

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КАРБОАНГИДРАЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА

Топчий Н.Н.¹, Полищук А.В.¹, Сытник С.К.²

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

²Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина

Карбоангидраза (КА, карбонатгидролиаза КФ 4.2.1.1) – один из самых распространенных металлоферментов, катализирующий обратимую гидратацию CO_2 в живых организмах от прокариот до человека. У высших растений КА представлена тремя семействами (α -КА, β -КА, γ -КА), каждое из которых включает множественные изоформы [1], что свидетельствует об их независимом эволюционном происхождении.

У *Arabidopsis* идентифицировано не менее 17 генов, кодирующих α -, β - и γ - КА, однако клеточная локализация некоторых изоформ остается неизвестной [1]. В хлоропластах, кроме большого количества β -карбоангидразы 1 (β -КА1) и значительно меньшем содержании α -КА1 в стромальном компартменте, выявлено β -КА5 и α -КА4 в тилакоидных мембранах. Показано присутствие КА в пигмент-белковом комплексе ФСII, вблизи комплекса ФСI и в люменальном пространстве тилакоидов. β -КА1 обычно представляют собой олигомеры, состоящие из 2–8 мономеров по 25–30 кДа. Кроме того, сообщалось [2] о формировании крупных гетероолигомеров КА и ферментов цикла Кальвина, включающих РБФ-карбоксилазу.

В разных биологических объектах активность КА эффективно подавляется ионами тяжелых металлов (ТМ) [3], однако их влияние на растительные КА до настоящего времени мало изучено. Целью настоящей работы было исследование влияния ионов тяжелых металлов (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+) на активность различных форм стромальных КА. Для достижения этой цели были получены целые хлоропласты, после осмотического разрушения которых фракция стромы отделялась от фракции тилакоидных мембран.

Целостность хлоропластов оценивали по уровню КА активности водных фракций, полученных после осаждения хлоропластов и их последовательных промывок. КА активность определяли методом инфракрасного газового анализа (ИКГА) по скорости выделения CO_2 до и после разрушения хлоропластов. Фракции растворимых белков разделяли с помощью нативного электрофореза в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-RAD). Визуализацию КА в гелях осуществляли по методу Эдвардса и Петтона [4].

На ПААГ изолированной стромальной фракции хлоропластов проявлялись 4 зоны КА активности, которые отвечали высоко- и низкомолекулярным белкам и меняли окраску в растворе бромтимолового синего в условиях насыщения CO_2 . Эти зоны имели разную энзиматическую активность, о чем свидетельствовала неодновременность визуализации полос: последней окрашивалась наиболее высокомолекулярная фракция. КА активность белковых зон в геле по-разному изменялась после обработки препаратов стромы растворами солей ТМ. По данным ИКГА все изученные ТМ подавляли КА активность стромальной фракции, но очень различались по эффективности ингибирования. Для 50% ингибирования КА было достаточно 200–300 нМ Ag^+ , тогда как I_{50} для Cu^{2+} составляла 3 мкМ, для Cd^{2+} – 35 мкМ, а для Zn^{2+} – более 80 мкМ.

Библиографические ссылки

1. DiMario R.J., Clayton H., Mukherjee A., Ludwig M. Moroney Plant Carbonic Anhydrases: Structures, Locations and Physiological Roles // Mol. Plant. 2017. Vol. 10. P. 30–46.
2. Jebanathirajah J.A. et al. Association of Carbonic Anhydrase // Planta. 1998. Vol. 204. P. 177–182.
3. Lionetto M.G., Caricato R., Giordano M.E., Schettino T. The complex relationship between metals and carbonic anhydrase // Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17. P. 1–14.
4. Edwards L.J., Patton R.L. Visualization of carbonic anhydrase activity in polyacrylamide gels // Stain Technol. 1966. Vol. 41. P. 333–334.