

**ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
ФОРМЫ АТФ-ЗАВИСИМОЙ ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ
ПЛОДОВ ЯБЛОНИ****С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ, Я.А.ОМАРОВ, А.А.КУЛИЕВ*****Бакинский Государственный Университет***

В субэпидермальных тканях большая часть активности фермента была сосредоточена в цитоплазматической фракции. Методом диск-электрофореза в ПААГ выявлены две молекулярные формы фермента, существенно различавшиеся по электрофоретической активности. Наиболее активная и доминирующая молекулярная форма АТФ-фосфофруктокиназы была локализована в цитозоле, а вторая, менее активная - в субклеточных частицах, осажденных при 10 000 g.

АТФ-зависимая фосфофруктокиназа (ФФК, КФ 2.7.1.11), ключевой фермент дихотомического пути распада глюкозы, широко распространена в растительных тканях. Показано, что она часто представлена несколькими молекулярными формами, количество которых может варьировать в зависимости от тканевой и видовой специфичности, а также стадий роста и развития [1-3]. Более того, эти формы могут локализоваться в разных компартментах клетки и существенно различаться между собой по своим свойствам [2, 4-6].

ФФК обнаружена также в сочных плодах, однако ее изучение практически ограничивается данными об активности на разных стадиях роста и развития [7-9]. Присутствие этого фермента в плодах яблони впервые было показано нами [10]. В настоящей работе представлены результаты исследования внутриклеточной локализации и изоферментного состава ФФК яблочек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Спелые плоды яблочек (*Pyrus Domestica* Borkh.) сортов «Антоновка» и «Ренет Симиренко» были собраны на преклимактерической стадии из государственных садовых угодий Губинского района Азербайджанской Республики. Были отобраны плоды приблизительно одинакового размера и без видимых дефектов. Все реактивы для экспериментов были из фирмы

«Sigma Chemical Co» (США). Эксперименты проводили с яблоками, хранившимися до их использования (октябрь) при 4°C в холодильной камере. Субэпидермальную ткань яблок в количестве 15 г. растирали в ступке в 30 мл экстрагирующей среды, состоящей из 25 мМ трис-НСl-буфера (рН 8,5), 5 мМ ЭДТА, 2,5 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанола (МЭ), 10 мМ цистеина, а также 2% поливинилпирролидона и 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань и полученный фильтрат подвергали последовательному центрифугированию при 1000, 10 000, 30 000 и 105 000 g.

В супернатанте измеряли активность фермента и изучали изоферментный состав. В осадке активность и изоферментный состав исследовали после обработки 0,1%-ным твином-80, приготовленным на основе экстрагирующей среды. Для предотвращения осмотического шока и сохранения структурной организации субклеточных частиц в серии экспериментов экстрагирующую среду готовили на 0,5 М сахарозе. Для создания ионной силы использовали 0,5 М KCl, который в зависимости от цели опыта добавляли либо непосредственно в супернатант, либо в экстрагирующую среду.

Активность ФФК определяли спектрофотометрически при 340 нм по скорости восстановления NAD. Инкубационная среда состояла из 25 мМ трис-НСl-буфера (рН 7,8), 2 мМ MgCl₂, 0,2 мМ NAD, 25 мМ АТР, 6 мМ фруктозо-6-фосфата, а также 20 мкг/мл дифосфат-фруктозо-6-фосфат 1-фосфотрансферазы (КФ 2.7.1.90), 10 мкг/мл глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.12), 5 мМ H₃AsO₄ и 0,3 мл исследуемой пробы при общем объеме 3 мл. Контрольная кювета не содержала субстрата. Реакция начиналась с внесения ферментного препарата, а измерение начинали спустя 20 мин после начала реакции при +25°C.

Диск-электрофорез в ПААГ проводили в щелочной системе с помощью прибора «Reanal» (Венгрия). В основе лежал метод Дэвиса [11]. Были использованы 7,5%-й акриламид для мелкопористого и 4,75%-й акриламид для крупнопористого геля, а также 25 %-я сахароза в качестве антиконвекционной среды. Электрофорез проводили в течение 3 ч при 4°C. Сила тока составляла в первые 20 мин 1 мА, а затем 3 мА на каждую трубку. Для выявления полос фермента гели инкубировали в среде, которую использовали для определения активности фермента, добавив к ней феназинметасульфат 0,02 мг/мл и тетразолий нитросиний 0,2 мг/мл. Продолжительность инкубации составляла 60-80 мин в темноте при +30°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по определению активности ФФК в различных фракциях ткани яблок представлены в табл.1. Как видно из полученных данных, активность фермента распределяется по фракциям неравномерно. Большая ее часть сосредоточена в супернатанте. Так, например, в яблоках «Ренет Симиренко» более 60%, а в «Антоновке» 72% общей ферментативной ак-

тивности обнаружено в супернатанте 105 000 g. Сравнительно низкая активность (17,6% для «Антоновки» и 23,5% для «Ренет Симиренко») выявляется в осадках фракции 10 000 g после их обработки твином-80 в присутствии KCl. В осадках, полученных при центрифугировании при 30 000 g и 105 000 g, активность фермента практически отсутствовала. Такое распределение активности по фракциям свидетельствует о преобладании цитоплазматической формы ФФК в субэпидермальных тканях яблок. Результаты наших исследований согласуются с имеющимися в литературе сообщениями о том, что ФФК растений, в основном, локализована в цитозоле [3, 9].

Как уже отмечалось, субклеточные частицы клеток яблок, осаждаемые при 10 000 g, также обладают значительной частью активности ФФК. Однако, не исключено, что реальная активность фермента в этих осадках намного выше, т.к. обработка твином-80 и KCl может приводить к существенному ее снижению. Кроме того, оптимальные условия функционирования ФФК субклеточных частиц могут отличаться от таковых для цитозольной формы.

Таблица 1

**Распределение активности ФФК яблок по субклеточным фракциям
($D_{340} \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$ гомогената)**

Фракция	Антоновка		Ренет Симиренко	
	активность во фракции	% от общей активности	активность во фракции	% от общей активности
Супернатант 1 000 g	240	96	190	93,1
Супернатант 105 000 g	180	72	145	60,2
Осадок 10 000 g	44	17,6	48	23,5
Осадок 30 000 g	следы	-	следы	-
Осадок 105 000 g	следы	-	следы	-

Интересно, что в зависимости от состава экстрагирующей среды уровень активности ФФК и характер ее изменения в супернатанте, полученном при различных значениях центрифугирования, существенно отличаются [Табл.2]. Наиболее активным был супернатант 1000 g, приготовленный с использованием экстрагирующей среды (без KCl, NADH и сахаразы). Однако дальнейшее центрифугирование этого супернатанта приводит к заметному снижению уровня активности ФФК в супернатанте при 10 000 g. В супернатантах 30 000 g и 105 000 g активность по сравнению с предыдущим супернатантом (10 000 g) практически не менялась. Потеря активности в супернатанте при 10 000 g наводит на мысль, что определенная часть фермента связана с субклеточными частицами.

Добавление KCl в экстрагирующую среду предотвращает потерю активности в последующих супернатантах. Возможно, что создаваемая

ионная сила KCl способствует переходу связанной формы фермента в экстрагирующий раствор и, таким образом, осаждение частиц центрифугированием не отражается на уровне активности супернатантов. Что же касается незначительного повышения общего уровня активности ФФК под влиянием KCl, то это скорее всего связано с непосредственным его действием на фермент, т.к. то же самое влияние этой соли наблюдается при ее добавлении в инкубационную среду для определения активности фермента. Стимулирующее влияние ионов K^+ на АТР-зависимую фосфофруктокиназу обнаружено и в других растительных объектах [2].

Таблица 2

Влияние состава экстрагирующей среды на активность ФФК различных супернатантов яблок ($D_{340} \cdot 10^3 \text{ мин}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$ гомогената)

Супернатант	Антоновка				Ренет Симиренко			
	ЭС*	ЭС+KCl	ЭС + KCl +сахароза	ЭС+KCl +НА/ДН+сахароза	ЭС	ЭС+KCl	ЭС + KCl +сахароза	ЭС+KCl +НА/ДН+сахароза
1 000 g	234	236	204	200	190	197	151	150
10 000 g	196	193	168	169	98	96	92	90
30 000 g	190	178	168	168	95	95	90	88
105 000 g	186	177	168	168	95	95	90	87

ЭС* – экстрагирующая среда

Применение KCl вместе с сахарозой снижает активность фермента в супернатантах 1000 g на 8 %, несмотря на то, что сама сахароза на активность ФФК *in vitro* никакого влияния не оказывает. Видимо, создавая осмотическое давление и оберегая субклеточные частицы от повреждения, сахароза предотвращает переход фермента из них в экстрагирующий раствор. Поэтому в варианте с сахарозой также не наблюдается разницы между активностью супернатантов после осаждения этих частиц центрифугированием. Сравнительный анализ всех трех вариантов экстрагирующих сред наводит на мысль, что под действием 0.5 М KCl в раствор выходит та часть фермента, которая связана с поврежденными в процессе приготовления супернатантов субклеточными частицами. Какие же могут быть эти частицы? Многочисленные исследования показывают, что альтернативным местом локализации ФФК в растительных тканях являются хлоропласты [2, 4, 6, 7, 8].

Ряд наблюдений в процессе наших экспериментов дает основание предположить, что и в яблоках, по-видимому, этот фермент также находится в хлоропластах. Так, например, фракция 10 000 g, содержащая хлоропласты, всегда обладает активностью ФФК. Примечательно, что осадок,

полученный из яблок «Ренет Симиренко» (сорт более богатый хлоропластами), был обильнее, более зеленым и обладал относительно большей активностью, чем аналогичный осадок из яблок сорта «Антоновка». При этом общий уровень ферментативной активности в плодах «Антоновки» был в 1,5 – 2 раза выше. Осадок супернатантов, полученных при 30 000 g (митохондриальная фракция) и 105 000 g (микросомальная фракция), где хлоропласты отсутствуют, были практически лишены ферментативной активности ФФК.

Таким образом, доминирующая молекулярная форма ФФК яблок локализована в цитоплазматической фракции, а меньшая – в субклеточных частицах, осаждаемых при 10 000 g.

В последующей серии экспериментов нами изучался изоферментный состав различных фракций субэпидермальных тканей яблок методом диск-электрофореза в ПААГ. На рисунке показаны зимограммы некоторых из них, позволяющие определить количество молекулярных форм ФФК и их внутриклеточную локализацию. Зимограммы супернатантов 1000 и 10 000 g, 30 000 и 15 000 g, а также осадков 30 000 и 105 000 g оказались сходными.

Супернатанты 1000 и 10 000 g, приготовленные на экстрагирующей среде (с добавлением KCl и сахарозы) хотя и обладали, как указывалось выше, достаточно высокой ферментативной активностью, после электрофореза в ПААГ активность не проявляли (гель №1). Добавление 0,4 мМ NADH в экстрагирующую среду или же непосредственно в супернатанты, но с последующим выдерживанием в течение часа, приводило к появлению двух молекулярных форм фермента, существенно различающихся электрофоретической подвижностью (гель №2). Эти формы характеризовались значением R_f 0,16 и 0,31.

Следует отметить, что присутствие NADH было необходимым условием электрофореза и для других фракций. В его отсутствии практически вся активность обнаруживалась на поверхности крупнопористого геля. Видимо, ФФК яблок склонна к образованию агрегаций достаточно больших размеров и вследствие этого фермент не может проникнуть в гель. Такая особенность наблюдалась у ФФК бананов [3]. По сообщениям авторов, агрегированные формы ФФК могут диссоциировать под влиянием KCl, NAD и NADH. Однако в наших экспериментах KCl и NAD не способствовали выявлению ферментативной активности ФФК на гелях после электрофореза.

С помощью электрофореза супернатантов, полученных при 30 000 и 105 000 g, приготовленных в присутствии 0,5 М сахарозы с последующим добавлением 0,5 М KCl и 0,2 мМ NADH, выявлена существенная молекулярная форма фермента с R_f 0,31 (гель №3). Другая форма с R_f 0,16 не проявлялась. Это свидетельствует о том, что доминирующая молекулярная форма с R_f 0,31 локализована в цитоплазме, а другая – в субклеточных частицах, осаждаемых при 10 000 g. Такое предположение также подтверждается электрофорезом осадка фракции 10 000 g после его обработки

твином-80 (гель №4). В этом случае выявляется другая молекулярная форма с R_f 0,16, а полоса с R_f 0,31 исчезает. На зимограмме осадков (30 000 и 105 000 g) активность фермента не обнаруживается.

Необходимо отметить, что электрофоретические исследования яблок сорта «Ренет Симиренко» дают сходные результаты.

Таким образом, установлено, что в субэпидермальных тканях плодов яблоки основная часть активности ФФК сосредоточена в цитозоле субэпидермальных тканей плодов, а минимальная – в субклеточных частицах, осаждаемых при 10 000 g. Обе фракции представлены по одной молекулярной форме ФФК, существенно различающихся по электрофоретической подвижности.

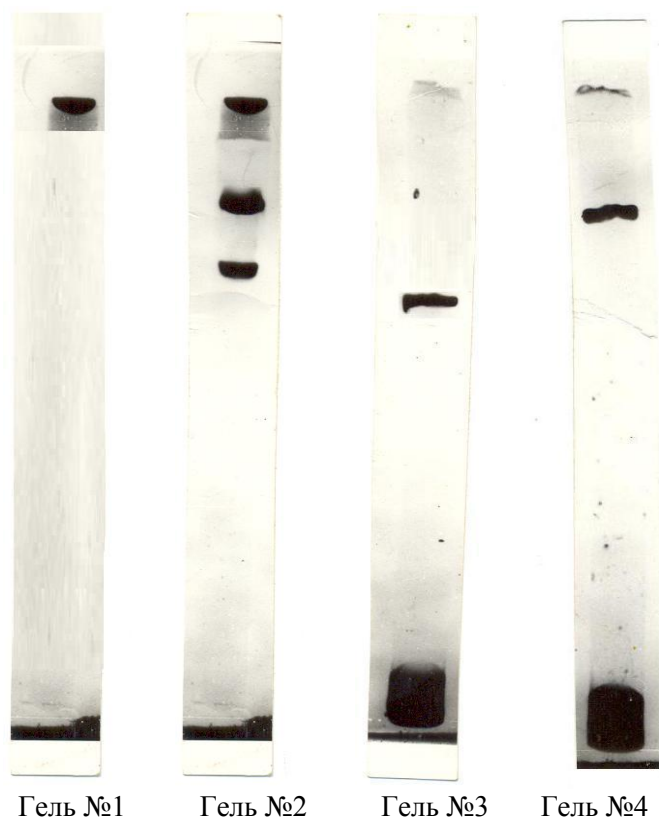


Рисунок 1. Диск-электрофореграммы различных фракций субэпидермальной ткани плодов яблоки сорта «Антоновка».

1. Супернатант 1000 g без NADH
2. Супернатант 1000 g в присутствии NADH
3. Супернатант 105 000 g
4. Осадок 10 000 g, обработанный твином-80.

LİTERATURYA

1. Turner W.L., Plaxton W.C. //Planta. 2003. v.217. P.113–121.
2. Lee H.S., Copeland L. //Physiol. Plant. 1996. v.96. P.607-614.
3. Plaxton W.C. //Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. v.47. P.185-214.
4. Tripodi K.E.J. and Podesta F.E. //Plant Physiol. 1997. v.113. P.779-786.
5. Suzuki M., Hashioka A., Mimura T., Ashihara H. //Physiol. Plant. 2005. v.123. P.246–253.
6. Whittaker A., Botha F.C. //Physiol. Plant. 1999. v.107. P.379-386.
7. Van Praag E., Zehavi U., Goren R. //Biochem. Mol. Biol. Int. 1999. v.47. P.749-756.
8. Nanos G.D., Romani R.J., Kader A.A. //J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1994. v.119, №2. P.288–294.
9. Chen L.S., Nose A. //Ann. of Botany. 2004. v.94. P.449–455.
10. Гюльяхмедов С.Г., Омаров Я.А., Джалилова Т.А. //Журн. Бильги. Сер. Химия, биология, медицина. Баку. 2004. т.21, №5. С.53-55.
11. Davis B.I. //Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. v.121. P.404.

ALMA MEYVƏLƏRİNİN ATF-ASILI FOSFOFRUKTOKİNAZANIN HÜCEYRƏDAXİLİ LOKALİZASİYASI VƏ MOLEKULYAR FORMALARI

S.G.GÜLƏHMƏDOV, Y.A.ÖMƏROV, A.Ə.QULİYEV

XÜLASƏ

Alma meyvələrinin parenximal toxumasından ATF-asılı fosfofruktokinazasının (FFK) hüceyrədaxili lokalizasiyası və molekulyar formaları öyrənilmişdir. Fermentin fəallığı müxtəlif fraksiyalar arasında qeyri-bərabər paylanmışdır. Fəallığın 65%-dən artıq hissəsi sitoplazmatik fraksiyada müşahidə olunmuşdur. PAAQ disk-elektroforezin nəticələri göstərdi ki, fermentin öz elektroforetik hərəkətliliyinə görə bir-birindən fərqlənən iki izoformasını mövcuddur. İzoformalardan biri sitoplazmada yerləşmişdir və nisbətən daha fəal idi, digəri isə, 10 000g çöküntüsündə aşkar olunmuşdur.

INTRACELLULAR LOCALISATION AND MOLECULAR FORMS OF ATP-DEPENDENT PHOSPHOFRUCTOKINASE FROM APPLE FRUITS

S.G.GYULAKHMEDOV, Y.A.OMAROV, A.A.KULIEV

SUMMARY

Intracellular localisation and molecular forms of the activity of ATP-dependent phosphofructokinase (PFK) from the parenchyma tissue of apple fruits has been studied. The enzymatic activity distributed unequally among different fractions. More than 65% of activity was detected in the cytoplasmic fraction. Disc-electrophoresis in PAG revealed two isoforms of the enzyme differing in electrophoretic mobility. One of the isoforms, most active and dominant, is located in cytosol, and the other in subunits precipitated at 10 000 g.