

СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ ИЗОЦИТРАТЛИАЗЫ ИЗ ЩИТКОВ КУКУРУЗЫ

Е. В. Маслова, Д. Н. Федорин, В. Ю. Башмаков, В. Н. Попов, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет

Методом изоплотностного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы проводили разделение компартментов клеток щитка кукурузы. Выделили глиоксисомальную, митохондриальную и цитоплазматическую фракции. Степень перекрёстного загрязнения определяли с помощью маркерных ферментов. Установлено, что в щитках кукурузы функционируют две формы изоцитратлиазы, имеющие глиоксисомальную локализацию. Предполагается, что изоформы исследуемого фермента выполняют различные функции: одна участвует в метаболизме ацетила-СoА, образующегося при расщеплении жиров, а вторая — обеспечивает различные анаэробные реакции.

ВВЕДЕНИЕ

Для растительных тканей принципиально важным является вопрос о субклеточной локализации ключевых ферментов глиоксилатного цикла, так как имеющиеся данные носят противоречивый характер. Для высших растений показано, что в жирозапасающих тканях все ферменты глиоксилатного цикла (возможно, за исключением аконитазы, локализованной в цитозоле) присутствуют, вероятно, только в глиоксисомах. Однако недавние исследования указали на то, что оба маркерных фермента глиоксилатного цикла были найдены в митохондриальной фракции *Euglena gracilis* в ходе изоплотностного центрифугирования [1]. При протекании глиоксилатного цикла у водорослей и грибов в глиоксисомах выявляется только активность изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) и малатсинтазы, тогда как ферменты, общие с циклом Кребса, — цитратсинтаза, аконитаза и малатдегидрогеназа — в глиоксисомах этих организмов отсутствуют [2]. Изучение субклеточной локализации ферментов глиоксилатного цикла у *Ascaris lumbricoides* показало, что ферменты глиоксилатного цикла локализованы в определенном типе митохондрий, ответственных за протекание данного цикла. В противоположность экспериментам с *Ascaris* и *Turbatrix*, в нематоде *Coenorhabditis elegans* активность глиоксисомальных ферментов ИЦЛ и МС обнаруживается в глиоксисомоподобных микротельцах [2].

Ранее было показано, что в щитках кукурузы функционируют 2 формы изоцитратлиазы, которые отличаются по кинетическим и физико-хими-

ческим характеристикам и предположительно выполняют различные функции [3]. В связи с этим интересным представляется исследование субклеточной локализации двух данных форм ИЦЛ в щитках кукурузы, а также изучение активности ключевых ферментов основных метаболических путей в некоторых компартментах клетки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования использовали 4х-дневные щитки кукурузы (*Zea mays* L., сорт Воронежская 76), выращенные гидропонным методом, при 25 °С и интенсивности света 25 Вт/м²).

Исследование субклеточной локализации изоцитратлиазы в щитках кукурузы проводили с помощью дифференциального центрифугирования на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия). Изоплотностное центрифугирование осуществляли на центрифуге Beckman (США), в градиенте плотности сахарозы со ступенями 1,3; 1,5; 1,8; 2,3; 2,5 М.

Активность изоцитратлиазы в лизисной реакции определяли при 324 нм [4], каталазы определяли при 230 нм [4], фумаратгидратазы при 240 нм [4], аконитатгидратазы при 240 нм [4], глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы при 340 нм [4], лактатдегидрогеназы при 340 нм [4]. Активность сукцинатдегидрогеназы определяли методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [5].

Белок определяли по Лоури [6].

Опыты проводились в трех повторностях. Аналитическое определение для каждой пробы осуществляли в двух повторностях. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента [7].

© Маслова Е. В., Федорин Д. Н., Башмаков В. Ю., Попов В. Н., Епринцев А. Т., 2007

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В щитках кукурузы субклеточную локализацию изоцитратлиазы определяли методом дифференциального центрифугирования, в ходе которого было показано, что изоцитратлиаза сосредоточена преимущественно в осадке, содержащим грубую фракцию микротелец. Так же была определена локализация ключевых ферментов основных метаболических путей. Как видно из таблицы 1, активность ферментов в различных фракциях не одинакова. Такой маркерный фермент пероксисом как каталаза имеет преимущественную локализацию во фракции микротелец. Кроме того, маркерные фер-

менты митохондрий (фумаратгидратаза и сукцинатдегидрогеназа) наибольшую активность проявляют также во фракции микротелец. При этом процент загрязнения полученного осадка органоидами клетки цитоплазматической фракцией составляет 25—40 %. Активность изоцитратлиазы разделилась по фракциям не равномерно, большая часть (65 %) обнаруживается во фракции микротелец, только 35 % в цитоплазматической. Полученные данные позволяют говорить, что исследуемый фермент имеет преимущественно глиоксисомальную локализацию, поскольку активности фермента в цитоплазме находится в пределах загрязнения.

Таблица 1

Активность ферментов основных метаболических путей ($n = 3, P < 0,05$)

	ферменты	V, мл	Белок, мг	E	E/г с. м.
ГОМОГЕНАТ	каталаза	50	156,3	1,13	0,113
	фумаратгидратаза			1,29	0,129
	аконитатгидротатаза			3,94	0,394
	изоцитратлиаза			2,47	0,247
	глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа			0,36	0,036
	лактатдегидрогеназа			0,14	0,014
	сукцинатдегидрогеназа			—	—
ЦИТОПЛАЗМА	каталаза	40	80,9	0,37	0,037
	фумаратгидратаза			0,78	0,078
	аконитатгидротатаза			1,26	0,126
	изоцитратлиаза			0,85	0,085
	глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа			0,17	0,017
	лактатдегидрогеназа			0,12	0,012
	сукцинатдегидрогеназа			—	—
МИКРОТЕЛЕЦА	каталаза	1,5	1,5	1,47	0,147
	фумаратгидратаза			1,8	0,18
	аконитатгидротатаза			0,83	0,083
	изоцитратлиаза			1,36	0,136
	глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа			0,05	0,005
	лактатдегидрогеназа			—	—
	сукцинатдегидрогеназа			0,99	0,099

Локализация ИЦЛ в щитках кукурузы ($n = 3, P < 0,05$)

Фермент	Цитоплазма				Глиоксисомы			
	V, мл	Белок, мг	E	Уд. акт., E/мг белка	V, мл	Белок, мг	E	Уд. акт., E/мг белка
ИЦЛ	2	10,60	4,25	0,82	2	5,20	5,53	0,52
Каталаза	2	10,60	4,90	0,94	2	5,20	6,40	0,60

С помощью специфического проявления электрофореграмм содержащих препараты ИЦЛ было установлено, что белковые зоны обладали изоцитратлиазной активностью (рис. 1). Специфическое проявление активности изоцитратлиазы в суммарной фракции гомогената в гелях, осуществлённое реактивом Шиффа показало наличие двух изоформ фермента с Rf 0,25 и 0,29.

Следовательно, ИЦЛ в щитке кукурузы представлена двумя изоформами, имеющими преимущественно глиоксисомальную локализацию, а наличие активности изоцитратлиазы на электрофореграмме в цитоплазматической фракции, по-видимому, связано с разрушением глиоксисом в процессе центрифугирования и выходом фермента в цитозоль. Возможно, выделенные изоформы ИЦЛ являются изоферментами, выполняющими разные функции в метаболизме растительной клетки.

Для разделения грубой фракции микротелец, применяли изоплотностное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы. Вывод о субклеточной локализации изоцитратлиазы делали на основании равенства отношений распределения активности маркерного фермента пероксином — каталазы в глиоксисомах и в цитоплазме; и ИЦЛ в глиоксисомах и в цитоплазме [8]. Как видно из полученных данных (таблица 2), распределение суммарной активности каталазы и ИЦЛ в глиоксисомах и цитоплазме не одинаково. Большая часть (57%) активности изоцитратлиазы как и каталазы сосредоточена в глиоксисомах, в цитоплазме активность этих ферментов составила 43%. Наличие активностей ИЦЛ и каталазы в цитозольной фракции по-видимому, связано с перекрёстным загрязнением органелл и частичным разрушением глиоксисом при ресуспендировании.

Таким образом, было выявлено, что изоцитратлиаза из щитков кукурузы имеет преимущественно глиоксисомальную локализацию, что следует из

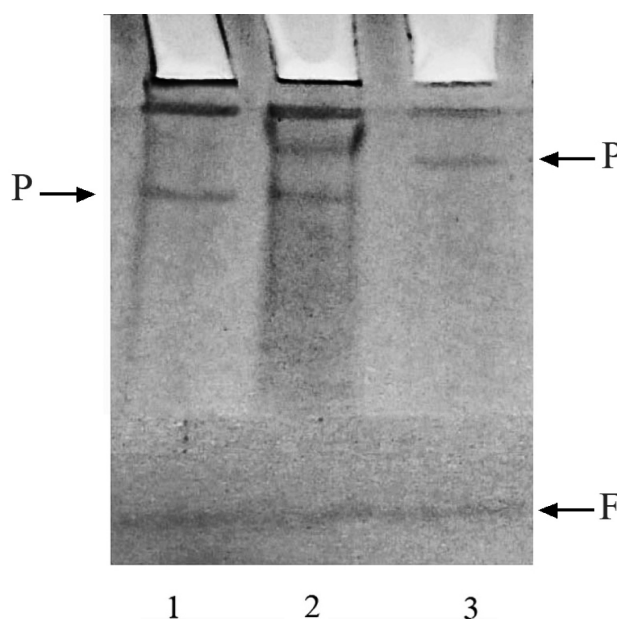


Рис. 1. Специфическое проявление изоформ изоцитратлиазы из щитков кукурузы в ПААГ после разделения на фракции: P — белковая полоса; F — фронт красителя, 1 — глиоксисомальная фракция, 2 — суммарная фракция, 3 — цитоплазматическая фракция

данных, полученных методом изоплотностного центрифугирования.

Было показано, что в щитках кукурузы функционируют 2 формы изоцитратлиазы, имеющие глиоксисомальную локализацию. Наличие двух форм, по-видимому, может быть связано с различиями в выполняемых ими функциях. Одна из форм участвует в метаболизации ацетила-СоА, образуящегося при расщеплении жиров, утилизируя его через глиокилатный цикл и обращенный гликолиз в доступную форму для клетки — глюкозу. Вторая форма может обеспечивать различные анаэробные реакции, связанные с необходимостью поставки дополнительных субстратов для нормального протекания цикла Кребса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А.Т. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла / А.Т. Епринцев, М. Ю. Шевченко, В. Н. Попов. — Воронеж.: Центрально-Черноземное книжное издательство, 2005. — 224 с.
2. Игамбердиев А. У. Микротельца в метаболизме растений / А.У. Игамбердиев / ВГУ. — Воронеж, 1990. — 148 с.
3. Маслова Е.В. Очистка и физико-химические свойства изоцитратлиазы из щитков кукурузы / Маслова Е.В. [и др.] / ВГУ. — Воронеж, 2007. — С. 110—115.
4. Землянухин А. А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений / А. А. Землянухин, Л. А. Землянухин / ВГУ. — Воронеж, 1996. — С. 38—39, 67—68, 87—89.
5. Cooper T.G., Beevers H.J. Mitochondria and Glyoxysomes From Castor Bean Endosperm. Enzyme Constituents and Catalytic Capacity // J. Biol. Chem. 1969. P. 3507—3513.
6. Lowry O.H. Protein measurement with the folin pihend reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — V. 193. — P. 265—275.
7. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин — М.: Высшая школа, 1980. — 293 с.
8. Schnarrenberger C., Oeser A., Tolbert N.E. Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. — Plant Physiol., 1971, vol. 48, №5, P. 566—574.