

А. В. Семеніхін, О. К. Золотарьова

Ідентифікація карбоангідразної активності, асоційованої з білковими комплексами фотосинтетичних мембран хлоропластів шпинату

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Є. Л. Кордюм)

Білкові комплекси фотосинтетичних мембран хлоропластів шпинату були розділені методом нативного електрофорезу із зміщенням заряду після солюбілізації мембран неіонним детергентом дигітоніном. Для визначення зон гелю, які містили АТФ-синтазний комплекс і його відокремлену каталітичну частину (CF_1), була використана кольорова реакція на АТФазну активність. Цитохромному b_6f комплексу тилакоїдів відповідала зона, яка завдяки присутності цитохромів мала червоний колір у нефарбованому гелі. Локалізація цитохромного b_6f комплексу, АТФ-синтази і CF_1 підтверджена аналізом субодиничного складу відповідних білкових зон після ДДС-електрофорезу. Визначення карбоангідразної активності в білкових зонах неденатурованого гелю шляхом фарбування бромтимоловим синім показало, що крім фотосистеми II, яка містить компоненти з карбоангідразною активністю, карбоангідраза асоційована також цитохромним b_6f комплексом і АТФ-синтазою. Наведені дані свідчать на користь припущення про участь множинних форм карбоангідрази у внутрішньотилакоїдному перенесенні протонів від центрів їх утворення до АТФ-синтази.

Карбоангідраза (КА, карбонат гідроліза, ЕС 4.2.1.1) — металофермент, що містить цинк і каталізує взаємоперетворення CO_2 і HCO_3^- . КА в десятки тисяч разів прискорює встановлення рівноваги між формами вугільної кислоти, яке в розчині досягається дуже повільно [1, 2]. У кристах мітохондрій, цитоплазмі (гіалоплазмі) та стромі хлоропластів вищих рослин наявні як розчинні форми ферменту, так і зв'язані з плазматичними та тилакоїдними [3] мембранами. Експериментально показано, що в тилакоїдних мембранах хлоропластів молекули КА асоційовані принаймні з трьома різними компонентами електрон-транспортного ланцюга тилакоїдів. Два носія карбоангідразної активності знайдені як в мономерах, так і в димерах фотосистеми II (ФСII). Препарати мембран, збагачених фотосистемою I (ФСІ), також містять КА [1, 3]. Доведено, що КА, асоційована з ФСII, каталізує утворення іонів бікарбонату в кількості, достатній для зв'язування протонів, що вивільнюються у внутрішній об'єм тилакоїду при фотосинтетичному окисленні води [2]. Встановлено [4], що вільна дифузія не може бути ефективним механізмом перенесення протонів від центрів їх утворення всередині тилакоїду до АТФ-синтази. Транспорт протонів значно прискорюється при залученні полегшеної дифузії за участю рухливих буферів, зокрема бікарбонату, фонд якого підтримується завдяки активності КА. Це дає підставу для припущення, що, крім асоційованих з ФСІ та ФСII карбоангідраз, у складі інших мембранних поліпептидних комплексів можуть бути присутні білки з карбоангідразною активністю.

У тилакоїдних мембранах, крім хлорофілвмістних поліпептидних комплексів фотосистем, наявні також інтегральні мультибілкові комплекси цитохромів b_6f і АТФ-синтази, а також, згідно з останніми даними, НАД-дегідрогеназний комплекс [5]. Разом ці компоненти

забезпечують фотосинтетичне перенесення електронів і спряжене з ним перенесення протонів, у результаті якого формується трансмембранний протонний градієнт — рушійна сила в процесі синтезу АТФ, тобто всі основні поліпептидні комплекси фотосинтетичних мембран беруть участь у світлозалежному протонному обміні.

Мета дослідження полягала у виявленні білкових комплексів тилакоїдної мембрани, з якими асоційована карбоангідразна активність.

Для цього був відпрацьований метод нативного електрофорезу зі зміщенням заряду для розділення нативних пігмент-білкових та білкових комплексів із листя шпинату і визначена карбоангідразна активність цих поліпептидів.

Тилакоїди виділяли зі свіжого подрібненого листя шпинату, руйнуючи їх у гомогенізаторі в крижаному буфері (20 мМ трис/NaOH (рН 7,8), 400 мМ сорбітол, 2 мМ ЕДТА, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ аскорбат і 0,1% БСА, 0,05% цистеїн, 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ)). Суспензію фільтрували через два шари полотна і центрифугували при 200 g 3 хв та при 2500 g протягом 10 хв. Осад ресуспендували в гіпотонічному буфері (20 мМ трис/NaOH (рН 7,5), 5 мМ сорбітол та 5 мМ MgCl₂) з подальшим центрифугуванням при 2500 g протягом 4 хв та при 15000 g протягом 10 хв. Осад, який містив ізольовані тилакоїди, промивали буфером зберігання (330 мМ сорбітол, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 2,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Трис/NaOH, рН 7,8) і після переосадження суспендували в невеликому об'ємі буферу зберігання при концентрації хлорофілу 4 мг/мл (концентрація білка 20 мг/мл). Усі операції по ізоляції тилакоїдів проводили 4 °С. Концентрацію хлорофілу в препаратах тилакоїдних мембран визначали за Арноном [6], концентрацію білка — за Лоурі [7].

Для солубілізації білкових комплексів очищені тилакоїдні мембрани інкубували протягом 30 хв при 4 °С у 10% розчині дигітоніну (при співвідношеннях детергент/білок 1 : 1; 2 : 1; 4 : 1; 8 : 1) за наявності інгібіторів протеаз 0,75 М амінокапронової кислоти і 1 мМ ФМСФ. Після інкубації (60 хв, 4 °С) фракцію розчинених білків тилакоїдних мембран відокремлювали центрифугуванням протягом 45 хв при 140 000 g і 4 °С. Вміст білка в супернатанті визначали за Лоурі [7].

Нативний електрофорез зі зміщенням заряду мембранних білкових комплексів проводили в модифікованій системі за Андерсоном та ін. [8] і Колісніченком та ін. [9] у блоках ПААГ (70 × 80 × 1 мм), у градієнті концентрації акриламід (4–11%) у 0,375 М трис HCl (рН 8,8) буфері. Концентруючий (формуєчий) гель містив 3,75% акриламід у 0,0625 М трис HCl (рН 6,8) буфері. Верхній (катодний) та нижній (анодний) електродні буфери склалися з розчину гліцину і трису (25 мМ трис HCl, 192 мМ гліцин), рН 8,3. Для забезпечення зміщення заряду в катодний електродний буфер додавали 0,005% розчин додецилсульфату натрію (ДДС-Na).

Для аналізу субодиничного складу комплексів, отриманих під час нативного електрофорезу, смужку гелю з білковими треками вирізали та проводили ДДС-денатуруючий електрофорез у другому напрямку в модифікованій системі Леммлі [10] у блоках ПААГ (70 × 80 × 1 мм). Розділюючий (робочий) гель формували, створюючи градієнт концентрації акриламід від 10 до 20%. Концентруючий (формуєчий) гель містив 4% акриламід. Білкові зони візуалізували за допомогою барвника кумасі R-250. Для визначення АТФазної активності використовували методи Алена і Хінцика [11] та Гоморі [12]. Гелі після нативного електрофорезу інкубували протягом ночі в розчині 10 мМ АТФ, 10 мМ CaCl₂ у 100 мМ трис HCl (рН 9,5). Потім гель промивали водою та інкубували протягом 20 хв у 3 мМ розчині Pb(NO₃)₂, приготованому на 80 мМ трис-малатному буфері (рН 7,0). Після промивання водою гелі занурювали в 0,2% розчин Na₂S. Місця локалізації АТФ-синтази проявлялися

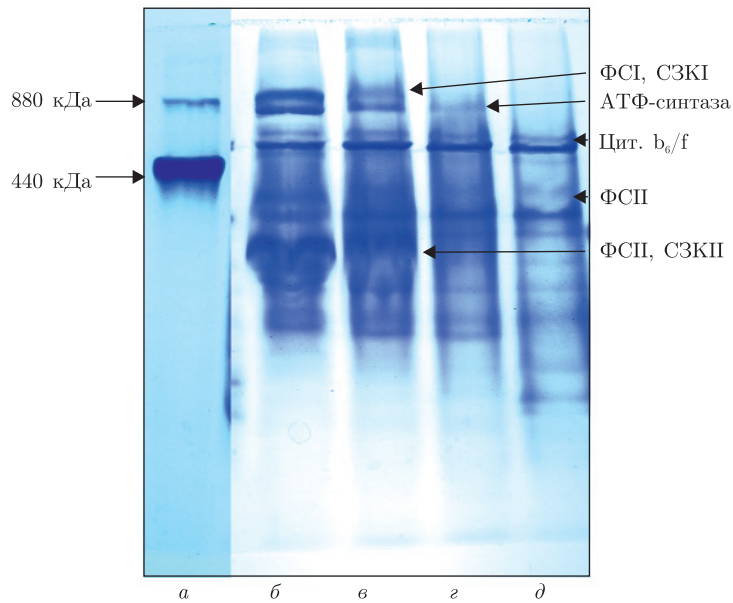


Рис. 1. Електрофоретичне розділення компонентів ізолюваних тилакоїдних мембран шпинату в ПААГ після солюбізації в 10% розчині дигітоніну в присутності 0,75 М амінокапронової кислоти і 1 мМ ФМСФ.

a — маркерні білки (феритин, мономер та димер); *b-d* — тилакоїди, солюбілізовані дигітоніном при співвідношенні детергент/білок: *b* — 8 : 1, *v* — 2 : 1, *z* — 4 : 1, *d* — 1 : 1

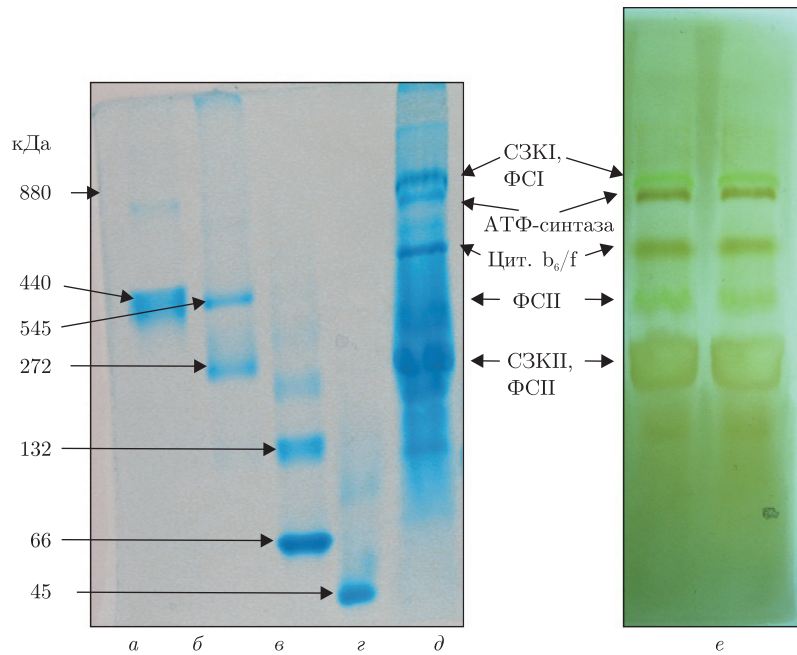


Рис. 2. АТФазна активність білкових зон нативного ПААГ електрофору тилакоїдів листків шпинату. Електрофореграма гелю, пофарбованого сульфідом свинцю, стрілки показують зони прояву АТФ-синтазної активності.

a-z — білки-маркери; *d* — білкові зони тилакоїдних мембран після солюбілізації дигітоніном; *e* — білкові зони, у яких виявилась АТФазна активність

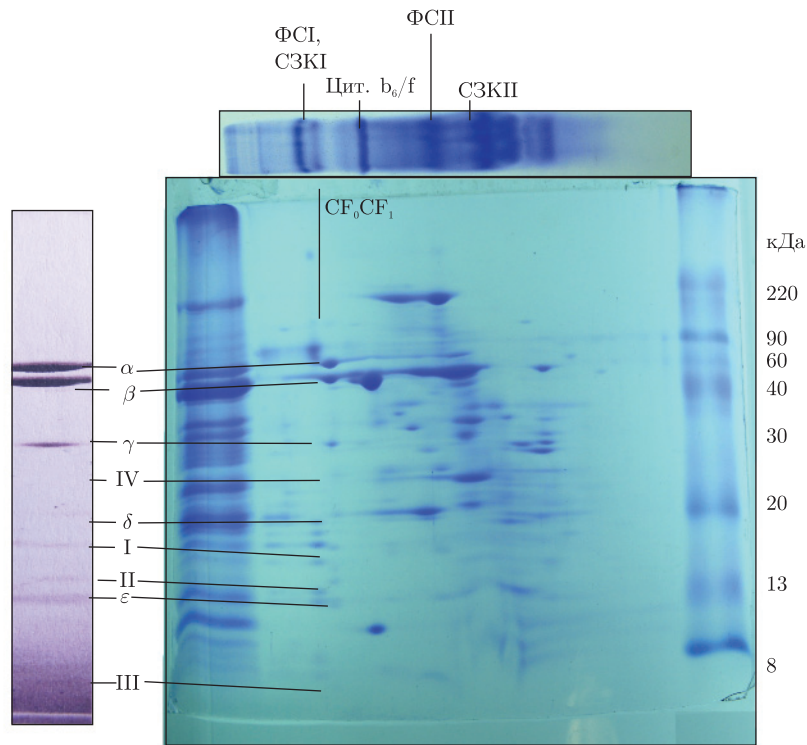


Рис. 3. Поділ білкових комплексів у другому напрямку (система Леммлі) ДДС / ПААГ і фарбування кумасі R-250. Молекулярну масу вказано в кДа. Субодиниці CF_0 I (19 кДа), II (16,5 кДа), III (8 кДа), IV (25 кДа) і субодиниці CF_1 α (60 кДа), β (56 кДа), γ (39 кДа), δ (20,5 кДа), ε (14,7 кДа)

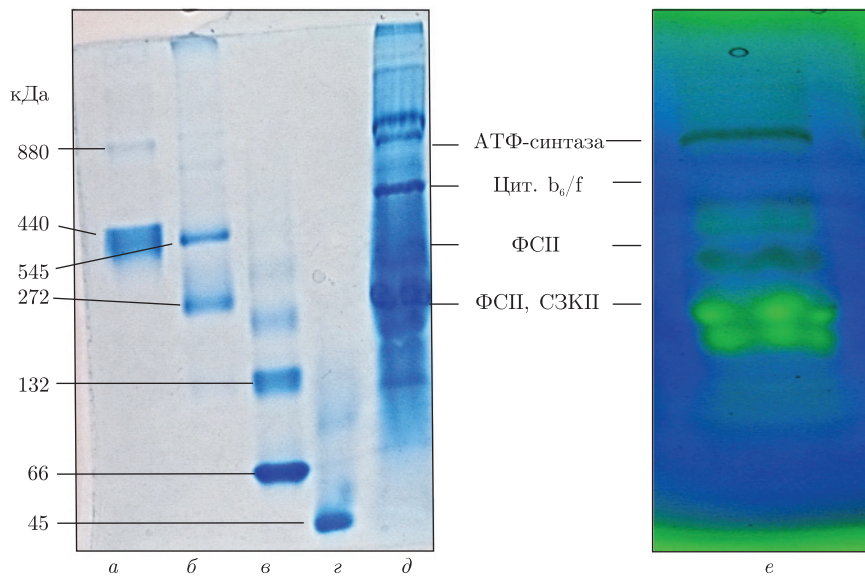


Рис. 4. Карбоангідразна активність білкових зон нативного ПААГ електрофорезу тилакоїдів листя шпинату. Електрофореграми гелю, пофарбованого бромтимоловим синім (e), стрілки показують зони прояву карбоангідразної активності. a-g — білки-маркери; d — білкові зони тилакоїдних мембран після солюбілізації дигітоніном; e — білкові зони, у яких виявилась карбоангідразна активність

у вигляді темно-червоних смуг за рахунок утворення нерозчинного PbS. Візуалізацію карбоангідразної активності проводили за методом Едвардса і Петтона [13]. Гелі інкубували 30 хв у 0,2% розчині бромтимолового блакитного на 50 мМ вероналовому буфері (рН 9,0), далі гель перенесли у воду, насичену CO₂ при 0 °С. У місці локалізації КА блакитне забарвлення індикатора змінювалося на жовте.

Залежно від природи детергенту та співвідношення детергент/білок в інкубаційному середовищі досягається солюбілізація тих чи інших пігмент-білкових комплексів. Дослідження екстрагуючої здатності різних детергентів [14] показали, що найефективніше солюбілізація білкових компонентів стромальних ділянок тилакоїдів відбувається при використанні дигітоніну. Для вирішення завдань роботи потрібно було ізолювати нативні комплекси ламелярних (стромальних) мембран.

Результати електрофоретичного розділення в ПААГ компонентів ізолюваних тилакоїдних мембран після солюбілізації дигітоніном показані на рис. 1. Видно, що кількість білкових зон на електрофореграмах залежить від співвідношення детергент/білок, причому високомолекулярні комплекси проявляються при більш високому вмісті детергенту. За даними рис. 1, найефективніша солюбілізація нативних білкових комплексів тилакоїдів досягалася при співвідношенні дигітонін/білок 8 : 1. Цей режим солюбілізації дає можливість виявити білкові структури з молекулярною масою ≈900 кДа і більше. При електрофоретичному розділенні солюбілізованих дигітоніном комплексів тилакоїдів на незабарвлених електрофореграмах у білковій зоні, яка мігрує приблизно як маркер з мол. масою 440 кДа, чітко проявляється смуга червоного кольору. Ця смуга, вірогідно, має відношення до цитохромного b₆f комплексу, який через наявність залізовмісних цитохромів у нативному стані забарвлений у червоний колір.

Для виявлення серед білкових зон таких, які мають АТФазну активність і, відповідно, можуть бути частиною нативного АТФ-синтазного комплексу, ми проаналізували специфічну ферментну активність у ПААГ-гелях. Після проявлення гелів за наявності АТФ та нітрату плюмбуму були виявлені чотири білкові смуги, що мають АТФазну активність. Положення цих смуг у гелі відповідає 700–750 кДа, ≈600 кДа і ≈130–200 кДа.

Як видно з рис. 2, АТФазна активність реєструється в білковій зоні з мол. масою 600 кДа, яка, за даними [15], відповідає повному комплексу АТФ-синтази тилакоїдів. Крім того, АТФазну активність мали білкова зона з мол. масою >900 кДа, яка, вірогідно, відповідає олігомерній формі ферменту, і білкова зона з мол. масою 200 кДа, близькою до молекулярної маси фактора спряження CF₁. Фактор спряження CF₁ є каталітичною (водорозчинною) частиною АТФ-синтазного комплексу, яка не містить гідрофобних субодиниць, що забезпечують занурення повного комплексу в мембрану. CF₁ зберігає здатність каталізувати реакцію гідролізу АТФ, завдяки чому легко виявляється на електрофореграмах.

Аналіз пептидного складу білкових зон, пов'язаних з АТФ-синтазою, проводили за допомогою методу електрофорезу в другому напрямку в денатуруючих умовах у присутності ДДС — Na (система Леммлі). Після розділення нативних білків та білкових комплексів (перший напрямок) смужку гелю вирізали, інкубували за наявності ДДС-Na та меркаптоетанолу й поміщали в систему денатуруючого ДДС-електрофорезу (система Леммлі). ДДС-електрофорез у другому напрямку поліпептидного комплексу показав наявність усіх субодиниць АТФ-синтазного комплексу — CF₀CF₁. Визначено дев'ять пептидних складових (рис. 3): субодиниці CF₀ I (19 кДа), II (16,5 кДа), III (8 кДа), IV (25 кДа) і субодиниці CF₁ α (60 кДа), β (56 кДа), γ (39 кДа), δ (20,5 кДа), ε (14,7 кДа), молекулярні маси яких в основному відповідають літературним даним [15].

Електрофореграма білкових зон, які були ферментно активними в АТФазній реакції, показує (див. рис. 3), що набір поліпептидів, з яких складаються білкові зони з мол. масою ≈ 600 і ≈ 900 кДа, є дуже близьким і відповідає поліпептидному складу повного АТФ-синтазного комплексу. Білкові зони з мол. масою 900 кДа та більше виявлялися на електрофореграмі за умов використання дигітоніну при співвідношенні до білка 8 : 1. На цій підставі можна зробити висновок, що додавання дигітоніну до тилакоїдів у співвідношенні 8 : 1 призводить до повної солюбілізації основних мембранних пігмент-білково-ліпідних комплексів тилакоїдів, що зберігають свою структуру і функціональну активність.

У паралельному експерименті по локалізації КА було показано, що в цьому поліпептидному комплексі наявна і карбоангідразна активність. Найбільш активною є КА, пов'язана із ФСІІ (рис. 4), що узгоджується з даними літератури [1–3]. Крім того, карбоангідразна активність надійно виявлялася також у білкових зонах, які містили АТФ-синтазу і цитохромний b_6f комплекс. Оскільки, як зазначалося вище, у складі комплексу ФСІІ знайдено два носія карбоангідразної активності [1, 3], це, можливо, пояснює більш інтенсивне забарвлення білкової зони ФСІІ за умов нашого експерименту.

Таким чином, показано, що основні комплекси тилакоїдної мембрани (ФСІІ, цитохромний b_6f комплекс і АТФ-синтаза) асоційовані з компонентами, які мають карбоангідразну активність. Оскільки ці комплекси беруть участь у перенесенні протонів, отримані результати свідчать на користь висунутого припущення про залучення множинних форм КА тилакоїдів у процеси фотосинтетичного протонного транспорту.

1. Ignatova L. K., Rudenko N. N., Mudrik V. A. et al. Carbonic anhydrase activity in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII // *Photosynth. Res.* – 2011. – **110**, No 2. – P. 89–98.
2. Shutova T., Kenneweg H., Buchta J. et al. The photosystem II-associated Cah3 in *Chlamydomonas* enhances the O_2 evolution rate by proton removal // *EMBO J.* – 2008. – **27**, No 5. – P. 782–791.
3. 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.
4. Золотарева Е. К. Протонная регуляция процессов фотосинтетической трансформации энергии // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2010. – **42**, № 1. – С. 37–50.
5. Aro E.-M., Suorsa M., Rokka A. et al. Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes // *J. Exp. Bot.* – 2005. – **56**. – P. 347–356.
6. Arnon D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenolase in *Beta vulgaris* // *Plant Physiol.* – 1949. – **24**, No 1. – P. 1–154.
7. 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.
8. Anderson L., Borg H., Mikaelsson M. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity // *FEBS Lett.* – 1972. – **20**. – P. 199–202.
9. Колесниченко А. В., Остроумова Е. А., Зыкова В. В. и др. Белки четырех видов злаков, иммунохимически родственные стрессовому белку 310 кД // *Физиология растений.* – 2000. – **47**, № 2. – С. 199–202.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.
11. Allen J. M., Hyncik G. Localization of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis // *J. Histochem. Cytochem.* – 1963. – **11**, No 2. – P. 169–175.
12. Gomori G. Preparation of buffers for use in enzyme studies // *Meth. Enzymol.* – 1955. – **1**. – P. 138–146.
13. Edwards L. J., Patton R. L. Visualization of carbonic anhydrase activity in polyacrilamide gel // *Stain Technol.* – **41**, No 6. – P. 333–334.
14. Ärvi S. J., Suorsa M., Paakkari V., Aro E.-M. Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super – and mega-complexes // *Biochem. J.* – 2011. – **439**. – P. 207–214.

15. McCarty R. E. A plant biochemist's view of H⁺-ATPases and ATP synthases // J. Exp. Biol. – 1992. – 172. – P. 431–441.

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

Надійшло до редакції 17.10.2013

А. В. Семенихин, Е. К. Золотарева

Идентификация карбоангидразной активности, ассоциированной с белковыми комплексами фотосинтетических мембран хлоропластов шпината

Белковые комплексы фотосинтетических мембран хлоропластов шпината были разделены методом нативного электрофореза со смещением заряда после их солюбилизации неионным детергентом дигитонином. Для определения зон геля, содержащих АТФ-синтазный комплекс и его каталитическую часть (CF₁), была использована цветная реакция на АТФазную активность. Цитохромному b₆f комплексу тилакоидов соответствовала зона, которая из-за наличия цитохромов имела красную окраску в неокрашенном геле. Локализация цитохромного b₆f комплекса, АТФ-синтазы и CF₁ подтверждена анализом субъединичного состава соответствующих белковых зон после ДДС-электрофореза. Определение карбоангидразной активности в белковых зонах неденатурированного геля цветной реакцией с бромтимоловым синим показало, что кроме фотосистемы II, которая содержит компоненты с карбоангидразной активностью, карбоангидраза ассоциирована также с цитохромным комплексом b₆f и АТФ-синтазой. Приведенные данные свидетельствуют в пользу предположения об участии множественных форм карбоангидразы во внутритилакоидном переносе протонов от центров их образования к АТФ-синтазе.

A. V. Semenihih, E. K. Zolotareva

Identification of carbonic anhydrase activity associated with protein complexes of photosynthetic membranes of spinach chloroplasts

Protein complexes of photosynthetic membranes of spinach chloroplasts were separated by native charge shift electrophoresis after the solubilization of membranes by a non-ionic detergent digitonin. To determine the areas of the gel that contained the ATP synthase complex and its isolated catalytic part (CF₁), the color reaction for ATPase activity was used. Due to the presence of cytochromes, the b₆f thylakoid membrane complex was red in the unstained gel. The localization of cytochrome b₆f complex, ATP synthase, and CF₁ was confirmed by the subunit analysis of the corresponding protein zones by SDS-electrophoresis. Using nondenaturing electrophoresis followed by detection of carbonic anhydrase (CA) activity in the gel stained with bromothymol blue, the following carriers of CA were detected: photosystem II, cytochrome b₆f complex, and ATP synthase. The data favor the assumption that multiple forms of thylakoid carbonic anhydrase take part in the internal proton transfer from the centers of their evolution to the ATP synthase.