

## BİOLOGİYA

РАДИОИЗОТОПНЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ БИОСИНТЕЗА  
МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩЕЙ  
И ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЛОДОВ ЯБЛОНИ

А.А.КУЛИЕВ, З.М.МАМЕДОВ, З.А.ТАГИ-ЗАДЕ  
*Бакинский Государственный Университет*  
*biochem@mail.az*

*Предложен радиоизотопный метод изучения биосинтеза малатдегидрогеназы (МДГ) декарбоксилирующей (ЕС 1.1.1.40) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, ЕС 1.1.1.49) плодов яблони в модельных экспериментах с использованием субэпидермальных тканей. Установлено, что из 0,35М раствора сахарозы <sup>14</sup>С-лейцин легко поглощается дисками яблок и включается в белок МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ. Оптимальная концентрация лейцина в инкубационной среде 3мкг/мл, минимальное время инкубации, когда включение радиоактивности достигает своего стационарного состояния – 1ч. Эти условия позволяют проследить интенсивность биосинтеза упомянутых ферментов в период роста и развития плодов яблони.*

Радиоизотопный метод широко используется в биохимических исследованиях (1-3). Использование этого метода позволяет подробно изучить отдельные звенья метаболизма и получить более достоверные данные. Применение радиоактивных предшественников для изучения биосинтеза индивидуальных белков, в том числе малатдегидрогеназы (МДГ) декарбоксилирующей (ЕС 1.1.1.40) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, ЕС 1.1.1.49), имеет свои особенности, которые должны быть учтены. Они могут быть связаны как с природой применяемого вещества, так и изучаемого объекта. Поэтому осуществление такого рода экспериментов требует определения оптимальных условий включения радиоактивных предшественников в индивидуальные белки ферментов с последующим их обнаружением в конкретном биологическом объекте.

Исследование биосинтеза белка может проводиться как на уровне целых плодов, так и кусочков их тканей. В первом случае возникают проблемы, связанные с преодолением барьера воскового покрытия. Для введения радиоактивных предшественников в ткани интактных плодов прибегают к методам вакуум-инfiltrации и вакуум-инъекции. Эти процедуры могут создать некоторые неудобства, вызванные нарушением проницаемости мембраны, изменением биохимического состава и консистенции плодов. Последние два обстоятельства связаны с тем, что радиоактивные аминокислоты часто вводятся в плоды с так на-

зываемыми «растворами-носителями».

Удобной моделью исследования биосинтеза индивидуальных белков является использование инкубации кусочков ткани с радиоактивными предшественниками в определенной среде в течение определенного времени. В этом случае ранение тканей и состав инкубационной среды могут вызвать изменения в биохимических процессах. Однако при удачном выборе оптимальных условий проведения экспериментов можно минимизировать эти «отклонения от нормы» и получить достоверные данные.

Целью наших исследований явилось определение оптимальных условий включения равномерно меченого  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белок МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ субэпидермальных тканей яблок с тем, чтобы сделать возможным изучение интенсивности биосинтеза этих ферментов на разных стадиях развития плодов.

### **Материалы и методы исследования**

Эксперименты проводились со стандартными дисками (1x10мм) субэпидермальных тканей плодов яблони (*Malus domestica* Borkh.) сорта Антоновка и Ренет Симиренко. Приготовление дисков осуществлялось при помощи специальной резалки, сконструированной для этой цели. В качестве инкубационной среды использовался раствор 0,35 М сахарозы, содержащий 50 мкг/мл хлорамфеникола. Для определения адсорбции, после инкубации в радиоактивной среде (удельная активность равномерно меченого  $^{14}\text{C}$ -лейцина 1 мкюри/мл) диски промывали несколько раз ледяной дистиллированной водой, высушивали в термостате, растирали в сцинтилляционной жидкости (приготовленной на диоксановой основе) и измеряли радиоактивность в них на счетчике "Mark-2" (США). Для определения поглощения радиоактивного лейцина после инкубации диски промывали 3 раза в 20 мл 0,35 М растворе сахарозы, содержащем 0,01 М нерадиоактивный лейцин, в течение 15 мин. Затем диски высушивали, растирали, и измеряли в них содержание радиоактивного лейцина, как описано выше.

Включение лейцина в белок МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ определялось следующим образом. После инкубации в радиоактивной среде диски промывали охлажденной дистиллированной водой, излишки которой осторожно удаляли фильтровальной бумагой. Затем из этих дисков готовили соответствующие ферментные препараты (4). После частичной очистки путем высаливания сульфатом аммония и обессоливания гель-фильтрацией на сефадексе G-25, собранные фракции белков концентрировали 100%-ным насыщением сульфатом аммония, диализировали против экстрагирующего раствора в течение ночи и подвергали электрофорезу в ПААГ (5). Выявление ферментов осуществлялось с помощью нитросинего тетразолия. Обнаруженные полосы ферментов вырезали, растворяли в 30%-ном  $\text{H}_2\text{O}_2$  в течение 2 часов при  $50^\circ\text{C}$ . Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике в растворе на диоксановой основе, или же на толуоловой основе со спиртом в соотношении 7:3. Радиоактивность пересчитали на расп/мин/г сырой ткани.

### **Результаты и их обсуждение**

Применение модельных экспериментов с использованием кусочков ткани для исследования биосинтеза белка имеет некоторые явные преимущества перед

использованием модельных опытов с целыми плодами. Во-первых, инкубирование кусочков тканей в определенной среде позволяет наблюдать весь спектр изменения биохимических процессов в период роста и развития плодов, в том числе и биосинтеза белка в течение относительно короткого времени (за 12-24 часов в зависимости от физиологического состояния плодов). Во-вторых, с его помощью можно преодолеть некоторые трудности, вызванные проникновением экзогенного предшественника в ткани. В-третьих, благодаря ему можно обойтись относительно малым количеством дорогостоящего радиоактивного реактива и сэкономить потребление радиоактивной аминокислоты. Эти соображения послужили для нас основанием для изучения биосинтеза МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ в модельных опытах с использованием стандартных дисков из субэпидермальных тканей яблок.

Использование модельных опытов с применением кратковременной инкубации кусочков ткани для изучения биосинтеза белка нередко встречается в научной литературе. Однако, степень искажения результатов под влиянием таких факторов, как изменение проницаемости мембраны и разбавление экзогенной метки эндогенным предшественником, которые могут создать серьезные трудности при интерпретации полученных данных, часто недооценивается. Ранее нами было установлено, что включение радиоактивной метки в белок на ранних этапах инкубации тканей сильно зависит от концентрации экзогенного предшественника в буферной среде (6-7). Это значит, что при кратковременной инкубации тканей малейшее изменение в проницаемости и в содержании эндогенного предшественника белка существенно отразится на полученных результатах и, следовательно, затруднит их интерпретацию. Поэтому при проведении такого рода экспериментов необходимо определить оптимальное значение времени инкубации тканей в зависимости от природы используемой аминокислоты и состава инкубационной среды, и определить минимальную концентрацию экзогенного предшественника, необходимую для достаточного насыщения эндогенного предшественника и стабилизации включения его в белок.

Прежде чем включиться в белок, радиоактивная аминокислота преодолевает несколько барьеров. Вместе с инкубационной средой сначала она заполняет межклеточное пространство и адсорбируется клетками, затем часть адсорбированного предшественника поглощается клетками и используется для биосинтеза белка.

Интенсивность адсорбции равномерно меченого  $^{14}\text{C}$ -лейцина дисками яблок в зависимости от времени их инкубации в 0.35 М сахарозе в течение 1 часа показана в табл. 1. Как видно из таблицы, скорость адсорбции особенно велика в первые 30 мин инкубации. За этот промежуток времени дисками яблок адсорбируется около 82% от общего количества  $^{14}\text{C}$ -лейцина, адсорбированного в течение всего инкубационного периода. Несмотря на частичное восстановление адсорбирующей способности вследствие увеличения интенсивности поглощения дисками яблок, скорость адсорбции в последующие 30 мин значительно понижается, что, по-видимому, связано с заполнением межклеточных пространств и насыщением поверхности клеток этой аминокислотой. В течение одночасового инкубационного периода 15-ти стандартных дисков яблок (при концентрации 3 мкг/мл) адсорбируется около 10% лейцина, содержащегося в инкубационной среде.

Таблица 1

**Адсорбция, поглощение и включение в белок дисками плодов  
яблони радиоактивного лейцина (расп/мин/Г<sub>сырого веса</sub>)**

Время инкубации (мин)	Адсорбированный лейцин	Поглощенный лейцин	Включенный в растворимую фракцию белков лейцин	Включенный в белок МДГ	Включенный в белок Г6ФДГ
<b>Антоновка</b>					
15	$4,9 \cdot 10^5$	$0,9 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^3$	45	32
30	$7,2 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^3$	113	86
45	$8,3 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$	$11,9 \cdot 10^3$	202	170
60	$9,1 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$12,4 \cdot 10^3$	310	230
<b>Ренет Симиренко</b>					
15	$4,3 \cdot 10^5$	$0,8 \cdot 10^5$	$0,9 \cdot 10^3$	36	24
30	$6,8 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^3$	91	75
45	$7,9 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^3$	160	133
60	$8,8 \cdot 10^5$	$3,3 \cdot 10^5$	$10,9 \cdot 10^3$	220	165

За абсорбцией радиоактивного лейцина последует их проникновения через мембрану в клетки тканей плодов. Поглощение аминокислот тканями плодов, по всей видимости, осуществляется посредством активного переноса. Ингибирование биосинтеза белка и действие восстанавливающих агентов, нарушающих нативные структуры белков, часто подавляют поглощение аминокислот.

Динамика зависимости поглощенного лейцина от времени инкубации сравнима с динамикой адсорбированного лейцина (табл.1). И в этом случае, в течение первых 30 мин инкубации происходит поглощение основного количества аминокислот. В последующие периоды инкубации интенсивность проникновения радиоактивной метки в клетки субэпидермальных тканей существенно снижается.

Интересно также соотношение поглощенного лейцина к адсорбированному в зависимости от времени инкубации дисков. Спустя 15 мин оно составляет чуть меньше 1:5. В последующие периоды доля поглощенного лейцина заметно повышается. По истечении 30 мин эта цифра достигает своего максимального значения – 1:3. Затем скорость поглощения стабилизируется и составляет несколько меньше 1/3 адсорбированного лейцина.

Следует отметить, что за поглощение лейцина нами принималось то его количество, которое преодолевало протоплазматическую мембрану и проникало в цитоплазму. Эта аминокислота при промывании дисков раствором с высокой концентрацией нерадиоактивного лейцина из тканей не вымывается. А количество меченого лейцина, поглощенного поверхностями клеток и заполняющего межклеточные пространства, которое легко вымывалось с нерадиоактивной аминокислотой, принималось за адсорбцию.

Определенная часть поглощенного лейцина участвует в биосинтезе белков. Количество радиоактивного лейцина, включенного в белок в течение одночасового инкубационного периода, составляет малую часть поглощенного лейцина (концентрация лейцина в инкубационной среде – 3 мкг/мл). В течение первых 15 мин инкубации ее доля в составе растворимой фракции белков плодов Антоновки в 65, а плодов Ренет Симиренко в 88 раз меньше поглощенного. По

мере увеличения инкубационного периода эта доля повышается и стабилизируется. Спустя 45 и 60 мин после инкубации в тканях плодов Антоновки она поднимается до 1:26 и 1:28, соответственно. Аналогичная картина характерна и для тканей плодов Ренет Симиренко.

Как и следовало ожидать, количество радиоактивной аминокислоты, включенной в белок МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ, по сравнению с поглощенным лейцином ничтожно мало. В течение первых 15 мин инкубации для МДГ декарбоксилирующей плодов Антоновки оно составляло всего 45, а для плодов Ренет Симиренко 36 расп/мин/г сырой ткани. В последующие четверть часа интенсивность включения радиоактивной метки в белок как МДГ декарбоксилирующей, так и Г6ФДГ прибл. утраивалась. Тенденция увеличения скорости включения метки в белок ферментов наблюдается до конца инкубационного периода и спустя 1 час после начала эксперимента достигает своего максимального значения. В этот период инкубации количество радиоактивного лейцина, включенного в белок МДГ декарбоксилирующей Антоновки, составляет менее чем одну сотую часть поглощенного лейцина. В плодах Ренет Симиренко это цифра еще меньше. Интенсивность включения метки в белок ферментов в плодах Антоновки заметно превосходила аналогичный процесс в плодах Ренет Симиренко. Другой важный вывод, вытекающий из полученных данных заключается в том, что скорость включения радиоактивного лейцина в белок МДГ декарбоксилирующей превосходила скорость соответствующего включения в белок Г6ФДГ прибл. в 1,3 раза.

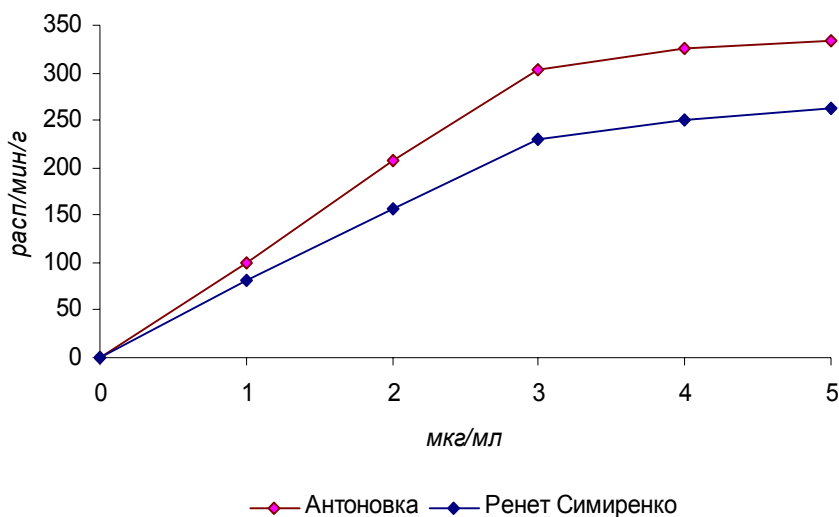
Увеличение времени инкубации до двух часов не выявило существенного изменения в уровне включения  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белки малик-фермента и Г6ФДГ (данные не представлены). Это свидетельствовало о том, что необходимое минимальное время инкубации дисков яблок для изучения биосинтеза этих ферментов равняется 1 часу. За этот промежуток времени включение радиоактивной метки в белок ферментов достигает своего стационарного состояния. Интересно, по сведениям американских исследователей в плодах авокадо и бананов также включение радиоактивного валина в белок в течение одночасового инкубационного периода носило прямолинейный характер (7). По мнению авторов для валина это как раз тот промежуток времени, который необходим для насыщения эндогенного фонда биосинтеза белка экзогенным предшественником. Авторы также показали, что время достижения стационарного состояния биосинтеза белка в существенной степени зависит от применяемых экзогенных аминокислот. В их экспериментах поглощение из фосфатного буфера с pH 6,5  $^{14}\text{C}$ -лейцина дисками авокадо происходило в 2, а включение в белок – в 4 раза интенсивнее, чем валина.

Характер динамики интенсивности включения  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белок ферментов в зависимости от инкубационного периода предполагает существование эндогенного фонда внутри клеток тканей плодов, который с течением времени разбавляется экзогенным радиоактивным лейцином.

Важным моментом в определении оптимальных условий включения радиоактивной метки в белок ферментов плодов является выявление подходящей концентрации экзогенной аминокислоты в инкубационной среде. Уточнение этого показателя необходимо для выяснения минимального количества экзоген-

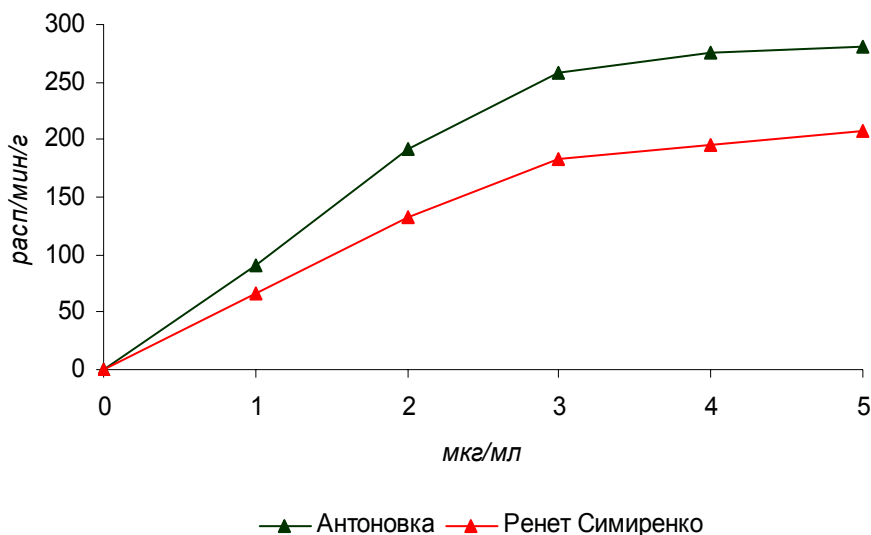
ного предшественника биосинтеза белка. Пренебрежение этим фактором может затруднить интерпретацию полученных данных из-за изменения проницаемости мембраны, а, следовательно, концентрации внутриклеточного предшественника белка в связи с ростом и развитием тканей плодов яблони.

На рис.1 представлена зависимость интенсивности включения радиоактивной метки в белок МДГ декарбоксилирующей плодов яблони от содержания равномерного  $^{14}\text{C}$ -лейцина в инкубационной среде, состоящей из 0,35 М сахарозы и 50 мкг/мл хлорамфеникола. Как видно из рисунка, количество радиоактивной метки, обнаруженное в составе новосинтезированного белка МДГ декарбоксилирующей в пределах концентрации лейцина 0-3,0 мкг/мл, находится почти в прямолинейной зависимости от его содержания в среде (время инкубации дисков 1 ч). Дальнейшее увеличение концентрации лейцина в инкубационном растворе на интенсивности включения метки в белок фермента существенно не отражается. Так, например, если в пределах концентрации 0-3 мкг/мл каждое увеличение содержания аминокислоты в среде на 1 мкг/мл сопровождается увеличением интенсивности включения радиоактивной метки в белок МДГ декарбоксилирующей Антоновки прибл. на 100 расп/мин/г ткани яблок, то при повышении концентрации на последующую единицу прирост включения понижается прибл. в 4 раза. Увеличение концентрации от 4-х до 5 мкг/мл сопровождается незначительным повышением (всего на 8 расп/мин/г) интенсивности включения метки в белок фермента. Аналогичная картина наблюдается также в варианте с плодами Ренет Симиренко. Сортовая разница между обследованными яблоками, главным образом, заключалась в том, что в соответствующих концентрациях радиоактивной аминокислоты уровень интенсивности включения метки в белок МДГ декарбоксилирующей в дисках из плодов Антоновки был заметно выше, чем в дисках из плодов Ренет Симиренко.



**Рис. 1.** Интенсивность включения радиоактивной метки в белок МДГ декарбоксилирующей плодов яблони в зависимости от концентрации равномерномеченого  $^{14}\text{C}$ -лейцина в инкубационной среде (время инкубации 1 час).

Характер изменения интенсивности включения метки в белок Г6ФДГ плодов яблони в зависимости от содержания радиоактивного лейцина в инкубационной среде сравним с таковой МДГ декарбоксилирующей. Сортовое различие проявлялось и в этом случае. Интенсивность включения радиоактивной метки в белок Г6ФДГ в плодах Антоновки была заметно выше, чем в плодах Ренет Симиренко. Относительно скорости включения предшественника в белки ферментов можно сказать следующее: при соответствующих концентрациях из инкубационной среды радиоактивный лейцин в белок МДГ декарбоксилирующей включался более интенсивно, чем в белок Г6ФДГ.



**Рис. 2.** Интенсивность включения радиоактивной метки в белок Г6ФДГ плодов яблони в зависимости от концентрации равномерно меченого  $^{14}\text{C}$ -лейцина в инкубационной среде (время инкубации 1 час).

Представленная картина зависимости интенсивности включения  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белок обоих НАДФН-образующих ферментов плодов яблони свидетельствует о том, что в течение одночасового инкубационного периода при концентрациях лейцина 3 мкг/мл происходит достаточно полное насыщение внутреннего фонда предшественника белка экзогенным предшественником. Другими словами, 3 мкг/мл лейцина — это та минимальная концентрация этой радиоактивной аминокислоты в 0,35 М сахарозной инкубационной среде, которая может быть использована для изучения биосинтеза МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ в модельных экспериментах с использованием кусочков ткани яблок.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показывают, что в модельных экспериментах с использованием стандартных дисков, оптимальные условия включения радиоактивного лейцина из 0,35 М раствора сахарозы в белок МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ наблюдаются при минимальной концентрации лейцина 3,0 мкг/мл и времени инкубации 1 час. При указанных значениях содержания радиоактивного лейцина в среде и инкубационного периода дисков влияние разбавления экзогенного лейцина эндогенным лейцином

должно сводиться к минимуму и не должно существенно отражаться на полученных результатах. Следовательно, эти условия экспериментов могут быть применены для изучения биосинтеза МДГ декарбоксилирующей и Г6ФДГ на разных стадиях созревания и старения плодов яблони.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ledzian K.I. Metabolism of specifically labeled glucose, glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate via the oxidative pentose phosphate cycle in a reconstituted spinach chloroplast system in darkness and in the light // *Plant Physiol.*, 2007, v. 96, p. 8-12.
2. Gahan P.B., Andersset G., Carmignac D.F., Greppin H. The relationship between the activities of the pentose phosphate pathway and glucolysis during early stages of floral induction in spinach // *Histochemistry*, 1987, v. 87, p. 289-291.
3. Beruter I. Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation // *Plant Physiol.*, 2004, v.161, p.1011-1029
4. Мамедов З.М., Кулиев А.А., Гюльяхмедов С.Г., Салькова Е.Г. Изучения основных НАДФН-генерирующих ферментов плодов яблони в модельных опытах // *Прикладная биохимия и микробиология*, 1998, т. 34, №2, с. 193-198.
5. Звягинцева Ю.В. Мамедов З.М., Салькова Е.Г. Гель-электрофорез малатдегидрогеназы (декарбоксилирующей) в экстрактах из яблок. В. кн. Биохимические методы, М.: Наука, 1980, с.87-90.
6. Chang G., Tong L. Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases // *Biochem.*, 2003, v. 42, p. 12721-12733.
7. Kuliev A.A., Mamedov Z.M. Protein synthesis in parenchymal tissue of apple fruits // *Acta Physiologiae Plantarum*, 1982, v. 4, № 1-2, p. 3-9.
8. Richmond A., Biale J.B. Protein synthesis in avocado fruit tissue // *Biochem. Biophys.*, 2006, v. 155, p. 211-214.

#### **ALMA MEYVƏLƏRİNİN DEKARBOKSİLLƏŞDİRİCİ MALATDEHİDROGENAZA VƏ QLÜKOZO-6-FOSFATDEHİDROGENAZA FERMENTLƏRİNİN BİOSİNTEZİNİN RADIOİZOTOP METODU İLƏ TƏDQIQI**

**A.Ə.QULIYEV, Z.M.MƏMMƏDOV, Z.A.TAĞIZADƏ**

#### **XÜLASƏ**

Alma subepidermal toxumalarının istifadəsilə yaradılan model eksperimentlərdə dekarboksilləşdirici malatdehidrogenaza (MDH, ES 1.1.1.40) və qlükozo-6-fosfatdehidrogenaza (Q6FDH, EC 1.1.1.49) fermentlərinin radioizotop metodu ilə sintezinin tədqiqi təklif edilmişdir. Müəyyənləşdirilmişdir ki, 0,35M saxarozə məhlulundan <sup>14</sup>C-leysin asanlıqla alma diskləri tərəfindən udulur və fermentlərin zülallarının tərkibinə daxil olur. Leysin in kübasiya mühtində optimal qatılığı 3mκq/ml və onun fermentlərin tərkibinə daxil olmasının stasionar vəziyyətə çatması üçün lazım olan in kübasiya müddəti isə 1 saata bərabərdir. Belə bir eksperimental şərait alma meyvələrinin böyümə və in küşafı dövründə adları çəkilən fermentlərin biosintezinin intensivliyinin öyrənilməsinə imkən verməlidir.

**RADIOISOTOPE METHOD OF STUDYING OF MALATDEHYDROGENASE  
(DECARBOXYLATING) AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE  
BIOSYNTHESIS OF APPLE FRUITS**

**A.A.KULIEV, Z.M.MAMMADOV, Z.A.TAGIZADE**

**SUMMARY**

The current work proposes the synthesis of malatdehydrogenase decarboxylating (MDH EC 1.1.1.40) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, ES 1.1.1.49). ferments with radioisotope method in a model experiment created by the use of apple fruit subepidermal tissues. It's defined, that  $^{14}\text{C}$  -leusine is easily absorbed by apple disks and incorporated into MDH and G6 PDH protein in 0,35 M sucrose solution. The optimum concentration of the leusine in the incubation medium is 3 mkg/ml and minimum duration of incubation, when radioactivity incorporation stabilizes, is an hour. These conditions permit us to scrutinize the intensivity of biosynthesis of the mentioned enzymes in the period of apple growth and development.