

ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ РОСЛИН

УДК 581.1: 577.355.3

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ КАРБОАНГИДРАЗЫ ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА

© 2014 г. А. В. Семенихин, А. В. Полищук, В. В. Подорванов

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного

Национальной академии наук Украины

(Киев, Украина)

На основе инфракрасного газового анализа (ИКГА) разработан метод определения скорости гидратации CO_2 и дегидратации HCO_3^- , катализируемой растворимой и мембраносвязанной карбоангидразой (КА) изолированных хлоропластов гороха. Предложенный подход позволяет определять последовательно в одном образце КА активность в реакциях дегидратации гидрокарбоната и гидратации CO_2 . В зависимости от состояния хлоропластов скорость реакции дегидратации в присутствии избытка субстрата оставалась постоянной в течение, по крайней мере, 30 с и соответствовала 100-1500 мкмоль CO_2 /(мг хл ч). С использованием ИКГА показано, что скорость гидратации CO_2 , также как и скорость дегидратации бикарбоната, не зависит от освещения суспензии изолированных хлоропластов. КА активность хлоропластов возрастала при обработке мембран Тритоном X-100. Изучено действие ионов тяжелых металлов (ТМ) на скорости взаимного превращения форм угольной кислоты, катализируемого КА изолированных хлоропластов, и показано, что полумаксимальное ингибирование (I_{50}) КА достигается при ~80 мкМ Cu^{2+} ; ~120 мкМ Zn^{2+} ; ~135 мкМ Cd^{2+} и ~10 мкМ Hg^{2+} . Полумаксимальное ингибирование растворимой КА, накапливающейся в среде суспендирования хлоропластов при длительном (2 ч) инкубировании, достигалось при более низких концентрациях ТМ.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, карбоангидраза, гидрокарбонат, углекислый газ, хлоропласт, тилакоидные мембраны, инфракрасный газовый анализ, ионы тяжелых металлов

Карбоангидраза (КА, карбонатгидролиза КФ 4.2.1.1) – один из наиболее распространенных металлоэнзимов, осуществляющий обратимую гидратацию CO_2 . В живых организмах от прокариот до человека КА представлена пятью типами (α , β , γ , δ , ζ) и множественными формами (Hewett-Emmett, Tashian, 1996; Supuran, 2008).

У высших растений большинство изоформ КА относится к β -типу и присутствует в виде димеров, тетрамеров или октамеров (Kimber, Pai, 2000). γ -карбоангидразы, найденные у бактерии *Methanosarcina thermophila*, являются гомотримерами (Alber, Ferry, 1994). Прототипом КА δ класса считается мономерная КА морской диатомовой водоросли

Thalassiosira weissflogii (Tripp et al., 2001). ζ -КА, являющаяся, по-видимому, мономером, имеет три немного отличающихся друг от друга активных центра в одной и той же полипептидной цепи (Supuran, 2008). Каталитический центр большинства α -, β - и δ -КАз содержит ион цинка Zn(II) с очень высоким (субпикомолярным) сродством к энзиму (Tripp et al., 2001), который может быть замещен на Co(II) , имеющий близкие к Zn(II) поляризуемость и ионный радиус (Hoffmann et al., 2011). В целом активность Co -содержащих форм энзима по сравнению с нативными Zn -содержащими карбоангидразами снижена (Tu, Silverman, 1985). В активном центре γ -КА присутствует ион Fe(II) , который может быть заменен на Zn(II) или Co(II) , а карбоангидразная реакция в ζ -КА катализируется ионами Cd(II) (Xu, 2008). Предполагается, что использование токсичного для многих организмов кадмия стало конкурент-

Адрес для корреспонденции: Семенихин Андрей Викторович, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина; e-mail: membrana@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

ным преимуществом диатомовых водорослей в обеднённых металлами океанических водах (Xu et al., 2008).

Карбоангидразы α -типа способны катализировать некоторые нефизиологические реакции, в том числе гидролиз сложных эфиров нитрофенола, причем доказано, что в катализе эстеразной реакции, как и реакции гидратации CO_2 , участвует один и тот же цинк-гидроксидный активный центр энзима (Host et al., 2006). Именно на определении эстеразной активности с искусственными субстратами основан самый распространенный и удобный, не зависящий от присутствия CO_2 , метод изучения кинетического поведения α -КАз, позволяющий быстро и достаточно точно оценивать эффективность потенциальных ингибиторов и активаторов α -КАз и их фармакологическую перспективность. С использованием эстеразного метода выполнены исследования токсичности целого ряда тяжелых металлов и определена кинетика ингибирования ими энзимов, изолированных из различных организмов (Lionetto, 2012).

Для изучения свойств других типов КАз до настоящего времени не предложено столь же удобного инструмента, поскольку, в отличие от изоэнзимов α -типа, они не проявляют эстеразной или фосфатазной активности (Hoffmann et al., 1999) из-за, возможно, различий в организации активного центра. Известно, в частности (Pannetier et al., 2011), что в активном центре α -КА ионы цинка координируются остатками гистидина $\text{Zn}(\text{His})_3(\text{H}_2\text{O})$, а у β -КАз – остатком гистидина и двумя остатками цистеина $\text{Zn}(\text{His})(\text{Cys})_2(\text{H}_2\text{O})$, причем $\text{Zn}(\text{II})$ в каталитическом центре β -КА связан более прочно, чем у α -КАз.

Возрастающий интерес к более глубокому исследованию карбоангидраз β -типа связан, в первую очередь, с поиском препаратов, способных воздействовать на бактерии и микроскопические грибы, жизнедеятельность которых зависит от активности эндогенных КАз этого типа.

Впервые ингибирование α -карбоангидраз ионами тяжелых металлов было показано в 1976 г. при изучении α -КА из эритроцитов канального сомика. В последующие годы были проведены многочисленные исследования действия Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ и Cd^{2+} на скорость энзиматических реакций, катализируемых карбоангидразами различных организмов (Lionetto et al., 2012). Однако влияние ТМ на КА β -типа до сих пор системно не исследовано, что в

первую очередь связано с отсутствием адекватных методов анализа.

Целью работы была разработка метода определения активности карбоангидразы на основе инфракрасного газового анализа (ИКГА) по ускорению реакций гидратации и дегидратации бикарбоната, а также изучение с помощью этого метода карбоангидразой активности изолированных хлоропластов гороха и влияния тяжелых металлов на этот показатель.

МЕТОДИКА

Для выделения хлоропластов использовали свежесрезанные листья двухнедельных проростков гороха (*Pisum sativum* L.). Среда выделения содержала 400 мМ сорбитола, 10 мМ NaCl , 10 мМ трицина- NaOH (рН 7,8), 10 мМ аскорбата натрия, 0,2 мМ ЭДТА и замораживалась до появления кристалликов льда. Листья разрушали в блендере Braun (Германия) в течение 20-30 с при максимальной скорости. Гомогенат процеживали через два слоя полотна, хлоропласты осаждали, центрифугируя суспензию в течение 3 мин при 7000 г. Осадок ресуспендировали в среде 100 мМ сорбитола, 10 мМ NaCl , 10 мМ KCl , 10 мМ трицин- NaOH (рН 7,8) и 2,5 мМ MgCl_2 и центрифугировали 1 мин при 800 г для удаления агрегатов и крупных фрагментов клетки. Для удаления растворимой КА осадок хлоропластов дважды промывали раствором, который отличался от среды выделения меньшим содержанием сорбитола (100 мМ) и отсутствием аскорбата. Концентрацию хлорофилла (хл) определяли по Арнону (Arnon, 1949); скорость фотосинтетического электронного транспорта – по поглощению кислорода суспензией освещенных хлоропластов в присутствии 0,1 мМ метилвиологена.

Анализы проводились в закрытой термостатированной стеклянной ячейке (объем 10 мл) инфракрасного CO_2 -анализатора (ИКГА) при 20° С (S151, Qubit Systems Inc., Канада) в непрерывном потоке воздуха (350 мл/ мин), содержащем 0,036-0,038 % CO_2 . Состав реакционной среды: сорбитол (100 мМ), NaCl (10 мМ), трис- HCl (10 мМ, рН 7,5) и хлоропласты, эквивалентные концентрации хл 10 мкг/мл. Направление реакции устанавливали за счет разницы в концентрациях CO_2 в газовой фазе и в растворе. Скорости реакции в обоих направлениях количественно соответствуют изменениям потока CO_2 через ячейку и, таким образом, для их определения не требуется никаких дополнительных расчетов. Скорость дегидратации HCO_3^- определяли по увеличению концентра-

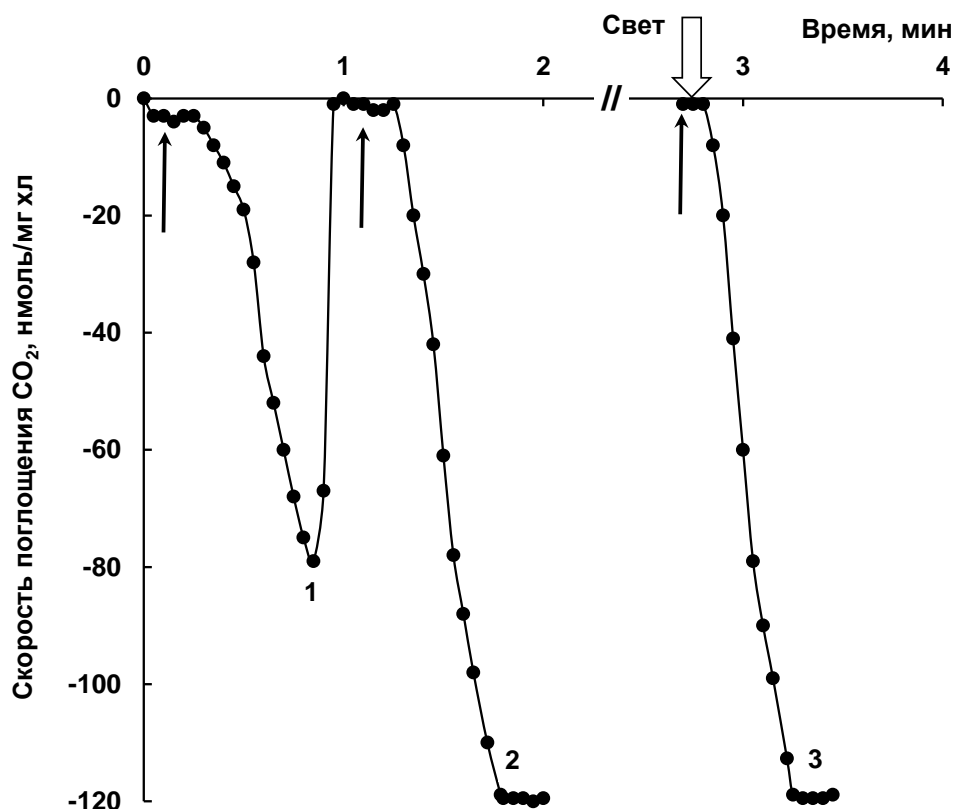


Рис. 1. Определение гидратазной активности тилакоидов методом ИКГА.

1 – кривая поглощения CO_2 при введении NaHCO_3 в концентрации 15 мМ в реакционную среду (рН 7,8); 2 – кривая поглощения CO_2 после добавления хлоропластов, эквивалентных 0,1 мг хл; 3 – кривая поглощения CO_2 при освещении после добавления хлоропластов (0,1 мг хл).

ции CO_2 в газовой фазе над реакционной средой в ответ на добавление избытка гидрокарбоната натрия. Скорость реакции гидратации CO_2 соответствовала скорости его поглощения из газовой фазы хлоропластами, добавленными в ячейку анализатора (рис. 1). Для удаления паров воды из воздуха использовались осушающие колонки и водяная ловушка, заполненная колотым льдом. После 5-7 мин перемешивания, концентрация CO_2 в проходящем воздухе достигала стационарного уровня. Раствор гидрокарбоната натрия подавали через тefлоновый капилляр из шприцевой пипетки до концентрации 15 мМ в ячейке. После внесения NaHCO_3 содержание CO_2 в газовой фазе возрастало и примерно за 1 мин достигало нового стационарного уровня (рис. 2). В условиях избыточного количества субстрата скорость катализируемой КА дегидратазной реакции оставалась постоянной в течение по крайней мере 30 с и соответствовала поступлению 100-1500 мкмоль CO_2 /(мг хл · ч) в зависимости от состояния хлоропластов.

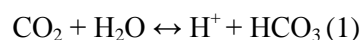
При определении влияния освещения на КА активность стеклянную ячейку с хлоропластами освещали белым светом с плотностью

светового потока на поверхности ячейки 200 мкмоль/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$). При анализе действия ингибиторов хлоропласты инкубировали с ними в течение 2 мин. Сульфамидные ингибиторы КА этоксизоламид (ЭА – 6-этокси-2-бензотиазолсульфонамид, «Sigma», США) и ацетазоламид (АА – N-5-сульфамойл-1,3,4-тиадиазолилацетамид, «Sigma») растворяли в диметилсульфоксиде и использовали в концентрации 0,5 мМ.

Результаты обработаны статистически с помощью программы Microsoft Excel 2010 и приведены как $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее распространенным методом определения КА активности остается метод Вилбура и Андерсона (1948), позволяющий оценивать скорость реакции гидратации углекислого газа



по измерению скорости закисления насыщенного CO_2 буферного раствора. Эта методика применима лишь в узком диапазоне значений рН, температуры и буферной ёмкости реакционной среды. Из-за этих ограничений метод

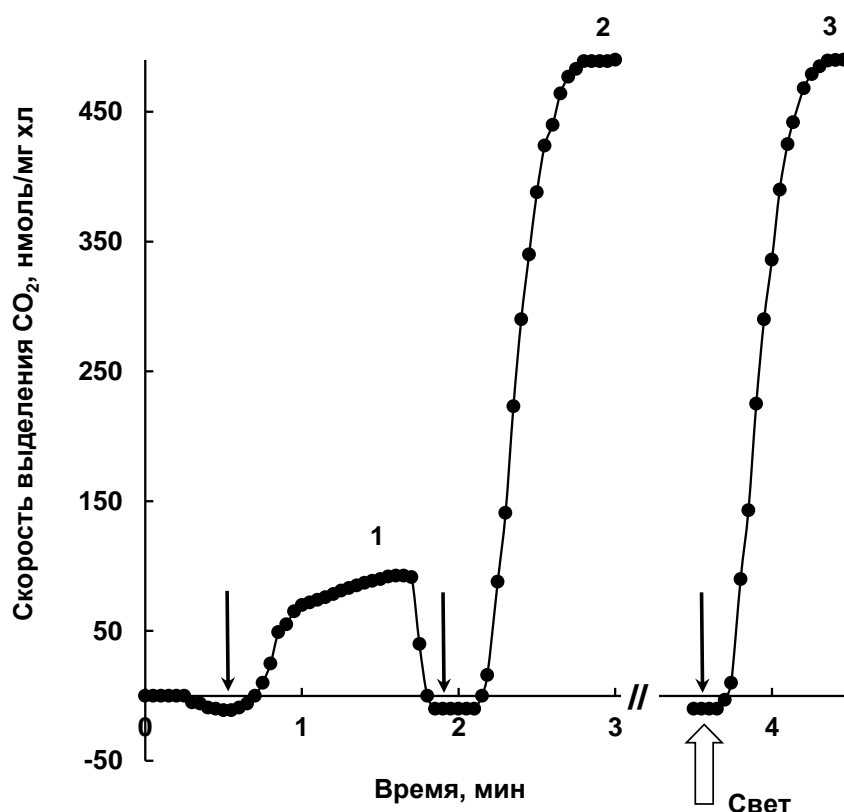


Рис. 2. Определение дегидратазной активности тилакоидов методом ИКГА.

1 – кривая выделения CO_2 при введении NaHCO_3 в концентрации 15 мМ в реакцию среду (pH 7,8); 2 – кривая выделения CO_2 после добавления хлоропластов, эквивалентных 0,5 мг хл; 3 – кривая выделения CO_2 при освещении после добавления хлоропластов (0,5 мг хл).

Вилбура и Андерсона не может быть использован при изучении кинетического поведения КАз β -типа в условиях вариации указанных параметров. В настоящей работе для определения скорости реакций, катализируемых КА, был использован ИКГА, позволяющий количественно оценивать изменение концентрации CO_2 – субстрата реакции гидратации и продукта реакции дегидратации бикарбоната (уравнение 1).

В условиях наших экспериментов содержание CO_2 в реакционных растворах соответствовало его концентрации в воздухе лабораторного помещения (600-650 ppm). Скорость катализируемой КА реакции гидратации CO_2 определяли по скорости поглощения углекислого газа суспензией хлоропластов, помещенной в ячейку газоанализатора. Объем над реакционной средой в течение 1-2 мин продували воздухом, содержащим 2000 ppm CO_2 до установления постоянного состава газовой фазы. Реакцию начинали, включая магнитную мешалку, обеспечивающую интенсивное перемешивание среды и ее уравнивание с газовой фазой. В этих условиях до начала перемешивания градиент концентрации CO_2 между водной

и газовой фазами составлял более 1300 ppm. В присутствии КА раствор поглощал CO_2 за счет гидратазной реакции со скоростью, оставшейся постоянной в течение по крайней мере 30 с. Поглощение CO_2 таким же объемом реакционной среды, не содержащей карбоангидразы, было значительно меньшим (рис. 1). Скорость гидратазной реакции рассчитывали по разности скоростей поглощения CO_2 суспензией хлоропластов (рис. 1, кривая 2) и реакционной средой (рис. 1, кривая 1).

Скорость реакции дегидратации бикарбоната определяли по скорости образования CO_2 в суспензии хлоропластов, содержащих 15 мМ бикарбоната натрия (рис. 2).

Функциональная роль мембраносвязанных форм КА, ассоциированных с тилакоидами, не установлена. Высказывались предположения о возможности непосредственного вовлечения этого фермента тилакоидов в процессы фотосинтетического преобразования энергии (Khrustin et al., 2004). Данные о возрастании КА активности при освещении тилакоидов (Moskvin et al., 2000) могут рассматриваться как свидетельство в пользу этих предположе-

Таблица 1. Влияние тяжелых металлов на скорость реакций, катализируемых КА в изолированных хлоропластах шпината

Ион металла	Концентрация, мкМ	Скорость реакции дегидратации, % от контроля	Скорость реакции гидратации, % от контроля
Hg ²⁺	5	30 ± 5	10 ± 3
	10	23 ± 4	6 ± 2
Cu ²⁺	50	35 ± 5	20 ± 4
	100	25 ± 5	10 ± 3
Zn ²⁺	50	67 ± 8	30 ± 4
	100	35 ± 4	18 ± 4
	200	28 ± 4	14 ± 5

Примечание. Скорость реакции дегидратации бикарбоната составляла в контроле 100-1500 мкмоль CO₂/(мг хл · ч), а скорость реакции гидратации двуокиси углерода – 100-1500 мкмоль CO₂/(мг хл · ч).

ний. Принимая во внимание, что КА активность в цитируемой работе определяли методом Вилбура и Андерсона (1948), имеющим существенные ограничения, мы провели исследование влияния света на уровень КА активности изолированных хлоропластов с помощью ИКГА. Полученные данные показывают, что скорость дегидратации CO₂, а также скорость гидратации бикарбоната не зависят от освещения хлоропластов (рис. 1, 2).

Активность КА хлоропластов ингибируется, как известно, в присутствии липорастворимого этоксизоламида (ЭА) и растворимого в воде ацетазоламида (АА) (Moskvin et al., 2004). Как видно из рис. 3, образование CO₂ в реакции дегидратации бикарбоната, катализируемое КА

хлоропластов, эффективно подавлялось АА и ЭА, причем действие последнего оказалось более выраженным. Таким образом, представленные результаты подтверждают применимость ИКГА для исследования КА активности биологических препаратов.

При добавлении в реакцию среду ионов тяжелых металлов скорости реакций дегидратации CO₂ и гидратации бикарбоната, катализируемые КА хлоропластов, снижались. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, наиболее сильными ингибиторами являлись ионы ртути. Ионы меди ингибировали КА тилакоидов гораздо слабее.

В присутствии солей цинка, кадмия и свинца ферментативная активность тилакоидов

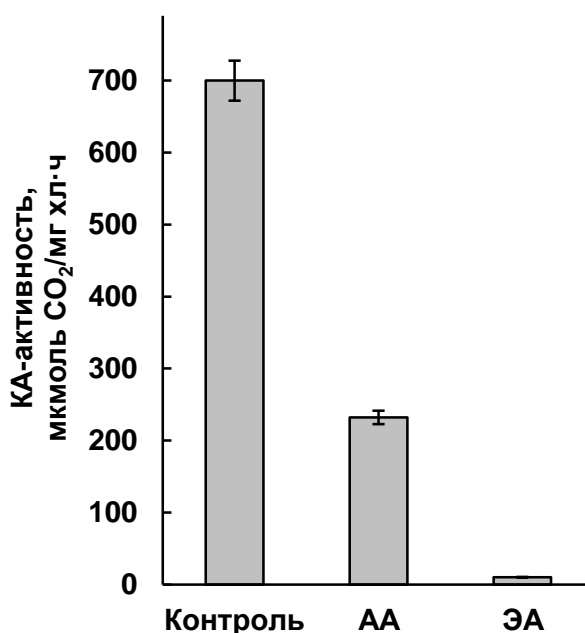


Рис. 3. Влияние ингибиторов карбоангидразы на скорость выделения CO₂ в присутствии хлоропластов.

Реакционная среда содержала 15 мМ NaHCO₃ и хлоропласты, эквивалентные 0,5 мг хл. Концентрация АА и ЭА составляла 0,5 мМ.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Таблица 2. Величины полумаксимального ингибирования (I_{50}) КА активности хлоропластов и супернатанта

Ион металла	I_{50} для КА хлоропластов, мкМ	I_{50} для КАз супернатанта, мкМ
Hg ²⁺	≈ 10	≈ 5
Cu ²⁺	≈ 80	≈ 30
Zn ²⁺	≈ 120	≈ 80
Cd ²⁺	≈ 140	≈ 100
Pb ²⁺	≈ 230	-

Примечание. Реакционная среда содержала 15 мМ NaHCO₃ и хлоропласты, эквивалентные 0,5 мг хл.

Таблица 3. Изменение скорости реакции дегидратации бикарбоната в присутствии хлоропластов и среды их суспендирования

Продолжительность инкубации	КА активность осадка хлоропластов, мкмоль/(мг хл · ч)	КА активность супернатанта, мкмоль/(мг хл · ч)
0 мин	460 ± 50	20 ± 8
40 мин при 4°C	510 ± 50	75 ± 25
120 мин при 4°C	480 ± 50	180 ± 35
120 мин при 4°C + тритон (30 мин)	940 ± 50	-

Примечание. 0,05% тритон X-100 добавляли к суспензии хлоропластов до соотношения хл/детергент 1:1 и инкубировали в течение 30 мин.

в реакции дегидратации бикарбоната снижалась в меньшей степени, чем в присутствии Hg²⁺ или Cu²⁺. Концентрации ионов ртути, меди, свинца, кадмия и цинка, вызывающие полумаксимальное ингибирование (I_{50}) КА активности хлоропластов в реакции дегидратации бикарбоната, приведены в сравнении в табл. 2. Видно, что концентрации изученных металлов, вызывающие 50% подавление каталитической активности КА хлоропластов, значительно различались и составляли: ~10 мкМ Hg²⁺; ~80 мкМ Cu²⁺; ~120 мкМ Zn²⁺; ~135 мкМ Cd²⁺; 230 мкМ Pb²⁺. Сравнивая эти результаты с опубликованными данными по ингибирующему действию ионов ТМ на карбоангидразы, изолированные из различных организмов, можно отметить, что токсичность каждого из изученных ТМ варьирует в широких пределах (Lionetto et al., 2012). Так, I_{50} для Zn²⁺ составляет для α -КА из различных организмов от 16,2 до 310 мкМ, а I_{50} для Cd²⁺ от 9,9 до 8250 мкМ. Чувствительность КАз к ионам меди также очень различается у различных организмов, а I_{50} (Hg²⁺) для КА хлоропластов по данным настоящей работы почти в 50 раз ниже, чем I_{50} (Hg²⁺) для α -КА из печени *Dicentrarchus labrax*.

Согласно результатам табл. 1, в присутствии ионов ТМ реакция гидратации CO₂ по-

давлялась в большей степени, чем реакция дегидратации бикарбоната. По-видимому, это связано с различиями в составе газовой фазы, концентрации хлоропластов и субстратов.

При хранении изолированных хлоропластов в изотонической среде связь КА с мембранами ослабляется, о чем свидетельствует возрастание уровня КА активности в среде инкубации. В табл. 3 приведены данные об изменении во времени распределения КА активности между осадком хлоропластов и надосадочной жидкостью. Свежевыделенные хлоропласты отмывали от растворимых форм КА путем трехкратного переосаждения. При последней промывке перед ресуспендированием осадка хлоропластов определяли уровень КА активности с супернатанте. Суспензию промытых хлоропластов (1 мг хл/мл) инкубировали при 4°C и через определенные промежутки времени отбирали по 1 мл для центрифугирования и последующего определения КА активности в полученных супернатанте и осадке мембран.

Видно, что по мере инкубации активность растворимой в водной среде КА увеличивалась, тогда как КА активность, связанная с хлоропластами, изменялась лишь незначительно. По-видимому, при переходе слабосвязанных карбоангидраз в раствор возрастает до-

ступность мембранного пула КА и, таким образом, общая КА активность хлоропластов не изменяется. После добавления 0,05% тритона X-100 к суспензии хлоропластов (соотношение хл/детергент 1:1) её общая КА активность значительно возростала (табл. 3). Эти результаты указывают на существование пула мембранных карбоангидраз, активность которых замаскирована и проявляется при добавлении неионного детергента.

Растворимые КА супернатанта оказались более чувствительными к токсическому действию ТМ, чем карбоангидразы, связанные с хлоропластами. Из данных, приведенных в табл. 3, видно, что полумаксимальное ингибирование КА активности в супернатанте достигалось при значительно меньших концентрациях ТМ, чем в хлоропластах. Вероятно, это связано с большей доступностью активного центра растворимого фермента для контакта с ионами ТМ.

Ранее мы сообщали, что в диапазоне концентраций 10-200 мкМ ионы исследуемых металлов существенно не влияют на скорость фотохимического переноса электронов от воды к метилвиологену (Полищук и др., 2009). При изучении изолированных центральных (core) комплексов ФС II высших растений было показано, что Zn^{2+} и Mg^{2+} ингибируют, а Ca^{2+} и Mn^{2+} стимулируют КА активность, связанную с этими частицами (Lu et al., 2005).

Нами было также установлено, что Cu^{2+} и Zn^{2+} при соотношении молярных концентраций 0,8 Cu^{2+} /хл и 5 Zn^{2+} /хл ингибировали светозависимое поглощение протонов суспензией изолированных хлоропластов (Подорванов и др., 2007, Полищук та ін., 2009). Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют предполагать, что ингибирование протонного обмена в мембранах хлоропластов может быть связано с подавлением активности тилакоидных карбоангидраз, участвующих в облегченном транспорте протонов (Vilarejo et al., 2002; Shutova et al., 2008). Это предположение подтверждается также результатами недавней работы, в которой показано изменение ультраструктуры хлоропластов в присутствии ионов ТМ, вызванное модификацией тилакоидных КАЗ (Водка и др., 2013).

Загрязнение воды и почвы ионами ТМ является одним из наиболее неблагоприятных факторов, влияющих на физиологические и биохимические процессы в растениях. Металлы поступают в листья и хлоропласты растений из воздуха в виде аэрозолей, а также при погло-

щении ТМ корневой системой и последующем транспорте по проводящим путям в листья. Механизмы ингибирующего действия ионов ТМ на процессы, протекающие в листьях, изучены лишь фрагментарно. До настоящего времени не исследовано влияние ТМ на активность множественных форм КАЗ высших растений (Иванов и др., 2007) и не вычленен вклад этих реакций в процессы адаптации к условиям антропогенного загрязнения. В хлоропластах, помимо растворимых форм, присутствуют карбоангидразы, входящие в состав надмолекулярных комплексов, обеспечивающих концентрирование и быстрый перенос CO_2 к центрам карбоксилирования РБФК/О (Karlsson et al., 1998). Следовательно, подавление активности КАЗ при их взаимодействии с ТМ будет нарушать процесс фотосинтетической фиксации CO_2 . Данные настоящей работы, полученные методом ИКГА, позволили определить некоторые свойства карбоангидраз хлоропластов и оценить параметры, характеризующие ингибирующее влияние ТМ на мембранную и растворимую формы КА хлоропластов.

ЛИТЕРАТУРА

- Иванов Б.Н., Игнатова Л.К., Романова А.К. Разнообразии форм и функций карбоангидразы высших наземных растений // Физиология растений. – 2007. – Т. 54, № 2. – С. 165-185.
- Полищук А.В., Топчий Н.Н., Сытник К.М. Влияние ионов тяжелых металлов на перенос электронов на акцепторной стороне фотосистемы II // Доповіді НАН України. – 2009. – № 6. – С. 203-210.
- Подорванов В.В., Полищук А.В., Золотарева Е.К. Влияние ионов меди на светоиндуцированный протонный перенос в хлоропластах шпината // Биофизика. – 2007. – Т. 52, № 6. – С. 1049-1053.
- Полищук О.В., Подорванов В.В., Сытник С.К. Вплив іонів цинку на перенесення протонів в ізолюваних хлоропластах шпинату // Доповіді НАН України. – 2007. – № 8. – С. 170-175.
- Водка М.В., Полищук А.В., Белявская Н.А., Золотарева Е.К. Воздействие тяжелых металлов, ингибиторов карбоангидразы, на мембранную систему хлоропластов листьев гороха // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 3 (30). – С. 46-55.
- Alber B.E., Ferry J.G. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – V. 91. – P. 6909-6913.
- Arnon D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // Plant Physiol. – 1949. – V. 24. – P. 1-154.
- Hewett-Emmett D., Tashian R.E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha, beta, and gamma carbonic anhydrase fam-

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

- ilies // Mol. Phylogen. Evol. – 1996. – № 5. – P. 52-77.
- Hoffmann K.M., Samardzic D., van den Heever K., Rowlett R.S. Co(II)-substituted *Haemophilus influenzae* β -carbonic anhydrase: Spectral evidence for allosteric regulation by pH and bicarbonate ion // Arch. Biochem. Biophys. – 2011. – V. 511, Is. 1-2. – P. 80-87.
- Host G., Martensson L.G., Jonsson B.H. Redesign of human carbonic anhydrase II for increased esterase activity and specificity towards esters with long acyl chains // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – V. 1764. – P. 1601-1606.
- Karlsson J., Clarke A.K., Chen Z.Y., Huggins S.Y., Park Y.I., Husic H.D., Moroney J.V., Samuelsson G. A novel alpha-type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂ // EMBO J. – 1998. – V. 17, № 5. – P. 1208-1216.
- Khristin M. S., Ignatova L. K., Rudenko N. N., Lvanov B. N., Klimov V. V. Photosystem II Associated Carbonic Anhydrase Activity in Higher Plants is Situated in Core Complex // FEBS Lett. – 2004. – V. 577, № 7. – P. 1208-1216.
- Kimber M.S., Pai E.F. The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases // EMBO J. – 2000. – V. 19, № 7. – P. 1407-1418.
- Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Erroi E., Schettino T. Carbonic anhydrase and heavy metals // 2012. – doi: 10.5772/33372 – <http://www.intechopen.com/books/biochemistry/carbonic-anhydrase-and-heavy-metals>
- Lu Y.-K., Theg S.M., Stemler A.J. Carbonic anhydrase activity of the photosystem II OEC33 protein from pea plant // Cell Physiol. – 2005. – V. 46. – P. 1944-1953.
- Moskvin O.V., Ivanov B.N., Ignatova L.K., Kollmeier M.A. Light-induced stimulation of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids // FEBS Lett. – 2000. – V. 470. – P. 375-377.
- Moskvin 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. – V. 79, № 1. – P. 93-100.
- Pannetier F., Ohanessian G., Frison G. Comparison between α - and β -carbonic anhydrases: can Zn(His)₃(H₂O) and Zn(His)(Cys)₂(H₂O) sites lead to equivalent enzymes? // Dalton Trans. – 2011. – V. 40. – P. 2696-2699.
- Shutova T., Kenneweg H., Buchta J., Nikitina J., Terentyev V., Chernyshov S., Andersson B., Allakhverdiev S.I., Klimov V.V., Dau H., Junge W., Samuelsson G. // The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O₂ evolution rate by proton removal // EMBO J. – 2008. – V. 27, № 5. – P. 782-791.
- Stemler A.J., Murphy J. Determination of the binding constant of H¹⁴CO₃⁻ to the photosystem II complex in maize chloroplasts: Effects of inhibitors and light // Photochem. Photobiol. – 1973. – V. 38, № 6. – P. 701-707.
- Stemler A. An assay for carbonic anhydrase activity and reactions that produce radiolabeled gases or small uncharged molecules // Anal. Biochem. – 1993. – V. 210. – P. 328-331.
- Supuran C.T. Carbonic anhydrases – an overview // Curr. Pharm. Des. – 2008. – V. 14. – P. 603-614.
- Tripp B.C., Smith K., Ferry J.G. Carbonic anhydrase : new insights for an ancient enzyme // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, № 3. – P. 615-618.
- Tu C.K., Silverman D.N. Catalysis by cobalt(II)- substituted carbonic anhydrase II of the exchange of oxygen-18 between CO₂ and H₂O // Biochemistry. – 1985. – V. 24. – P. 5881-5887.
- Villarejo A., Shutova T., Moskvin O., Forssun M., Klimov V.V., Samuelsson G. Photosystem II-associated carbonic anhydrase regulates the efficiency of photosynthetic oxygen evolution // EMBO J. – 2002. – V. 21, № 4. – P. 1930-1938.
- Wilbur K.W., Anderson N.G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase // J. Biol. Chem. – 1948. – V. 176. – P. 147-154.
- Xu Y., Feng L., Jeffrey P.D., Shi, Y., Morel F.M. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms // Nature. – 2008. – V. 452, № 7183. – P. 56-61.

Поступила в редакцию
19.05.2014 г.

**EFFECT OF HEAVY METALS IONS ON THE ACTIVITY
OF CARBONIC ANHYDRASE IN PEA CHLOROPLASTS**

A. V. Semenihih, A. V. Polishchuk, V. V. Podorvanov

*M.G. Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
e-mail: membrana@ukr.net*

A method for determination of the rate of CO₂ hydration and HCO₃⁻ dehydration catalyzed by soluble and membrane bound carbonic anhydrase (CA) of isolated chloroplasts is developed on the basis of infrared gas analysis (IRGA). The proposed approach allows determining in series in one sample CA activity in reactions of HCO₃⁻ dehydration and CO₂ hydration in series. The rate of dehydration reaction at substrate excess remained constant for at least 30 seconds corresponded to 100-1500 μmol CO₂/(mg chl·h) depending on physiological state of chloroplasts. Using IRGA, it was shown that CA activity of isolated chloroplasts is independent on the light. CA activity was increased by treatment of chloroplast membranes with Triton X-100. The effect of heavy metal (HM) ions at a rate of carbonic acid forms interconversion in isolated chloroplasts was studied. It was showed that half-maximal inhibition (I₅₀) of chloroplast CA activity reached at ~10 μM Hg²⁺; ~80 μM Cu²⁺; ~120 μM Zn²⁺; ~135 μM Cd²⁺. A soluble CA was accumulated in the suspending medium of chloroplasts during prolonged (2 hrs) incubation and inhibited by the HMs at much lower concentrations than membrane carbonic anhydrase forms.

Key words: *Pisum sativum, carbonic anhydrase, bicarbonate, carbon dioxide, thylakoid membranes of chloroplasts, an infrared gas analysis, heavy metals ions*

**ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ
НА АКТИВНІСТЬ КАРБОНАНГІДРАЗИ ХЛОРОПЛАСТІВ ГОРОХУ**

A. B. Семеніхін, О. В. Поліщук, В. В. Подорванов

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)
e-mail: membrana@ukr.net*

На основі інфрачервоного газового аналізу (ІКГА) розроблено метод визначення швидкості гідратації CO₂ і дегідратації HCO₃⁻, що каталізується розчинною і мембранозв'язаною карбонангідроною (КА) ізольованих хлоропластів гороху. Запропонований підхід дозволяє визначати послідовно в одному зразку КА активність в реакціях дегідратації бікарбонату і гідратації CO₂. Залежно від стану хлоропластів, швидкість реакції дегідратації в присутності надлишку субстрату залишалася сталою протягом, принаймні, 30 секунд і відповідала 100-1500 мкмоль CO₂/(мг хл·год). З використанням ІКГА показано, що КА активність ізольованих хлоропластів не залежить від освітлення. КА активність хлоропластів зростала при обробці мембран Тритоном X-100. Вивчено дію іонів важких металів (ВМ) на швидкості взаємного перетворення форм вугільної кислоти, що каталізується КА ізольованих хлоропластів, і показано, що напівмаксимальне інгібування (I₅₀) КА досягається при ~10 μM Hg²⁺; ~80 μM Cu²⁺; ~120 μM Zn²⁺; ~135 μM Cd²⁺. Напівмаксимальне інгібування розчинної КА, що накопичується в середовищі суспендування хлоропластів при тривалому (2 год) інкубуванні, досягалося при більш низьких концентраціях ВМ.

Ключові слова: *Pisum sativum, карбонангідраза, бікарбонат, вуглекислий газ, хлоропласт, тілакоїдні мембрани, інфрачервоний газовий аналіз, іони важких металів*