

А. В. Семеніхін

**Карбоангідразна активність чинника спряження CF_1 ,
ізольованого з хлоропластів шпинату***(Представлено членом-кореспондентом НАН України Є. Л. Кордюм)*

Досліджено карбоангідразну активність чинника спряження CF_1 — каталітичної частини АТФ-синтазного комплексу хлоропластів. Чистоту препарату CF_1 , що виділяли стандартним методом з ізольованих хлоропластів шпинату, перевіряли електрофоретичним аналізом у нативних та денатуруючих умовах (система Леммлі). Властивості отриманого препарату відповідали літературним даним щодо CF_1 : поліпептид складався з 5 типів субодиниць з відповідною молекулярною масою та за наявності іонів Mg^{2+} або Ca^{2+} каталізував реакцію гідролізу АТФ. Під час аналізу ізольованого препарату CF_1 в нативному гелі з використанням рН-індикатора бромтимолового синього доведено, що в буферному розчині, який насичували CO_2 , у місцях локалізації CF_1 колір поліпептидної зони змінюється з синього на жовтий, що свідчить про активацію конверсії вуглекислого газу з утворенням бікарбонату та протонів. Зроблено висновок, що ізольований CF_1 крім АТФазної активності має також карбоангідразну активність. Розглядається ймовірна роль карбоангідразної активності в механізмі синтезу-гідролізу АТФ, що каталізується АТФ-синтазою.

У хлоропластах, мітохондріях і бактеріях синтез-гідроліз АТФ, сполучений з транс-мембранним перенесенням протонів, здійснюється зв'язаним з мембраною ферментом — АТФ-синтазою. Він складається з гідрофобної частини — F_0 , функціонуючої як протонний канал, і гідрофільної частини — чинника спряження F_1 , що виконує каталітичні функції і містить центри зв'язування нуклеотидів [1]. Чинник спряження хлоропластів CF_1 , подібно до каталітичних частин мітохондріальних і бактеріальних АТФ-синтаз, складається з п'яти типів поліпептидів у стехіометричному відношенні $\alpha : \beta : \gamma : \delta : \epsilon = 3 : 3 : 1 : 1 : 1$ [2–4]. 3α і 3β субодиниці, що розташовані навколо подвійної спіралі γ субодиниці, містять три каталітичних і три так звані некаталітичних центри зв'язування нуклеотидів. Назва останніх обумовлена вкрай низькою, несумісною з каталізом, швидкістю обміну нуклеотидів, зв'язаних з цими центрами, з середовищем [5].

CF_1 АТФаза хлоропластів є водорозчинним ферментом і може бути відділена від тилакоїдних мембран при їх обробці ЕДТА. АТФазна активність ізольованого CF_1 , на відміну від інших F_1 АТФаз, є латентною, тобто вона відсутня в ізольованому ферменті та індукується при нагріванні, при обробці тіоловими сполуками, трипсином або детергентами [6]. Значна активація АТФазної активності досягається також при додаванні до реакційного середовища деяких оксианіонів — бікарбонату, борату, фосфату і деяких інших [5]. Екзогенний бікарбонат здатен також стимулювати синтез АТФ у тилакоїдах [7]. Нещодавно, при визначенні ензиматичної активності окремих поліпептидів тилакоїдних мембран після їхнього розділення в ПААГ вдалося показати, що повний АТФ-синтазний комплекс тилакоїдів має карбоангідразну активність [8]. Природа цієї активності та її локалізація у межах мультисубодиничного комплексу $CF_1 \cdot CF_0$ лишаються невідомими.

© А. В. Семеніхін, 2014

Метою дослідження було визначення карбоангідразної активності ізольованого чинника спряження CF_1 — каталітичної частини АТФ-синтази хлоропластів.

Хлоропласти виділяли із свіжого листа шпинату як описано раніше [7] і руйнували протягом 10 хв у гіпотонічному середовищі, що містило 5 мМ трис-НСІ (рН 7,8) і 10 мМ NaCl, розмішуючи розчин на магнітній мішалці. Тилакоїди двічі промивали гіпотонічним середовищем і переосаджували протягом 10 хв при 15000 g та використовували для виділення препарату чинника спряження за методом Лієна і Рекера [5] та Степанової і Нікіфорової [9] з деякими модифікаціями. Відмиті від надлишку солей і розчинних білків тилакоїди суспендували до концентрації 1,0 мг хл/мл у розчині 1,0 мМ ЕДТА, 0,750 М амінокапронова кислота, 50 мМ трис, рН 7,8. Суспензію перемішували протягом 20 хв і після осадження мембран (10 хв при 15 000 g) у супернатант додавали сухий сефадекс G-25, інкубували 45–60 хв, центрифугували при 1000 g 10 хв. Сконцентрований розчин обезсолювали за допомогою центрифугування (1000 g, 10 хв) на сефадексі G-25 у 0,0625 М трис, 0,750 М амінокапронова кислота, рН 6,8. Сконцентрований, очищений препарат використовували для визначення білкового складу та ферментної активності після нативного електрофорезу та ДДС-електрофорезу у ПААГ. Усі операції по ізоляції тилакоїдів і CF_1 виконували при 4 °С. Концентрацію хлорофілу в препаратах тилакоїдних мембран визначали за Арноном [10], концентрацію білка — за Лоурі [11].

Для аналізу чистоти отриманий препарат CF_1 розділяли на протеїнові зони електрофорезом нативного білка зі зміщенням заряду за Андерсоном та ін. і Колісніченком та ін. [8] у модифікованій системі. Розділення проводили в блоках (70 × 80 × 1,5 мм) з градієнтним ПААГ (4–11%) у 0,375 М трис-НСІ буфері (рН 8,8). Концентруючий (формуєчий) гель містив 3,75% акриламід у 0,0625 М трис-НСІ буфері (рН 6,8). Верхній (катодний) та нижній (анодний) електродні буфери склалися з розчину гліцину і трису (25 мМ трис-НСІ, 192 мМ гліцин), рН 8,3. Для забезпечення зміщення заряду в катодний електродний буфер додавали 0,005% розчин ДДС-Na. АТФазну активність визначали методом Алєна і Хінцика [12] та Гоморі [8]. Місце локалізації CF_1 проявлялося у вигляді темно-червоної зони завдяки утворенню нерозчинного PbS. Карбоангідразну активність у гелі візуалізували методом Едвардса і Петтона [8], реєструючи зміну блакитного забарвлення індикатора бромтимолового блакитного на жовте в місці локалізації карбоангідрази.

Для аналізу субодичного складу CF_1 відповідну смужку гелю вирізали та проводили ДДС-денатуруючий електрофорез у модифікованій системі Леммлі у другому напрямку як описано раніше [8]. Поліпептидні зони виявляли за допомогою барвника Кумасі R-250.

Результати електрофоретичного розділення препарату ізольованого CF_1 наведені на рис. 1 (див. вклейку). Видно, що білкові фракції представлені в основному поліпептидом з молекулярною масою 440–450 кДа. Ця величина є близькою до значення молекулярної маси CF_1 , встановленої раніше у роботах [2–4]. Поліпептиди основної зони протеїнової фракції виявляли каталітичну активність у реакції гідролізу АТФ, яку було зафіксовано в гелі за допомогою кольорової реакції з нітратом свинцю (рис. 2, див. вклейку). При додаванні сульфід натрію в місцях локалізації АТФазної активності після інкубації, протягом 8–12 год, з'являються темно-червоні смуги, щільність яких зростає з часом. Цей спосіб локалізації АТФази має ту перевагу, що не призводить до інактивації ферменту і використовується як швидкий і простий якісний тест на АТФазу.

Аналіз субодичного складу основного поліпептиду фракції проводили методом електрофорезу в денатуруючих умовах у системі Леммлі в присутності ДДС-Na. Для цього смужку гелю, яка містила основний поліпептид фракції, що виявила АТФазну активність, ви-

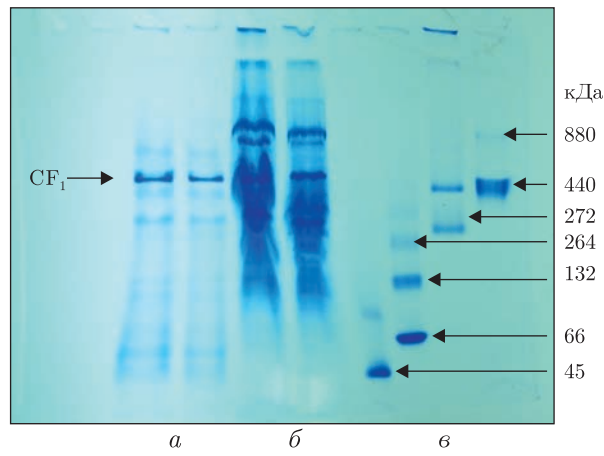


Рис. 1. Електрофореграма нативного білка (безбарвний нативний електрофорез зі зміщенням заряду):
a — очищений чинник спряження CF_1 ; *b* — дигітоніновий солюбілізат тилакоїдів; *c* — білки-маркери

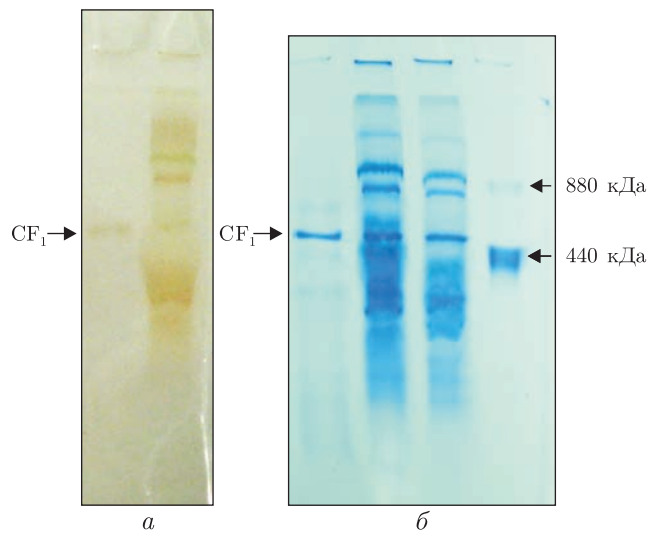


Рис. 2. АТФазна активність білкових зон очищеного чинника спряження після нативного ПААГ електрофорезу:
a — АТФазна активність; *b* — ПААГ, оброблений барвником Кумасі G-250

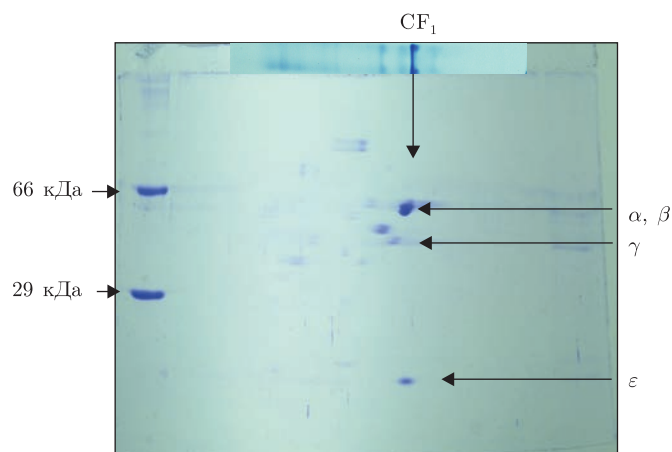


Рис. 3. Електрофореграма пептидного складу чинника спряження тилакоїдних мембран (електрофорез у другому напрямку (система Леммлі)). Субодиниці CF_1 — α (60 кДа), β (56 кДа), γ (39 кДа), δ (20,5 кДа), ϵ (14,7 кДа)

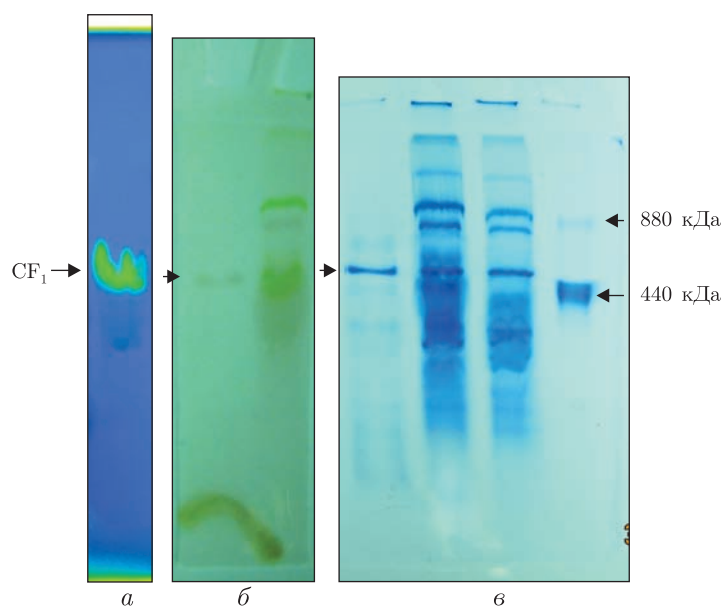


Рис. 4. Карбоангідразна активність білкових зон очищеного чинника спряження після нативного ПААГ електрофорезу:
a — ПААГ, забарвлений бромтимоловим синім; *б* — ПААГ, що інкубували за наявності 2 мМ $CoSO_4$; *в* — ПААГ, оброблений барвником Кумасі G-250 (880 кДа, 440 кДа — білки-маркери (димер та мономер феретину))

різали, інкубували у присутності ДДС-Na та меркаптоетанолу і розділяли в денатуруючій системі ДДС-електрофорезу.

Результати розділення наведені на рис. 3 (див. вклейку). Видно, що зона поліпептиду з орієнтовною молекулярною масою 440–450 кДа розділилася на 4–5 смужок, які за молекулярною масою відповідають основним субодинацям CF_1 . Маса субодинаць чинника спряження CF_1 та їхнє стехіометричне співвідношення відомі і визначені раніше [2–4]. Зіставлення результатів, наведених на рис. 3, з літературними даними свідчить на користь того, що складові отриманого в роботі протеїнового комплексу за набором і молекулярною масою відповідають складу CF_1 . Таким чином, за ознаками орієнтовної молекулярної маси (див. рис. 1), здатності каталізувати реакцію гідролізу АТФ (див. рис. 2) і субодиначного складу (див. рис. 3) основний поліпептид отриманої фракції може бути ідентифікований як чинник спряження хлоропластів CF_1 .

Визначення карбоангідразної активності в протеїнових зонах отриманої фракції проводили в нативному гелі за допомогою рН-індикатору бромтимолового синього, колір якого змінюється з синього на жовтий у діапазоні значень рН від 7,6 до 5,8. Якщо гелі занурені в буферний розчин, насичений CO_2 , у місцях локалізації карбоангідраз активується реакція гідратації вуглекислого газу, у ході якої утворюється нестійка вугільна кислота. При розкладі H_2CO_3 вивільняються протони, які призводять до локального зниження рН, що наочно реєструється зміною кольору індикатору (рис. 4, див. вклейку). Карбоангідразну активність у протеїнових зонах отриманої фракції CF_1 у нативному гелі визначали ще одним методом: гелі занурювали в інкубаційне середовище — 2 мМ $CoSO_4$, 5 мМ H_2SO_4 , 2% (в/об) $NaHCO_3$, 90 мМ Na_2SO_4 та витримували 2 год при 20 °С. Потім гелі обробляли розведеним розчином Na_2S , багаторазово промивали водою. У місцях розташування ферменту утворювався чорний осад сульфиду кобальту (див. рис. 4).

Результати визначення карбоангідразної активності свідчать про те, що поліпептидна зона, яка виявилася каталітично активною в реакції гідролізу АТФ, має також і карбоангідразну активність. Тобто, протеїновий комплекс, локалізований у цій зоні, здатен каталізувати реакцію інтерконверсії вуглекислого газу в бікарбонат з вивільненням і поглинанням протонів відповідно.

Таким чином, результати дослідження підтверджують, що ізольована каталітична частина АТФ-синтази — мультисубодиначний чинник спряження CF_1 поряд з АТФазною має також і карбоангідразну активність. Виникає питання про можливе значення цієї ензиматичної функції для роботи АТФ-синтазного комплексу, фундаментальним призначенням якого є забезпечення синтезу АТФ з АДФ і фосфату. Оскільки за фізіологічних умов фосфорилування АДФ пов'язане з поглинанням, а гідроліз АТФ — з утворенням протонів, то здатність карбоангідрازی прискорювати виведення і перенесення протонів із зони реакції може мати критичне значення для забезпечення високої швидкості реакцій фотофосфорилування і гідролізу АТФ.

Обговорюючи можливу роль виявленої карбоангідразної активності в механізмі роботи АТФ-синтазного комплексу, необхідно зауважити, що всі відомі карбоангідрازی є металоензимами, в активному центрі яких наявний іон цинку [13]. Відомі також кадмієві форми карбоангідрازی, які синтезуються в клітинах деяких діатомових водоростей при дефіциті цинку в середовищі. У цьому зв'язку слід підкреслити, що ні CF_1 , ні повний комплекс АТФ-синтази не містять іонів цинку або кадмію. Також до складу АТФ-синтази обов'язково входять іони магнію, які утворюють разом з АТФ або АДФ субстратні комплекси, компетентні в реакціях гідролізу або синтезу АТФ. Наявність у просторовій структурі CF_1

іонів магнію підтверджується даними, отриманими за допомогою рентгеноструктурного аналізу, які свідчать про наявність трьох молекул MgATФ, включених до некаталітичних центрів CF₁ [14]. Чи здатні ці іони брати участь у забезпеченні карбоангідразної активності комплексу, невідомо. Раніше карбоангідразна активність була виявлена у фотосистемі II — мультисубодиничному хлорофіл-протеїновому комплексі тилакоїдів, який, також як і АТФ-синтаза, не містить ні іонів цинку, ні іонів кадмію [13] і функціонування якої пов'язано з необхідністю транспортування зовні великої кількості протонів, що утворюються при фотосинтетичному розкладі води. До складу фотосистеми II, як показано структурними дослідженнями, входять іони кальцію [13], які, ймовірно, можуть брати участь у формуванні активного центру ензиматичної карбоангідразної реакції.

Роль представників широкої родини карбоангідраз полягає в прискоренні взаємоперетворення бікарбонату і протонів до діоксиду вуглецю і води (або навпаки) — зворотної реакції, що відбувається досить повільно за відсутності каталізатора. Однією з функцій ензиму є стабілізація кислотно-лужного балансу в тканинах тварин і рослин, а також запобігання формуванню локальних градієнтів рН через пришвидшення транспортування протонів із центрів їхнього формування. Численні форми карбоангідраз присутні в різних компартментах рослинних, тваринних і бактеріальних клітин. Можна припустити, що визначена карбоангідразна активність каталітичної частини АТФ-синтази допомагає прискорювати синтез-гідроліз АТФ комплексом CF₁CF₀ через полегшення протонного обміну [15], пов'язаного з конвертацією форм вугільної кислоти.

1. *Bek-Somjai T., Lincoln P., Nordén B.* Mechanical control of ATP synthase function: activation energy difference between tight and loose binding sites // *Biochemistry*. – 2010. – **49**(3). – P. 401–403.
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**(2). – P. 1026–1031.
3. *Tiedge H., Liinsdorf 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.
4. *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.
5. *Lien S., Racker E.* Preparation and assay of chloroplast coupling factor CF₁ // *Meth. Enzymol.* – 1971. – **23**. – P. 547–555.
6. *Мальян А. Н.* Некаталитические нуклеотидсвязывающие центры: свойства и механизм участия в регуляции активности АТФ-синтаз // *Успехи биол. химии*. – 2013. – **53**. – P. 297–322.
7. *Онойко Е. В., Полищук А. В., Золотарева Е. К.* Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы // *Доп. НАН України* – 2010. – № 10. – С. 160–165.
8. *Семеніхін А. В., Золотарьова О. К.* Ідентифікація карбоангідразної активності, асоційованої з білковими комплексами фотосинтетичних мембран хлоропластів шпинату // *Доп. НАН України* – 2014. – № 6. – С. 151–154.
9. *Степанова А. М., Никифорова Л. Ф.* Методика выделения латентной Ca²⁺ – АТФ-азы из хлоропластов гороха // *Методы биохимического анализа растений* / Под ред. В. В. Полевого, Г. Б. Максимова. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. – С. 62–68.
10. *Arnon D. I.* Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // *Plant Physiol.* – 1949. – **24**, No 1. – P. 1–154.
11. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265–275.
12. *Allen J. M., Huncik G.* Localization of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis // *J. Histochem. Cytochem.* – 1963. – **11**, No 2. – P. 169–175.
13. *Игнатова Л. К., Руденко Н. Н., Христин М. С., Иванов Б. Н.* Гетерогенная природа карбоангидразной активности тилакоидных мембран // *Биохимия*. – 2006. – **71**, № 5. – С. 651–659.

14. Bowler M. W., Montgomery M. G., Leslie A. G. W., Walker J. Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**. – P. 14238–14242.
15. Zolotareva E. K., Polishchuk O. V., Semeniukhin A. V., Onoiko E. B. The contribution of light-dependent bicarbonate uptake in thylakoid membrane energization // Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future: 15th Intern. conf. on Photosynthesis. – Berlin; Heidelberg: Springer, 2013. – P. 197–202.

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

Надійшло до редакції 22.04.2014

А. В. Семенихин

Карбоангидразная активность сопрягающего фактора CF₁, изолированного из хлоропластов шпината

Исследована карбоангидразная активность сопрягающего фактора CF₁ – каталитической части АТФ-синтазного комплекса хлоропластов. Чистоту препарата CF₁, выделенного стандартным методом из изолированных хлоропластов шпината, тестировали электрофоретическим анализом в нативных и денатурирующих условиях в системе Лэммли. Свойства полученного препарата соответствовали литературным данным для CF₁: полипептид состоял из 5 типов субъединиц с соответствующей молекулярной массой и в присутствии ионов Mg²⁺ или Ca²⁺ катализировал реакцию гидролиза АТФ. При анализе изолированного препарата CF₁ в нативном геле с помощью рН-индикатора бромтимолового синего показано, что при погружении геля в буферный раствор, насыщенный СО₂, в местах локализации CF₁ цвет полипептидной зоны меняется с синего на желтый, что указывает на активацию конверсии углекислого газа с образованием бикарбоната и протонов. Сделан вывод, что изолированный CF₁ наряду с АТФазной имеет также карбоангидразную активность. Обсуждается возможная роль карбоангидразной активности в механизме синтеза-гидролиза АТФ, катализируемых АТФ-синтазой.

A. V. Semeniukhin

Carbonic anhydrase activity of coupling factor CF₁ isolated from spinach chloroplasts

The aim of the work was to determine the carbonic anhydrase (CA) activity of coupling factor CF₁ – catalytic part of ATP synthase complex from chloroplasts. The purity of CF₁ prepared by the standard method from spinach chloroplasts was tested by electrophoretic analysis under native and denaturing conditions in the Laemmli system. The properties of the obtained preparation correspond to the literature data for CF₁: polypeptide consists of 5 types of subunits with appropriate molecular masses and catalyzes ATP hydrolysis in the presence of Mg²⁺ or Ca²⁺. The analysis of the isolated preparation of CF₁ in the native gel with a pH indicator bromothymol blue was shown that, when the gel was immersed in a buffer solution saturated with CO₂, the color of the polypeptide zone with CF₁ changed from blue to yellow, indicating the activation of carbon dioxide conversion into bicarbonate and protons. Data obtained in this study allow us to conclude that the isolated CF₁ along with ATPase has also the carbonic anhydrase activity. A possible role of the CA-activity in the mechanisms of ATP synthesis-hydrolysis catalyzed by ATP synthase is discussed.