

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.03.092>  
УДК 577.23

**Н.Ф. Михайленко, А.В. Семеніхін,  
А.П. Хомочкін, О.К. Золотарьова**

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ  
E-mail: membrana@ukr.net

## **Естеразна активність чинника спряження $CF_1$ , ізолюваного з хлоропластів шпинату**

*Представлено академіком НАН України К.М. Ситником*

*Показано здатність ізолюваного чинника спряження  $CF_1$  – каталітичної частини АТФ-синтазного комплексу хлоропластів – каталізувати гідроліз *p*-нітрофенілового естеру оцтової кислоти. Специфічні інгібітори карбоангідрази – ацетазоламід (АА) і етоксизоламід (ЕА) – в концентрації 1–100 мкМ модифікували естеразну активність ензиму. АА в низькій концентрації (менше 5 мкМ) стимулював, а в діапазоні 25–75 мкМ інгібував естеразну активність  $CF_1$ . ЕА в концентраціях 1–75 мкМ спричиняв значні зміни естеразної активності  $CF_1$ . АА і ЕА також впливали на латентну АТФазну активність ензиму: в концентраціях 1–25 мкМ активували, а 30–100 мкМ пригнічували гідроліз АТФ. Отримані результати дають підставу припустити, що виявлена естеразна активність  $CF_1$  пов'язана з карбоангідразною функцією чинника спряження і, можливо, є необхідною для перенесення протонів, спряженого з реакціями синтезу або гідролізу АТФ.*

**Ключові слова:** хлоропласти,  $CF_1$ -АТФаза, карбоангідраза, естераза, сульфаніламідні інгібітори

Чинник спряження  $CF_1$  є водорозчинною частиною АТФ-синтазного комплексу фотосинтетичних (тилакоїдних) мембран хлоропластів, який складається з п'яти типів субодиниць у стехіометричному співвідношенні  $\alpha:\beta:\gamma:\delta:\epsilon \sim 3:3:1:1:1$  [1] і містить каталітичні і регуляторні центри, що беруть участь у світлозалежному синтезі і гідролізі АТФ [2]. Після відокремлення від мембрани чинник  $CF_1$  втрачає здатність каталізувати синтез АТФ, але зберігає АТФазну активність. При цьому ізолюваний  $CF_1$  є латентною (прихованою) АТФазою і каталізує гідроліз АТФ лише після активації теплом або в результаті обробок редокс-реагентами, оксіаніонами, спиртами і деякими детергентами [2, 3].

Нещодавно ми показали, що ізолювана  $CF_1$ -АТФаза виявляє також карбоангідразну активність, значно прискорюючи взаємоперетворення форм вугільної кислоти  $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$  [4, 5]. Хоча функціональне значення цієї активності для роботи комплексу АТФ-синтази лишається невизначеним, було висунуто припущення про її участь у протонному перенесенні крізь  $CF_1$ -АТФазу, спряженому з процесами світлозалежного синтезу або гідролізу АТФ [4, 6].

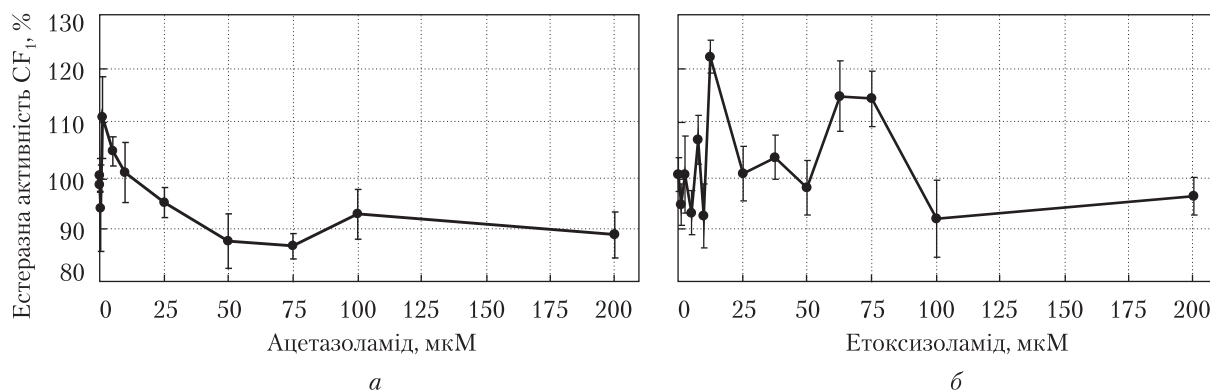
© Н.Ф. Михайленко, А.В. Семеніхін, А.П. Хомочкін, О.К. Золотарьова, 2017

Карбоангідрази (КА) відіграють головну роль у багатьох біологічних процесах. Існує принаймні шість різних ортологів цього ензиму (позначених як  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ), що свідчить про їх незалежне еволюційне походження. Хоча чотири з цих протеїнів пов'язані з конкретною групою організмів ( $\alpha$  – з хребетними,  $\beta$  – з прокаріотами,  $\gamma$  – з археями,  $\epsilon$  – з хемолітотрофами), геномний аналіз показує, що в межах одного організму наявні ізоформи більше ніж одного ортологу. У  $C_3$ -рослин ідентифіковані принаймні 15 генів, які кодують ізоформи КА з  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -родин [7]. Локалізація деяких ізоформ КА лишається невідомою. У хлоропластах, крім великої кількості  $\beta$ -карбоангідрази 1 ( $\beta$ -КА1), виявлені  $\beta$ -КА5 і  $\alpha$ -КА4 у тилакоїдних мембранах, а в стромі –  $\alpha$ -КА1 [8]. Показана також наявність КА в пігмент-білковому комплексі фотосистеми II (ФСII), поблизу комплексу фотосистеми I і в люменальному просторі тилакоїдів [9].

Відомо, що, на відміну від  $\beta$ -КА,  $\alpha$ -форми ензиму здатні каталізувати гідроліз низки естерів, тобто мають естеразну активність [10]. Наявність естеразної активності у складі мітохондріальної  $F_1$ -АТФази була встановлена понад 35 років тому [11]. З метою повнішої характеристики КА, пов'язаної з АТФ-синтазним комплексом хлоропластів, нами була визначена естеразна активність ізольованої  $CF_1$ -АТФази та вивчена дія специфічних інгібіторів карбоангідраз – ацетазоламідів і етоксизоламідів.

Хлоропласти виділяли із свіжого листа шпинату як описано раніше [6] і руйнували протягом 10 хв у гіпотонічному розчині, що містив 5 мМ *трис*-HCl (pH 7,8) і 10 мМ NaCl. Тилакоїди двічі промивали гіпотонічним середовищем, переосаджували протягом 10 хв при 15 000 g і використовували для виділення препарату чинника спряження за методом Захарова із співавт. [12] з деякими модифікаціями. Осад тилакоїдів суспендували в середовищі 1 мМ ЕДТА, 5 мМ *трис*- $SO_4$  (pH 7,5) до концентрації хлорофілу 1–1,5 мг/мл і змішували з хлороформом у співвідношенні об'ємів суспензії хлоропластів та розчинника 2:1. Суміш інтенсивно перемішували протягом 15 с і центрифугували 5 хв при 5 000 g. Верхню водну фазу відокремлювали, центрифугували протягом 30 хв при 20 000 g, і чинник спряження осаджували 2 М сульфатом амонію. Усі операції з ізоляції тилакоїдів і  $CF_1$  виконували при 4 °С. Концентрацію протеїну і чистоту отриманого препарату  $CF_1$  за результатами електрофорезу зі зміщенням заряду оцінювали як описано раніше [4]. Субодиночний склад  $CF_1$  аналізували після візуалізації поліпептидних зон ПААГ ДДС-денатуруючого електрофорезу в модифікованій системі Леммлі як описано в [4]. Поліпептидні зони виявляли за допомогою барвника кумасі R-250. Препарат містив практично один поліпептидний комплекс з молекулярною масою близько 440 кДа, що, за даними робіт [1, 3, 4], відповідає чиннику спряження  $CF_1$ . Аналіз субодиночного складу згідно з даними електрофоретичного розділення денатурованого комплексу за наявності ДДС натрію показав п'ять типів поліпептидів з молекулярною масою 60 кДа ( $\alpha$ -субодиноця), 56 кДа ( $\beta$ -субодиноця), 39 кДа ( $\gamma$ -субодиноця), 20,5 кДа ( $\delta$ -субодиноця), 14,7 кДа ( $\epsilon$ -субодиноця). Це також відповідає даним [1, 3] і підтверджує, що отриманий препарат є чинником спряження  $CF_1$ .

АТФазну активність ізольованого ензиму стимулювали прогріванням, для чого препарат (1,5–2,0 мг) вносили в розчин, що містив 10 мМ АТФ, 2 мМ  $CaCl_2$  і 20 мМ *трис*-HCl (pH ~ 7,8), і суміш на 30 хв вмішували в термостат з температурою 37 °С.  $Ca^{2+}$ -АТФазну активність визначали при 25 °С за кількістю утвореного неорганічного фосфату в реакційному середовищі, що містило 15 мМ *трис*-HCl (pH 7,8), 5 мМ АТФ та 2 мМ  $CaCl_2$  і виражали в



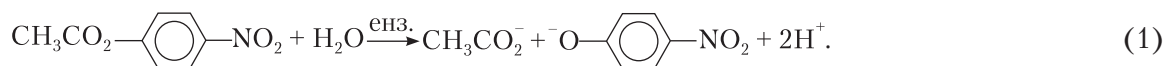
Вплив АА (а) і ЕА (б) на естеразну активність ізолюваного чинника спряження  $CF_1$

мкмоль  $\Phi_n$  / (мг протеїну · год) [5]. Кількість  $\Phi_n$  у пробі визначали методом Лоурі та Лопеса в модифікації Скулачова [13].

Естеразну активність ізолюваного ензиму  $CF_1$  визначали при 25 °С у розчині за швидкістю гідролізу *n*-нітрофенілового естеру (*n*-НФЕ) оцтової кислоти [14]. Реакційне середовище (2 мл) містило 5 мМ *трис*-HCl (рН 7,8), 0,5 мМ *n*-НФЕ оцтової кислоти і 80–150 мкг  $CF_1$ .

Усі дослідження проводили не менше ніж у трьох біологічних повторностях, кількість аналітичних повторностей у межах однієї біологічної дорівнювала 3. Визначали середні значення і їх стандартні помилки. Порівнюючи вибірки, використовували *t*-критерій Стьюдента, розбіжності вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

Для визначення швидкості естеразної реакції як субстрат використовували *n*-НФЕ оцтової кислоти, при гідролізі якого утворюються *n*-нітрофенол і оцтова кислота:



Ця реакція пришвидшується не тільки за наявності  $\alpha$ -КА, але й  $\alpha$ -хімотрипсину або ацетилхолінестерази [15].

За експериментальних умов гідроліз нітрофенілових естерів виявився зручною моделлю, яку широко використовують при дослідженні  $\alpha$ -КА. Кінетика реакції при цьому є двофазною [15]: спочатку швидко утворюється *n*-нітрофенол у концентрації, що приблизно дорівнює кількості ензиму, після чого вивільнення продукту значно сповільнюється. Така кінетика була інтерпретована як результат початкового швидкого утворення інтермедіатного комплексу ацилгідрозину з ензимом і одночасного вивільнення стехіометричних кількостей *n*-нітрофенолу.

На рисунку, а наведено експериментальні дані по впливу гідрофільного інгібітора КА — ацетазоламід (АА) на швидкість гідролізу *n*-НФЕ за наявності ізолюваного чинника  $CF_1$ . Швидкість реакції в контролі при відсутності інгібітора становила 150–550 мкмоль / (мг протеїну · год) і знижувалася при додаванні 25–75 мкМ АА. Під впливом АА в концентраціях 1–5 мкМ швидкість гідролізу *n*-НФЕ була вищою порівняно з контролем.

Залежність естеразної активності  $CF_1$  від концентрації ліпофільного інгібітора КА — етоксизоламід (ЕА) не є монотонною. У діапазоні протестованих концентрацій ЕА на кри-

**Вплив інгібіторів КА на  $Ca^{2+}$ -АТФазну активність  
ізольованого чинника спряження  $CF_1$ , мкмоль/(мг протеїну · год)**

Інгібітор	Концентрація інгібітора				
	0	10 мкМ	20 мкМ	50 мкМ	100 мкМ
АА	46 ± 2,2	147,8 ± 3,1	181,3 ± 9,1	45 ± 1,4	39 ± 1,2
ЕА	46 ± 2,2	110,5 ± 2,5	163 ± 7,3	44 ± 1,3	38 ± 1,2

вій залежності швидкості реакції гідролізу *n*-НФЕ від концентрації інгібітора спостерігалось принаймні дві ділянки, де зростання ензиматичної активності чергувалося з її зменшенням (див. рисунок, б). Естеразна активність  $CF_1$  також немонотонно змінювалася залежно від концентрації АА (див. рисунок, а). Така кінетична поведінка свідчить про наявність у складі ензиму декількох центрів, при зв'язуванні з якими АА або ЕА стимулюють або пригнічують естеразну активність.  $CF_1$ , який складається з багатьох субодиниць, містить декілька каталітичних [1, 3] і некаталітичних [2] центрів. Останні виконують регуляторну роль і, можливо, беруть участь у зв'язуванні інгібіторів КА.

Таким чином, визначення естеразної активності ізольованого чинника спряження  $CF_1$  у розчині показало, що поряд зі здатністю прискорювати гідроліз АТФ і каталізувати перетворення форм вугільної кислоти [4, 5] цей комплекс також пришвидшує розклад нітрофенілових естерів. Усі ці функції  $CF_1$  залежать від наявності специфічних сульфаніламідних інгібіторів КА — АА або ЕА в мікромолярних концентраціях.

Залежність естеразної активності ізольованого  $CF_1$  від концентрації інгібіторів КА порівнювали з їх ефектом на АТФазну активність ізольованого препарату  $CF_1$ . Як відомо, АТФазна активність  $CF_1$  є латентною, і в наших експериментах за наявності іонів  $Ca^{2+}$  вона не перевищувала 45–48 мкмоль/(мг протеїну · год). Після теплової активації  $Ca^{2+}$ -АТФазна активність зростала і становила 175–195 мкмоль/(мг протеїну · год) (таблиця). Під впливом інгібіторів КА в діапазоні зростаючих концентрацій від 1 до 25 мкМ швидкість реакції  $Ca^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ за наявності неактивованого ензиму зростала до рівня, який забезпечувався чинником спряження, активованим теплом (див. таблицю). З подальшим зростанням концентрації АА чи ЕА від 30 до 100 мкМ швидкість гідролізу АТФ знижувалася до значень, менших за рівень латентної активності ензиму. Отже, АТФазна активність ізольованого  $CF_1$  також змінюється при варіюванні концентрації інгібіторів КА за немонотонною кінетикою: спочатку активність зростає, а потім знижується, що свідчить про існування в ензими декількох центрів зв'язування сульфаніламідних інгібіторів з різною афінністю, які регулюють швидкість АТФазної і естеразної реакцій  $CF_1$ .

Чутливість цих реакцій ізольованого  $CF_1$  до дії сульфаніламідів виявилася значно вищою порівняно з відповіддю мембранозв'язаного АТФ-синтазного комплексу тилакоїдів, функціональна активність якого змінювалася за наявності 0,5–1 мМ АА або ЕА [6].

На підставі отриманих результатів можна зробити припущення про те, що карбоангідразна активність каталітичної частини АТФ-синтазного комплексу, наявність якої була встановлена нами раніше [4, 5], може бути пов'язана з карбоангідразою  $\alpha$ -типу, оскільки цей тип КА виявляє естеразну активність. Цей ензим може бути задіяним у перенесенні протонів, які поглинаються або вивільнюються в реакції синтезу або гідролізу АТФ відповідно.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Tiedge H., Lünsdorf H., Schäfer 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**, № 23. P. 7874–7878.
2. Malyan A.N. Noncatalytic nucleotide binding sites: Properties and mechanism of involvement in ATP synthase activity regulation. *Biochemistry* (Moscow). 2013. **78**, № 13. P. 1512–1523. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297913130099>
3. Groth G., Strotmann H. New results about structure, function and regulation of the chloroplast ATP synthase (CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>). *Physiol. Plant*. 1999. **106**, № 1. P. 142–148. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106120.x>
4. Semenihin A.V., Zolotareva O.K. Carbonic anhydrase activity of integral-functional complexes of thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Ukr. Biochem. J.* 2015. **87**, № 3. P. 47–56. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj87.03.047>
5. Хомочкін А.П., Семеніхін А.В., Золотарьова О.К. Дія інгібіторів карбоангідрази на ензиматичну активність ізольованої тилакоїдної CF<sub>1</sub> АТФази. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2016. № 1. С. 92–98. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.01.092>
6. Онойко Е.Б., Полищук А.В., Золотарева Е.К. Стимулирование фотофосфорилирования в изолированных хлоропластах шпината экзогенным бикарбонатом: роль карбоангидразы. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2010. № 10. С. 160–165.
7. Moroney J.V., Bartlett S.G., Samuelsson G. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell Environ*. 2001. **24**, № 2. P. 141–153. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00669.x>
8. Fabre N., Reiter I.M., Becuwe-Linka N., Genty B., Rumeau D. Characterization and expression analysis of genes encoding  $\alpha$  and  $\beta$  carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*. 2007. **30**, № 5. P. 617–629. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01651.x>
9. Rudenko N.N., Ignatova L.K., Fedorchuk T.P., Ivanov B.N. Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. *Biochemistry* (Moscow). 2015. **80**, № 6. P. 674-687. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297915060048>
10. Winum J.-Y., Colinas P. Carbonic anhydrases as esterases and their biotechnological applications. *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts: From Theory to Medical and Industrial Applications*. C.T. Supuran, G. De Simone (Eds.). Amsterdam: Elsevier, 2015. P. 361–371. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63258-6.00021-4>
11. Ягужинский Л.С., Гудзь Т.И., Верховский А.Б. Эстеразная активность олигомицинчувствительной АТФази митохондрий. *Биохимия*. 1978. **43**, № 11. С. 2058–2063.
12. Захаров С.Д., Сытник С.К., Мальян А.Н., Макаров А.Д. Выделение и свойства CF<sub>1</sub>-АТФазы с измененной субмолекулярной структурой. *Биохимия*. 1978. **43**, № 5. С. 887–891.
13. Никулина Г.И. Обзор методов колориметрического определения фосфора по образованию молибденовой сини. Москва-Ленинград: Наука, 1965. 45 с.
14. Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И. Активность эстераз в тканях различных отделов желудочно-кишечного тракта северного оленя. *Сельскохозяйственная биология*. 2007. № 6. С. 77–80.
15. Bender M.L., Kézdy F.J., Wedler F.C. Alpha-Chymotrypsin: enzyme concentration and kinetics. *J. Chem. Educ.* 1967. **44**, № 2. P. 84–88. doi: <https://doi.org/10.1021/ed044p84>

Надійшло до редакції 04.10.2016

REFERENCES

1. Tiedge, H., Lünsdorf, H., Schäfer, G. & Schairer, H. U. (1985). Subunit stoichiometry and juxtaposition of the photosynthetic coupling factor 1: Immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, No. 23, pp. 7874-7878.
2. Malyan, A. N. (2013). Noncatalytic nucleotide binding sites: Properties and mechanism of involvement in ATP synthase activity regulation. *Biochemistry* (Moscow), 78, No. 13, pp. 1512-1523. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297913130099>
3. Groth, G. & Strotmann, H. (1999). New results about structure, function and regulation of the chloroplast ATP synthase (CF<sub>0</sub>CF<sub>1</sub>). *Physiol. Plant.*, 106, No. 1, pp. 142-148. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106120.x>

4. Semenihin, A. V. & Zolotareva, O. K. (2015). Carbonic anhydrase activity of integral-functional complexes of thylakoid membranes of spinach chloroplasts. Ukr. Biochem. J., 87, Iss. 3, pp. 47-56. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj87.03.047>
5. Khomochkin, A. P., Semenihin, A. V. & Zolotareva, E. K. (2016). Effect of carbonic anhydrase inhibitors on enzymatic activity of isolated thylakoid  $CF_1$  ATPase. Dopov. Nac. akad. nauk Ukr., No. 1, pp. 92-98 (in Ukrainian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.01.092>
6. Onoiko, E. V., Polishchuck, A. V. & Zolotareva, E. K. (2010). The stimulation of photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts by exogenous bicarbonate: the role of carbonic anhydrase. Dopov. Nac. akad. nauk Ukr., No. 10, pp. 160-165 (in Russian).
7. Moroney, J. V., Bartlett, S. G. & Samuelsson, G. (2001). Carbonic anhydrases in plants and algae. Plant Cell Environ., 24, No. 2, pp. 141-153. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2001.00669.x>
8. Fabre, N., Reiter, I. M., Becuwe-Linka, N., Genty, B. & Rumeau, D. (2007). Characterization and expression analysis of genes encoding  $\alpha$  and  $\beta$  carbonic anhydrases in Arabidopsis. Plant Cell Environ., 30, No. 5, pp. 617-629. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01651.x>
9. Rudenko, N.N., Ignatova, L.K., Fedorchuk, T.P. & Ivanov, B. N. (2015). Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. Biochemistry (Moscow), 80, No. 6, pp. 674-687. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297915060048>
10. Winum, J.-Y., Colinas, P. (2015). Carbonic Anhydrases as Esterases and Their Biotechnological Applications. In Supuran, C. T., De Simone, G (Eds.) From Theory to Medical and Industrial Applications (pp. 361-371), Amsterdam: Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63258-6.00021-4>
11. Yaguzhinskiy, L. S., Gudzh, T. I. & Verkhovskiy, A. B (1978). Esterase activity of oligomycin sensitive ATPase of mitochondria. Biokhimiia, 43 (No. 11), pp. 2058-2063 (in Russian).
12. Zakharov, S. D., Sytnik, S. K., Malian, A. N. & Makarov, A. D. (1978). Isolation and structure of  $CF_1$ -ATPase with a modified structure submolecular. Biokhimiia, 43, No. 5, pp. 887-891 (in Russian).
13. Nikulina, G. I. (1965). Review of methods for the colorimetric determination of phosphorus on the formation of molybdenum blue. Moscow, Leningrad: Nauka, 1965 (in Russian).
14. Efimtseva, E. A. & Chelpanova, T. I. (2007). Esterase activity in the tissues of various parts of the gastrointestinal tract of the reindeer. Selskokhozyaistvennaya biologiya, No. 6, pp. 77-80 (in Russian).
15. Bender, M. L., Kezdy, F. J. & Wedler, F. C. (1967). Alpha-Chymotrypsin: Enzyme concentration and kinetics. J. Chem. Educ., 44, No. 2, pp. 84-88. doi: <https://doi.org/10.1021/ed044p84>

Received 04.10.2016

*Н.Ф. Михайленко, А.В. Семенihin, А.П. Хомочкин, Е.К. Золотарёва*

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

E-mail: membrana@ukr.net

#### ЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СОПРЯГАЮЩЕГО ФАКТОРА $CF_1$ , ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ ХЛОРОПЛАСТОВ ШПИНАТА

Показана способность изолированного сопрягающего фактора  $CF_1$  — каталитической части АТФ-синтазного комплекса хлоропластов — катализировать гидролиз *n*-нитрофенилового эфира уксусной кислоты. Специфические ингибиторы карбоангидразы — ацетазоламид (АА) и этоксизоламид (ЭА) — в концентрациях 1–100 мкМ модифицировали эстеразную активность фермента. АА в низкой концентрации (менее 5 мкМ) стимулировал, а в диапазоне 25–75 мкМ ингибировал эстеразную активность  $CF_1$ . ЭА в концентрациях 1–75 мкМ вызывал значительные изменения эстеразной активности  $CF_1$ . АА и ЭА также влияли на латентную АТФазную активность фермента: в концентрациях 1–25 мкМ активировали, а 30–100 мкМ подавляли гидролиз АТФ. Полученные результаты позволяют предположить, что обнаруженная эстеразная активность  $CF_1$  связана с карбоангидразной функцией сопрягающего фактора и, возможно, необходима для переноса протонов, сопряженного с реакциями синтеза либо гидролиза АТФ.

**Ключевые слова:** хлоропласты,  $CF_1$ -АТФаза, карбоангидраза, эстераза, сульфаниламидные ингибиторы.

*N.F. Mykhailenko, A.V. Semenikhin, A.P. Khomochkin, E.K. Zolotareva*

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

E-mail: membrana@ukr.net

ESTERASE ACTIVITY OF CF<sub>1</sub> COUPLING FACTOR  
ISOLATED FROM SPINACH CHLOROPLASTS

It is shown that the isolated coupling factor CF<sub>1</sub> (a catalytic part of the ATP synthase complex of chloroplasts) is able to catalyze the hydrolysis of *p*-nitrophenyl ester of acetic acid. Specific inhibitors of carbonic anhydrase, acetazolamide (AA), and ethoxazolamide (EA) in the concentration range of 1 to 100 μM modified the esterase activity of the enzyme. AA at low concentrations (less than 5 μM) stimulated and in the range of 25-75 μM inhibited the esterase activity of CF<sub>1</sub>. 1-75 μM EA caused the considerable changes in the esterase activity of CF<sub>1</sub>. AA or EA affected also the latent ATPase activity of the enzyme: in the concentration 1-25 μM activated and 30-100 μM inhibited ATP hydrolysis. These results suggest that the observed esterase activity of CF<sub>1</sub> is related to the carbonic anhydrase function of the coupling factor and is probably necessary for the proton transfer coupled with the reactions of ATP synthesis or hydrolysis.

**Keywords:** *chloroplasts, CF<sub>1</sub>-ATPase, carbonic anhydrase, esterase, sulfanilamide inhibitors.*