

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ NADP-ЗАВИСИМОЙ
ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПЛОДОВ ЯБЛОНИ****С.Н.ОМАРОВА, Я.А.ОМАРОВ, А.А.КУЛИЕВ***Бакинский Государственный Университет**saboma@rambler.ru, biochem@mail.az*

Выявлено, что основная часть (более 90%) ферментативной активности NADP-ИДГ сосредоточена в супернатанте, а меньшая в хлоропластах. В результате денатурирующего электрофореза субэпидермальных тканей яблок выявлены две изоформы, различающиеся по электрофоретической подвижности, которые, как предполагается, являются цитозольной и хлоропластной изоформами. Выявлены молекулярные массы цитозольной и хлоропластной изоформ, которые равны 90 и 125 кДа, соответственно. Проведенный денатурирующий SDS-электрофорез выявил единственную полосу с молекулярной массой 43 кДа, что позволяет предположить, что фермент состоит из идентичных субъединиц.

Растения обладают двумя типами изоцитратдегидрогеназы, использующими различные кофакторы; один из них является NAD-зависимым ферментом (NAD-ИДГ), в то время как другой использует в качестве кофактора NADP (NADP-ИДГ). Первая изоцитратдегидрогеназа является ферментом цикла трикарбоновых кислот (цикла ТКК или Кребса) и локализована только в митохондриях эукариотических клеток. Изоферменты NADP-ИДГ же локализованы в цитозоле [1], митохондриях [2], пластидах [3] и пероксисомах [4], и их точные физиологические функции в этих компартментах еще не определены. Предполагается, что кроме физиологической роли изоферментов NADP-ИДГ в синтезе аминокислот, эти изоэнзимы играют важную роль также и в продукции НАДФН.

Активность NADP-ИДГ в компартментах растительных клеток распределена неравномерно. Известно, что приблизительно 90% ее ферментативной активности сосредоточено в цитозоле, 10% - в хлоропластах, 1% находится в пероксисомах, и в следовых количествах обнаружена в митохондриях [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Эти наблюдения подтверждают идею о том, что цитозоль является главным местом образования 2-оксоглутарата.

Таким образом, NADP-ИДГ, локализованная в цитозоле, играет немаловажную роль в обмене веществ в растительном организме. К сожалению, данные относительно внутриклеточного распределения, молекулярных форм и биохимической роли этого фермента в сочных плодах, в частности, яблоках, отсутствуют вовсе.

Целью данной работы явилось выявление молекулярных форм NADP-ИДГ из субэпидермальных тканей плодов яблони, что тем самым позволит раскрыть роль этого фермента в различных компартментах клеток субэпидермальной ткани яблок.

Материалы и методы

Плоды яблони (*Malus domestica* Borkh.) сорта Ренет Симиренко были собраны в предклимактерической стадии из садовых угодий Губинского района Азербайджанской Республики. Были отобраны плоды приблизительно одинакового размера и без видимых дефектов. Эксперименты проводили с яблоками, хранившимися в холодильной камере при 4-5°C. Субэпидермальную ткань яблок весом 15 г, растирали в ступке в 30 мл экстрагирующей среды, состоящей из 30 мМ трис-HCl буфера (pH 9.0), 2 мМ ЭДТА, 5мМ MgCl₂, 14 мМ 2-меркаптоэтанола, 5% поливинилпирролидона, 1% полиэтиленгликоля. Гомогенат фильтровали через капроновую ткань и полученный фильтрат подвергали последовательному центрифугированию при 1000, 10 000 и 30 000 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 NADP-ИДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм по скорости восстановления NADP. Инкубационная среда состояла из 30 мМ трис-HCl буфера (pH 8.2), 2.5 мМ MgCl₂, 12 мкМ изоцитрата, 10 мкМ НАДФ и 0,3 мл исследуемой пробы. Общий объем инкубационной среды – 3 мл. Контрольная кювета не содержала субстрата. Реакция начиналась с внесения ферментного препарата, а измерение начинали спустя 20 мин после начала реакции при +20°C. Активность фермента выражали в нмоль НАДФН·мин⁻¹·мг⁻¹ белка.

Нативный электрофорез в ПААГ проводили в щелочной системе с помощью прибора «Reanal» (Венгрия). В основе лежал метод Дэвиса [10]. Были использованы 7 %-й акриламид для концентрирующего и 4 %-й акриламид для разделяющего геля, а также 25 %-я сахароза в качестве антиконвекционной среды. Электрофорез проводили в течение 6 ч при 4°C. Сила тока составляла 2 МА на каждую трубку. Для выявления полос фермента гели инкубировали в среде, которую использовали для определения активности фермента, добавив к ней 0,02 мг/мл феназинметасульфата и 0,2 мг/мл тетразолия нитросинего, согласно методике Маркерта и Моллера [11]. Продолжительность инкубации составляла 60-80 мин в темноте при +30°C. Молекулярную массу белковых молекул определяли по методу Вебер и Осборна [12]. В качестве маркерных белков для определения нативной молекулярной массы ферментной молекулы были использованы гексамер уреазы (545 кДа), тример уреазы (272 кДа), димер бычьего сывороточного альбумина (132 кДа), мономер бычьего сывороточного альбумина (66 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидраза (29 кДа) и бычий лактоальбумин

(14,2 кДа).

SDS-электрофорез в ПААГ проводили по методике Леммли [13] в течение двух часов при комнатной температуре с последующим окрашиванием с 0,25 % Кумасси бриллиантовым голубым R-250. Для приготовления геля использовался 10 % акриламид. В качестве маркерных белков были использованы следующие белки: лизоцим (Мг 14,3 кДа), лактоглобулин (Мг 18,4 кДа), трипсिन (Мг 24 кДа), пепсин (Мг 34,7 кДа), овальбумин (Мг 45 кДа) и бычий сывороточный альбумин (66 кДа).

Результаты и обсуждение

Нами было изучено распределение активности исследуемого нами фермента в различных фракциях субэпидермальной ткани плодов яблони. Данные по определению активности NADP-ИДГ в различных фракциях ткани яблок представлены в таблице 1. Как видно из полученных данных, активность NADP-ИДГ распределена по фракциям неравномерно. Основная часть ферментативной активности сосредоточена в супернатанте. Более 90% от общей ферментативной активности обнаружено в супернатанте 1 000 г. Ферментативная активность, выявляемая в осадках хлоропластной (10 000 г) и митохондриальной фракции (30 000 г) после их обработки твином-80, была сравнительно низкой и практически отсутствовала, соответственно.

Таблица 1

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

Фракция	активность во фракции	% от общей активности
Супернатант 1 000 g	165±2,3	91
Супернатант 10 000 g	154±1,9	85
Супернатант 30 000 g	150±1,7	82
Осадок 1000 g	17±0,3	9
Осадок 10 000 g	46±0,8	25
Осадок 30 000 g	следы	-

Согласно литературным данным, данный фермент присутствует в микросомальной фракции растительных объектов в следовых количествах, поэтому учитывая этот факт мы не проводили выявление распределения активности фермента в данной фракции. Полученные данные позволяют предположить о преобладании цитоплазматической формы NADP-ИДГ в субэпидермальных тканях яблок. Результаты наших исследований согласуются с имеющимися в литературе сообщениями о том, что NADP-ИДГ растений, в основном, локализована в цитозоле [3, 5, 14].

Как было выше отмечено, супернатант 1000 g характеризовался максимальной ферментативной активностью, которая составляла около 91% от общей активности. В супернатантах же 10 000 g и 30 000 g активность NADP-ИДГ снижалась до 85% и 82%. Следует отметить, что постепенное снижение активности фермента по мере центрифугирования, сопровождалось постепенным повышением ферментативной активности соответствующих осадков. Потеря активности в супернатанте 10 000 g, сопровождающаяся повышением активности

в соответствующем осадке, наводит на мысль о том, что определенная часть фермента связана с субклеточными частицами, осаждаемыми при этом ускорении, а именно с хлоропластами. Эти результаты дают основание предположить, что и в яблоках этот фермент, по-видимому, находится еще и в хлоропластах. Так, фракция 10 000 g, содержащая хлоропласты, всегда обладала активностью NADP-ИДГ, что свидетельствует о наличии изоформ NADP-ИДГ в хлоропластах. Что же касается осадка 30 000 g, то активность NADP-ИДГ в этой фракции практически не обнаруживалась. Следовательно, митохондриальная фракция, осаждаемая при этом ускорении, не содержит изофермента NADP-ИДГ. Осадок супернатанта, полученного при 30 000 g (митохондриальная фракция), где хлоропласты отсутствуют, был практически лишен ферментативной активности NADP-ИДГ.

Таким образом, доминирующая молекулярная форма NADP-ИДГ яблок локализована в цитоплазматической фракции, а другая – в хлоропластах.

В последующей серии экспериментов нами изучался изоферментный состав различных фракций субэпидермальных тканей яблок методом диск-электрофореза в ПААГ. На рисунке 1 показаны электрофореграммы некоторых из них, позволяющие определить количество молекулярных форм NADP-ИДГ и их внутриклеточную локализацию. Электрофореграммы супернатантов 1000 g, 10 000 g и 30 000 g оказались практически сходными.

Электрофорез супернатантов 1000 и 10 000 g, а также осадка фракции 10 000 g, приготовленных на экстрагирующей среде (с добавлением KCl и сахарозы) выявил две молекулярные формы фермента, существенно различающиеся электрофоретической подвижностью (гель 1 и 2). Эти формы характеризовались значениями R_f 0,13 и 0,32. Эти значения R_f свидетельствуют о том, что полоса со значением 0,32 заряжена более отрицательно, чем другая.

С помощью электрофореза супернатантов, полученных при 30 000 g и приготовленных в присутствии 0,5 М сахарозы с последующим добавлением 0,5 М KCl, была выявлена единственная молекулярная форма фермента с R_f 0,32. Другая форма с R_f 0,13 - не проявлялась. Это свидетельствует о том, что доминирующая молекулярная форма с R_f 0,32 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. В этом случае выявляется другая молекулярная форма с R_f 0,13, а полоса с R_f 0,32 исчезает. На электрофореграмме осадков (30 000 g) активность фермента не обнаруживается, что еще раз подтверждает то, что митохондриальная фракция практически лишена ферментативной активности NADP-ИДГ.

Модификация условий миграции и времени инкубации в растворе для окрашивания не влияло на количество полос.

В следующей серии экспериментов была определена молекулярная масса нативных изоформ, полученных в результате электрофореза. Значения молекулярных масс этих изоформ определяли с использованием белков-стандартов по калибровочной кривой, построенной на основании данных электрофореза. Выявлено, что обе полосы располагаются между димером (132 кДа) и мономером бычьего сывороточного альбумина (66 кДа). Используя указанную методику определения молекулярной массы NADP-ИДГ, было установлено, что масса

цитозольной и хлоропластной изоформ составляет около 90 и 125 кДа, соответственно (результаты не показаны). Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым молекулярная масса нативной цитозольной NADP-ИДГ как из листьев, так и корней гороха равна 82 кДа [15], а из семян шотландской сосны – 95 кДа [8]. Что касается молекулярной массы хлоропластной NADP-ИДГ, сообщается, что она в миксотрофных клетках растения табака составляет 136 кДа, а масса цитозольной изоформы – 117 кДа [3].

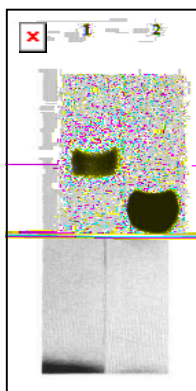


Рис. 1. Диск-электрофореграммы фракций субэпидермальной ткани плодов яблони сорта Ренет Симиренко.

1 – электрофореграмма фракции осадка 10 000 g;
2 – электрофореграмма фракции 1000 g

Таким образом, установлено, что основная часть активности NADP-ИДГ сосредоточена в цитозоле субэпидермальных тканей плодов яблони, а минимальная – в хлоропластах, субклеточных частицах, осаждаемых при 10 000 g. Каждая из фракций представлена одной молекулярной формой NADP-ИДГ, существенно различающихся по электрофоретической подвижности.

На следующем этапе был проведен электрофорез в денатурирующих условиях, который, как известно, проводят для выявления субъединичного состава какого-либо белка. Значения молекулярных масс субъединиц фермента также определяли с использованием белков-стандартов по калибровочной кривой. Проведенный SDS-электрофорез обеих изоформ выявил единственную полосу с молекулярной массой 43 кДа, находящуюся вблизи овальбумина - белка с молекулярной массой 45 кДа (рис.2). Полученные данные позволяют предположить, что цитозольная изоформа является гомодимером, а хлоропластная – гомотримером, т.е. состоят из идентичных субъединиц. Согласно литературным данным, большинство изоэнзимов цитозольной NADP-ИДГ являются гомодимерами и построены из субъединиц с молекулярной массой около 47 кДа [16].

Имеется некоторое количество работ по выявлению субъединичного состава NADP-ИДГ в различных растительных объектах. Описываются два типа структуры фермента. Согласно первому типу, фермент состоит из одной полипептидной цепи, как это встречается у *A. niger* и в свином сердце, молекулярные массы для которых определены и равны 60 кДа и 68 кДа, соответственно [17, 18]. Второй тип характеризуется димерной структурой как в *E. coli*, *Fundulus heteroclitus* и печени свиньи. Эти ферменты имеют молекулярные массы 75 кДа, 90 кДа и 80 кДа, соответственно, и построены из двух идентичных субъединиц [19, 20, 21]. В нашем случае, мы предполагаем, что цитозольная NADP-ИДГ плодов яблок принадлежит ко второму типу.

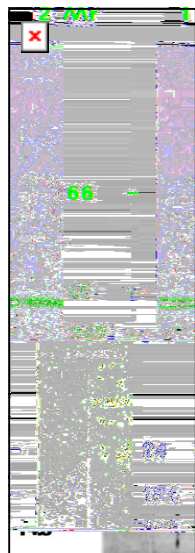


Рис. 2. Определение молекулярных масс субъединиц NADP-ИДГ на 10%-ом ПААГ. Маркерные белки – лизоцим, лактоглобулин, трипсиноген, пепсин, овальбумин и бычий сывороточный альбумин.

1 – очищенный фермент из хлоропластной фракции субэпидермальной ткани яблок;
2 – очищенный фермент из цитозольной фракции субэпидермальной ткани яблок.

Точные физиологические роли этих двух изоэнзимов NADP-ИДГ неизвестны по сей день. Однако, известно, что они катализируют окислительное декарбоксилирование изоцитрата, по-крайней мере в цитозоле и хлоропластах [16]. Субклеточная локализация NADP-ИДГ предполагает, что эти изоформы могут выполнять в растительном метаболизме различные функции. Предполагается, что цитозольный фермент вовлечен в снабжение хлоропластной глутаматсинтазной активности 2-оксоглутаратом [20]; более того, цитрат, образованный в митохондриях или запасенный в вакуолях, также может быть перемещен в цитозоль, где посредством активной цитозольной аконитазы превращается в изоцитрат [19].

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить субклеточное распределение ферментативной активности NADP-ИДГ и изоферментный состав фермента субэпидермальных тканей яблок, что, как известно, является одной из важных задач стоящих перед исследователем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Galvez S, Hodges M, Decottignes P, Bismuth E, Lancien M, Sangwan RS, Dubois F, LeMarechal P, Cre'tin C, Gadal P. // *Plant Molecular Biology*, 1996, v.30, p.307–320.
2. Galvez S, Roche O, Bismuth E, Brown S, Gadal P, Hodges M. // *PNAS*, 1998, v.95, p.7813–7818.
3. Galvez S., Bismuth E., Sarda C., Gadal P. // *Plant Physiol.*, 1994, v.105, p.593-600.
4. Corpas F.J., Barroso J.B., Sandalio L.M., Palma J.M., Lupianez J.A., and del Rio L.A. // *Plant Physiol.*, 1999, v. 121, p. 921–928.
5. Palma J.M., Jimenez A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Lundqvist M., Gomez M., Sevilla F. and del Rio L.A. // *J. Exp. Bot.*, 2006, v. 57, № 8, p. 1747–1758.
6. Canino S., Nieri B., Pistelli L., Alpi A., De Bellis L. // *Physiol. Plant.*, 1996, v. 98, №1, p. 13–19.
7. Chen R. // *Planta*, 1998, v. 207, p. 280-285.
8. Palomo J., Gallardo F., Suarez M.F., Canovas F.M. // *Plant Physiol.*, 1998, v. 118, p. 617–626.
9. Popova T.N., Appenroth K.J. // *J. Plant Physiol.*, 2002, v. 159, p. 239-244.

10. Davis B.I. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. v.121, p.404.
11. Markert C.L., Moller F. // PNAS, 1959, v.47, p.753-763.
12. Webber A., Osborn M. // J. Biol. Chem., 1969, v.244, № 16, p.4406-4412.
13. Laemmli U.K. // Nature, 1970, v.227, p.680-685.
14. Gallardo F., Galvez S., Gadal P., Canovas F. // Planta, 1995, v.196, p.148-154.
15. Chen R., Le Marechal P., Vidal J., Jacqout J.P., Gadal P. // Eur. J. Biochem., 1988, v.175, p.565-572.
16. Hodges M. // J. Exp. Bot., 2002, v. 53, no. 370, p. 905-916.
17. Meixner-Monoroï B., Kubicek C. P., Harrer W. & Schreferl G. // Biochem. J., 1986, v.236, p.549-557.
18. Colman R.F. // J.Biol.Chem. 1972, v.247, p.6727-6729.
19. Reeves H.R., Daumy G.O., Lin C.C. & Houston M. // Biochim. Biophys. Acta, 1972, v.258, p.27-39.
20. Ilingworth J.A. & Tipton K.F. // Biochem. J. 1970, v.118, p.253-258.
21. Gonzalez-Villasenor L.I. & Powers D.A. // J.Biol.Chem., 1985, v.260, p.9106-9113.
22. Chen R.D., Gadal P. // Plant Physiol. Biochem., 1990b., v.28, p.141-145.
23. Brouquisse R., Nishimura M., Gaillard J., Douce R. // Plant Physiol., 1987, v.84, p.1402-1407.

ALMA MEYVƏLƏRİNİN NADP-ASILI İZOSİTRATDEHİDROGENAZASININ MOLEKULYAR FORMALARI

S.N.ÖMƏROVA, Y.A.ÖMƏROV, A.Ə.QULİYEV

XÜLASƏ

Müəyyən edilmişdir ki, alma meyvələrinin subepidermal toxumalarında NADP-asılı izositratdehidrogenaza fermentinin fəallığının əksər hissəsi (90% çox) supernatantda, kiçik hissəsi isə xloroplastlarda lokalizasiya olunur. Alma meyvələrinin subepidermal toxumalarının poliakrilamid gəldə nativ (denaturasiyaya uğradılmayan) elektroforez nəticəsində fermentin elektroforetik hərəkətliyi ilə fərqlənən iki izoforması aşkar edilmişdir ki, onlar fərz olunduğu kimi, müvafiq olaraq sitozol və xloroplast izoformalarıdır. Bu izoformaların molekul kütlələri müvafiq olaraq 90 və 125 kDa bərabərdir. Poliakrilamid gəldə aparılmış denaturasiyaedici SDS-elektroforez molekul kütləsi 43 kDa olan yeganə zolağı aşkar etmişdir, bu isə fermentin identik subvahidlərdən təşkil olunduğundan xəbər verir.

MOLECULAR FORMS OF NADP-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASE OF APPLE FRUITS

S.N.OMAROVA, Y.A.OMAROV, A.A.GULIYEV

SUMMARY

It is revealed that, most part of NADP-IDH (more than 90%) is localized in the supernatant and lesser part - in chloroplasts. The result of native (under non-denaturing conditions) electrophoresis in PAAG showed two bands with calculated R_f value of 0.32 and 0.13. As proposed, these bands are cytosolic and chloroplast isoenzymes respectively. Molecular masses of each isoforms were determined as 90 and 125 kDa. The molecular mass of NADP-IDH subunits was 43 kDa as determined by SDS/acrilamid electrophoresis that testifies to the enzyme consisting of identical subunits.