АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім.О.В.ПАЛЛАДІНА

На правах рукопису

ПЕДЧЕНКО Вадим Костянтинович

ОЧИЩЕННЯ, ВЛАСТИВОСТІ ТА РЕГУЛЯЦІЯ H^+-АТФази ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КЛІТИН КОРЕНІВ КУКУРУДЗИ

03.00.04 - біохімія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

АВ 27.293

Роботу виконано у відділі фізіології живлення рослин Інституту фізіології рослин та генетики АН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук Т.О.ПАЛЛАДІНА

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук В.А.Тугай
кандидат біологічних наук А.Ф.Терещенко

Провідна установа: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії АН України

Захист відбудеться "24" травня 1993 р. в 14 годин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01 в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна АН України за адресою: 252601, Київ-30, вул.Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна АН України.

Автореферат розіслано "23" квітня 1993 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук О.В.Кирсенко

ЛННБ України ім.В.Стефаника
00803128 (М)

ім. В. Стефаника
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми.

У плазматичних мембранах рослинних клітин міститься електрогенний насос, що використовує енергію гідролізу АТФ для транспорту протонів з цитоплазми у позаклітинне середовище, діяльність якого зумовлена H^+-АТФазою (ЕС 3.6.1.35) (Serrano, 1989). Створюваний H^+-АТФазою трансмембранний електрохімічний градієнт протонів використовується системами вторинно-активного транспорту для надходження до рослинної клітини іонів або транспорту метаболічних продуктів шляхом симпорту з протонами (Bush, 1990; Lew, 1991). Завдяки роботі протонного насосу відбувається підкислення середовища в клітинних стінках, що сприяє росту клітин розтягненням (Rayle, Cleland, 1977) та підтримується стабільне значення pH цитоплазми, яке забезпечує певну спрямованість та інтенсивність клітинного метаболізму. На рівні цілої рослини H^+-АТФаза плазматичних мембран бере участь у процесах мінерального живлення, росту та морфогенезу, завантажування провідних тканин метаболітами, регуляції транспірації та прорастання насіння (Полевой, Саламатова, 1991; Serrano, 1990). Важливість фізіологічних функцій зумовлює великий інтерес до всебічного дослідження властивостей H^+-АТФази.

За останнє десятиріччя були з'ясовані основні характеристики H^+-АТФази препаратів плазматичних мембран, ізольованих із різних рослинних об'єктів (Briskin, 1990). Було відзначено подібність цього фермента до H^+-АТФази плазматичних мембран клітин грибів (Serrano, 1985). Встановлено, що H^+-АТФаза плазматичних мембран належить до P-типу транспортних АТФаз, представниками якого є Na^+,K^+-, Ca^{2+}- и H^+,K^+-АТФази тваринних тканин, а також K^+-АТФаза бактеріальних мембран (Болдырев, 1990). Характерними ознаками цих ферментів є утворення в ході каталізованої ними реакції аспартілфосфатного інтермедіата та чутливість до орто-ванадату. Значним досягненням в дослідженні H^+-АТФази було визначення її амінокислотної послідовності (Pardo, Serrano, 1989) та створення моделі її організації (Serrano, 1990).

Проте, ряд аспектів, в тому числі молекулярний механізм функціонування ферменту та способи регуляції його активності в клітинах вищих рослин, залишаються нез'ясованими. Це значною мірою зумовлено тим, що до останнього часу для вивчення ката-

літичної і транспортної функцій H^+-АТФази користувалися препаратами плазматичних мембран, основними недоліками яких є низький вміст ферменту, а також присутність кислих фосфатаз, які можуть в певній мірі маскувати активність АТФази (Gallagher, Leonard, 1982). Окрім того, використання таких препаратів для вивчення ролі ліпідів в регуляції активності H^+-АТФази обмежене високим вмістом ліпідів плазмалеми. Вирішення цих питань зумовило необхідність одержання очищених препаратів ферменту та їх детальної характеристики.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було вивчення каталітичних та регуляторних властивостей солюбілізованої H^+-АТФази плазматичних мембран коренів кукурудзи та порівняння їх з властивостями мембранозв'язаного ферменту. Для досягнення зазначеної мети необхідно було вирішити ряд завдань:

1. Розробити методи виділення і очищення солюбілізованих препаратів H^+-АТФази, проаналізувати їх поліпептидний склад та провести імунохімічну ідентифікацію ферменту.
2. Дослідити кінетичні характеристики та чутливість до інгібіторів АТФазної активності мембранного та солюбілізованого препаратів.
3. Вивчити вплив екзогенних фосфоліпідів та стеринів на активність H^+-АТФази.
4. З використанням групоспецифічних інгібіторів ідентифікувати функціонально важливі амінокислотні залишки солюбілізованого ферменту.
5. За допомогою імунофлуоресцентного методу вивчити розподіл H^+-АТФази в коренях паростків кукурудзи.

Наукова новизна роботи. В роботі вперше проведено порівняльне вивчення властивостей H^+-АТФази плазматичних мембран коренів паростків кукурудзи у мембранозв'язаному і солюбілізованому стані. Показано, що після селективної солюбілізації цього фермента двома цвітеріонними детергентами не змінюються його основні каталітичні характеристики - $K_м$ для MgАТФ і стимуляція K^+. На основі експериментів з груповспецифічними інгібіторами зроблено припущення про суттєву роль сульфгідрильних, амінних та імідазольних груп у функціонуванні H^+-АТФази.

Одержано очищений препарат ферменту з високою АТФазною активністю і показано, що H^+-АТФаза представлена двома поліпептидами з молекулярною масою близько 94 кДа.

Встановлено залежність реактивуючої дії екзогенних фосфоліпідів від співвідношення детергент:білок та продемонстровано кількісне встроювання солюбілізованого ферменту в ліпосоми, що свідчить про високу спорідненість H^+- АТФази до ліпідів мембран. Вперше показано, що лізофосфатиділхолін є специфічним стимулятором H^+-АТФази як у мембраноав'язаній, так і у солюбілізованій формі.

За допомогою імунофлуоресцентного методу встановлено, що підвищений вміст H^+-АТФази спостерігається у саме тих тканинах кореня, що характеризуються високою активністю іонного транспорту.

Практична цінність роботи. Одержані результати розширюють уявлення про властивості, функціональну роль та особливості регуляції H^+-АТФази плазматичних мембран у клітинах вищих рослин та відкривають нові можливості у вивченні цього фермента.

Встановлені закономірності можуть використовуватися при розробці теоретично обгрунтованих систем мінерального живлення та в селекції високопродуктивних сортів рослин.

Результати роботи використовувалися в курсах лекцій з біоенергетики та мінерального живлення на кафедрі фізіології та екології рослин Київського університету ім.Тараса Шевченка.

Апробація роботи. Основні результати роботи доповідались на IV и V Всесоюзних міжуніверситетських конференціях "Біологія клітини" (Тбілісі, 1985; Тбілісі, 1987); 8-мій міжнародній нараді "Мембранний транспорт у рослин" (Венеція, 1989); 19-ій конференції ФЕБС (Рим, 1989); IV Всесоюзній конференції молодих вчених з фізіології рослинної клітини (Москва, 1990); 12-ому міжнародному симпозіумі "Транспортні та рецепторні білки рослинних мембран" (Брістоль, 1991).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 16 друкованих робіт.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 170 сторінках друкарського тексту. Вона складається з вступу, огляду літератури та експериментальної частини, яка містить опис матеріалів та методів досліджень, викладення одержаних результатів з їх обговоренням, заключення, висновків та списку цитованої літератури, що включає 282 найменування. Робота включає 15 таблиць та ілюстрована 25 рисунками.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Об'єктом дослідження були корені 8-денних етиольованих паростків кукурудзи сорто-лінійного гібриду Дніпровський 247МВ, які вирощувалися при 26°С на 0.5 мМ розчині $CaSO_4$.

Фракцію, збагачену плазматичними мембранами виділяли шляхом центрифугування мікросом у градієнті щільності сахарози (Leonard, Van Der Woude,1976) за власною модифікацією (Pedchenko et al.,1990).

АТФазну активність вимірювали при 30°С в середовищі, яке містило 50 мМ МЕС-трис (рН 6.5), 5 мМ азід натрію, 0.2 мМ молібдат аммонію, 50 мМ KCl, 3 мМ $MgSO_4$, 3мМ АТФ за модифікованим методом Ратбуна (Rathbun, Bettlach, 1969;Pedchenko et al., 1990) та виражали у мкмоль $Ф_н$/мг білку·год. Кінетичні константи визначали за методом нелінійної регресії (Page, 1987) з попереднім обрахунком концентрації комплексу MgАТФ (Serrano, 1985). Активність кислої фосфатази вимірювали у середовищі, що містило 50 мМ МЕС-трис (рН 5.0) та 2.5 мМ пНФФ як субстрат реакції. Кількість утворюваного п-нітрофенолу визначали спектрофотометрично при 400 нм.

Концентрацію білку визначали за методом Bradford (1976), а в присутності детергентів - за модифікованим методом Лоурі (Markwell et al., 1978).

АТФ-залежну генерацію мембранного потенціалу у везикулах плазматичних мембран реєстрували за змінами флуоресценції зондів АНС та аураміна О (Педченко, Палладіна, 1985).

Солюбілізацію H^+-АТФази цвітергентом 3-14 проводили за модифікованим методом Вара і Серрано (Vara, Serrano, 1982). Плазматичні мембрани осаджували центрифугуванням 30 хв при 100000g. Осад мембран суспендували у гліцериновому буфері (20% гліцерин, 1мМ ЕДТО, 1мМ дітіотрейтолу (ДТТ), 1мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ), 10мМ МЕС-трис, рН 6.5) при концентрації білку 2 мг/мл, додавали Тритон Х-100 і KCl до концентрацій 0.3% і 0.5 М відповідно та центрифугували 45 хв при 115000g. Осад суспендували при 20°С у гліцериновому буфері при концентрації білку 1 мг/мл, додавали цвітергент 3-14 до 4 мг/мл та холат натрію до 9 мг/мл і центрифугували 30 хв при 115000g.

Для солюбілізації H^+-АТФази лівофосфатиділхоліном (лФХ) за модифікованим методом Серрано (Serrano, 1984) фракцію плазматичних мембран, що містила 0.25 М KI, центрифугували 30 хв

при 100000g. Осад ресуспендували у гліцериновому буфері (20% гліцерин, 0.1мМ ЕДТО, 1мМ ДТТ, 1мМ ФМСФ, 10мМ ГЕПЕС-трис, pH 7.2) при концентрації білку 2 мг/мл, додавали Тритон Х-100 до 0.4% і центрифугували 45 хв при 115000g. Осад ресуспендували в тому ж буфері до концентрації білку 1 мг/мл та інкубували в 5 мг/мл лФХ 10 хв при 20°С з наступним центрифугуванням 30 хв при 115000g.

В обох методах супернатанти, що містили солюбілізовану H^+-АТФазу зберігали при -18°С.

Для очищення H^+-АТФази, 3 мл препарату, солюбілізованого лФХ, наносили на лінійний градієнт гліцерину (34 мл, 25-55%), що містив 1 мМ трис-МЭС (pH 6.5), 2 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЕДТО, центрифугували при 144000g протягом 16 год при 4°С та збирали фракції об'ємом по 1.5 мл.

Поліпептидний склад фракцій аналізували методом електрофорезу в присутності додецилсульфату натрію (ДСН) у градієнтному поліакриламідному гелі (10-20%) за Леммлі (Laemmli,1970).

Імунодетекцію проводили після напівсухого горизонтального переносу білків з поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану в буфері, що містив 48 мМ трис, 39 мМ гліцин, 0.05% ДСН и 20% метанол, при силі струму 0.8 мА/см^2 протягом 2 год при 20°С. Для локалізації ферменту були використані кролячі поліклональні антитіла до очищеної H^+-АТФази *Arabidopsis thaliana* у розведенні 1:250 та вторинні антитіла до імуноглобулінів кроля, кон'юговані з пероксидазою хріну у розведенні 1:200. Візуалізацію іммуноблотів проводили за допомогою 1-хлоро-4-нафтолу.

Гель-фільтрацію препаратів H^+-АТФази проводили на колонці 1.6х30 см, заповненій Sepharose-6B CL, яку врівноважували трьома об'ємами буфера, що містив 10 мМ МЕС-трис, 50 мМ ацетат калію і 5 мМ азид натрію (pH 6.5). Елюцію проводили в тому ж буфері при 20°С та швидкості потоку 0.5 мл/хв.

Для імуноцитолокалізації H^+-АТФази сегменти коренів 4-денних паростків кукурудзи інкубували 2 год при 20°С у фіксаторі Чемберлена (формалін: 70% етанол:оцтова кислота, 5:90:5). Промивку, зневоднювання та заливку у парафін проводили за стандартними цитологічними методиками (Паушева, 1988). Зрізи завтовшки 15 мкм послідовно інкубували 2 год при 20°С з кролячими антитілами до очищенної H^+-АТФази плазматичних мембран

(розведення 1:200) та 1 год з вторинними антитілами кози до імуноглобулінів кроля, кон'югованими з ФІТЦ (1:100). Після промивок зрізи продивлялися під флуоресцентним мікроскопом "Jenamed" (Германія) у 50% гліцерині.

Лізофосфатиділхолін одержували з обробленого фосфоліпазою A_2 фосфатиділхоліну шляхом адсорбційної хроматографії на колонці з силікагелем.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.

При дослідженні субстратної специфічності та інгібіторному аналізі було встановлено, що АТФазна активність препарату плазматичних мембран коренів кукурудзи зумовлена в основному H^+-АТФазою, характерними ознаками якої є оптимум при pH 6.5, значне інгібірування орто-ванадатом, діциклогексілкарбодіімідом (ДЦКД) та діетилстільбестролом (ДЕС) і стимуляція іонами калію (біля 30%). Відсутність гальмування при дії олігоміцину, азиду, молібдату, нітрату та уабаїну свідчила про незначний рівень забруднень іншими клітинними мембранами. Залежність АТФазної активності від концентрації комплексу MgATФ мала гіперболічний вигляд з $K_м$ 0.2 мМ, яка не змінювалася в присутності 50 мМ K^+.

Оскільки активний центр H^+-АТФази локалізований на цитоплазматичному боці мембрани, АТФазна активність препарату визначається ферментом, локалізованим в інвертованих везикулах. З використанням трьох незалежних методів - активації в присутності каналоутворюючого іонофору аламетіцину, зв'язування мембран на імобілізованому лектині та змін АТФазної активності при варіюванні осмолярності реакційного середовища, нами було показано, що доля таких везикул складає біля 60% від їх загальної кількості. Додавання до мембранного препарату MgATФ призводило до характерних змін флуоресценції потенціал-чутливих зондів, що свідчило про генерацію внаслідок транспорту протонів АТФазою позитивного всередині везикул мембранного потенціалу . Цей потенціал швидко розсіювався в присутності протонофору карбонілціанід-м-хлорфенілгідразону і знижувався після обробки плазматичних мембран інгібітором H^+-АТФази ДЦКД.

Очищення H^+-АТФази неможливе без руйнування білок-ліпідного комплексу мембран, тому важливим етапом дослідження було вивчення впливу різних детергентів на АТФазну активність плаз-

матичних мембран. При цьому було встановлено, що концентраційні залежності для іонних, неіонних та цвітеріонних детергентів мали двофазну форму: при низьких концентраціях спостерігалася активація, а при підвищених - інгібірування. Активація АТФази при концентраціях нижче критичної концентрації міцелоутворення (ККМ) мабуть пов'язана із збільшенням проникності мембран до MgATФ, оскільки найбільша стимуляція фермента не перевищувала значення, розрахованого нами раніше за співвідношенням везикул в різною орієнтацією плазматичної мембрани.

Значні відміни у впливі на АТФазну активність були виявлені при використанні лізофосфатиділхоліну (лФХ): активація відбувалася при концентраціях, нижчих за ККМ і значно перевищувала ефект інших детергентів, а гальмування при підвищені концентрації було відсутнє (рис.1). Оскільки відомо, що лФХ входить до складу плазматичних мембран рослинних клітин (Sandstrom, Cleland, 1989), одержані результати зумовили необхідність детального вивчення стимулюючої дії лФХ у зв'язку з можливою участю цієї сполуки в регуляції активності H^+-АТФази in vivo.

Проведені з використанням препарату плазматичних мембран дослідження показали, що максимальна стимуляція під дією лФХ спостерігається при pH 6.5 (pH-оптимум H^+-АТФази), і супроводжується значним збільшенням V_{max}, в той час як $K_м$ ферменту для MgATФ, інгібірування ванадатом та ступінь активації K^+ досто-

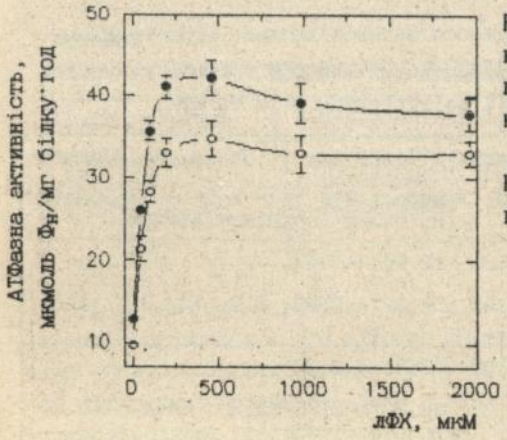

Рис.1. Вплив лФХ на активність H^+-АТФази препарату плазматичних мембран коренів кукурудзи.

Катіони в середовищі інкубації: ○ - 3 мМ $MgSO_4$;
● - 3 мМ $MgSO_4$, 50мМ KCl.

вірно не змінювалися. Тому можна припустити, що цей ефект пов'язаний насамперед з гідрофобною взаємодією лФХ з молекулою H^+-АТФази, що зумовлює перехід ферменту до активованого стану. Слід також зазначити, що при заміні АТФ іншими нічними субстратами стимуляція гідролазної активності не спостерігалася, що переконливо свідчить про специфічність лФХ щодо H^+-АТФази.

Необхідною умовою для вивчення каталітичного механізму та особливостей регуляції H^+-АТФази є одержання очищенного ферменту. Враховуючи низький вміст H^+-АТФази у плазматичних мембранах рослин, важливим етапом, що передує її солюбілізації, було вилучення з мембран більшої частини білкових домішок. Нами було встановлено, що обробка мембранних препаратів Тритоном Х-100 (детергент:білок-2:1) при підвищеній іонній силі призводить до видалення 2/3 загального білку зі збереженням біля 80% АТФазної активності і супроводжується значним зниженням активності кислої фосфатази. Одержаний збагачений препарат ферменту був використаний для солюбілізації H^+-АТФази із застосуванням двох цвітеріонних детергентів - синтетичного (цвітергент 3-14) та природнього (лФХ), ефективність яких було виявлено при очищенні ферменту з коренів вівса (Vara, Serrano, 1982; Serrano, 1983). При порівнянні солюбілізуючої дії цих двох детергентів з'ясувалося, що в препаратах, солюбілізованих лФХ, вихід загальної АТФазної активності та коефіцієнт очищення H^+-АТФази вищі, порівняно з одержаними при застосуванні цвітергенту 3-14 (табл.1). АТФазна активність препаратів, солюбілізованих

Таблиця 1

Очищення H^+-АТФази плазматичних мембран коренів кукурудзи при солюбілізації цвітергентом 3-14 та лФХ.

Препарат	Білок, мг	АТФазна активність, мкмоль $\Phi_н$ / мг білку·год	Вихід, %		Очищення, разів
			Білку	АТФази	
Плазматичні мембрани	28.29	12.94 ± 0.43	-	-	-
Цвітергент 3-14 (супернатант)	2.53	56.17 ± 2.38	8.9	23.3	4.3
Плазматичні мембрани	52.00	7.81 ± 0.32	-	-	-
лФХ (супернатант)	6.32	79.68 ± 3.75	12.2	74.4	10.2

цвітергентом З-14 підвищувалася в 2-3 рази при доданні екзогенних фосфоліпідів сої (азолектину) (табл.2), досягаючи насичення при співвідношенні білок:ліпід-1:15. Нами було вперше продемонстровано, що при зростанні співвідношення цвітергент:білок відбувається як зниження АТФазної активності солюбілізованого препарату, так і зростання реактивуючої дії екзогенних фосфоліпідів. Це свідчить, що солюбілізація цвітергентом З-14 супроводжується частковою оберненою інактивацією H^+-АТФази внаслідок її деліпідування.

Слід також відзначити, що активуюча дія лФХ зберігалася в солюбілізованих препаратах (табл.2). Оскільки в останніх відсутні латентні молекули АТФази, одержані результати підтверджують раніше висунуте припущення про те, що активація H^+-АТФази лФХ є специфічною і не може пояснюватися виключно мембранотропним ефектом цієї сполуки.

Додаткове підвищення АТФазної активності препарату, солюбілізованого цвітергентом З-14, було зареєстровано при використанні суміші азолектину зі стеринами, значний вміст яких є характерним для плазматичних мембран рослин (Keenan et al., 1973). Активуюча дія ситостерину була вищою, ніж холестерину, і спостерігалася при ваговому співвідношенні 3:1, тоді як підвищення долі стеринів викликало зменшення активності. Активація H^+-АТФази стеринами може пояснюватися їх впорядковуючою дією на фосфоліпідний матрикс мембрани.

Таблиця 2

Активація солюбілізованих препаратів H^+-АТФази плазматичних мембран азолектином та лФХ.

Солюбілізуючий детергент	АТФазна активність, мкмоль $Ф_н$/мг·год		
	контроль	+азолектин	+лФХ
Цвітергент З-14	27.47 ± 1.42	56.17 ± 1.85	45.09 ± 2.49
лФХ	58.69 ± 2.06	47.88 ± 1.23	67.64 ± 2.98

Під час гель-фільтрації фракції плазматичних мембран на колонці з сефарозою вся АТФазна активність виявлялася у вільному об'ємі у вигляді єдиного піку оптичної густини при 280 нм, тобто була цілком зв'язана з везикулами. При хроматографії солюбілізованих препаратів розподіл активності змінювався -

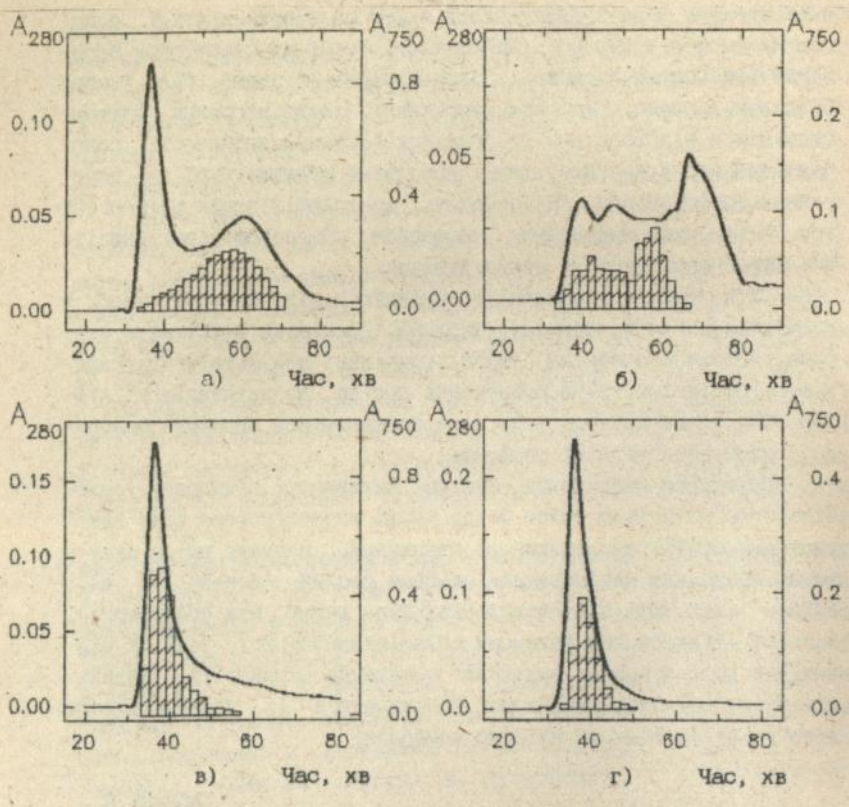

Рис.2. Розподіл АТФазної активності (діаграма, A_{750}) та білку (крива, A_{280}) після гель-фільтрації препаратів H^+-АТФази, солюбілізованих лФХ (а,в) та цвітергентом 3-14 (б,г): а, б - без добавок; в, г - в присутності азолектинових ліпосом (10 мг/мл).

більша частина активності виходила з колонки з певною затримкою (рис.2 а,б). Це свідчило про включення H^+-АТФази в міцели детергентів і було додатковим критерієм солюбілізації. Додання до солюбілізованих препаратів надлишку ліпосом з азолектину призводило до встроювання H^+-АТФази в їхні мембрани, що супроводжувалося кількісним виходом АТФазної активності у вільному об'ємі (рис.2 в,г). Активність АТФази, солюбілізованої цві-

тергентом З-14, після цієї процедури збільшувалася в 1.7 раза, що пояснюється активуючою дією фосфоліпідів. Таким чином, за допомогою гель-фільтрації нами були одержані переконливі докази високої спорідненості H^+-АТФази до фосфоліпідів мембрани, а також оберненості порушення ліпід-білкової взаємодії під час солюбілізації ферменту цвітеріонними детергентами.

Взаємодія детергентів з H^+-АТФазою може призводити до значних змін конформації ферменту, тому необхідно було дослідити каталітичні властивості солюбілізованих препаратів. За допомогою кінетичного аналізу було встановлено, що залежність АТФазної активності від концентрації комплексу MgATФ мала гіперболічний вигляд, тобто відповідала рівнянню Міхаеліса-Ментен (рис. 3), причому K_m для солюбілізованих препаратів не відрізнялася достовірно від одержаної для плазматичних мембран (біля 0.65 мМ), в той час як V_{max} значно збільшувалася. В окремих дослідах, коли варіювали концентрації одного з компонен-

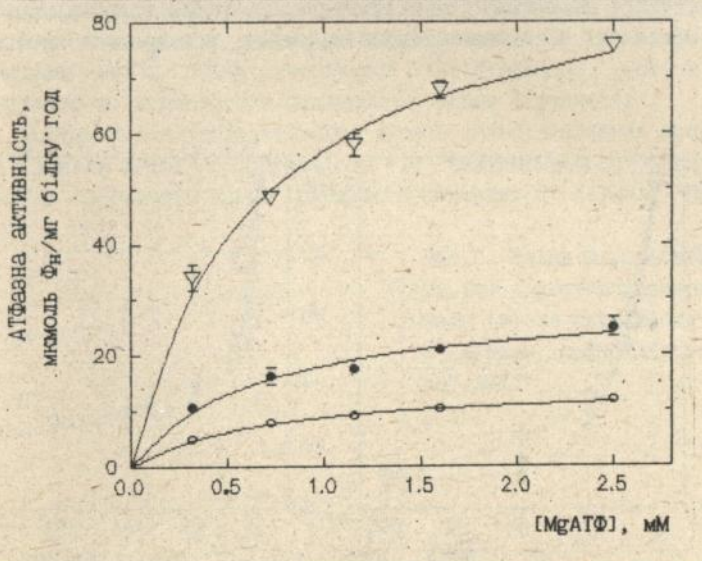

Рис.3. Залежність АТФазної активності плазматичних мембран (○) та препаратів, солюбілізованих цвітергентом З-14 (●) або лФХ (▽) від концентрації комплексу MgATФ.

тів комплексного субстрату при сталій концентрації другого, виявилося, що максимальна активність спостерігається при еквімолярному співвідношенні Mg^{2+} та АТФ. Підвищені концентрації вільного АТФ (більше 1 мМ) в значній мірі знижували АТФазну активність, тоді як вільний Mg^{2+} дещо підвищував її. Оскільки значення K_m та стимуляція АТФазної активності K^+ після солюбілізації не змінювалися, можна зробити висновок про відсутність значних конформаційних змін в молекулі ферменту під дією цвітеріонних детергентів.

Важливою характеристикою H^+-АТФази є її чутливість до специфічних інгібіторів, насамперед до ДЦКД та ванадату. Одержані нами результати свідчать про те, що інгібіторний ефект цих сполук значно більший для солюбілізованих препаратів, ніж для плазматичних мембран (рис. 4). Значне зниження I_{50} може пояснюватися очищенням H^+-АТФази під час солюбілізації від інших фосфогідролаз. Окрім того, ДЦКД може реагувати також з СООН-групами ліпідів або поліпептидів, загальна кількість яких зменшується, що посилює його ефективність після солюбілізації.

Збагачені H^+-АТФазою солюбілізовані препарати є зручним

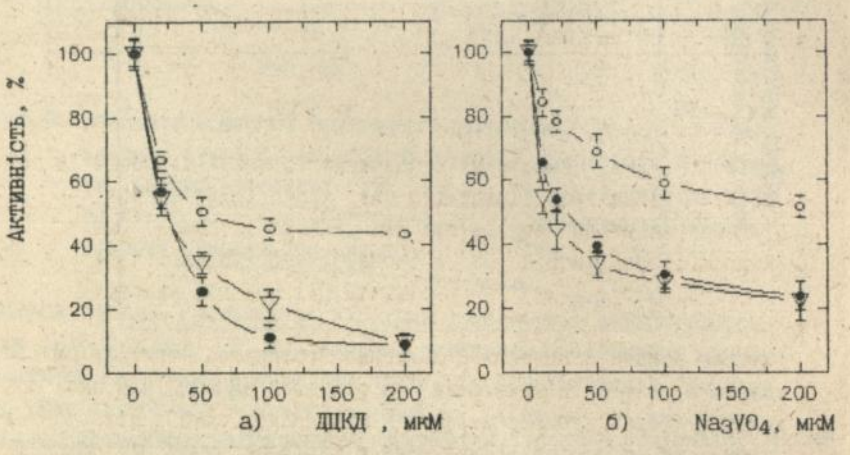

Рис.4. Інгібірування ДЦКД (а) та ванадатом (б) АТФазної активності плазматичних мембран (○) та препаратів, солюбілізованих цвітергентом 3-14 (●) або лФХ (▽).

об'єктом для дослідження локалізації функціонально важливих амінокислотних залишків ферменту. Зараз єдиним надійно ідентифікованим є залишок аспрагінової кислоти, що фосфорилюється під час реакційного циклу всіх АТФаз Р-типу (Walderhaug et al., 1985). Для пошуку інших важливих залишків ми використовували різні групоспецифічні реагенти. Було встановлено, що H^+-АТФаза мала високу чутливість до модифікаторів SH-груп - пара-хлормеркурібензоату та N-етилмалеіміду. Більш гідрофільні інгібітори (іодацетамід та моноіодоцтова кислота) мали значно слабший ефект, що може вказувати на розташування чутливої SH-групи в гідрофобному оточенні.

Модифікація аміногруп під дією флуорескамӥну та залишків гістидину діетилпірокарбонатом також призводили до значного зниження АТФазної активності солюбілізованого ферменту (рис.5), причому перший інгібітор був більш ефективним. Преінкубація АТФази з наведеними інгібіторами в присутності надлишку реагентів, що містили специфічні функціональні групи (дітіотрейтолу, лізину або гістидину) значно знижувала гальмування активності, що свідчить про специфічність дії інгібіторів. Додавання MgATФ також зменшувало інгібірування, хоча й не призводило до відновлення початкового рівня активності.

Оскільки електрофоретичний аналіз солюбілізованих препаратів виявив певну гетерогенність їх поліпептидного складу, нами був проведений пошук подальшого очищення H^+-АТФази. Най-

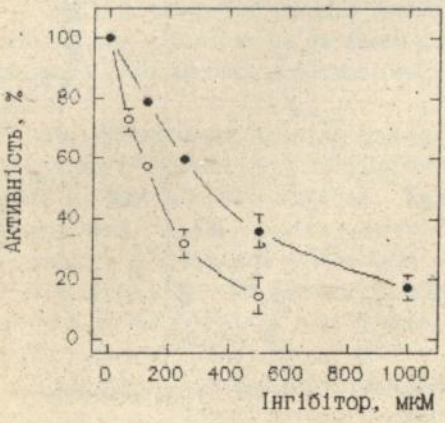

Рис.5. Вплив флуорескамӥну (○) і діетилпірокарбонату (●) на активність H^+-АТФази, солюбілізованої лФХ.

вища ефективність спостерігалася при центрифугуванні солюбілізованого ферменту в лінійному градієнті гліцерину (рис.6), після якого переважна частина АТФазної активності виявлялася в єдиному піці, який відділявся від основної маси білкових домішок за рахунок більш високої швидкості седиментації. При цьому було досягнуто очищення в 23 рази по відношенню до початкової фракції плазматичних мембран. Електрофоретичний аналіз показав, що основну частину білку в очищеному препараті складає поліпептидний дублет з молекулярною масою близько 94 кДа, який за допомогою імуноблотінгу був ідентифікований як каталітична субодиниця H^+-АТФази плазматичних мембран кукурудзи. Очищені препарати H^+-АТФази з коренів томатів та вівса мали аналогічні молекулярні маси (Anthon, Spanswick, 1986; Serrano, 1984).

Висока чутливість та специфічність імунологічних методів були використані нами для вивчення локалізації H^+-АТФази в коренях паростків кукурудзи in situ. За допомогою імунофлуоресцентного забарвлювання радіальних зрізів було показано, що епідерміс та периферійна частина осьового циліндру значно

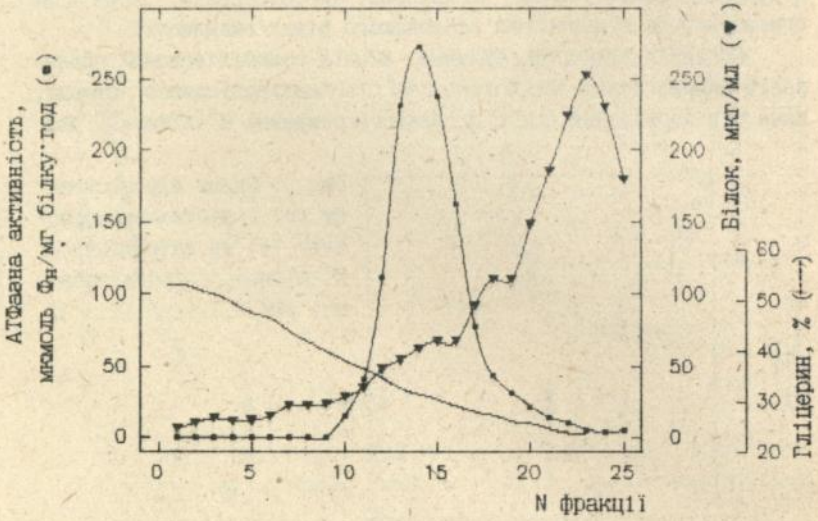

Рис.6. Розподіл АТФазної активності та білку після центрифугування препарату, солюбілізованого лФХ, в градієнті гліцерину.

збагачені H^+-АТФазою у порівнянні з іншими тканинами коренів. Загальна площина цих тканин не перевищує 5% від загальної поверхні зрізів, що пояснює низький вміст АТФази у препаратах плазматичних мембран рослин. Одержані результати узгоджуються з гіпотезою про існування в коренях рослин двох зон активного транспорту іонів (Люттге, Хигинботам, 1984). Підвищений вміст H^+-АТФази у плазматичних мембранах цих тканин є підтвердженням важливої ролі цього ферменту в поглинанні та транспорті елементів мінерального живлення в рослинах.

ВИСНОВКИ.

1. Охарактеризовано АТФазну активність везикульованих препаратів плазматичних мембран, ізольованих з коренів паростків кукурудзи. За допомогою флуоресцентних зондів показано, що H^+-АТФаза генерує мембранний потенціал.

2. Проведено селективну солюбілізацію H^+-АТФази з використанням 2 цвітеріонних детергентів. Порівняння властивостей фермента у мембранозв'язаному та солюбілізованому стані показало, що останній характеризується більшою активністю та підвищеною чутливістю до інгібіторів, в той час як значення $K_м$ для MgАТФ та стимуляція іонами калію не змінюються.

3. Препарати H^+-АТФази, солюбілізовані цвітергентом 3-14, мають нижчу активність, порівняно з солюбілізованими лізофосфатиділхоліном, проте вона підвищується в присутності екзогенних фосфоліпідів.

4. Під час реконструкції солюбілізованих препаратів спостерігається кількісне зв'язування фермента з ліпосомами, що свідчить про високу спорідненість H^+-АТФази до мембранних ліпідів.

5. Встановлено, що лізофосфатиділхолін є специфічним стимулятором H^+-АТФази як у мембранозв'язаній, так і у солюбілізованій формі. Припускається, що ефект лізофосфатиділхоліну обумовлений гідрофобною взаємодією з молекулою фермента, яка переводить H^+-АТФазу в активований стан.

6. Виявлено, що ковалентна модифікація сульфгідрильних, амінних та імідазольних груп призводить до інактивації АТФази, що свідчить про їхню суттєву роль у функціонуванні ферменту.

7. Проведено очищення солюбілізованої H^+-АТФази центрифугуванням в лінійному градієнті щільності гліцерину. За допомо-

гою ДСН-електрофорезу та імуноблотінгу очищеного препарату показано, що H^+-АТФаза репрезентована поліпептидним дублетом з молекулярною масою близько 94 кДа.

8. З використанням імунофлуоресцентного аналізу досліджено локалізацію H^+-АТФази в коренях паростків кукурудзи. Встановлено, що найбільшим вмістом ферменту характеризуються клітини епідерми та периферійної частини центрального циліндру, що відзначаються високою інтенсивністю активного транспорту іонів. Таким чином, підтверджено важливу роль H^+-АТФази в мінеральному живленні рослин.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Педченко В.К., Палладіна Т.О. Електрогенність H^+-АТФази плазматичних мембран коренів кукурудзи //Доп. АН УРСР. Сер. Б. - 1985. - N4. - С.73-76.
2. Педченко В.К., Палладина Т.А. Получение солюбилизированных препаратов H^+-АТФазы плазматических мембран корней кукурузы //IV Всесоюзн. межуниверс. конф."Биология клетки".Тезисы докл.-Тбилиси, 1985.-С.545-547.
3. Палладина Т.А., Педченко В.К., Симчук Е.Е. Реактивация фосфолипидами солюбилизированной H^+-АТФазы плазматических мембран корней кукурузы // Докл. АН СССР. - 1986. - Т.287, N7. - С.1499-1502.
4. Педченко В.К., Палладина Т.А., Насырова Г.Ф. Некоторые биохимические характеристики H^+-АТФазы плазматических мембран клеток корней кукурузы // V Всесоюзн. межуниверс. конф. "Биология клетки".Тезисы докл.- Тбилиси, 1987. - С.347-348.
5. Бедявская Н.А., Палладина Т.А., Педченко В.К., Подлуцкий А.Г. Действие фосфолипаз на морфологию препаратов плазматических мембран кукурузы //Докл. АН УССР.Сер.Б. - 1987. - N5. - С.51-55.
6. Palladina T.A., Pedchenko V.K., Nasirova G.F., Simchuk E.E. Lipid dependence of plasma membrane H^+-ATPase //14 Intern. Biochem. Congress. Reports. - Prague, 1988. - P.124.
7. Palladina T.A., Pedchenko V.K., Nasirova G.F. Lipid dependence of solubilized H^+-ATPase preparations from plant plasma membranes //19 Meet. FEBS. Abstr.- Rome, 1989.- TH 349.
8. Palladina T.A., Nasirova G.F., Pedchenko V.K. Effects of

phospholipases on plasma membrane vesicles from corn seedling roots /Plant Membr. Transport: the current position. - Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1989. - P.115-116.

9. Педченко В.К. Активация H^+-АТФазы плазматических мембран клеток корней кукурузы лизофосфатидилхолином //IV Всесоюзн. конф. молодых ученых по физиологии растит.клетки.Тезисы докл.- М.-1990.-С.117.
10. Pedchenko V.K., Nasirova G.F., Palladina T.A. Lysophosphatidylcholine specifically stimulates plasma membrane H^+-ATPase from corn roots //FEBS Lett. - 1990. - V.275, N1. - P.205-208.
11. Palladina T.A., Nasirova G.F., Simchuk E.E., Pedchenko V.K. Participation of plasma membrane lipids in the H^+-ATPase regulation //12 Int. Long Ashton Symp. "Transport and receptor proteins of plant membranes".Abstr.-Bristol, 1991.- P.54.
12. Palladina T., Nasyrova G., Simchuk E., Pedchenko V. Mechanisms involved in lipid regulation of the plasma membrane H^+-ATPase //9th Intern. Workshop on Plant Membrane Biology. Abstr. - Monterey, California, 1992. - P.250.

Підп. до друку. 13.04.93 Формат 60×84/16 Папір офс.
Друк. офс. Умовн. друк. арк. 0,93 Обл.-вид. арк. 0,70 тир. 120.
Зам. 3-3569.

Київська книжкова друкарня наукової книги. Київ, Репіна, 4.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Ав 27.293