tentative scheme is presented of the mechanisms of carboanhydrase action in photosynthesizing cells, which involves the compartmentation of both CA forms, the controlling effect of pH gradient in different compartments, and the topology of the membrane-bound CA form in the thylakoid membranes of chloroplasts.