

BİOLOGİYA

UOT 577.152.1.16

QURAQLIQDA AMARANT YARPAQLARININ SUBHÜCEYRƏ
FRAKSIYALARINDA NAD-MALATDEHİDROGENAZANIN
KATALİTİK XASSƏLƏRİNİN ONTOGENEZZDƏ DƏYİŞMƏ
DİNAMİKASI

* U.Ə.QURBANOVA, ** İ.M.ƏLİMƏMMƏDZADƏ, * H.Q.BABAYEV
*AMEA Botanika İnstitutu, ** Bakı Dövlət Universiteti
Babayev_hg@yahoo.com

Amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumaları və onların subhüceyrə fraksiyaları-sitozol, mitoxondri, xloroplastlar ayrılmış, təmizlənmiş və hər bir fraksiyada ontogenezzdə NAD- Malatdehidrogenazanın katalitik və kinetik xassələri (K_m və V_{max}) ontogenezzdə müqayisəli öyrənilmişdir.

Açar sözlər: Amarant-ontogenezz-quraqlıq stressi-aktivlik-kinetika-adaptasiya

C₄-bitkilər CO₂-nin assimilyasiyasının yüksək effektivliyinə, anatomik, morfoloji və biokimyəvi cəhətdən yüksək dərəcədə ixtisaslaşmış fotosintez aparatına və karboksilləşmə mərkəzlərində karbon qatılşdıran biokimyəvi mexanizmə malikdirlər [4, 9].

C₄-fotosintezin reaksiyalarını lokalizasiyasına görə MH-də gedən karboksilləşmə və ÖTH-də gedən dekarboksilləşmə reaksiyalarından ibarət olmaqla iki mərhələyə ayırmaq olar. C₄-bitkilərinin əksəriyyətinin MH-də baş verən karboksilləşmə mərhələsində ilkin olaraq karboanhidraza (KA) fermentinin iştirakı ilə ağızciqlar vasitəsilə atmosferdən daxil olan CO₂ bikarbonat anionlarına (HCO₃⁻) çevrilir. Fosfoenolpiruvat karboksilaza (FEPK) ilkin karboksilaza kimi fəaliyyət göstərərək CO₂ qazını FEP-lə birləşdirərək üçkarbonlu ikiəsaslı oksaloasetat (OA) əmələ gətirir. Sonra OA malata və ya aspartata çevrilir. Karboksilləşmə mərhələsində əmələ gələn üzvi dikarbon turşularının (malat, aspartat) dekarboksilləşməsi isə ÖTH-də baş verir. ÖTH-nə daşınan C₄-turşular dekarboksilazası köməyiylə onlardan CO₂ ayrılır və əmələ gələn CO₂ Rubisco-nun substratı olaraq onun ətrafında toplanmaqla qatılığını atmosfərə nisbətən 10 dəfələrlə artırır. Nəticədə ÖTH-də dekarboksilləşmə ilə əlaqədar olaraq C₄-turşularının miqdarı getdikcə azalır. Onun yerini doldurmaq üçün MH-də karboksilləşmə reaksiyalarının sürətlənməsi hesabına C₄-turşularının sintezi artır. Paralel olaraq hər iki karboksilləşmə reaksiyaları bir-

biri ilə korrelyasiya təşkil edir. C₄-fotosintezdə üç müxtəlif dekarboksilaza - NADF-dən asılı malik enzim (NADF-ME), NAD-dən asılı malik enzim (NAD-ME) və fosfoenolpiruvat karboksikinaza (FEP-KK) iştirak edir [10]. Bunlar C₄-tsiklin modifikasiya olunmuş üç yarımqrupunu təşkil edirlər.

MDH fermentlərinə arxeobakteriyalardan tutmuş məməlilərə qədər bütün canlı orqanizmlərdə və bütün subhüceyrə orqanoidlərində-sitoplazmada, mitoxondrilərdə, qlioksisomlarda, peroksisomlarda, xloroplastlarda rast gəlmək olar [21]. MDH fermentlər kompleksinə daxil olan fermentlərdən ən geniş öyrənilən NAD⁺-asılı MDH-dır (L-malat; NAD-oksireduktaza, NAD-MDH, EC 1.1.1.37). NAD-MDH Krebs tsiklinə NAD/NADH koenzim sistemi istifadə edərək OA-ın malata çevrilməsinin dönər reaksiyasını kataliz etməklə yanaşı malatın və OA-ın sintezini də həyata keçirir [2, 15, 21].

Bu izoformaların biokimyəvi xarakteristikası MDH-nın yalnız tənəffüs ilə deyil [17, 22], fototənəffüs, yağ turşularının β-oksidləşməsi, toxumun cücərməsi və stresə davamlılıq kimi proseslərlə də əlaqəli olduğunu göstərilmişdir [6, 18, 23]. Beləliklə, bu fermentin mühüm və mürəkkəb bir rola malik olması onun ali bitkilərdə karbonun və enerjinin paylanmasında vacibliyini göstərir ki, bu da öz növbəsində bitkilərdə tənəffüs, fotosintez və fototənəffüsü əlaqələndirən molekulyar mexanizmlər haqqında yeni ideyalar verir [6, 22].

NAD-MDH eubakteriyalardan, arxeobakteriyalardan, göbələklərdən, bitkilərdən, məməlilərdən, eyni zamanda orqanizmlərin subhüceyrə fraksiyalarından, o cümlədən mitoxondrilərdən ayrılmış və xassləri öyrənilmişdir [12]. Canlıların əksəriyyətində, bütün eukariotlarda və bir çox bakteriya növlərində NAD-MDH homodimer olub molekulu 2 oxşar subvahiddən ibarətdir [15, 16]. Bitki hüceyrələrində MDH-nın müxtəlif subhüceyrə lokalizasiyasına malik 6-ya qədər izoformasının aşkar olması onun tədqiqini xeyli çətinləşdirir.

Qeyd olunan əlamətləri nəzərə alaraq bu məqalədə biz quraqlığın təsiri şəraitində amarant yarpaqlarında NAD-MDH-nın kataliz etdiyi reaksiyaların kinetik xassələrinin müqayisəli öyrənilməsinə qarşımıza məqsəd qoymuşuq.

MATERIAL VƏ METODLAR

Tədqiqat məqsədilə C₄-bitkilərin NAD-malik enzim yarım tipinə aid olan qeyri-ənənəvi amarant bitkisinin *Amaranthus cruentus* L. növünün 30-35 günlük yarpaqlarından istifadə olunmuşdur. Amarant cinsinə aid olan növlər yüksək fotosintez intensivliyinə, karbon və malat mübadiləsində böyük effektivliyə malik olub NAD-ME tip bitkilərin öyrənilməsində model bitki kimi istifadə oluna bilirlər.

NAD-MDH-nın lokalizasiyasını öyrənmək üçün amarant yarpaqlarından assimilyasiyaedici toxumalar-mezofil (MH) və ötürücü topaların örtük hüceyrələri (ÖTH) mexaniki üsulla ayrılmış və təmizlənmişdir [11, 13].

Ferment preparatının alınması: Fermentlərin aktivliyini təyin etmək üçün yarpaqlar distillə suyu ilə yuyulduqdan, filtr kağızı ilə qurudulduqdan sonra

qayçı ilə xırda hissələrə doğranmış və dezintegratorda (MPW-302, Polşa) 30 san. fasilə ilə 2 dəqiqə müddətində 20 mM MgCl₂·6H₂O, 1 mM EDTA, 5 mM DTT və 0,5% PVP tərkibli, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) bufer məhlulunda homogenizasiya olunmuşdur. Alınan homogenat ikiqat kaprondan süzüləndən sonra nüvədən və parçalanmayan toxuma hissəciklərindən azad olunmaq üçün əvvəlcə 5 dəq. 1000g, sonra isə 15 dəq. ərzində 10000g sürəti ilə sentrifüqalaşdırılmışdır. Çöküntü atıldıqdan sonra alınan ferment preparatı fermentlərinin aktivliklərinin tədqiq olunması məqsədi ilə istifadə olunmuşdur.

NAD-MDH aktivliyinin təyini spektrofotometrik (Ultrospec 3300 pro, Amersham, USA) üsulla yerinə yetirilmişdir [19]. Reaksiya mühiti 1 mM OA, 10 mg/ml qara malın zərdab albumini (BSA), 10 mM MgCl₂ (2 M), 0,15 mM NAD·H və 5-10 µl ferment preparatı olan 100 mM, pH 8,0, Tris-HCl buferindən ibarətdir. Reaksiya reaksiya mühitinə 1 mM substrat, yəni OA əlavə etməklə başlanır. Spektrofotometrik küvyetlərdə NAD·H-in miqdarı 340 nm dalğa uzunluğunda 1 dəqiqə ərzində bu birləşmənin molyar qatılığının optiki sıxlığının azalmasına əsasən təyin edilmişdir. Fermentin aktivliyi aşağıdakı düstura əsasən hesablanmışdır:

$$A = \Delta OS \cdot V / \varepsilon \cdot b \cdot \tau$$

A – beynəlxalq sistemdə aktivlik, ΔOS-optiki sıxlığın bir dəqiqə ərzində dəyişməsidir, B – reaksiya mühitinin həcmi (ml), τ-reaksiyanın gedişinə sərf olunan zaman, ε – ekstinksiyanın millimolyar ekvivalentidir. O NAD-MDH-nin kofermenti olan NAD⁺ və NADH üçün 340 nm dalğa uzunluğunda maksimum udulma zamanı 6,22 mM·sm⁻¹-ə bərabərdir, b – reaksiya mühitinə əlavə olunan ferment ekstraktının µl-lə həcmidir.

Buğda yarpaqlarından mitoxondrilər Hongun işləyib hazırladığı və bizim tərəfimizdən obyektə uyğun olaraq modifikasiya olunmuş metodla yerinə yetirilmişdir [14].

Ümumi zülalların miqdarı spektrofotometrə, 610 nm dalğa uzunluğunda 0,12%-li Coomassie Brilliant Blue G-250 məhlulunun köməyiylə təyin olunmuşdur. Dərəcəli ayrının qurulması üçün BSA istifadə edilmişdir [20].

NAD-MDH aktivliyinin gəldə spesifik aşkarlanması disk-elektroforez üsulu ilə PAAQ gəldə spesifik mühitdə tetrazol metodu ilə yerinə yetirilmişdir [8].

Statistika: Cədvəl və qrafiklərdə verilən qiymətlər orta riyazi göstəricilərdir. Standart səhvlər və kənarlanmalar Microsoft Office Excel proqramında hesablanmışdır („Təsviri statistika“ opsiyası).

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN ANALİZİ

Məlumdur ki C₄-bitkilər C₃-bitkilərlə müqayisədə ekstremal mühit amillərinin təsirinə qarşı daha çox davamlılıq göstəriirlər. Buna görə də bitkilərdə abiotik stres amillərinə qarşı adaptasiya mexanizmlərinin öyrənilməsində C₄-bitkilər, o cümlədən amarant klassik bitki kimi əhəmiyyət kəsb edir. Ama-

rant yarpaqlarında NAD-MDH fermentinin aktivliyi, lokalizasiyası və izoferment tərkibi disk-elektroforez üsulu ilə öyrənilmiş və alınmış nəticələr 1-ci cədvəldə verilmişdir. Cədvəldən görüldüyü kimi amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-nin sitozol fraksiyalarında kontrol da NAD-MDH aktivliyi çiçəkləməni fazada quraqlıq variantlarla müqayisədə həmişə yüksək olmuşdur. Ontogenezin növbəti çiçəkləmə və toxumyetişmə fazalarında bunun əksinə olaraq hər iki variantda fermentin aktivliyi çiçəkləməni fazaya nisbətən artmışdır. Bu mərhələlərdə quraqlığın təsirindən NAD-MDH aktivliyi kontroldan yüksək olsa da vegetasiyanın sonunda toxumyetişmə mərhələsinə nisbətən hər iki variantda fermentin aktivliyi təxminən 45-50% azalır.

Cədvəl 1

Amarant yarpaqlarının MH və ÖTH-də NAD-MDH aktivliyinin subhüceyrə paylanması

Hüceyrə, variant		NAD-MDH aktivliyi					
		Xloroplast		Sitoplazma		Mitoxondri	
		EU/mg zülal	%	EU/mg zülal	%	EU/mg zülal	%
Çiçəkləməni							
MH	K	19,3	8,5	82,7	36,4	125,0	55,1
	Q	21,5	10,5	68,6	33,5	114,6	56,0
ÖTH	K	16,7	8,3	50,4	25,1	133,6	66,6
	Q	20,6	11,3	41,4	22,7	120,5	66,0
Çiçəkləmə							
MH	K	21,6	10,6	56,6	27,8	125,5	61,6
	Q	26,1	13,3	46,3	23,6	123,4	63,1
ÖTH	K	19,0	7,6	79,5	31,8	151,9	60,6
	Q	12,4	6,1	51,1	25,1	139,8	68,8
Toxum yetişmə							
MH	K	10,3	4,6	67,5	29,9	148,27	65,6
	Q	8,3	5,2	16,6	10,3	135,67	84,5
ÖTH	K	6,7	3,4	45,3	23,1	144,4	73,5
	Q	4,2	1,8	69,5	30,2	156,96	68,0
(tənəf güclənir)							
Vegetasiyanın sonu							
MH	K	1,0	2,18	16,3	35,59	28,5	62,23
	Q	0,5	1,5	12,6	37,95	20,1	60,55
ÖTH	K	0,4	0,8	4,5	6,9	60,8	92,3
	Q	0,2	0,56	3,5	9,83	31,89	89,6

Qeyd: MH-mesofil hüceyrəsi, ÖTH-örtük topa hüceyrəsi, K-kontrol, Q-quraqlıq.

Cədvəldən görüldüyü kimi bitkinin inkişafının çiçəkləməni fazasından tutmuş vegetasiyanın sonuna qədər MH-nin xloroplastlarında NAD-MDH aktivliyi kontrolda quraqlığa nisbətən kəskin azalır. Lakin ÖTH-nin xloroplast-

larında NAD-MDH aktivliyinin MH-nin xloroplastlarında ümumi aktivlikdən az olmasına baxmayaraq quraqlıq variantlarda fermentin aktivliyi kontroldan bütün fazalarda yüksək olmuşdur.

Amarant yarpaqlarının hər iki assimilyasiyaedici toxumalarının mitoxondri fraksiyalarında NAD-MDH fermentinin aktivliyi öyrənilən fazalarda sitozol və xloroplast fraksiyalarına nisbətən xeyli yüksək olmuşdur. Belə ki, çiçəkləmə-önü fazasında mitoxondri fraksiyalarında fermentin toxumalar və variantlar üzrə xüsusi aktivliyi sitozol və xloroplast fraksiyalarında lokalizasiya olunan fermentin xüsusi aktivliyindən uyğun olaraq ~2,5 və 8 dəfə, çiçəkləmə fazasında isə ~2 və ~9 dəfə yüksək olmuşdur.

Göstərilən bu fərqlər növbəti fazalarda daha da artmışdır. Eləcə də NAD-MDH zülalə görə ümumi aktivliyi, MH və ÖTH-nin mitoxondri fraksiyalarında NAD-MDH aktivliyi quraqlıq stresinə məruz qalmış variantlarda kontroldan daima yüksək olmuşdur. Hətta vegetasiyanın sonuna yaxın NAD-MDH fermenti hər iki toxumada və hər iki variantda kifayət qədər aktivlik saxlamışdır.

Kontrol variantda MH sitozol fraksiyasında fermentin zülalə görə ümumi aktivliyi nisbətən stabil qalmışdır, quraqlığın təsiri artdıqca isə kəskin azalmışdır. Kontrol variantda ÖTH sitozolunda çiçəkləmə fazasında fermentin zülalə görə ümumi aktivliyi maksimal olduğu halda, quraqlıq variantda maksimal aktivlik toxum yetişmə fazasında müşahidə olunub.

Xloroplast fraksiyada ÖTH quraqlıq variantdan başqa digər variantlarda çiçəkləmə mərhələsində maksimal aktivlik müşahidə olunmuşdur. Vegetasiyanın sonuna doğru bütün variantlarda fermentin ümumi aktivliyinin azalması baş vermişdir.

Məlumdur ki, biokimyəvi reaksiyaların sürəti fermentin substratlarının qatılığından birbaşa asılıdır [7]. Bu məqsədlə yüksək təmizlənmiş preparatlarla fermentin kinetik parametrləri öyrənilmişdir. NAD-MDH-nin kataliz etdiyi düzünə və əksinə gedən reaksiyaların OA və malatın qatılığından asılı olaraq reaksiya sürətinin dəyişmə dinamikası tədqiq olunmuşdur. Amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumalarının subhüceyrə fraksiyalarında lokalizasiya olunan izoformalar normal suvarma şəraitində OA-ın qatılığı 1,0 mM olduqda reaksiyanı daha yüksək sürətlə kataliz edirlər. Quraqlıq stresinə məruz qalmış variantlarda OA-ın 1,0 mM qatılığında NAD-MDH-nin aktivliyi normal suvarılan bitkilərlə müqayisədə 20% yüksək olmuşdur.

Amarantın inkişafının çiçəkləmə fazasında quraqlıqda yarpaqların assimilyasiyaedici toxumalarının subhüceyrə fraksiyalarında qismən təmizlənmiş NAD-MDH fermentinin kataliz etdiyi düzünə və əksinə gedən reaksiyaların kinetik sabitləri Mixaelis-Menten (K_m) və reaksiyanın maksimal sürətləri (V_{max}) Laynuiver-Berk qrafiki ilə təyin edilmişdir. Bu zaman alınan nəticələr 1 və 2-ci şəkillərdə verilmişdir. Şəkillərdən görünür ki, amarant bitkisinin MH-nin sitozolunda kontrolda K_m OA=1,54 mM, V_{max} OA=80,7 EU/mq zülal, quraqlıqda K_m OA=1,89 mM, V_{max} OA=91 EU/mq zülal olduğu halda MH-nin mitoxondrilərində kontrolda K_m OA=2,5 mM, V_{max} OA=30,8 EU/mq zülal, qu-

raqlıqda $K_m OA=3,3$ mM, $V_{max} OA=40,1$ EU/mq zülal olmuşdur. Bu göstəricilər amarantın ÖTH-də kontrollda sitozolda $K_m OA=1,94$ mM, $V_{max} OA=80,7$ EU/mq zülal, quraqlıqda $K_m OA=1,7$ mM, $V_{max} OA=100,2$ EU/mq zülal olduğu halda ÖTH-nin mitoxondrilərində kontrollda $K_m OA=1,5$ mM, $V_{max} OA=134,2$ EU/mq zülal, quraqlıqda $K_m OAA=2,0$ mM, $V_{max} OA=141,7$ EU/mq zülal olmuşdur.

Alınan nəticələri analiz etdikdə məlum olur ki, amarant bitkisinin yarpaqlarında NAD-MDH-nin kataliz etdiyi reaksiyanın OA-a görə K_m -ləri buğda sortlarının flaq yarpaqlarındakı həmin göstəricidən aşağı qiymətə malik olub 1,2-2,1 mM aralığında yerləşirlər. Amarantın ÖTH-də baş verən həmin reaksiyanın V_{max} -u isə buğdanın flaq yarpaqlarının MH-nin subhüceyrə fraksiyaları ilə müqayisədə 3-5 dəfə çoxdur. Amarantın ÖTH-də $V_{max} OA$ MH-dəki $V_{max} OA$ -dan həmişə yüksək olmuşdur. Quraqlıqda kontrolla müqayisədə bu fərq daha da artmışdır. Amarantın MH-nin subhüceyrə fraksiyaları arasında sitozol fraksiyada V_{max} mitoxondri fraksiyasına nisbətən ~2 dəfə çox olmuşdur. Amarant yarpaqlarında MH ilə ÖTH-nin sitozol fraksiyalarında kontrol və quraqlıq variantlarında K_m və V_{max} -lar təqribən bir-birlərinə bərabər olsalar da ÖTH-nin mitoxondri fraksiyasında $V_{max} OA$ MH-nin mitoxondri fraksiyasına nisbətən ~3-4 dəfə yüksək olmuşdur.

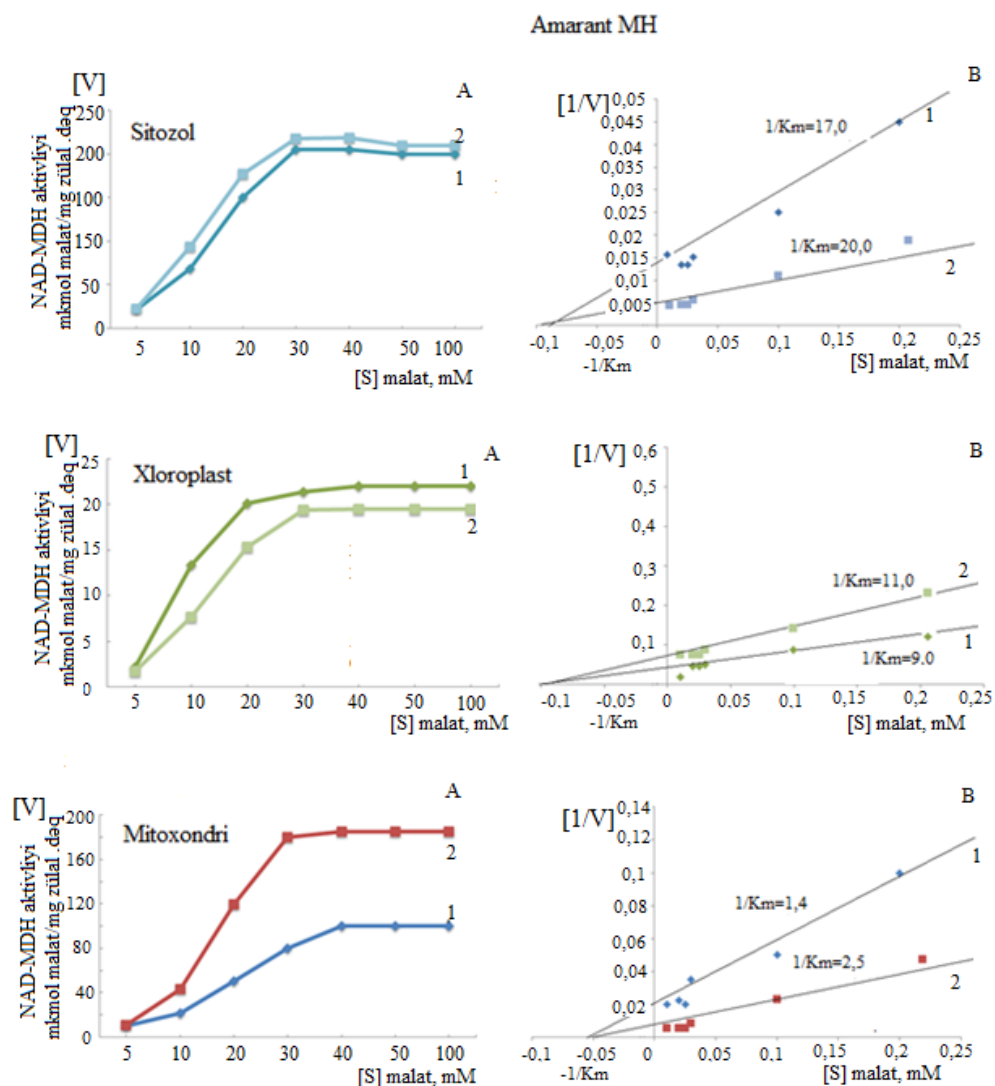
Alınan nəticələr MDH-nin OAA-a qarşı yüksək, malata qarşı isə aşağı həssaslığının olduğunu göstərir ki, bu da başqa tədqiqatçıların nəticələri ilə uyğunluq təşkil edir. Əvvəllər aparılmış tədqiqatlarda göstərilir ki, malata qarşı fermentin aşağı həssaslığa malik olması malatın katalitik çevrilməsi zamanı fermentin konformasiya dəyişkənliyi ilə əlaqədardır [3, 24].

K_m qiymətlərinin müqayisəsi göstərir ki, sitoplazmatik MDH malata OA-la müqayisədə az uyğunluq göstərir. Digər izoformaların kofermentlərə qarşı oxşar xassə göstərir. K_m qiymətləri bitkinin növündən, mübadilənin tipindən, hüceyrə daxilində yerinə yetirdiyi funksiyasından və boyumə şəraitindən asılı olaraq dəyişir.

1 və 2-ci şəkillərdə amarant yarpaqlarında malatın müxtəlif qatılıqlarının NAD-MDH aktivliyinə təsirinin kinetikasi verilmişdir. Əgər şəkillərin B variantına, yəni Laynuiver Berkə görə verilən qrafiklərə diqqət etsək görərik ki, onlar düzxətli olub eyni xarakterli quruluşa malikdirlər. Bu quruluş inhibirləşmənin rəqabətsiz növünə xas olan əlamətdir [5, 7]. Bu xüsusiyyətin əsası ondan ibarətdir ki, fermentin inhibirləşməsi zamanı K_m nisbi olaraq dəyişməz qaldığı halda V_{max} azalır. Şəkillərdən görüldüyü kimi amarant yarpaqlarının subhüceyrə fraksiyalarında normal suvarma və quraqlıqda malatın 20-40 mM qatılıqlarda fermentin aktivliyinin artmasına səbəb olur.

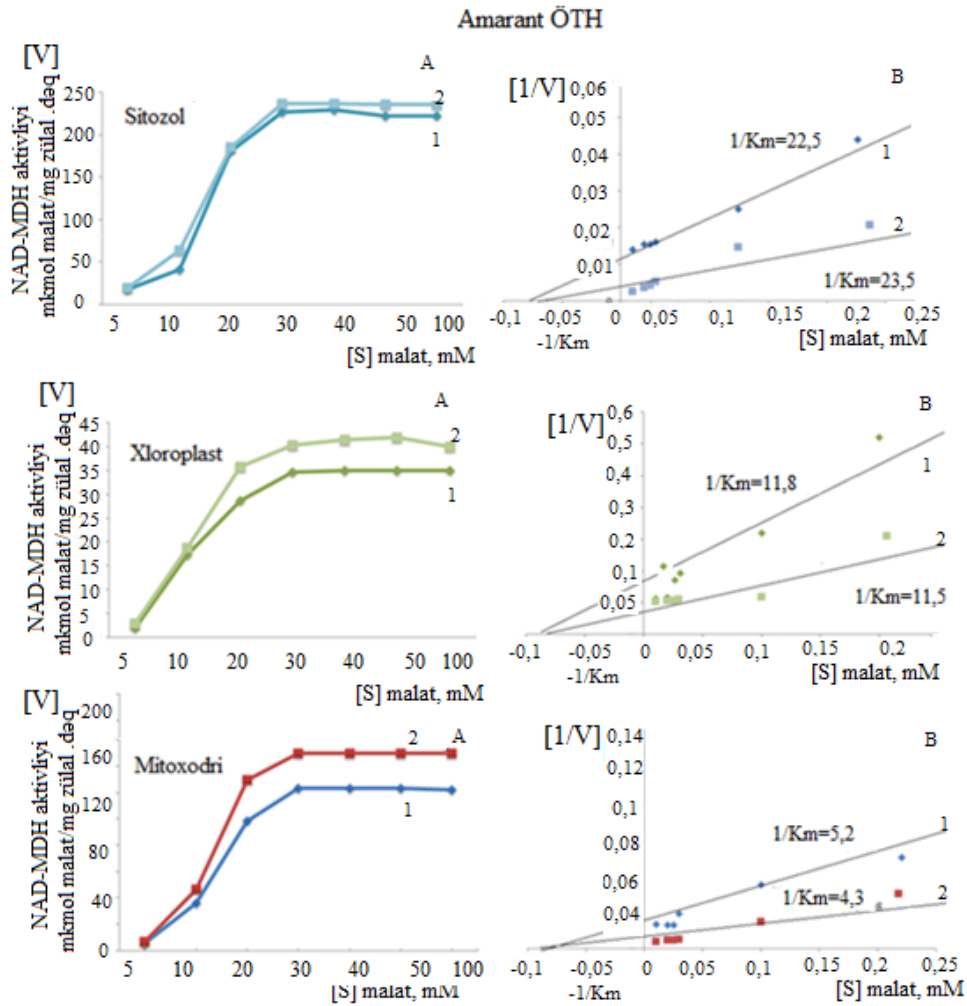
NAD-MDH fermentinin ayrı-ayrı izoformaları xüsusi aktivliyinə, reaksiyanın sürətinə, düzünə və əksinə gedən reaksiyanın katalitik effektivliyinə görə biri-birindən fərqlənirlər. Düzünə və əksinə gedən reaksiyada NAD-MDH-nin kinetik parametrlərinə görə fərqlənən 2 müxtəlif konformasion vəziyyətdə olur [1]. Malatın oksidləşməsi əlavə energetik baryerin aradan qaldırılması və katalitik akt zamanı molekulların strukturunda əhəmiyyətli konformasiya

dəyişikliklərinin baş verməsi ilə müşayiət olunduğuna görə reaksiya sabit sürətlə baş vermir. Malat həyəcanlanmış vəziyyətindən sakit vəziyyətə keçərək ayrılan hidrogen ionunu kofermentə ötürərək substrat molekulu ilə MDH birləşməsinə şərait yaradır. Yalnız reaksiya məhsulları ayrıldıqdan və MDH molekulu başlanğıc konformasiya vəziyyətinə qayıtdıqdan sonra substratın yenidən katalitik çevrilməsi baş verir. Bu keçidlərlə əlaqədar olaraq katalitik prosesin sürəti zəifləyir. Oksaloasetatın malata çevrilmə reaksiyası strukturunda baş verən konformasiya dəyişmələri ilə əlaqədar deyil.



Şək. 1. Çiçəkləmə fəzasında Amarantın MH subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-nin kataliz etdiyi malatın reduksiya reaksiyanın substratın qatılığından asılı olaraq dəyişməsinin kinetikasi. 1-kontrol, 2-quraqlıq. A-Mixaelis-Menten. B-Laynuiver-Berk, OA-oksaloasetat.

Görünür NAD-MDH müxtəlif subhüceyrə fraksiyalarında düzünə və dönər reaksiyaların katalitik xüsusiyyətlərindəki fərqlər onların subhüceyrə daxilində yerinə yetirdiyi fizioloji funksiya ilə bağlıdır. Sitozol və qlioksisomlarda malatın oksidləşmə reaksiyasının sürəti OA reduksiyası reaksiyasına nisbətən daha sürətli olması pH aşağı olması ilə izah edilir. pH qiyməti yüksək olan mitoxondri və etioplastlarda OA malata çevrilməsi reaksiyasının daha sürətli olması həmin orqanoidlərdə pH yüksək olması ilə izah edilir. Qlioksomal və sitoplazmatik MDH-ın dimer forması digərlərinə nisbətən daha yüksək katalitik aktivlik göstərir. Mitoxondrilərdə və xloroplastlarda lokalizasiya olunan fermentin tetramer forması xüsusi aktivliyin və katalitik effektivliyin aşağı olması ilə fərqlənir.



Şəkl. 2. Çiçəkləmə fəzasında Amarantın ÖTH subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-nin kataliz etdiyi malatın reduksiya reaksiyanın substratın qatılığından asılı olaraq dəyişməsinin kinetikasi. 1-kontrol, 2-quraqlıq. A-Mixaelis-Menten. B-Laynuiver-Berk, OA-oksaloasetat.

Malatın oksidləşməsi əlavə energetik baryerin aradan qaldırılması və katalitik akt zamanı molekulların strukturunda əhəmiyyətli konformasiya dəyişikliklərinin baş verməsi ilə müşayiət olunduğuna görə reaksiya sabit sürətlə baş vermir. Malat həyəcanlanmış vəziyyətindən sakit vəziyyətə keçərək ayrılan hidrogen ionunu kofermentə ötürərək substrat molekulu ilə MDH birləşməsinə şərait yaradır. Yalnız reaksiya məhsulları ayrıldıqdan və MDH molekulu başlanğıc konformasiya vəziyyətinə qayıtdıqdan sonra substratın yenidən katalitik çevrilməsi baş verir. Bu keçidlərlə əlaqədar olaraq katalitik prosesin sürəti zəifləyir. Oksaloasetatın malata çevrilmə reaksiyası strukturunda baş verən konformasiya dəyişkənlikləri ilə əlaqədar deyil.

Müəyyən olunmuşdur ki, amarantın inkişafının aktiv fazalarında NAD-MDH fermentinin aktivliyi yarpaqlarının mezofil və örtük topa hüceyrələrinin mitoxondri fraksiyalarında sitozol və xloroplast fraksiyalarına nisbətən xeyli yüksək olur və quraqlığın təsiri şəraitində bu fərq daha da artır. Alınan nəticələr eyni zamanda onu göstərir ki, amarant bitkisinin mezofil və örtük topa hüceyrələrinin sitozol və mitoxondri fraksiyalarında olan NAD-MDH izoformaları oksaloasetatın malata çevrilməsi reaksiyasını həyata keçirir. Bundan fərqli olaraq amarantın mezofil hüceyrələrinin xloroplast və mitoxondri, örtük topa hüceyrələrinin isə xloroplast fraksiyasında lokalizasiya olunan izoformalar əksinə olaraq malatın oksaloasetata çevrilməsi reaksiyasını həyata keçirirlər.

ƏDƏBİYYAT

1. Блюменфельд Л.А., Плешанов П.Г. // Биофизика. 1986, т. 30, № 5, с. 760-763.
2. Епринцев А.Т., Игамбердиев А.У. // Физиология растений, 1995, т. 42, № 5, с. 759.
3. Сатар А.Ф., Парфенова И.В., Мальцева Е.В., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010, т. 10, вып. 2, С. 231-236.
4. Byrt C., Grof C., Furbank R. // J. of Integrative Plant Biology, 2011, v. 53, No 2, p. 120-135.
5. Cook P., Cleland W. Enzyme Kinetics and Mechanism / New York, USA: Garland Sci., 2007, 416 p.
6. Cousins A., Baroli I., Badger M. et al. // Plant Physiology, 2007, V. 145, P. 1006–1017.
7. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. New York, USA: Wiley-Blackwell, 2012, 510 p.
8. Fieldes M., Electrophoresis, 1992, V. 13, P. 454-455.
9. Furbank R., von Caemmerer S., Sheehy J. // Functional Plant Biology, 2009, V. 36, P. 845–856.
10. Furbank R. // J. of Experimental Botany, 2011, V. 62, P. 1-6.
11. Gardestrom P., Edwards E. // Plant Physiol, 1983, V. 71, No 1, P. 24-29.
12. Goward C., Nicholls D. // Protein Science, 1994, V. 3, P. 1883-1888.
13. Guliev N.M., Babaev G.G., Bairamov Sh.M., Aliev D.A. // Russian Journal of Plant Physiology, 2003, Vol. 50, No 2, P. 213-219.
14. Hong T., Nose A., Agarie S. // J. of Experimental Botany, 2004, V. 55, No 406, P. 2201-2211.
15. Minarik P., Tomaskova N., Kollarova M. // Gen. Physiol. Biophys., 2002, V. 21, P. 257-265.
16. Musrati R., Kollarova M., Mernik N. // Gen Physiol. Biophys., 1998, V. 17, No 3, P. 193-210.

17. Nunes-Nesi A., Carrari F., Lytovchenko A. et al. // Plant Physiol., 2005, V. 137, P. 611–622.
18. Pracharoenwattana I., Cornah J., Smith S. // The Plant Journal, 2007, V. 50, P. 381–390.
19. Scheibe R., Stitt M. // Plant Physiol Biochem., 1988, V. 26, P. 473–481.
20. Sedmak, J., Grossberg, S. // Anal. Biochem, 1977, V. 79, P. 544-552.
21. Selinski J., Konig N., Wellmeyer B. et al. // Mol. Plant., 2014, V. 7, P. 170–186.
22. Tomaz T., Bagard M., Pracharoenvwattana I. // Plant Physiology, 2010, V. 154, P. 1143-1154.
23. Wang Yu, Brautigam A., Weber A. // J. of Exp. Botany., 2014, V. 53, No 7, P. 3568-3578.
24. Wisemann M., McKay D., Crow K. // Arch. Biochem. Biophys. 1991, V. 290, No 3, P. 191-196.

**ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ
ХАРАКТЕРИСТИКИ НАД-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ РЕАКЦИИ В
СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ЛИСТЬЕВ АМАРАНТА В ОНТОГЕНЕЗЕ
ПРИ ЗАСУХЕ**

У.А.КУРБАНОВА, И.М.АЛИММММЕДЗАДЕ, Г.Г.БАБАЕВ

РЕЗЮМЕ

Выделены и очищены ассимиляционные ткани и их субклеточные фракции-цитизол, хлоропласт и митохондрии листьев амаранта. Сравнительно изучена динамика изменения активности и кинетические характеристики (K_m , V_{max}) реакции, катализируемой НАД-Малатдегидрогеназой, в выделенных субклеточных фракциях, в онтогенезе при засухе.

Ключевые слова: амарант, онтогенез, водный стресс, НАД, МДГ, активность, кинетика, адаптация

**THE STUDY OF THE CHANGE DYNAMICS OF CATALITICAL PROPERTIES
OF NAD-MALATEDEHIDROGENASE IN ONTHOGENESIS IN SUBCELLULAR
FRACTIONS OF THE AMARANTH LEAVES UNDER DROUGHT**

U.A.GURBANOVA, I.M.ALIMAMMADZADE, H.G.BABAYEV

SUMMARY

Assimilation cells and their subcellular fractions - cytosol, chloroplasts and mitochondria from the leaves of amaranth have been isolated and purified. In the high-purified fractions of assimilation cells of amaranth leaves, the dynamics of the activity changes and the kinetic parameters of the reactions, catalizing by the enzyme of NAD-Malatedehydrogenase has been comparatively investigated.

Key words: amaranth, onthogenes, water stress, NAD, MDH, activity, kinetics, adaptation

Redaksiyaya daxil oldu: 16.09.2015-ci il
Çapa imzalandı: 05.02.2016-cı il.