

<https://doi.org/10.15407/frg2019.02.172>

УДК 58.04:546.47/49:581.174

ВПЛИВ ІОНІВ Cd²⁺ НА АКТИВНІСТЬ СТРОМАЛЬНИХ КАРБОАНГІДРАЗ ХЛОРОПЛАСТІВ ШПИНАТУ

Н.М. ТОПЧІЙ¹, О.В. ПОЛЩУК¹, О.К. ЗОЛОТАРЬОВА¹, С.К. СИТНИК²

¹Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національної академії наук України
01004 Київ, вул. Терещенківська, 2
e-mail: ntopchiy@ukr.net

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Фракцію стромальних білків хлоропластів, ізольованих із листків *Spinacia oleracea*, отримано шляхом осмотичного руйнування цілих хлоропластів, відмитих від компонентів цитозолу. Методом інфрачервоного CO₂-аналізу досліджено вплив іонів кадмію на активність стромальних карбоангідраз (КА). Напівмаксимальне інгібування дегідратазної активності КА спостерігали при добавлянні до реакційного середовища 35 мкМ CdCl₂, при добавлянні 80 мкМ ферментативна активність становила 15 % контрольного значення. КА активність у ПААГ після неденатурувального електрофорезу візуалізували за зміною забарвлення індикатора бромтимолового синього в місцях локалізації КА. Виявлено чотири білкові смуги з різною рухливістю й різним рівнем КА активності. Число смуг із КА активністю та інтенсивність їх забарвлення зменшились після попередньої обробки стромальних білків CdCl₂ різної концентрації. Найчутливішою до дії Cd²⁺ виявилася низькомолекулярна форма КА, активність якої повністю пригнічувалась у зразках, оброблених 80 мкМ CdCl₂, тоді як КА, асоційована з РБФК/О, частково зберігала активність після інкубації стромальних білків зі 150 мкМ CdCl₂. Отримані дані підтвердили можливість використання КА хлоропластів як біомаркера раннього моніторингу забруднення навколишнього середовища важкими металами.

Ключові слова: *Spinacia oleracea*, кадмій, карбоангідраза, біомаркер.

Забруднення біосфери важкими металами внаслідок антропогенного навантаження набуло глобального характеру. Кадмій (Cd) є одним із найнебезпечніших забруднювачів атмосфери, водних і ґрунтових екосистем. Згідно з матеріалами Європейської агенції довкілля, Cd, разом із Hg, As, Pb і Ni, належать до найшкідливіших важких металів [1], зниження вмісту яких у навколишньому середовищі потребує спеціальних зусиль. Кадмій є рідкісним розсіяним елементом, зростання його концентрації у воді, повітрі і продуктах харчування пов'язане з господарською діяльністю людини. Головними джерелами надходження кадмію є викиди часточок пилу, а також стічні води гірничодобувних і металургійних підприємств, де переробляють

мідно-цинкові руди — основне джерело кадмію для промисловості. Крім того, надходження кадмію в навколишнє середовище пов'язане з внесенням у ґрунт великих кількостей фосфатних добрив. Більшу частину (до 85 %) кадмію використовують для виробництва Cd-Ni акумуляторів, антикорозійних покриттів сталевих конструкцій, в ядерних реакторах, як стабілізатор пластмас [2].

Кадмій легко поглинається кореневою системою рослин, транслюкується до різних органів і поширюється по ланцюгах живлення [3]. Деякі види рослин відносно толерантні щодо токсичного впливу кадмію і здатні його накопичувати [4]. Споживання таких рослин і продуктів їх переробки загрозові для здоров'я людини. У зв'язку з цим вивчення адаптаційних біохімічних відповідей рослинних організмів на дію Cd, а також пошук чутливих біомаркерів для раннього моніторингу забруднення навколишнього середовища є актуальними.

У літературі є свідчення про множинні шкідливі ефекти Cd на рослинний організм, що виявляються в гальмуванні росту, порушенні фізіологічних і біохімічних процесів, включаючи фотосинтез і дихання, водний обмін, мінеральне живлення рослин [5, 6].

Дуже чутливою до Cd є фотосистема II (ФС II) [7]. Показано, що на донорному боці ФС II Cd конкурує з Ca²⁺, витискує важливі кофактори системи розщеплення води і змінює комплекс окиснення води [8]. Cd також впливає на транспорт електронів з акцепторного боку ФС II, в сайті зв'язування Q_B [9]. Крім цього, Cd взаємодіє з білками комплексу ФС I [10]. Отже, множинні токсичні ефекти Cd можуть бути причиною пригнічення фотосинтетичного транспорту електронів.

Разом із цим є свідчення про більшу уразливість системи фіксації неорганічного вуглецю кадмієм. У працях [11, 12] показано, що інгібування активності рибулозо-1,5-бис-фосфаткарбоксилази/оксигенази (РБФК/О), індуковане кадмієм, виявлялось значно раніше, ніж вплив на фотосинтетичні світлові реакції. Встановлено також, що активність карбоангідрози — ензиму, пов'язаного з фотосинтетичною фіксацією CO₂, чутливіша до Cd, ніж транспорт електронів [13]. Отже, на сьогодні первинні впливи токсичної дії Cd на фотосинтез не з'ясовані.

Нещодавно при порівнянні впливу іонів Cu²⁺ на дегідратазну активність стромальних і тилакоїдних КА ми спостерігали різну чутливість множинних форм ензиму до інгібувальної дії Cu²⁺ [14].

Оскільки карбоангідрози різних організмів нині використовуються як чутливі біомаркери антропогенного забруднення довкілля важкими металами, метою нашої роботи було дослідження *in vitro* чутливості різних ізоформ стромальних карбоангідроз хлоропластів *Spinacia oleracea* до інгібування іонами кадмію.

Методика

Цілі незруйновані хлоропласти (клас А за класифікацією Холла) [15] зі збереженими зовнішніми оболонками виділяли з листків шпинату *Spinacia oleracea* згідно з методикою [16]. Листки після видалення

центральных жилок гомогенизували в замороженому до появи кристалів льоду середовищі, яке містило 330 мМ сорбітолу, 10 мМ пірофосфату, 5 мМ ізоаскорбату, 4 мМ $MgCl_2$ (рН 6,5). Гомогенат проціджували через 2 шари полотна, хлоропласти осаджували центрифугуванням за 2500 g (5400 об/хв) протягом 3 хв і двічі відмивали від компонентів цитозолу переосаджуванням в ізотонічному середовищі (330 мМ сорбітолу, 1 мМ $MgCl_2$, 50 мМ HEPES, рН 7,6) за 2500 g протягом 2 хв. Перед останнім центрифугуванням вимірювали концентрацію хлорофілів за Арноном [17], необхідну для розрахунків КА активності в надосаді до руйнування хлоропластів. Після другого осадження надосад відбирали й використовували для нативного електрофорезу білків з метою оцінювання ступеня цілісності хлоропластів. Хлоропласти руйнували при 0 °С протягом 10 хв у гіпотонічному розчині, що містив 5 мМ $MgCl_2$ (рН 6,5), за періодичного перемішування. Перед осадженням зруйнованих хлоропластів визначали концентрацію хлорофілів, необхідну для розрахунків КА активності в надосаді після руйнування хлоропластів. Суспензію зруйнованих хлоропластів центрифугували за 5000 g (7500 об/хв) протягом 3 хв. Надосадову рідину (екстракт стромальних ферментів), отриманий після центрифугування, використовували для оцінювання КА активності.

Карбоангідазну активність препаратів визначали за швидкістю утворення CO_2 при ензиматичній дегідратації гідрокарбонату за допомогою інфрачервоного CO_2 -газоаналізатора (S151, «Qubit Systems Inc.», Канада) (ІЧГА). Вимірювання проводили в закритій термостатованій скляній комірці об'ємом 20 мл за 5 °С в безперервному потоці повітря (400 мл/хв) без CO_2 , для чого його попередньо пропускали 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) та аліквоту аналізованого препарату врівноваженого з газовою фазою, вносили 100 мкл 100 мМ $NaHCO_3$ (до кінцевої концентрації 5 мМ) й інкубували 1 хв при продуванні для виходу решток атмосферного CO_2 з газометричної системи. Реакцію дегідратації гідрокарбонату інтенсифікували пришвидшеним відведенням продукту — CO_2 після вмикання перемішування зі швидкістю 1200 об/хв. КА активність розраховували в мікромолях CO_2 за годину на 1 мг хлорофілу. Для дослідження впливу іонів кадмію до реакційного середовища добавляли розчин $CdCl_2$ до кінцевої концентрації 10–80 мкМ.

Цілісність хлоропластів перевіряли вимірюванням КА активності в надосаді на CO_2 -газоаналізаторі до і після руйнування хлоропластів, а також за допомогою нативного електрофорезу білків стромальної фракції і надосаду до руйнування хлоропластів.

Нативний електрофорез білків строми проводили в камері Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-RAD) за Орнстейном і Девісом [18]. Концентрувальний гель містив 4 % акриламід у 0,0625 М *tris*-HCl (рН 6,8), роздільний гель — 7 % акриламід у 0,375 М *tris*-HCl (рН 8,8). Верхнім і нижнім електродним розчином був *tris*-гліциновий буфер (25 мМ *tris*-HCl, 192 мМ гліцин). Електрофорез проводили при 75 МА

(190 В) за температури 0 °С протягом 1 год. Розчин CdCl₂ добавляли до білкових препаратів до кінцевих концентрацій 20, 80 і 150 мкМ, перед нанесенням на гель їх інкубували упродовж 10 хв.

КА активність у гелях візуалізували за методом Едвардса і Петтона [19]. Гелі інкубували 30 хв у 50 мМ вероналовому буфері (рН 8,1) з добавлянням 0,2 %-го розчину рН-індикатора бромтимолового синього до появи темно-синього забарвлення. Потім гель перенесли у воду, насичену СО₂ за 0 °С. В гелі, у місці локалізації КА відбувалася гідратація СО₂ із закисненням середовища, що супроводжувалося зміною забарвлення індикатора і появою жовтих смуг.

Дослідження проводили у трьох повтореннях. Результати наведено як середні величини зі стандартними похибками. Вірогідність різниці вибірок визначено за допомогою *t*-критерія Стьюдента за $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Розчинні білки строми хлоропластів ізолювали за допомогою осмотичного руйнування цілих хлоропластів (клас А), кілька разів відмитих від цитоплазматичних компонентів в ізотонічному середовищі. Після руйнування зовнішніх оболонок хлоропластів КА активність середовища значно зростала через вивільнення високоактивних стромальних КА (рис. 1, а). Так, КА активність стромальної фракції становила 220 мкмоль СО₂/(год · мг хл.), тоді як у надосаді до осмотичного руйнування хлоропластів активність КА була у 10 разів меншою (див. рис. 1, а). Зростання КА активності надосаду після осмотичного руйнування було одним із критеріїв цілісності ізолюваних хлоропластів, що підтверджено також результатами електрофоретичного аналізу (див. рис. 1, б). Як бачимо, кількість та інтенсивність забарвлення білкових зон у стромальній фракції хлоропластів значно зросла порівняно із середовищем суспендування цілих хлоропластів, яке практично не містило білків, крім незначної кількості РБФК/О (найінтенсивніше забарвлена зона на електрофореграмі). Маркерним білком слугував основний фермент циклу Кальвіна РБФК/О, локалізований виключно в стромі хлоропластів, наявність незначної його кількості у середовищі суспендування цілих хлоропластів вказує на невелику кількість зруйнованих хлоропластів (див. рис. 1, б). Відсутність інших білкових зон у надосаді до руйнування хлоропластів пов'язана з ретельним відмиванням від цитоплазматичних білків, до яких належить кілька ізоформ цитоплазматичних β-карбоангідраз (βКА2, βКА3, βКА4).

Дані щодо впливу різних концентрацій CdCl₂ на КА активність стромальної фракції, яка пригнічувалася зі зростанням концентрації CdCl₂, наведено на рис. 2. За наявності 10 мкМ CdCl₂ активність знижувалася на 20 %, за 35 мкМ CdCl₂ спостерігали напівмаксимальне інгібування (I_{50}) КА активності. З підвищенням концентрації CdCl₂ до 80 мкМ у середовищі реакції ферментативна активність становила лише 15 % контрольного значення. Дуже подібну картину інгібування КА активності стромальних білків хлоридом кадмію спос-

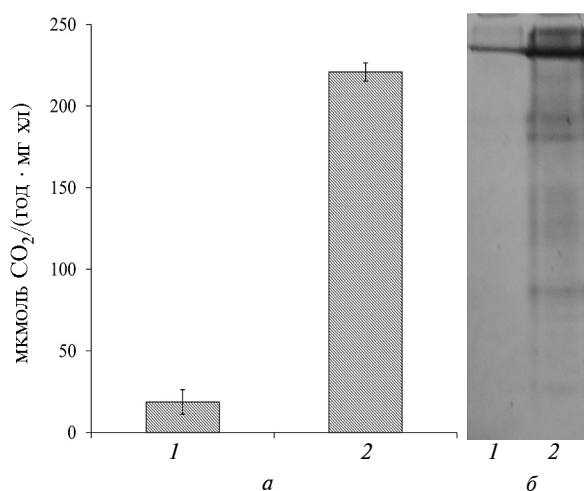


Рис. 1. Карбоангідразна активність (а) та електрофореграми білків (б) надосаду до осмотичного руйнування хлоропластів (1) і стромальної фракції (2), отриманої після осмотичного руйнування

терігали автори праці [13], які вимірювали швидкість гідратації CO₂ потенціометричним методом Вілбура та Андерсона [20], з визначенням зміни швидкості закиснення буферного розчину. За даними цієї праці I₅₀ досягалося при 30 мкМ CdCl₂, тоді як 100 мкМ CdCl₂ повністю інгібувало активність стромальних КА. Слід зазначити, що залежність інгібування стромальних КА від концентрації CdCl₂ (див. рис. 2) мала двостадійний характер зміни КА активності в діапазоні концентрацій CdCl₂ 0—30 і 30—80 мкМ. За зростання концентрації CdCl₂ від 30 до 40 мкМ спостерігали пришвидшений спад КА активності, що може свідчити про конформаційні зміни КА та появу чутливішої до інгібування іонами кадмію форми.

Відомо, що в стромі хлоропластів рослин із C₃ шляхом фотосинтезу у великій кількості міститься карбоангідраза β-типу (βКА1). Основною структурною одиницею цього високоактивного ензиму є ди-

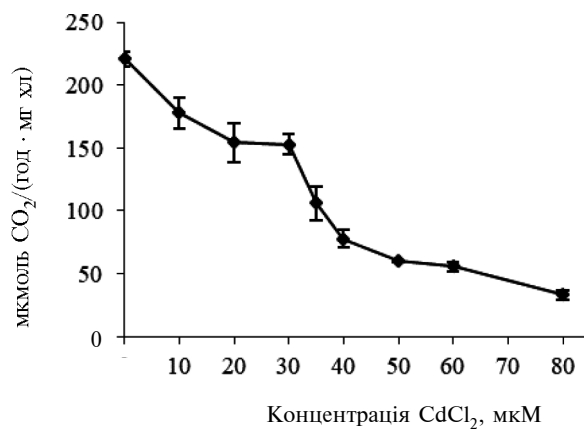


Рис. 2. Залежність дегідратазної активності стромальних карбоангідраз хлоропластів від концентрації CdCl₂

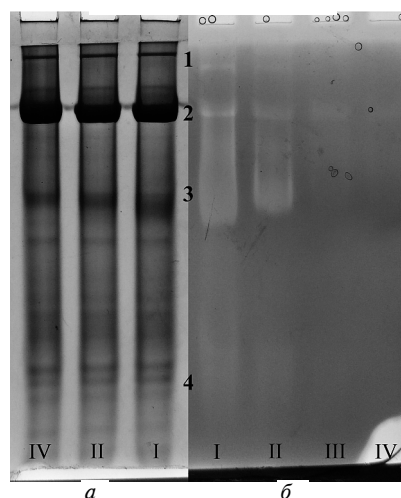


Рис. 3. Электрофореграммы стромальных белков после нативного электрофореза и фарбування Кумассі блакитним G-250 (а) та візуалізація карбоангідразної активності в ПААГ після фарбування бромтимоловим синім (б). Білки перед аналізом інкубували протягом 10 хв за таких концентрацій CdCl₂: I — фракція строми (контроль); II — 20 мкМ Cd²⁺; III — 80 мкМ Cd²⁺; IV — 150 мкМ Cd²⁺; 1–4 — білкові смуги, в яких виявлено КА активність

мер, який залежно від систематичної належності може утворювати тетрамери, гексамери та октамери. У дводольних C₃-рослин βКА1 є октамером [21]. Крім того, в стромі локалізована ще одна ізоформа βКА — βКА5 і, можливо, одна з ізоформ αКА [22]. Ми візуалізували КА активність у ПААГ після нативного електрофорезу за допомогою рН-залежного барвника бромтимолового синього. В гелі, у місці локалізації КА, відбувалися гідратація CO₂ і локальне закиснення середовища, що супроводжувалося зміною забарвлення індикатора і появою жовтих смуг (рис. 3). Необхідною умовою для збереження ферментативної активності в гелі є проведення електрофорезу і процедур, пов'язаних із фарбуванням та візуалізацією при 0 °С. У стромальній фракції, в результаті візуалізації КА активності в ПААГ (див. рис. 3, б) проявились чотири смуги з різною рухливістю і різним рівнем КА активності. Колір бромтимолового синього при добавлянні субстрату КА — CO₂ змінювався з розділенням у часі: першою проявлялася смуга 3, далі 4, потім 2, останньою з'являлася смуга 1 (дані візуалізації в часі не наводимо). Ми вважаємо, що порядок зміни кольору в ході карбоангідразної реакції відповідає ензиматичній активності білкових смуг.

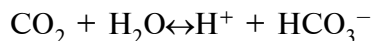
На електрофореграмах стромальних білків (див. рис. 3, а), проявлених Кумассі блакитним G-250, найінтенсивніша смуга відповідає РБФК/О — білка строми з найбільшим вмістом. Із порівняння білкових смуг зі смугами візуалізації КА активності випливає, що смуга 2, ймовірно, належить асоціату КА з РБФК/О. Смуга 1 із КА активністю ймовірно також є мультиферментним комплексом. Оскільки молекулярна маса РБФК/О становить близько 560 кД, очевидно, що поліпептиди, локалізовані на електрофореграмі в смугах 1 і 2 (див. рис. 3, а) мають молекулярну масу вищу за 200 кД — молекулярну

масу октамера β КА1 [21]. Дослідженням кристалічної структури β КА1 *Pisum sativum* встановлено, що високоактивна форма β КА1 існує як октамер із молекулярною масою 200 кД [21]. Ймовірно, що в наших дослідженнях цю високоактивну форму — октамер β КА1 — можна віднести до смуги 3, а димер β КА1 — до смуги 4.

Для визначення впливу іонів Cd^{2+} на активність різних форм КА зразки стромальних білків перед електрофоретичним аналізом інкубували з додаванням різних концентрацій CdCl_2 . Результати розділення стромальних білків, оброблених CdCl_2 , наведено на рис. 3, а. Як бачимо, після фарбування Кумасі відмінностей у кількості та розподілі білкових смуг між контролем та варіантами, обробленими хлоридом кадмію, немає.

Зміну рівня ензиматичної активності в білкових смугах після обробки стромальних білків CdCl_2 ілюструє рис. 3, б. З нього видно, що після обробки зразків 20 мкМ Cd^{2+} КА активність усіх чотирьох смуг у гелі дещо знижувалася, про що свідчить зменшення інтенсивності їх забарвлення при додаванні субстрату. Після обробки 80 мкМ Cd^{2+} активність високоактивних ізоформ КА істотно знижувалася (смуги 3 і 4), тоді як ізоформа КА, яка мігрує разом із РБФК/О, виявилася стійкішою до цієї концентрації Cd^{2+} . У препаратах, оброблених 150 мкМ Cd^{2+} , КА активність низькомолекулярної ізоформи КА (смуга 4), високоактивної (смуга 3) і смуги 1 пригнічувалася майже повністю. Натомість ензиматична активність ізоформи КА (смуга 2), що мігрує разом із РБФК/О, до кінця не інгібувалася при обробці CdCl_2 . Отже, згідно з результатами роботи, різні форми стромальної КА хлоропластів шпинату мають різну чутливість до дії іонів кадмію.

Локалізовані в різних органах множинні форми рослинних карбоангідраз є цинковмісними металоензимами, які каталізують оборотну реакцію гідратації вуглекислого газу:



Вони є представниками еволюційно незалежних родин (α КА, β КА і γ КА) і відіграють фундаментальну роль у низці біохімічних процесів, включаючи фотосинтез і дихання, біосинтез амінокислот і жирних кислот, а також беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного рН, підтриманні кислотно-основної рівноваги [23].

У рослин із C_3 -типом фотосинтезу найпоширенішими є КА β -родини [23]. У геномі *Arabidopsis thaliana* виявлено шість генів (*AtβCA1-6*), що кодують β КА, а їх множинні ізоформи утворюються внаслідок альтернативного сплайсингу транскриптів КА [24, 25]. Локалізацію різних КА у компартментах клітин було виявлено методом вбудовування гена зеленого флуоресцентного білка (GFP). Так, ізоформи β КА1 і β КА5 локалізовані в стромі хлоропластів; β КА2, β КА3 і β КА4 — в цитоплазмі; β КА4 — в плазматичній мембрані; β КА6 — у матриксі мітохондрій [23, 26].

Стромальна карбоангідраза β КА1 є другим за вмістом (після РБФК/О) розчинним білком клітин мезофілу листків. Її кількість може досягати 2 % загальної кількості розчинних білків у C_3 -рослин [27]. β КА1 — високоактивний ензим, здатний забезпечувати над-

звичайно високу швидкість перетворення субстрату. Каталітична константа β КА1 гороху ($k_{cat} = 4 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$) близька до α КАІІ людини ($k_{cat} = 1,0 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$) — одного з найшвидших ферментів [28]. Активний центр β КА містить молекулу цинку, координаційно зв'язану з залишком гістидину, двома залишками цистеїну і молекулою води. Активною одиницею β КА є димер, активний центр якого розміщений між двома мономерами. Молекулярна маса β КА змінюється від 25 кД (мономер) до 200 кД (октамер) [21].

У цій роботі за електрофоретичного розділення білків стромальної фракції виявлено чотири смуги з КА активністю, дві з яких, очевидно, належать білковим асоціатам із молекулярною масою, що близька або перевищує молекулярну масу РБФК/О (смуги 2 й 1), (див. рис. 3, б). Тісна асоціація РБФК/О і карбоангідрази у карбоксисомах водоростей і фотосинтезуючих бактерій забезпечує роботу механізму концентрування вуглецю (carbon concentrating mechanism, CCM) [29]. Наявність асоціату карбоангідрази і РБФК/О, а також мультиферментного комплексу РБФК/О, карбоангідрази, фосфорibuлокінази, рибозо-5-фосфатізомерази з молекулярною масою понад 600 кД у хлоропластах тютюну виявили автори праці [30]. На їх думку, асоціат карбоангідрази і РБФК/О є частиною цього високомолекулярного комплексу, який відокремлюється при хроматографічному розділенні.

Згідно з результатами нашого дослідження, всі чотири білкові смуги з КА активністю різною мірою чутливі до інгібування іонами кадмію (див. рис. 3, б). Залежність КА активності стромальних білків від концентрації Cd^{2+} в цілому відрізняється від картини, яку ми спостерігали в нашій попередній роботі при вивченні дії іонів Cu^{2+} [14]. Зокрема, I_{50} сумарної КА активності стромальних білків досягалося за добавляння 3 мкМ Cu^{2+} , тоді як I_{50} для іонів Cd^{2+} становило 35 мкМ (див. рис. 2). Згідно з літературними даними, пошкодження КА є одним із критичних чинників, що зумовлює токсичність важких металів для живих клітин, яка змінюється в широких межах і залежить від типу тканин. Так, I_{50} для іонів Cd^{2+} становить від 20 мкМ (α КА клітин зябер річкового вугра) до 900 мкМ (α КА еритроцитів канального сома) [31].

Селективну чутливість КА різних організмів до інгібування важкими металами використовують при створенні систем біомоніторингу навколишнього середовища [31–33]. Однак реакція множинних КА рослин на наявність у воді і ґрунті важких металів досі залишається малодослідженою і потребує подальшого вивчення.

Отже, результати нашої роботи підтвердили різну чутливість ізоформ КА та їх високомолекулярних асоціатів до інгібування іонами кадмію, а також можливість використання КА хлоропластів як біомаркера раннього моніторингу забруднення навколишнього середовища.

REFERENCES

1. <https://eur-lex.europa.eu/>

2. Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K. & Antunes, P. M. (2016). Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 241, pp. 73-137. doi: 10.1007/398_2016_8.
3. Ilyin, V.B. (2012). Heavy metals and non-metals in the soil-plant system. *Novosibirsk: Science*. 218 p. [in Russian].
4. Kupper, H. & Leitenmaier, B. (2013). Cadmium-accumulating plants. In *Cadmium: from toxicity to essentiality*. Springer, Dordrecht, pp. 373-393.
5. Dias, M. C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Goncalves, B. & Santos, C. (2012). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiol. Plant.*, 35, No. 4, pp. 1281-1289. doi: 10.1007/s11738-012-1167-8.
6. Benavides, M. P., Gallego, S. M., & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian J. of Plant Physiol.*, 17, No. 1, pp. 21-34. doi:10.1590/S1677-04202005000100003.
7. Perreault, F., Dionne, J., Didur, O., Juneau, P. & Popovic, R. (2011). Effect of cadmium on photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*: alteration of O-J-I-P fluorescence transients indicating the change of apparent activation energies within photosystem II. *Photosynth. Res.*, 107, No. 2, pp. 151-157. doi: 10.1007/s11120-010-9609-x.
8. Faller, P., Kienzler, K. & Krieger-Liszka, A. (2005). Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochim. Biophys. Acta*, 1706, No. 1-2, pp. 158-164. DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.10.005.
9. Sigfridsson, K.G.V., Bernat, G., Mamedov, F. & Styring, S. (2004). Molecular interference of Cd²⁺ with photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1659, pp.19-31. doi:10.1016/j.bbabi.2004.07.003.
10. Fagioni, M., D'Amici, G.M., Timperio, A.M. & Zolla, L. (2009). Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. *J. Proteome Res.* 8, pp. 310-326. doi: 10.1021/pr800507x.
11. Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S. & Massacci, A. (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis*. *Plant Physiol.*, 133, No. 2, pp. 829-837. doi: 10.1104/pp.103.026518.
12. Krupa, Z., Oquist, G. & Huner, N. P. (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiol. Plant.*, 88, No. 4, pp. 626-630. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01381.x.
13. Asencio, C.I. & Cedeno-Maldonado, A. (1978). Effects of cadmium on carbonic anhydrase and activities dependent on electron transport of isolated chloroplasts. *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, 63, pp. 195-201.
14. Polishchuk, A. V., Semenihin, A. V., Topchiy, N. M. & Zolotareva, O. K. (2018). Inhibition of multiple forms of carbonic anhydrases of spinach chloroplasts by Cu ions. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 4, pp. 94-101. doi: https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.04.094 [in Ukrainian].
15. Hall, D. O. (1972). Nomenclature of isolated chloroplasts. *Nature*, 235, No. 56, pp. 125-128.
16. 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.
17. Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, No. 1, pp. 1-15.
18. Ornstein, L. & Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, pp. 321-349.
19. Edwards, L. J. & Patton, R. L. (1966). Visualization of carbonic anhydrase activity in polyacrylamide gel. *Stain Technol.*, 41, No. 6, pp. 333-334.
20. Wilbur, K.W. & Anderson, N.G. (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 176, pp. 147-154.
21. Kimber, M.S. & Pai, E.F. (2000). The active site architecture of *Pisum sativum* beta-carbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha-carbonic anhydrases. *EMBO J.*, 19, No. 7, pp. 1407-1418. https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1407.

22. Rudenko, N.N., Ignatova, L.K., Fedorchuk, T.P. & Ivanov, B.N. (2015). Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. *Biochemistry*, 80, No. 6, pp. 798-813. DOI: 10.1134/S0006297915060048.
23. Fabre, N., Reiter, I.M., Becuwe-Linka, N., Genty, B. & Rumeau, D. (2007). Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 30, pp. 617-629. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01651.x.
24. Moroney, J.V., Bartlett, S.G. & Samuelsson, G. (2001). Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ.*, 24, pp. 141-153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00669.x>.
25. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.09.001>
26. DiMario, R.J., Quebedeaux, J.C., Longstreth, D.J., Dassanayake, M., Hartman, M.M. & Moroney, J.V. (2016). The cytoplasmic carbonic anhydrases β -CA2 and β -KA4 are required for optimal plant growth at low CO₂. *Plant Physiol.*, 171, pp. 280-293. doi/10.1104/pp.15.01990.
27. Badger, M.R. & Price, G.D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, pp. 369-392.
28. Johansson, I.M. & Forsman, C. (1993). Kinetic studies of pea carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 218, No. 2, pp. 439-446.
29. Kaplan, A. & Reinhold, L. (1999). CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 50, No. 1, pp. 539-570.
30. Jebanathirajah, J. A. & Coleman, J.R. (1998). Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 204, pp. 177-182.
31. Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Erroi, E. & Schettino, T. (2012). Carbonic anhydrase and heavy metals. *Biochemistry* ed. by Ekinici D., pp. 205-224. ISBN: 978-953-51-0076-8.
32. 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, No. 127, pp. 1-14.
33. Soyut, H., Beydemir, C. & Hisar, O. (2008). Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow. Trout. *Biol. Trace Elem. Res.*, 123, No. 1, pp. 179-190.

Received 28.01.2019

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Cd²⁺ НА АКТИВНОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА

Н.Н. Топчий¹, А.В. Полищук¹, Е.К. Золотарева¹, С.К. Сытник²

¹Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Национальной академии наук Украины, Киев

e-mail: ntopchiy@ukr.net

²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Фракция стромальных белков хлоропластов, изолированных из листьев *Spinacia oleracea*, получена после осмотического разрушения целых хлоропластов, отмытых от компонентов цитозоля. Методом инфракрасного CO₂-анализа исследовано влияние ионов кадмия на активность стромальных карбоангидраз (КА). Полумаксимальное ингибирование дегидратазной активности КА наблюдалось при добавлении к реакционной среде 35 мкМ CdCl₂, при добавлении 80 мкМ ферментативная активность составляла 15 % контрольного значения. КА активность в ПААГ после неденатурирующего электрофореза визуализировали по изменению окраски индикатора бромтимолового синего в местах локализации КА. Обнаружены четыре белковые зоны с разной подвижностью и с различным уровнем КА активности. Количество зон с КА активностью и интенсивность их окраски уменьшались после предобработки

стромальных белков CdCl₂ разной концентрации. Наиболее чувствительной к действию Cd²⁺ оказалась низкомолекулярная форма КА, активность которой полностью подавлялась в образцах, обработанных 80 мкМ CdCl₂, тогда как КА, ассоциированная с РБФК/О, частично сохраняла активность после инкубации стромальных белков со 150 мкМ CdCl₂. Полученные данные подтвердили возможность использования КА хлоропластов как биомаркера раннего мониторинга загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами.

Ключевые слова: *Spinacia oleracea*, кадмий, карбоангидраза, биомаркер.

THE INFLUENCE OF Cd²⁺ IONS ON THE ACTIVITY OF STROMAL CARBONIC ANHYDRASES OF SPINACH CHLOROPLASTS

N.M. Topchii¹, O.V. Polishchuk¹, E.K. Zolotareva¹, S.K. Sytnyk²

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine

2 Tereshchenkivska St., Kyiv, 01004, Ukraine

² Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine

31/17 Vasylsivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The fraction of stromal proteins was obtained after osmotic destruction of whole chloroplasts isolated from spinach leaves (*Spinacia oleracea*) and washed from the cytosol components. The effect of cadmium ions on the activity of stromal carbonic anhydrase (CA) was studied by infrared CO₂ analysis. The half-maximal inhibition of CA dehydratase activity was observed under 35 μM CdCl₂ in the solution; at 80 μM CdCl₂, the enzyme activity was 15 % of the control. The CA activity in PAAG after non-denaturing electrophoresis was visualized by the change in the color of the bromothymol blue indicator at the sites of CA localization. Four protein zones with different mobility and different levels of CA activity were identified. The number of zones with CA activity and the intensity of their staining decreased after pre-incubation of the stromal proteins with CdCl₂, depending on its concentration. The low molecular weight form of CA was the most sensitive to the Cd²⁺ action, whose activity was completely suppressed in the samples treated with 80 μM CdCl₂, while the CA migrated together with Rubisco remained partly active after stromal proteins incubation with 150 μM CdCl₂. The obtained data confirm the possibility of chloroplast CA using as a biomarker for early monitoring of the environmental pollution by heavy metals.

Key words: *Spinacia oleracea*, cadmium, carbonic anhydrase, biomarker.