



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 — ацетазоламід (АА) і етоксизоламід (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  $CO_2 \cdot (mg \text{ білка} \cdot \text{хв})^{-1}$  і майже в 30 разів перевищує АТФазну активність ферменту. АА і ЕА інгібують як АТФазну, так і карбоангідрозну 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 карбоангідрозної 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 карбоангідрозну активність ферменту при близьких і відносно низьких концентраціях. Функціональна роль виявленої карбоангідрозної 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  $\alpha : \beta : \gamma : \delta : \varepsilon \sim 3 : 3 : 1 : 1 : 1$  [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

CF<sub>1</sub> АТФаза хлоропластів є водорозчинним ферментом і може бути відділена від тилакоїдних мембран при їх обробці ЕДТА. На відміну від інших F<sub>1</sub> АТФаз, АТФазна активність ізольованого CF<sub>1</sub> є латентною (прихованою), тобто вона відсутня в ізольованого ферменту та індукується при нагріванні, обробці тійовими 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 CF<sub>1</sub> 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 CF<sub>1</sub> АТФазу, з яким пов'язані реакції синтезу і гідролізу АТФ у мембранному поліпептидному комплексі АТФ-синтази.

Мета дослідження полягала у визначенні ферментативної активності ізольованої CF<sub>1</sub> АТФази та вивченні її реакції на присутність специфічних інгібіторів карбоангідрازی — ацетозоламідю (АА) і етоксизоламідю (ЕА).

Карбоангідразну активність ізольованого ферменту визначали в розчині за швидкістю утворення CO<sub>2</sub> за наявності бікарбонату за допомогою інфрачервоного газового аналізу.

Хлоропласти виділяли зі свіжого листа шпинату як описано раніше [7] і руйнували протягом 10 хв у гіпотонічному середовищі, що містило 50 мМ трис-НСl (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 Нікіфорової [9] з деякими модифікаціями. Усі операції по ізоляції тилакоїдів і CF<sub>1</sub> виконували при 0–4 °С. Концентрацію протеїну визначали за Лоурі [10].

Чистоту отриманого препарату CF<sub>1</sub> оцінювали за результатами електрофорезу зі зміщенням заряду як описано раніше [8]. Субодиничний склад CF<sub>1</sub> аналізували після візуалізації поліпептидних зон ПААГ ДДС-денатуруючого електрофорезу в модифікованій системі Леммлі [8]. Поліпептидні зони виявляли за допомогою барвника кумасі R-250.

Латентний ізольований фермент 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-НСl (рН ~ 7,9), 10 мМ CaCl<sub>2</sub>. Суміш поміщали на водяну баню з температурою 60 °С та термостатували протягом 3 хв, після чого переносили в посудину з водою кімнатної температури. Ca<sup>2+</sup>-АТФазну активність визначали при 26 °С за кількістю утвореного неорганічного фосфору в реакційному середовищі, що містило 15 мМ трис-НСl, рН 7,9, 5 мМ АТФ та 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, і виражали в мкмоль Фн · (мг протеїну · хв)<sup>-1</sup> [9]. Кількість Фн у пробі визначали методом Лоурі та Лопеса в модифікації Скулачова [11].

Швидкість карбоангідразної реакції за наявності ізольованого CF<sub>1</sub> і в контролі визначали за кількістю CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub> (610 ppm). Реакційне середовище (2 мл) містило 2,5 мМ бікарбонату натрію і 50 мМ трис-НСl (рН 7,6).

Згідно з результатами електрофоретичного розділення ізольованого CF<sub>1</sub> (рис. 1), у препараті присутній практично один поліпептидний комплекс з молекулярною масою близь-

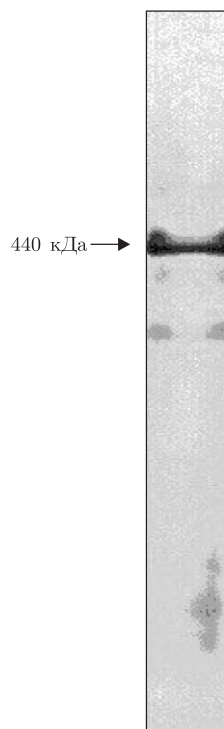


Рис. 1. Електрофореграма нативного білка (безбарвний нативний електрофорез зі зміщенням заряду): очищений чинник спряження  $CF_1$

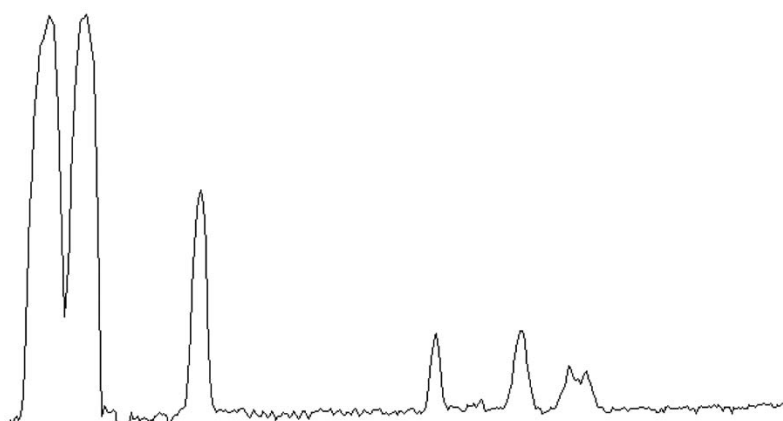


Рис. 2. Денситограма, отримана шляхом сканування ПААГ гелю, після візуалізації поліпептидних зон, розділених за наявності ДДС натрію. (Денситограма виконана за допомогою програмного забезпечення ImageJ)

ко 440, що, за даними робіт [2, 4], відповідає значенням, характерним для чинника  $CF_1$ . Аналіз субодиничного складу за даними електрофоретичного розділення денатурованого комплексу за наявності ДДС натрію показав присутність п'яти типів поліпептидів (рис. 2) з молекулярною масою 60 кДа ( $\alpha$ -субодиниця), 56 кДа ( $\beta$ -субодиниця), 39 кДа ( $\gamma$ -субодиниця), 20,5 кДа ( $\delta$ -субодиниця), 14,7 кДа ( $\varepsilon$ -субодиниця). Це також відповідає літературним даним [2–4] і підтверджує, що отриманий препарат є чинником спряження  $CF_1$ .

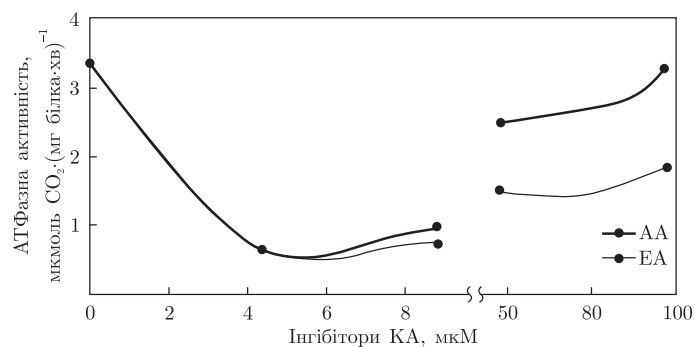


Рис. 3. Вплив інгібіторів карбоангідрази (КА) ацетазоламід (АА) і етоксизоламід (ЕА) на  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазну активність ізолюваного чинника спряження

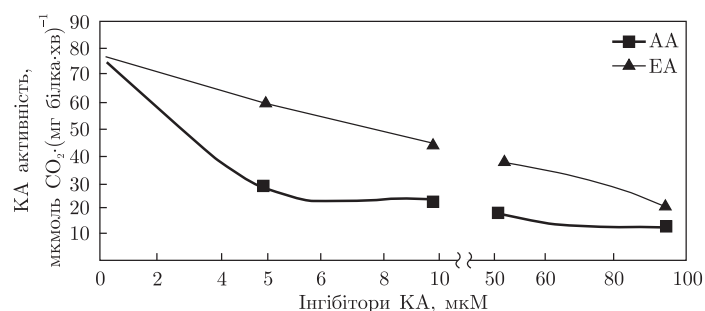


Рис. 4. Вплив інгібіторів карбоангідрази (КА) ацетазоламід (АА) і етоксизоламід (ЕА) на карбоангідразну активність ізолюваного чинника спряження

АТФазна активність препарату  $\text{CF}_1$  за наявності іонів  $\text{Ca}^{2+}$  після теплової активації становила близько  $3,5 \text{ мкмоль} \cdot (\text{мг протеїну} \cdot \text{хв})^{-1}$  (рис. 3). Активованій ензим інкубували за умов зростаючих концентрацій (від 1 мкМ до 1 мМ) інгібіторів карбоангідрази — АА і ЕА. Встановлено, що швидкість реакції  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ знижувалася в міру підвищення концентрації АА і ЕА (див. рис. 3). Концентрація АА і ЕА, яка викликала 50% інгібування АТФазної реакції, становила близько 2 мкМ. При зростанні концентрації ЕА швидкість реакції гідролізу АТФ дещо підвищувалася, чого не спостерігалось при підвищенні концентрації АА.

Наявність карбоангідразної активності в ізолюваному препараті  $\text{CF}_1$  тестували, визначаючи кількість утвореного  $\text{CO}_2$  в розчині гідрокарбонату натрію (рис. 4). Швидкість дегідратазної реакції значно зростала порівняно з контролем і за наявності  $\text{CF}_1$  становила близько  $73 \text{ мкмоль} \cdot (\text{мг протеїну} \cdot \text{хв})^{-1}$ , тобто карбоангідразна активність ізолюваного  $\text{CF}_1$  перевищувала майже в 30 разів його  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазну активність. Інгібітори карбоангідрази ефективно пригнічували швидкість дегідратазної реакції, причому водорозчинний АА більшою мірою, ніж жиророзчинний ЕА. 50% інгібування реакції дегідратації бікарбонату досягалось при концентрації близько 2 мкМ АА і 12 мкМ ЕА.

Таким чином, визначення карбоангідразної активності в ізолюваного чинника спряження  $\text{CF}_1$  у розчині показало, що поряд зі здатністю прискорювати гідроліз АТФ цей комплекс також ефективно каталізує перетворення форм карбонатної кислоти, причому обидві функції  $\text{CF}_1$  пригнічувалися специфічними сульфаніламідними інгібіторами карбоангідраз-ацетазоламідом і етоксизоламідом у мікромолярних концентраціях. Чутливість ізолюваного

CF<sub>1</sub> 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 I<sub>50</sub> для Ca<sup>2+</sup>-АТФазної реакції, яку каталізував ізольований CF<sub>1</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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 високоекспресивних 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 локації.

Трансмембранний вихід протонів крізь повний комплекс CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub> 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 CF<sub>1</sub>, 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 CF<sub>1</sub>. 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., 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.
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 шпината 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 шпинату // Доп. НАН України. – 2014. – № 6. – С. 151–155.
9. Степанова А. М., Никифорова Л. Ф. Методика выделения латентной  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы 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. 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  $\alpha$ -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., Liinsdorf 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., Polishchuck 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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 CF<sub>1</sub> АТФазы

*Изучено действие ингибиторов карбоангидразы — ацетазоламида (АА) и этоксизоламида (ЭА) на ферментативную активность изолированного сопрягающего фактора CF<sub>1</sub> — каталитической части АТФ-синтазного комплекса хлоропластов. Фермент выделяли из хлоропластов шпината, обрабатывая их 1 мМ ЭДТА. Показано, что карбоангидразная активность CF<sub>1</sub>, которую определяли в растворе по ускорению образования CO<sub>2</sub> в реакции дегидратации бикарбоната, составляет 73 мкмоль CO<sub>2</sub> · (мг белка · мин)<sup>-1</sup> и почти в 30 раз превосходит АТФазную активность фермента. АА и ЭА ингибируют как АТФазную, так и карбоангидразную активность CF<sub>1</sub>. I<sub>50</sub> для Ca<sup>2+</sup>-АТФазной реакции, катализируемой изолированным CF<sub>1</sub> 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, CF<sub>1</sub> 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 CF<sub>1</sub> ATPase

*We studied the effect of carbonic anhydrase inhibitors — acetazolamide (AA) and ethoxzolamide (EA) — on the enzymatic activity of the isolated coupling factor CF<sub>1</sub> — 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 CF<sub>1</sub>, which was determined in a solution by the acceleration of the formation of CO<sub>2</sub> in the bicarbonate dehydration reaction, was 73 μmol CO<sub>2</sub> · (min · mg protein)<sup>-1</sup> and almost 3 times more than the ATPase activity of the enzyme. Acetazolamide and ethoxzolamide inhibit both the ATPase and carbonic anhydrase activities of CF<sub>1</sub>. I<sub>50</sub> for Ca<sup>2+</sup>-ATPase reaction catalyzed by isolated CF<sub>1</sub> 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, CF<sub>1</sub> ATPase, photosynthetic membranes of chloroplasts.