

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.04.094>

УДК 58.04:546.47/56:581.174

**О.В. Поліщук¹, А.В. Семеніхін²,
Н.М. Топчій¹, О.К. Золотарьова¹**

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ

² Ніжинський державний університет ім. Миколи Гоголя

E-mail: membrana@ukr.net, semenihin1964@ukr.net

Інгібування множинних форм карбоангідрازی хлоропластів шпинату іонами купруму

Представлено членом-кореспондентом НАН України С.Л. Мосякіним

Досліджено вплив Cu^{2+} на карбоангідразну активність різних фракцій хлоропластів. Стромальну фракцію і фракцію тилакоїдних мембран отримували після осмотичного руйнування інтактних хлоропластів, відмитих від компонентів цитозолу. Стромальні карбоангідрازی виявилися значно чутливішими до дії Cu^{2+} , ніж тилакоїдні. Так, напівмаксимальне інгібування (I_{50}) карбоангідразної активності ензимів у стромальній фракції досяглося при концентрації Cu^{2+} 3 мкМ, тоді як I_{50} для тилакоїдних карбоангідраз становило від 10 до 20 мкМ Cu^{2+} . Розподіл активності по білкових зонах стромальної і тилакоїдної фракцій після електрофоретичного розділення змінювався в присутності іонів купруму: зменшувалася інтенсивність забарвлення і кількість смуг, що змінювали свій колір. Отримані дані підтверджують можливість використання карбоангідраз хлоропластів як біомаркера забруднення навколишнього середовища.

Ключові слова: *Spinacia oleracea*, карбоангідраза, важкі метали, хлоропласти, тилакоїдні мембрани, інфрачервоний газовий аналіз, іони міді, іони цинку.

Карбоангідраза (КА, карбонатгідроліаза КФ 4.2.1.1) — один з найпоширеніших металоензимів, що здійснює оборотну гідратацію CO_2 . В живих організмах від прокариот до людини КА представлена шістьма родинами (позначаються як α , β , γ , δ , ϵ , ζ), кожна з яких включає множинні форми [1, 2], що свідчить про їх незалежне еволюційне походження. Хоча чотири з цих родин білків пов'язані з конкретною групою організмів (α — з хребтними, β — з прокариотами, γ — з археями і ϵ — з хемолітотрофами), геномний аналіз показує, що в межах одного організму наявні ізоформи більше ніж однієї родини [2].

У *Arabidopsis* ідентифіковано принаймні 17 генів, які кодують ізоформи КА з α , β і γ родин, проте клітинна локалізація деяких ізоформ КА залишається невідомою [3]. Серед рослинних КА маловивченими залишаються стромальні і тилакоїдні форми ферменту, локалізовані на внутрішніх мембранах хлоропластів клітин мезофілу листка [4]. У хлоропластах, крім великої кількості β -карбоангідрازی 1 (β -КА1) і значно меншого вмісту α -КА1, ло-

© О.В. Поліщук, А.В. Семеніхін, Н.М. Топчій, О.К. Золотарьова, 2018

калізованих у стромальному компартменті, виявлено β -КА5 і α -КА4 в тилакоїдних мембранах [5]. Показано також присутність КА у пігмент-білковому комплексі фотосистеми, поблизу комплексу фотосистеми 1 і в люменальному просторі тилакоїдів [6]. Відомо, що активність КА з різних біологічних об'єктів ефективно пригнічується іонами важких металів (ВМ) [7], проте їх вплив на КА рослин до теперішнього часу системно не досліджувався.

Купрум є необхідним елементом для росту і розвитку рослин, однак надлишкові кількості прямо і побічно впливають на фотосинтетичні процеси, пригнічуючи їх. Зокрема, нами в попередніх дослідженнях після обробки листків гороху 80 мкМ Cu^{2+} відмічалася зміна будови гран, неоднорідність упаковки тилакоїдів у гранах, що проявлялося у збільшенні внутрішньотилакоїдних (люменальних) проміжків і товщини тилакоїдів гран порівняно з контролем. Подібні ефекти спостерігалися також і після обробки листків і хлоропластів 200 мкМ Zn^{2+} . На підставі отриманих даних було зроблено висновок, що структурні зміни в системі тилакоїдних мембран під дією іонів міді та цинку спричинені зниженням рівня зв'язаного бікарбонату. Цей висновок узгоджується зі значним зниженням активності хлоропластної КА, що, вірогідно, викликало втрату мембранозв'язаного бікарбонату [8, 9]. Питання, які саме з множинних форм КА, локалізованих у хлоропластах, є чутливими до ВМ, лишається невирішеним. З літературних джерел відомо, що діапазон чутливості різних типів КА до ВМ є надзвичайно широким — діючі концентрації становлять від пМ до мМ [7], і різні КА одного і того ж організму можуть по-різному реагувати на рівень ВМ у середовищі.

Мета даної роботи — порівняння чутливості стромальних і тилакоїдних КА до солей купруму в реакційному середовищі. Для досягнення цієї мети було отримано препарати хлоропластів, під час осмотичного руйнування яких фракція строми відокремлювалася від фракції тилакоїдних мембран.

Об'єкт та методи дослідження. Хлоропласти класу В, які зберігають зовнішні оболонки, виділяли зі свіжого листя шпинату як описано в роботі [11] з модифікаціями. Середовище виділення містило 330 ммоль/л сорбітолу, 5 ммоль/л ізоаскорбату і 10 ммоль/л пірофосфату (рН 6,5). Після виділення хлоропласти відмивали три рази по 1 хв при 2500 g у середовищі суспендування, яке містило 330 мМ сорбітол, 50 мМ НЕРЕС (рН 7,6) та 1 мМ MgCl_2 , і руйнували при 0 °С протягом 20 хв у гіпотонічному розчині, що містив 5мМ MgCl_2 (рН 6,5). Перевірку інтактності здійснювали за допомогою фериціанідної проби [11] та оцінюючи карбоангідразну активність суспензії до і після руйнування хлоропластів. Суспензію зруйнованих хлоропластів центрифугували при 5000 g протягом 3 хв. Супернатант, який містив переважно компоненти стромальної фракції хлоропластів, зберігали і використовували в подальших дослідженнях (варіант “Строма”). Осад тилакоїдів двічі відмивали від стромальних білків середовищем суспендування, переосаджували протягом 3 хв при 5000 g і суспендували до концентрації хлорофілу 0,23 мг/мл. Для більш повного вивільнення зв'язаних з тилакоїдами КА мембранну фракцію обробляли так, як описано в роботі О.В. Москвіна зі співавт. [10]. Тилакоїдну фракцію розділяли на три частини. Першу частину інкубували 30 хв при 0 °С, після чого центрифугували протягом 3 хв при 5000 g і отримували супернатант розчинних білків (варіант “Контроль”). Частину тилакоїдної фракції заморожували при -20 °С на 30 хв і після розморожування розчинні білки відокремлювали центрифугуванням протягом 3 хв при 5000 g (варіант “Заморожені”). До іншої частини суспензії додавали тритон X-100 до кінцевої концентрації 0,023 % зі збереженням

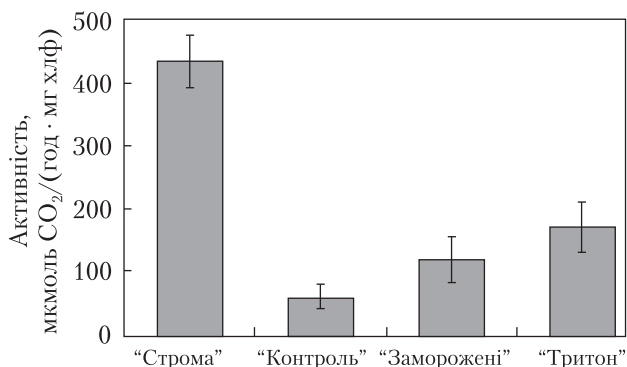


Рис. 1. HCO₃⁻ дегідратазна активність препаратів хлоропластів, зумовлена наявністю водорозчинних карбоангідраз

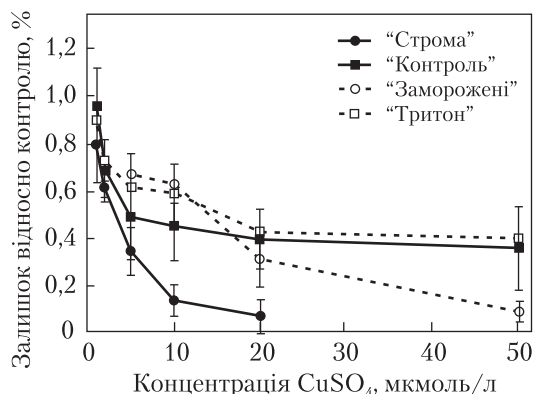


Рис. 2. Залежність карбоангідразної активності різних фракцій хлоропластів від концентрації CuSO₄

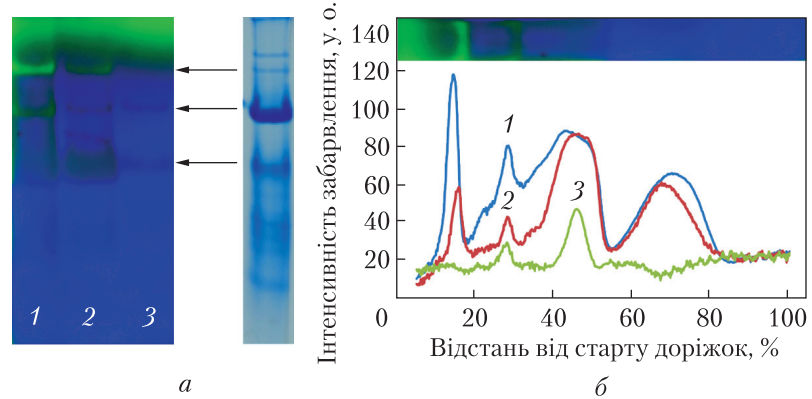
співвідношення детергент : хлорофіл 1 : 1 і інкубували протягом 30 хв при 0 °С, після чого розчинні білки відокремлювали центрифугуванням (варіант “Тритон”).

Карбоангідразну активність препаратів визначали за кількістю CO₂, що утворюється під час дегідратації бікарбонату [12], за допомогою інфрачервоного CO₂-газоаналізатора (S151, “Qubit Systems Inc.”, Канада). Аналіз виконували в закритій термостатованій скляній комірці об’ємом 20 мл при 5 °С, в безперервному потоці повітря (400 мл/хв), позбавленого CO₂ завдяки пропусканню через колонку з аскаритом. Об’єм реакційного середовища становив 2 мл. Перед початком вимірювання до буферного розчину, що містив 50 мМ HEPES (рН 7,8) і аликвоту препарату, що аналізується, урівноваженого з газовою фазою, вносили 100 мкл 100 мМ NaHCO₃ (до кінцевої концентрації 5 мМ) і інкубували 1 хв при продуванні для виходу залишків атмосферного CO₂ з газометричної системи. Реакція дегідратації бікарбонату інтенсифікувалася за рахунок прискореного відведення продукту – CO₂ – після вмикання перемішування, швидкість якого становила 1200 об/хв.

Для дослідження впливу іонів купруму до реакційного середовища додавали CuSO₄ до кінцевої концентрації, що знаходилася в діапазоні 1–50 мкмоль/л.

Усі дослідження проводили в трьох повторях. Визначали середні значення і стандартні похибки. Для порівняння вибірок використовували *t*-критерій Стьюдента, розбіжності вважали достовірними при $P \leq 0,05$. На рисунках наведено середні величини і їх стандартні похибки. Нативний електрофорез фракцій розчинних білків хлоропластів проводили за методом Андерсон та ін. так, як описано раніше [13]. Візуалізацію карбоангідразної активності в гелях здійснювали за методом Едвардса і Петтона [13]. Гелі інкубували 30 хв у 0,2 % розчині рН-індикатора бромтимолового блакитного на 50 мМ вероналовому буфері (рН 9,0), далі гель переносили у воду, насичену CO₂ при 0 °С. У місці локалізації КА відбувалася інтенсивна гідратація CO₂ з утворенням слабкої кислоти H₂CO₃, що супроводжувалося закисленням середовища, і блакитне забарвлення індикатора змінювалося на жовте. Для дослідження впливу іонів купруму перед нанесенням на гель до препаратів додавали CuSO₄ до кінцевих концентрацій 2 і 100 мкмоль/л. Після сканування гелів локалізацію і інтенсивність забарвлення смуг оцінювали за допомогою програми ImageJ (NIH, США).

Рис. 3. Результати електрофоретичного аналізу карбоангідразної активності стромальних білків хлоропластів (4–11 % ПААГ) після фарбування бромтимоловим синім. *а* – електрофореграми, праворуч – фарбування кумассі блакитним G–250, тривалість інкубації – 10 хв; *б* – денситограма гелів після візуалізації карбоангідразної активності; 1 – контроль; 2 – після обробки 2 мкМ CuSO_4 ; 3 – після обробки 100 мкМ CuSO_4



Результати та обговорення. На рис. 1 наведено дані щодо HCO_3^- -дегідратазної активності різних препаратів хлоропластів, зумовленої наявністю водорозчинних КА. Найвища активність спостерігалась у фракції стромальних білків (варіант “Строма”), 427 мкМ CO_2 /(год·мг хлорофілу), найнижча – у варіанті “Контроль”, 55 мкМ CO_2 /(год·мг хлорофілу). Карбоангідразна активність фракції розчинних білків тилакоїдів зростала після заморожування та обробки детергентом, що вказує на те, що тилакоїдні КА є значною мірою мембранозв’язаними білками.

На рис. 2 наведено експериментальні дані щодо впливу різних концентрацій CuSO_4 на швидкість реакції дегідратації бікарбонату за наявності стромальної або тилакоїдних фракцій хлоропластів. Наведено дані щодо впливу на розчинні білки тилакоїдів, солюбілізовані в ході інкубації у водному розчині (крива “Контроль”), внаслідок додавання тритону X-100 (крива “Тритон”) і після заморожування–розморожування мембран (крива “Заморожені”). Активність КА стромальної фракції пригнічувалася при значно нижчій концентрації CuSO_4 , ніж активність КА білків тилакоїдних фракцій, які виявилися більш стійкими до інгібування іонами купруму. Так, напівмаксимальне інгібування (I_{50}) активності КА ензимів у стромальній фракції досягалося при концентрації Cu^{2+} 3 мкМ, тоді як I_{50} для тилакоїдних фракцій становило від 10 до 15 мкМ Cu^{2+} . При концентрації CuSO_4 20 мкМ КА активність стромальної фракції пригнічувалася більш ніж на 95 %, тоді як у тилакоїдних фракціях зберігалася від 35 до 45 % початкової дегідратазної активності. Активність КА в контрольній фракції і в препараті тилакоїдних білків, отриманих після обробки тритоном, не змінювалася зі збільшенням концентрації CuSO_4 від 20 до 50 мкМ. Водночас активність КА препаратів, отриманих після заморожування тилакоїдів, знижувалася від 35 до 10 % початкового значення зі збільшенням концентрації CuSO_4 від 20 до 50 мкМ.

Загалом, на відміну від стромальної фракції, залежність карбоангідразної активності від концентрації іонів купруму в тилакоїдних фракціях є стадійною. З даних рис. 2 видно, що криву концентраційної залежності можна розділити на три ділянки: значне зниження активності КА з підвищенням концентрації іонів Cu^{2+} до 5 мкМ, незначні зміни активності КА в діапазоні концентрацій Cu^{2+} від 5 до 10 мкМ і зниження активності КА зі зростанням концентрації CuSO_4 від 10 до 50 мкМ. На нашу думку, стадійний хід кривої залежності карбоангідразної активності від концентрації Cu^{2+} пов’язаний з конформаційними змінами в олігомерах КА, які супроводжуються зміною чутливості до іонів купруму.

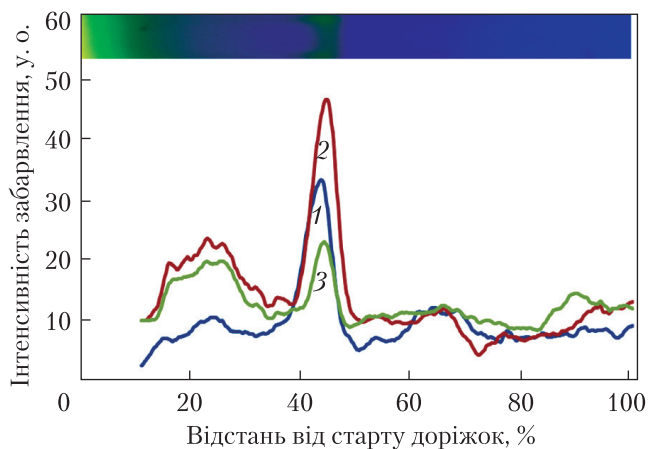


Рис. 4. Денситограма гелів після візуалізації карбоангідразної активності білків тилакоїдної фракції хлоропластів, оброблених тритонном, за допомогою бромтимолового синього; 1 – контроль; 2 – після обробки 2 мкМ CuSO_4 ; 3 – після обробки 100 мкМ CuSO_4

Присутність множинних форм КА в досліджуваних препаратах підтверджується даними, отриманими за допомогою електрофорезу стромальної (рис. 3) і тилакоїдної фракцій (рис. 4) розчинних білків хлоропластів. Після фарбування бромтимоловим синім смуги гелю,

в яких була наявна КА активність, змінювали забарвлення із синього на жовте через зелене (див. рис. 3). На рис. 3, б наведено денситограму пофарбованих гелів, отриманих шляхом електрофоретичного розділення білків стромальної фракції до і після обробки розчином CuSO_4 . Після попередньої інкубації препаратів у розчинах 2 мкМ CuSO_4 або 100 мкМ CuSO_4 кількість смуг, що змінювали свій колір, і інтенсивність їх забарвлення змінювалися. Найчутливішими до впливу солі купруму виявилися найбільш високомолекулярна і низькомолекулярні форми КА. Їх забарвлення помітно знижувало інтенсивність після інкубації гелів у розчині 2 мкМ CuSO_4 і повністю зникало після обробки гелів 100 мкМ CuSO_4 . Забарвлення смуги з R_f близько 0,5 практично не змінювалося після обробки 2 мкМ CuSO_4 і значно знижувалося після обробки гелю 100 мкМ CuSO_4 . У гелях, оброблених 100 мкМ CuSO_4 , карбоангідразна активність зберігалася в смугах з R_f близько 0,3 і 0,5, тобто ензими, локалізовані в цих зонах, є значно стійкішими до інгібування іонами купруму, ніж високо- і низькомолекулярні форми КА.

Судячи з даних електрофоретичного розділення КА тилакоїдних фракцій (див. рис. 4), ці препарати не містять високомолекулярної форми ферменту, найбільш чутливої до інгібування іонами купруму (див. рис. 3, б). У тилакоїдній фракції присутні в основному дві форми КА – з R_f близько 0,3 і 0,5. КА з R_f близько 0,3, за результатами денситрування гелів, пофарбованих бромтимоловим синім, практично не інгібується 2 мкМ CuSO_4 , і значною мірою інгібується 100 мкМ CuSO_4 . КА тилакоїдної фракції з R_f близько 0,5 частково інгібувалася як 2 мкМ CuSO_4 , так і 100 мкМ CuSO_4 .

У стромальному компартменті вищих рослин КА є одним з найпоширеніших білків. Стромальна КА, переважною формою якої є високоактивна β -КА1, становить приблизно 0,5–2 % загальної кількості розчинного білка листків [5, 6]. Вважається, що роль цієї КА полягає у сприянні дифузії CO_2 з оболонки хлоропласта до RuBisCO , де він доставляється (у формі HCO_3^-) на активний сайт ферменту для здійснення реакції карбоксилювання. Рослинні КА є переважно олігомерами в діапазоні розмірів від 42 до 220 кДа, залежно від виду, на відміну від ферментів ссавців, які в нативному стані існують як мономери [15]. β -КА1 є, вірогідно, октамером. Присутність у тилакоїдних мембранах, очищених від стромальних компонентів, декількох форм карбоангідразної активності доведено роботами останніх 20 років [4–6]. Показано також наявність високо- і низькомолекулярних КА в

мембранних препаратах фотосистеми 2. Результати даної роботи свідчать про різну чутливість олігомерних форм хлоропластної КА до інгібування іонами купруму.

Раніше ми встановили, що Cu^{2+} інгібує світлозалежне поглинання протонів у суспензії ізольованих хлоропластів [14], що, як можна припустити, пов'язане з пригніченням активності тилакоїдних КА, які беруть участь в полегшеному протонному транспорті. Які саме форми з множинних КА задіяні в цих реакціях, буде визначатися в подальших дослідженнях.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Hewett-Emmett D., Tashian R.E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha, beta, and gamma carbonic anhydrase families. *Mol. Phylog. Evol.* 1996. **5**. P. 52–77.
2. Supuran C.T. Carbonic anhydrases - an overview. *Curr. Pharm. Des.* 2008. **14**, № 7. P. 603–614.
3. DiMario R. J., Clayton H., Mukherjee A., Ludwig M., Moroney J.V. Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles. *Mol. Plant.* 2017. **10**. P. 30–46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.001>
4. Rudenko N.N., Ignatova L.K., Ivanov B.N. Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms. *Photosynth. res.* 2007. **91**, №1. P. 81–89. doi: <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9148-2>
5. Fabre N., Reiter I.M., Becuwe-Linka N., Genty B., Rumeau D. Characterization and expression analysis of genes encoding alpha and beta carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 2007. **30**. P. 617–629. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01651.x>
6. Rudenko N.N., Ignatova L.K., Fedorchuk T.P., Ivanov B.N. Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. *Biochemistry (Moscow)*. 2015. **80**, № 6. P. 674–687.
7. Lionetto M. G., Caricato R., Giordano M. E., Schettino T. The complex relationship between metals and carbonic anhydrase: new insights and perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. **17**, Iss. 1. 127. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms17010127>
8. Водка М.В., Полищук О.В., Білявська Н.О., Золотарьова О.К. Реакція фотосинтетичного апарату шпинату на дію важких металів, інгібіторів карбоангідрази. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2013. № 10. С. 152–158.
9. Водка М.В., Полищук А.В., Белявская Н.А., Золотарёва Е.К. Действие тяжелых металлов на фотосинтетический аппарат и активность карбоангидразы хлоропластов гороха. *Вісн. Харк. Нац. аграр. ун-ту. Сер. Біол.* 2013. Вип. 3. С. 46–55.
10. Moskvina O.V., Shutova T.V., Khristin M.S., Ignatova L.K., Villarejo A., Samuelsson G., Klimov V.V., Ivanov B.N. Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids. *Photosynth. Res.* 2004. **79**, № 1. P. 93–100. doi: <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000011925.93313.db>
11. Reeves S.G., Hall D.O. Higher plants chloroplasts and grana: general preparative procedures (excluding high carbon dioxide fixation ability chloroplasts). *Methods Enzymol.* 1980. **69**. P. 85–94. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(80\)69010-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(80)69010-7)
12. Семенихин А.В., Полищук А.В., Подорванов В.В. Влияние ионов тяжелых металлов на активность карбоангидразы хлоропластов гороха. *Вісн. Харк. Нац. аграр. ун-ту. Сер. Біол.* 2014. Вип. 2. С. 23–31.
13. Семенихин А.В., Золотарьова О.К. Ідентифікація карбоангідразної активності, асоційованої з білковими комплексами фотосинтетичних мембран хлоропластів шпинату. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2014. № 6. С. 151–155.
14. Подорванов В.В., Полищук А.В., Золотарева Е.К. Влияние ионов меди на светоиндуцированный протонный перенос в хлоропластах шпината. *Биофизика.* 2007. **52**, № 6. С. 1049–1053.
15. Atkins C.A., Patterson B.D., Graham D. Plant carbonic anhydrases I. Distribution of types among species. *Plant Physiol.* 1972. **50**. P. 214–217.

Надійшло до редакції 16.01.2018

REFERENCES

1. Hewett-Emmett, D. & Tashian, R. E. (1996). Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha, beta, and gamma carbonic anhydrase families. *Mol. Phylogen. Evol.*, 5, pp. 52-77.
2. Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases - an overview. *Curr. Pharm. Des.*, 14, No. 7, pp. 603-614.
3. DiMario, R. J., Clayton, H., Mukherjee, A., Ludwig, M. & Moroney, J. V. (2017). Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles. *Mol. Plant*, 10, pp. 30-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.001>
4. Rudenko, N. N., Ignatova, L. K. & Ivanov, B. N. (2007). Multiple sources of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids: soluble and membrane-bound forms. *Photosynth. res.*, 91, No. 1, pp. 81-89. doi: <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9148-2>
5. Fabre, N., Reiter, I. M., Becuwe-Linka, N., Genty, B. & Rumeau, D. (2007). Characterization and expression analysis of genes encoding alpha and beta carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 30, pp. 617-629. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01651.x>
6. Rudenko, N. N., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P. & Ivanov, B. N. (2015). Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. *Biochemistry (Moscow)*, 80, No. 6, pp. 674-687.
7. Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E. & Schettino, T. (2016). The complex relationship between metals and carbonic anhydrase: new insights and perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, Iss. 1, 127. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms17010127>
8. Vodka, M. V., Polishchuk, A. V., Bilyavs'ka, N. O. & Zolotareva, O. K. (2013). Response of spinach photosynthetic apparatus to the action of heavy metals, carbonic anhydrase inhibitors. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 10, pp. 152-158 (in Ukrainian).
9. Vodka, M. V., Polishchuk, A. V., Bilyavs'ka, N. A. & Zolotareva, E. K. (2013). Effects of heavy metals on photosynthetic apparatus and carbonic anhydrase activity on pea chloroplasts. *Visnyk Kharkiv. Nats. Ahrar. Un-tu. Ser. Biol.*, Iss. 3, pp. 46-55 (in Russian).
10. Moskvina, O. V., Shutova, T. V., Khristin, M. S., Ignatova, L. K., Villarejo, A., Samuelsson, G., Klimov, V. V. & Ivanov, B. N. (2004). Carbonic anhydrase activities in pea thylakoids. *Photosynth. Res.*, 79, No. 1, pp. 93-100. doi: <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000011925.93313.db>
11. Reeves, S. G. & Hall, D. O. (1980). Higher plants chloroplasts and grana: general preparative procedures (excluding high carbon dioxide fixation ability chloroplasts). *Methods Enzymol.*, 69, pp. 85-94. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(80\)69010-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(80)69010-7)
12. Semenihin, A. V., Polishchuk, A. V. & Podorvanov, V. V. (2014). Effect of heavy metals ions on the activity of carbonic anhydrase in pea chloroplasts. *Visnyk Kharkiv. Nats. Ahrar. Un-tu. Ser. Biol.*, Iss. 2, pp. 23-31 (in Russian).
13. Semenihin, A. V. & Zolotareva, O. K. (2014). Identification of carbonic anhydrase activity associated with protein complexes of spinach photosynthetic membranes. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 6, pp. 151-155 (in Ukrainian).
14. Podorvanov, V. V., Polishchuk, A. V. & Zolotareva, E. K. (2007). Copper ions effect on light-induced proton transfer in spinach chloroplasts. *Biofizika*, 52, No. 6, pp.1049-1053 (in Russian).
15. Atkins, C. A., Patterson, B. D. & Graham, D. (1972). Plant carbonic anhydrases I. Distribution of types among species. *Plant Physiol.*, 50, pp. 214-217.

Received 16.01.2018

*А.В. Полищук*¹, *А.В. Семенihin*², *Н.М. Топчий*¹, *Е.К. Золотарёва*¹

¹ Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

² Нежинский государственный университет им. Николая Гоголя

E-mail: membrana@ukr.net, semenihin1964@ukr.net

ИНГИБИРОВАНИЕ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ
КАРБОАНГИДРАЗЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА ИОНАМИ МЕДИ

Изучено влияние Cu^{2+} на карбоангидразную активность различных фракций хлоропластов. Стромальная фракция и фракция тилакоидных мембран были получены в результате осмотического разрушения интактных хлоропластов, отмытых от компонентов цитозоля. Стромальные карбоангидразы оказались го-

раздо более чувствительными к действию Cu^{2+} . Так, полумаксимальное ингибирование (I_{50}) карбоангидразной активности энзимов в стромальной фракции достигалось при концентрации Cu^{2+} 3 мкМ, тогда как I_{50} для тилакоидных фракций составляло 10–20 мкМ Cu^{2+} . Распределение активности по белковым зонам после электрофоретического разделения изменялось в присутствии Cu^{2+} : уменьшалась интенсивность окраски и количество окрашенных зон. Полученные данные подтверждают возможность использования карбоангидраз хлоропластов как биомаркера загрязнения окружающей среды.

Ключевые слова: *Spinacia oleracea*, карбоангидраза, тяжелые металлы, хлоропласты, тилакоидные мембраны, ионы меди, ионы цинка.

A.V. Polishchuk¹, A.V. Semenikhin², N.M. Topchy¹, E.K. Zolotareva¹

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany of the NAS of Ukraine, Kiev

² Gogol Nizhyn State University, Ukraine

E-mail: membrana@ukr.net, semenihin1964@ukr.net

INHIBITION OF MULTIPLE FORMS OF CARBONIC ANHYDRASES OF SPINACH CHLOROPLASTS BY CU IONS

The influence of Cu^{2+} on the carbonic anhydrase (CA) activity of various chloroplast fractions is studied. The stromal and thylakoid fractions are obtained after the osmotic destruction of intact chloroplasts washed out from cytosol components. Stromal CAs have been shown to be more sensitive to Cu^{2+} than the thylakoid CA. So, the half-maximal inhibition (I_{50}) of the CA activity of the stromal fraction is achieved at a concentration of 3 μM of Cu^{2+} , whereas I_{50} at the inhibition of thylakoid CA was 10–20 μM Cu^{2+} . In the presence of CuSO_4 , the distribution of the CA activity on the protein zones of the stromal and thylakoid fractions after the electrophoretic separation is changed: color intensity and the number of colored zones decrease depending on the Cu^{2+} concentration. The obtained data confirm the possibility of using CA of chloroplasts as a biomarker of the environmental pollution.

Keywords: *Spinacia oleracea*, carbonic anhydrase, heavy metals, chloroplasts, thylakoid membranes, infrared gas analysis, copper ions.