

СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ИЗОФЕРМЕНТОВ ИЗОЦИТРАТЛИАЗЫ В РАСТЕНИЯХ

А. В. Сальников, Ассиль Мундер Хаба, Махмуд Али С.,
М. В. Зайчикова, А. Т. Епринцев

Воронежский государственный университет
Поступила в редакцию 15.05.2012 г.

Аннотация. С помощью дифференциального и изоплотностного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы установлено, что изоцитратлиаза имеет преимущественно глиоксисомальную локализацию. Кроме того, определенная часть активности изоцитратлиазы обнаруживается в цитоплазме. Показано, что различно локализованные формы фермента обладают неодинаковой электрофоретической подвижностью (R_f 0,27 и 0,31). Предполагается, что изоформы изоцитратлиазы участвуют в разных физиологических процессах. Глиоксисомальная форма обеспечивает функционирование глюконеогенеза, а цитоплазматическая (внеглиоксисомальная) участвует в метаболизме органических кислот с двумя атомами углерода.

Ключевые слова: изоцитратлиаза, изоформы, глиоксилатный путь, ультрацентрифугирование, электрофорез.

Abstract. With a differential and discontinuous sucrose density gradient centrifugation revealed that isocitrate lyase has a predominantly glyoxysomal localization. Furthermore, some of the activity of isocitrate lyase is found in the cytoplasm. Shown that different forms of the enzyme localized to vary in electrophoretic mobility (R_f 0,27 and 0,31). It is assumed that isocitrate lyase isoforms are involved in various physiological processes. Glyoxysomal the form ensures the functioning of gluconeogenesis, and cytoplasmatic (unglyoxysomal) is involved in the metabolism of organic acids with two carbon atoms.

Keywords: isocitrate lyase, isoforms, glyoxylate pathway, ultracentrifugation, electrophoresis.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время ферменты глиоксилатного цикла являются объектами значительного количества исследований. Глиоксилатный цикл выступает важнейшим этапом глюконеогенеза, т. к. осуществляет синтез из двух молекул ацетил-КоА одной молекулы сукцината, используемой в дальнейших реакциях, что обеспечивает синтез углеводов. Этот метаболический процесс имеет широкое распространение в природе, функционируя в различные физиологические периоды жизни многих организмов. В жирозапасающих тканях растений основной функцией глиоксилатного цикла считается участие в глюконеогенезе при мобилизации запасных жиров. У высших растений малатсинтаза и особенно изоцитратлиаза присутствуют в тканях, активно утилизирующих жиры. Обычно ак-

тивность глиоксилатного цикла коррелирует с содержанием жира в семенах. Епринцев А. Т. с соавт. [1] показали, что при прорастании семян запасные жиры, являющиеся водонерастворимыми, превращаются в углеводы, которые дальше транспортируются к метаболически активным точкам, где утилизируются в энергетических и анаболических процессах. Физиологическая роль глиоксилатного цикла для растений – важный этап глюконеогенеза, обеспечивающий растущий организм в условиях гетеротрофного питания доступными формами органического вещества.

Изоцитратлиаза - фермент «метаболической вилки», как правило, является матриксным энзимом глиоксисом. Однако, в работах А. У. Игамбердиева [2] сообщалось о наличии второй изоформы, локализованной вне глиоксисом – внеглиоксисомальная форма.

В последнее время появились сообщения о полифункциональности данной изофер-

© Сальников А. В., Ассиль Мундер Хаба, Махмуд Али С., Зайчикова М. В., Епринцев А. Т., 2013

ментной системы. Работа данной системы позволяет метаболизировать двухуглеродные соединения и использовать их как строительный материал. В растительном организме в процессе фотодыхательного метаболизма образуется глиоксилат, но благодаря синтазной реакции ИЦЛ он может использоваться как в катаболических, так и в анаболических реакциях.

Ранее в нашей лаборатории проводили исследования изоцитратлиазы в кукурузе и сое [3]. Было показано наличие у них двух изоферментов ИЦЛ, и их функциональная роль была связана с реализацией глиоксилатного цикла у растений при прорастании масличных семян и с использованием при этом жиров и липидов в конструктивном метаболизме [4].

Амарант и кукуруза являются растениями с ярко выраженными признаками C_4 -фотосинтеза. Эти сельскохозяйственные культуры обладают высокой продуктивностью, что во многом обусловлено организацией их ферментативного аппарата. Поэтому изучение различных характеристик энзимов, обеспечивающих мобилизацию липидов, представляет значительный научный интерес.

Целью работы являлось исследование субклеточной локализации изоцитратлиазы в растениях.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования служили проростки семян амаранта (*Amaranthus caudatus* L., сорт «Рыжик») и кукурузы (*Zea mays* L., сорт «Воронежский»), выращенные гидропонным способом при температуре 25°C.

Активность изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) определяли спектрофотометрически на СФ-2000 («Ломо», Россия), по изменению поглощения света при длине волны 324 нм, за счёт образования комплекса фенилгидразина с глиоксилатом. Среда спектрофотометрирования содержала 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂, 4 мМ дитиотрейтола, 2 мМ изоцитрата натрия, 4 мМ фенилгидразина солянокислого [5].

За единицу активности принимали количество фермента, превращающее 1 мкМ субстрата или образующее 1 мкМ продукта за 1 минуту при 25°C и оптимальном значении рН.

Субклеточную локализацию определили с помощью дифференциального и изоплотностного центрифугирования. Материал (5 г) гомогенизировали со средой следующего состава: 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 0,5 М сахаразы, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотрейтола [6].

Для проведения изоплотностного центрифугирования осадок (полученный как указывалось выше, но ресуспендированный в среде с сахаразой) наслаивали на вершину градиента плотности сахаразы со ступенями 1,3М, 1,5М, 1,8М, 2,3М, 2,5М; центрифугировали 100000g 90 минут. Далее фракции с органеллами осторожно отбирали, ресуспендировали и использовали для определения активности ферментов.

В ходе исследований для разделения белков применялся метод диск-электрофореза в 7,5% ПААГ при 4°C по модифицированному методу Девиса с последующим универсальным и специфическим окрашиванием геля. Для специфической идентификации изоцитратлиазы применяли модифицированный реагент Шиффа следующего состава: фуксин, 1 н HCl, конц HCl, метасульфат Na [7].

Опыты проводили в трёх повторностях. Аналитическое определение для каждой пробы осуществляли в двух повторностях. В таблице и на рисунках приведены данные типичных опытов, где каждое значение есть среднее арифметическое. При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях гетеротрофного питания в масличных растениях важную роль играет глюко-неогенез, обеспечивающий мобилизацию запасных липидов. Анализ полученных данных по динамике изоцитратлиазной активности показывает корреляцию ее величины от этапа онтогенеза амаранта и кукурузы (рис. 1).

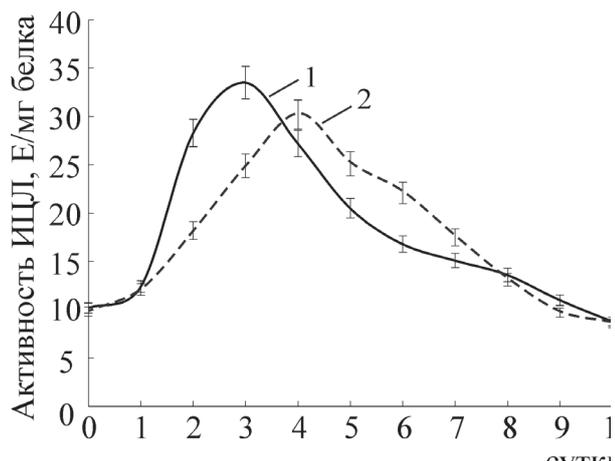


Рис.1. Динамика активности изоцитратлиазы в щитках кукурузы и проростках семян амаранта (n=3, P<0,05). Обозначения: 1. - проростки семян амаранта; 2 - щитки кукурузы.

Субклеточную локализацию изоцитратлиазы определяли методом дифференциального и изоплотного центрифугирования, в ходе которых выделили пероксисомальную и цитоплазматическую фракции. Полученные данные свидетельствуют, что активность ИЦЛ распределилась по фракциям неравномерно. Наибольшая активность фермента сосредоточена в осадке (87,38 %), содержащем фракцию митохондрий и пероксисом (рис.2).

В результате проведенных расчетов было выявлено, что изоцитратлиаза из проростков амаранта имеет преимущественно глиоксисомальную локализацию, что следует из равенства отношений: $1,93 / 6,11 = 2,42 / 7,87$ (табл.1). Анализ результатов исследования субклеточной локализации изоцитратлиазы в щитках кукурузы позволил установить аналогичное внутриклеточное распределение фермента.

Полученные результаты позволяют утверждать, что исследуемый фермент име-

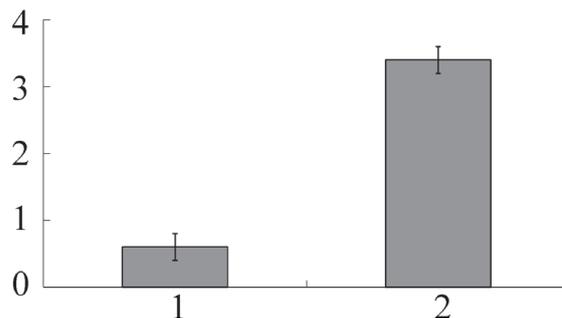


Рис.2. Распределение активности ИЦЛ между фракциями, полученными в результате дифференциального центрифугирования: 1 – цитоплазматическая фракция; 2 – глиоксисомальная фракция.

ет преимущественно органельную локализацию. Ранее аналогичные результаты были получены для изоцитратлиазы из сои [8].

С помощью электрофореза в 7,5% ПААГ с последующим специфическим окрашиванием на активность изоцитратлиазы был выявлен её изоферментный состав в проростках амаранта и кукурузы. В проростках амаранта и щитках кукурузы было обнаружено по две изоформы фермента с различной электрофоретической подвижностью (Rf 0,27 и 0,31 – для амаранта, Rf 0,25 и 0,29 – для кукурузы) (рис.3).

Таким образом, проведенные исследования показали, что в проростках растений (амарант и кукуруза) выявляются 2 изоформы изоцитратлиазы. Установлено, что их локализация связана с глиоксисомальной фракцией и цитоплазматической. В цитоплазме локализуется фермент, который называют внеглиоксисомальной формой изоцитратлиазы. Изоформы изоцитратлиазы участвуют в различных физиологических процессах – в осуществлении глиоксилатного цикла и в метаболизме двухуглеродных кислот.

Таблица 1.

Субклеточная локализация ИЦЛ в амаранте после разделения грубой фракции микротелец методом изоплотного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (n=3, P<0,05)

Фермент	Цитоплазма				Глиоксисомы			
	V, мл	Белок, мг	Е	Уд. акт., Е/мг белка	V, мл	Белок, мг	Е	Уд. акт., Е/мг белка
ИЦЛ	2	9,44	2,42	0,26	2	4,95	7,87	1,59
Каталаза	2	9,44	1,93	0,21	2	4,95	6,11	1,23

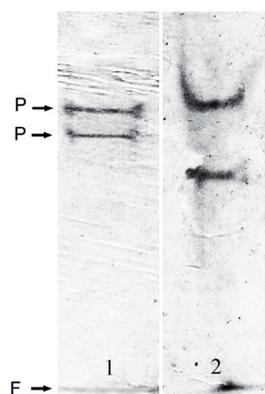


Рис.3. Электрофореграммы ИЦЛ. 1 и 2 - специфическое проявление ИЦЛ из щитков кукурузы и проростков семян амаранта соответственно. P – белковая полоса; F – фронт красителя

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А.Т. Глиоксилатный цикл: Универсальный механизм адаптации? / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, М.Ю.Шевченко. — М.: Изд-во Академкнига, 2007. — 228 с.
2. Игамбердиев, А.У. Микротельца в метаболизме растений. / А.У. Игамбердиев. — Изд-во ВГУ. Воронеж, 1990. — 148 с.
3. Glycolate oxidase isoforms are distributed between the mesophyll and bundle sheath tissues of maize leaf / V.N. Popov [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. — 2003. — V. 160. — №. 8. — P. 851-857.
4. Епринцев А.Т. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1999. — 191 с.
5. Епринцев А.Т. Получение и свойства изоформ изоцитратлиазы из семян Glycine max L. / А.Т. Епринцев [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2010. — V. 1. — P. 103-108.
6. Popov V. N. Induction of glyoxylate cycle enzymes in rat liver upon food starvation / V. N. Popov, A. U. Igamberdiev, C.Schnarrenberger // *FEBS Lett.* — 1996. — Vol. 390. — P. 258-260.
7. Епринцев А.Т. Физико-химические и кинетические характеристики изоформ изоцитратлиазы из кукурузы / А.Т. Епринцев, Е.В. Маслова // *Биохимия*. — 2009. — V. 74. — P. 528-532.
8. Чан Тхи Хоанг Куен. Субклеточная локализация изоцитратлиазы в сое разных сортов / Чан Тхи Хоанг Куен, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев // Сб. Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. — Воронеж. ООО «Центрально-Черноземное книжное издательство». — 2012. — Вып.14. — С.230-234.

Епринцев Александр Трофимович — профессор, доктор биологических наук, зав. кафедрой биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет

Сальников Алексей Владимирович — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Ассиль Мундер Хаба — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет

Махмуд Али С. — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет

Зайчикова Марина Викторовна — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет

Eprintsev Alexander T. — Full Professor, Doctor of Biology, Head Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University

Salnikov Alexey V. — graduate student of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University; e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Assil Munder Haba — graduate student of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University

Mahmoud Ali S. — graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University

Zaichikova Marina V. — graduate student of biochemistry and cell physiology Voronezh State University