



УДК 577.23

<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.01.092>

А. П. Хомочкін, А. В. Семеніхін, О. К. Золотарьова

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

E-mail: membrana@ukr.net

Дія інгібіторів карбоангідрази на ензиматичну активність ізольованої тилакоїдної CF_1 АТФази

(Представлено академіком НАН України К. М. Ситником)

Досліджено дію інгібіторів карбоангідрази — ацетазоламиду (АА) і етоксизоламиду (ЕА) на ферментативну активність ізольованого чинника спряження CF_1 — каталітичної частини АТФ-синтазного комплексу хлоропластів. Фермент виділяли з хлоропластів шпинату, обробляючи їх 1 мМ ЕДТА. Показано, що карбоангідрозна активність CF_1 , визначена в розчині за прискоренням утворення CO_2 в реакції дегідратації гідрокарбонату, становить 73 мкмоль $CO_2 \cdot (мг\ білка \cdot хв)^{-1}$ і майже в 30 разів перевищує АТФазну активність ферменту. АА і ЕА інгібують як АТФазну, так і карбоангідразну активність CF_1 . I_{50} для Ca^{2+} -АТФазної реакції, що каталізується ізольованим CF_1 у розчині, становить 2 мкМ для АА і ЕА. АТФазна активність дещо зростає при збільшенні концентрації ЕА. 50% інгібування карбоангідразної активності досягається за наявності 2 мкМ АА і 12 мкМ ЕА. Зроблено висновок, що і водорозчинний АА, і жиророзчинний ЕА пригнічують як АТФазну, так і карбоангідразну активність ферменту при близьких і відносно низьких концентраціях. Функціональна роль виявленої карбоангідразної активності може полягати в полегшенні перенесення протонів, які поглинаються або виділяються в реакції синтезу або гідролізу АТФ відповідно.

Ключові слова: карбоангідраза, гідроліз АТФ, ацетазоламід, CF_1 АТФаза, фотосинтетичні мембрани хлоропластів.

CF_1 АТФаза є водорозчинним ензимом, який входить до складу АТФ-синтазного комплексу фотосинтезуючих (тилакоїдних) мембран хлоропластів і містить каталітичні і регуляторні центри, що беруть участь у синтезі АТФ [1]. Як і каталітичні частини мітохондріальних і бактеріальних АТФ-синтаз, CF_1 АТФаза складається з п'яти типів субодиниць у стехіометричному співвідношенні $\alpha : \beta : \gamma : \delta : \epsilon \sim 3 : 3 : 1 : 1 : 1$ [2–4]. Після відокремлення від мембрани CF_1 АТФаза втрачає здатність каталізувати синтез АТФ, але зберігає АТФазну активність [3].

© А. П. Хомочкін, А. В. Семеніхін, О. К. Золотарьова, 2016

CF₁ АТФаза хлоропластів є водорозчинним ензимом і може бути відділена від тилакоїдних мембран при їх обробці ЕДТА. На відміну від інших F₁ АТФаз, АТФазна активність ізольованого CF₁ є латентною (прихованою), тобто вона відсутня в ізольованого ензиму та індукується при нагріванні, обробці тіоловими сполуками, трипсином або детергентами [5]. Значна активація АТФазної активності досягається також при додаванні до реакційного середовища деяких оксоаніонів — бікарбонату, борату, фосфату і деяких інших [6]. Екзогенний бікарбонат здатен також стимулювати синтез АТФ у тилакоїдах [7].

Нещодавно ми виявили, що ізольована CF₁ АТФаза здатна також каталізувати реакцію взаємоперетворення форм карбонатної кислоти $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, тобто виявляє карбоангідразну активність [8].

Функціональна роль цієї активності лишається невизначеною, але було висунуто припущення про її можливу участь у полегшенні протонного перенесення крізь CF₁ АТФазу, з яким пов'язані реакції синтезу і гідролізу АТФ у мембранному поліпептидному комплексі АТФ-синтази.

Мета дослідження полягала у визначенні ензиматичної активності ізольованої CF₁ АТФази та вивченні її реакції на присутність специфічних інгібіторів карбоангідрази — ацетозоламідю (АА) і етоксизоламідю (ЕА).

Карбоангідразну активність ізольованого ензиму визначали в розчині за швидкістю утворення CO₂ за наявності бікарбонату за допомогою інфрачервоного газового аналізу.

Хлоропласти виділяли зі свіжого листя шпинату як описано раніше [7] і руйнували протягом 10 хв у гіпотонічному середовищі, що містило 50 мМ трис-НCl (рН 7,8) і 10 мМ NaCl.

Тилакоїди двічі промивали гіпотонічним середовищем, переосаджували протягом 10 хв при 15 000 g та використовували для виділення препарату чинника спряження за методом Лієна і Рекера [3] та Степанової і Нікифорової [9] з деякими модифікаціями. Усі операції по ізоляції тилакоїдів і CF₁ виконували при 0–4 °С. Концентрацію протеїну визначали за Лоурі [10].

Чистоту отриманого препарату CF₁ оцінювали за результатами електрофорезу зі зміщенням заряду як описано раніше [8]. Субодиничний склад CF₁ аналізували після візуалізації поліпептидних зон ПААГ ДДС-денатуруючого електрофорезу в модифікованій системі Леммлі [8]. Поліпептидні зони виявляли за допомогою барвника кумассі R-250.

Латентний ізольований ензим активували нагріванням, для чого препарат (1,5–2,0 мг) вносили в розчин, що містить 10 мМ АТФ, 5 мМ дитіотрейтолу і 25 мМ трис-НCl (рН ~ 7,9), 10 мМ CaCl₂. Суміш поміщали на водяну баню з температурою 60 °С та термостатували протягом 3 хв, після чого переносили в посудину з водою кімнатної температури. Ca²⁺-АТФазну активність визначали при 26 °С за кількістю утвореного неорганічного фосфору в реакційному середовищі, що містило 15 мМ трис-НCl, рН 7,9, 5 мМ АТФ та 5 мМ CaCl₂, і виражали в мкмоль Фн · (мг протеїну · хв)⁻¹ [9]. Кількість Фн у пробі визначали методом Лоурі та Лопеса в модифікації Скулачова [11].

Швидкість карбоангідразної реакції за наявності ізольованого CF₁ і в контролі визначали за кількістю CO₂, який утворюється при дегідратації бікарбонату, в зачиненій комірці інфрачервоного газового аналізатора (ІФГА) (S151, “Qubit Systems Inc.”, Канада) при 20 °С в потоці повітря з постійним вмістом CO₂ (610 ppm). Реакційне середовище (2 мл) містило 2,5 мМ бікарбонату натрію і 50 мМ трис-НCl (рН 7,6).

Згідно з результатами електрофоретичного розділення ізольованого CF₁ (рис. 1), у препараті присутній практично один поліпептидний комплекс з молекулярною масою близь-

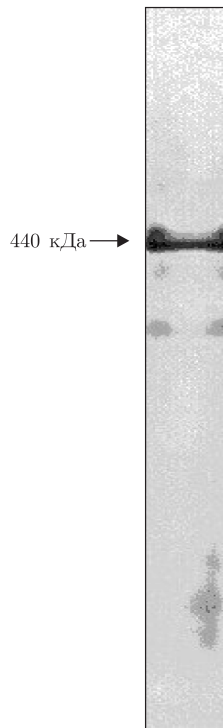


Рис. 1. Електрофореграма нативного білка (безбарвний нативний електрофорез зі зміщенням заряду): очищений чинник спряження CF_1

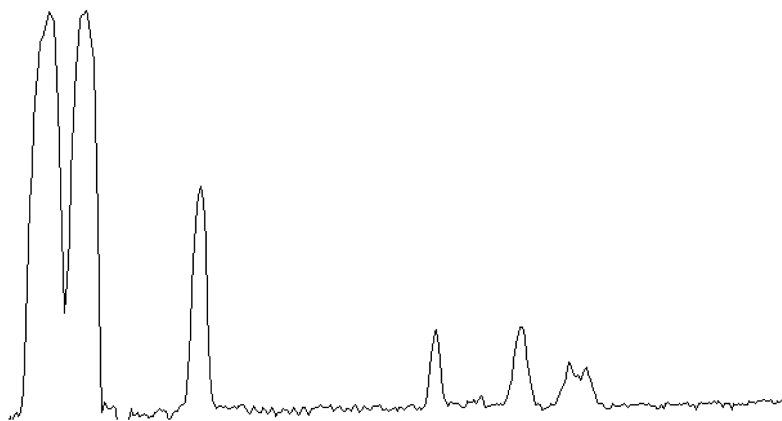


Рис. 2. Денситограма, отримана шляхом сканування ПААГ гелю, після візуалізації поліпептидних зон, розділених за наявності ДДС натрію. (Денситограма виконана за допомогою програмного забезпечення ImageJ)

ко 440, що, за даними робіт [2, 4], відповідає значенням, характерним для чинника CF_1 . Аналіз субодиночного складу за даними електрофоретичного розділення денатурованого комплексу за наявності ДДС натрію показав присутність п'яти типів поліпептидів (рис. 2) з молекулярною масою 60 кДа (α -субодиноця), 56 кДа (β -субодиноця), 39 кДа (γ -субодиноця), 20,5 кДа (δ -субодиноця), 14,7 кДа (ϵ -субодиноця). Це також відповідає літературним даним [2–4] і підтверджує, що отриманий препарат є чинником спряження CF_1 .

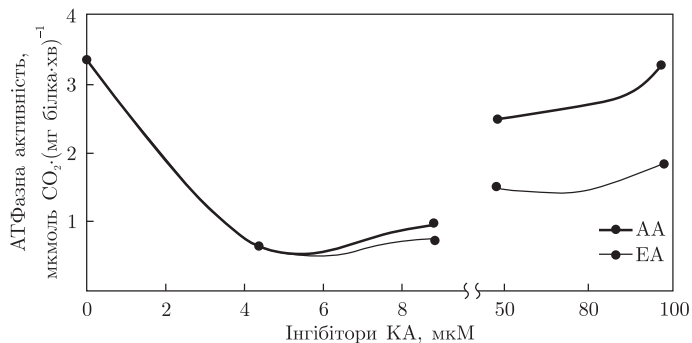


Рис. 3. Вплив інгібіторів карбоангідрازی (КА) ацетазоламід (AA) і етоксизоламід (EA) на Ca^{2+} -АТФазну активність ізольованого чинника спряження

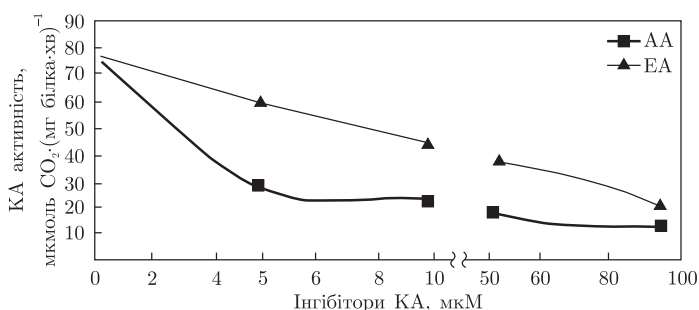


Рис. 4. Вплив інгібіторів карбоангідрازی (КА) ацетазоламід (AA) і етоксизоламід (EA) на карбоангідразну активність ізольованого чинника спряження

АТФазна активність препарату CF_1 за наявності іонів Ca^{2+} після теплової активації становила близько $3,5 \text{ мкмоль} \cdot (\text{мг протеїну} \cdot \text{хв})^{-1}$ (рис. 3). Активовані ферменти інкубували за умов зростаючих концентрацій (від 1 мкМ до 1 мМ) інгібіторів карбоангідрازی — AA і EA. Встановлено, що швидкість реакції Ca^{2+} -залежного гідролізу АТФ знижувалася в міру підвищення концентрації AA і EA (див. рис. 3). Концентрація AA і EA, яка викликала 50% інгібування АТФазної реакції, становила близько 2 мкМ. При зростанні концентрації EA швидкість реакції гідролізу АТФ дещо підвищувалася, чого не спостерігалося при підвищенні концентрації AA.

Наявність карбоангідразної активності в ізольованому препараті CF_1 тестували, визначаючи кількість утвореного CO_2 в розчині гідрокарбонату натрію (рис. 4). Швидкість дегідратаційної реакції значно зростала порівняно з контролем і за наявності CF_1 становила близько $73 \text{ мкмоль} \cdot (\text{мг протеїну} \cdot \text{хв})^{-1}$, тобто карбоангідразна активність ізольованого CF_1 перевищувала майже в 30 разів його Ca^{2+} -АТФазну активність. Інгібітори карбоангідрازی ефективно пригнічували швидкість дегідратаційної реакції, причому водорозчинний AA більшою мірою, ніж жиророзчинний EA. 50% інгібування реакції дегідратації бікарбонату досягалося при концентрації близько 2 мкМ AA і 12 мкМ EA.

Таким чином, визначення карбоангідразної активності в ізольованого чинника спряження CF_1 у розчині показало, що поряд зі здатністю прискорювати гідроліз АТФ цей комплекс також ефективно каталізує перетворення форм карбонатної кислоти, причому обидві функції CF_1 пригнічувалися специфічними сульфаниламідними інгібіторами карбоангідраз-ацетазоламідом і етоксизоламідом у мікромольних концентраціях. Чутливість ізольованого

CF₁ до сульфаніламідів виявилася значно вищою порівняно з мембранними реакціями на рівні тилакоїдів. Так, Москвін зі співавт. [12] показали, що карбоангідразна активність тилакоїдних мембран та їх фрагментів пригнічується за наявності близько 1 мМ АА або ЕА.

Було показано також, що світлозалежний синтез АТФ в тилакоїдах інгібується за наявності 500 мкМ АА, тобто при концентрації в 250 раз вищій за I₅₀ для Ca²⁺-АТФазної реакції, яку каталізував ізольований CF₁ в розчині (див. рис. 3).

Роботами останніх років визначено, що в хлоропластах локалізовано декілька карбоангідраз α-і β-типу [13]. За кількістю хлоропластні карбоангідрози β-типу значно переважають α-тип, хоча точна локалізація і функціональне значення цих ензимів до цього часу не відомі.

Встановлено наявність карбоангідразної активності в двох місцях пігмент-білкового комплексу фотосистеми II (ФСII): 1 — поблизу комплексу фотосистеми I, 2 — в люменальному просторі тилакоїдів [12–14]. Нещодавно в мутантних рослинах з нокаутом гена, що кодує α-КА4, був зареєстрований підвищений вміст крохмалю в листках при значному збільшенні кількості та розміру крохмальних зерен. За умов варіювання вмісту CO₂ в середовищі було показано, що від рівня експресії α-карбоангідрози 4 (α-КА4) залежить ефективний квантовий вихід ФС II і параметри фотохімічного і нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу.

Автори прийшли до висновку, що роль α-КА4 полягає в прискоренні доставки протонів для активації віолоксантин деепоксидози і структурних перебудов у світлозбиральних комплексах [14]. Були також отримані дані про взаємозв'язок рівня експресії різних карбоангідраз. Так, у мутантів, які не містили α-КА4, істотно збільшувався рівень експресії генів інших карбоангідраз, α-КА2 і вискоекспресивних β-КА1 і β-КА2. Цей факт свідчить на користь припущення про участь тилакоїдних карбоангідраз у забезпеченні мембранного транспорту від комплексів, що генерують протони, до центрів їх трансмембранної транслокації.

Трансмембранний вихід протонів крізь повний комплекс CF₁CF₀ забезпечує циклічні конформаційні перебудови АТФ-синтази тилакоїдів, сполучені із синтезом АТФ.

Наведені в даній роботі результати підтверджують наявність карбоангідразної активності в каталітичній частині АТФ-синтазного комплексу, що, як і активність інших карбоангідраз, виявилася чутливою до дії специфічних інгібіторів сульфаніламідної природи, причому реакція гідролізу АТФ, каталізуюча CF₁, також пригнічувалася при таких самих концентраціях цих інгібіторів. Це може свідчити про участь ендогенної карбоангідразної активності в забезпеченні функціонування АТФ-синтазного комплексу і його каталітичної частини — фактору CF₁. Функціональна роль знайденої карбоангідрози може полягати в полегшенні перенесення протонів, що поглинаються або вивільняються в реакції синтезу або гідролізу АТФ відповідно.

Цитована література

1. *Beke-Somfai T., Lincoln P., Nordén B.* Mechanical control of ATP synthase function: activation energy difference between tight and loose binding sites // *Biochemistry*. – 2010. – **49**, No 3. – P. 401–403. doi: 10.1021/bi901965 c.
2. *Merchant S., Shaner S.L., Selman B.R.* Molecular weight and subunit stoichiometry of the chloroplast coupling factor 1 from *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. Biol. Chem.* – 1983. – **258**, No 2. – P. 1026–1031.
3. *Lien S., Racker E.* Preparation and assay of chloroplast coupling factor CF1 // *Methods Enzymol.* – 1971. – **23**. – P. 547–555.

4. Tiedge H., Lünsdorf H., Schafer G., Schairer H. U. Subunit stoichiometry and juxtaposition of the photosynthetic coupling factor 1: Immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1985. – **82**. – P. 7874–7878.
5. Mills J. D., Mitchell P. Thiol modulation of the chloroplast protonmotive ATPase and its effect on photophosphorylation // Biochim. Biophys. Acta. – 1984. – **764**, No 1. – P. 93–104.
6. Мальян А. Н. Некаталитические нуклеотидсвязывающие центры: свойства и механизм участия в регуляции активности АТФ-синтаз // Успехи биол. химии. – 2013. – **53**. – С. 297–322.
7. Онойко Е. Б., Полищук А. В., Золотарева Е. К. Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах пшеницы экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы // Доп. НАН України. – 2010. – № 10. – С. 160–165.
8. Семеніхін А. В., Золотарева О. К. Ідентифікація карбоангідразної активності, асоційованої з білковими комплексами фотосинтетичних мембран хлоропластів пшениці // Доп. НАН України. – 2014. – № 6. – С. 151–155.
9. Степанова А. М., Нікіфорова Л. Ф. Методика виділення латентної Ca^{2+} -АТФази із хлоропластів гороха // Методи біохімічного аналізу рослин / Под ред. В. В. Полевого, Г. Б. Максимова. – Ленінград: Изд-во Ленінгр. ун-та, 1978. – С. 62–68.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol Chem. – 1951. – **193**. – P. 265–275.
11. Engelbrecht S., Schurmann K., Junge W. Chloroplast ATP synthase contains one single copy of subunit 6 that is indispensable for photophosphorylation // Eur. J. Biochem. – 1989. – **179**. – P. 117–122.
12. Moskvina O. V., Shutova T. V., Khristina 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**, No 1. – P. 93–100.
13. Rudenko N. N., Ignatova L. K., Ivanov B. N. Several carbonic anhydrases in higher plants thylakoids // Photosynth. Res. – 2007. – **91**, No 1. – P. 81–89.
14. Журикова Е. М., Игнатова Л. К., Семенова Г. А., Руденко Н. Н., Мудрик В. А., Иванов Б. Н. Влияние нокаута гена альфа-карбоангидразы 4 на фотосинтетические характеристики *Arabidopsis thaliana* и накопление крахмала в листьях // Физиология раст. – 2015. – **62**, № 4. – С. 602–604.

References

1. Beke-Somfai T., Lincoln P., Nordén B. Biochemistry., 2010, **49**, No 3: 401–403. doi: 10.1021/bi901965c.
2. Merchant S., Shaner S.L., Selman B. R. J. Biol. Chem., 1983, **258**, No 2: 1026–1031.
3. Lien S., Racker E. Methods Enzymol., 1971, **23**: 547–555.
4. Tiedge H., Lünsdorf H., Schafer G., Schairer H. U. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985, **82**: 7874–7878.
5. Mills J. D., Mitchell P. Biochim. Biophys. Acta., 1984, **764**, No 1: 93–104.
6. Malyan A. N. Uspekhi biol. chem., 2013, **53**: 297–322 (in Russian).
7. Onoiko E. B., Polishchuk A. V., Zolotareva E. K. Dop. NAN Ukraine, 2010, No 10: 160–165 (in Russian).
8. Semenihin A. V., Zolotareva E. K. Dop. NAN Ukraine, 2014, No 6: 151–155 (in Ukrainian).
9. Stepanova A. M., Nikiforova L. F. Methods of isolation of latent Ca^{2+} -ATPase from the pea chloroplasts, Methods of biochemical analysis of plants, Ed. V. V. Polevoy, G. B. Maximov, Leningrad: Izd-vo Leningrad. State University, 1978: 62–68 (in Russian).
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol Chem., 1951, **193**: 265–275.
11. Engelbrecht S., Schurmann K., Junge W. Eur. J. Biochem., 1989, **179**: 117–122.
12. Moskvina O. V., Shutova T. V., Khristina M. S., Ignatova L. K., Villarejo A., Samuelsson G., Klimov V. V., Ivanov B. N. Photosynth. Res., 2004, **79**, No 1: 93–100.
13. Rudenko N. N., Ignatova L. K., Ivanov B. N. Photosynth. Res., 2007, **91**, No 1: 81–89.
14. Zhurikova E. M., Ignatova L. K., Semenova G. A., Rudenko N. N., Mudrik V. A., Ivanov B. N. J. Plant Physiol., 2015, **62**, No 4: 564–569 (in Russian).

Надійшло до редакції 31.07.2015

А. П. Хомочкин, А. В. Семенихин, Е. К. Золотарева

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

E-mail: membrana@ukr.net

Действие ингибиторов карбоангидразы на энзиматическую активность изолированной тилакоидной CF₁ АТФазы

Изучено действие ингибиторов карбоангидразы — ацетазоламида (АА) и этоксизоламида (ЭА) на ферментативную активность изолированного сопрягающего фактора CF₁ — каталитической части АТФ-синтазного комплекса хлоропластов. Фермент выделяли из хлоропластов шпината, обрабатывая их 1 мМ ЭДТА. Показано, что карбоангидразная активность CF₁, которую определяли в растворе по ускорению образования CO₂ в реакции дегидратации бикарбоната, составляет 73 мкмоль CO₂ · (мг белка · мин)⁻¹ и почти в 30 раз превосходит АТФазную активность фермента. АА и ЭА ингибируют как АТФазную, так и карбоангидразную активность CF₁. I₅₀ для Ca²⁺-АТФазной реакции, катализируемой изолированным CF₁ в растворе, составляет 2 мкМ для АА и ЭА. АТФазная активность несколько возрастает при увеличении концентрации ЭА. 50% ингибирование карбоангидразной активности достигается в присутствии 2 мкМ АА и 12 мкМ ЭА. Сделан вывод, что и водорастворимый АА, и жирорастворимый ЭА подавляют как АТФазную, так и карбоангидразную активность фермента при близких и относительно низких концентрациях. Функциональная роль обнаруженной карбоангидразной активности может состоять в облегчении переноса протонов, поглощающихся или выделяющихся в реакции синтеза или гидролиза АТФ соответственно.

Ключевые слова: карбоангидраза, гидролиз АТФ, ацетазоламид, CF₁ АТФаза, фотосинтезирующие мембраны хлоропластов.

A. P. Khomochkin, A. V. Semenikhin, E. K. Zolotareva

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

E-mail: membrana@ukr.net

Effect of carbonic anhydrase inhibitors on enzymatic activity of isolated thylakoid CF₁ ATPase

We studied the effect of carbonic anhydrase inhibitors — acetazolamide (AA) and ethoxylzolamide (EA) — on the enzymatic activity of the isolated coupling factor CF₁ — a catalytic part of ATPsynthase complex of chloroplasts. The enzyme was isolated from spinach chloroplasts after their extraction with 1 mM EDTA. Carbonic anhydrase activity CF₁, which was determined in a solution by the acceleration of the formation of CO₂ in the bicarbonate dehydration reaction, was 73 μmol CO₂ · (min · mg protein)⁻¹ and almost 3 times more than the ATPase activity of the enzyme. Acetazolamide and ethoxylzolamide inhibit both the ATPase and carbonic anhydrase activities of CF₁. I₅₀ for Ca²⁺-ATPase reaction catalyzed by isolated CF₁ in solution was 2 μM for AA and EA. ATPase activity increased somewhat with the concentration of EA. 50% inhibition of the carbonic anhydrase activity was achieved in the presence of 2 μM AA and 12 μM EA, respectively. Thus, water-soluble AA and liposoluble EA inhibit both the ATPase and carbonic anhydrase enzyme activities at similar and relatively low concentrations. The functional role of the discovered carbonic anhydrase activity may consist in facilitating the transfer of protons uptaken or released in the reactions of ATP synthesis or hydrolysis, respectively.

Keywords: carbonic anhydrase, hydrolysis of ATP, acetazolamide, CF₁ ATPase, photosynthetic membranes of chloroplasts.