

Г. М. НОВИКОВА, Т. Я. РАКИТИНА, А. А. ШАХОВ

СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 9 IV 1974)

Для разработки проблемы нефотосинтетической трансформации световой энергии в растениях важное значение имеет фотостимуляция активности ферментов, рассмотренная в обзоре (1). В связи с этим представляет интерес светочувствительность некоторых пероксисомальных ферментов, установленная при действии света на целые листья (2, 3) и изолированные пероксисомы (4, 5). В последних работах исследовалось действие света на локализованную в пероксисомах гликолатоксидазу, участвующую в окислении гликолата, который образуется при фотосинтезе в хлоропластах.

Наличие у пероксисом малатдегидрогеназной активности (6, 7) позволяет представить один из путей метаболической связи их с хлоропластами и митохондриями через обмен малата и переокисление НАД-Н. НАД-зависимая малатдегидрогеназа (МДГ) существует в растениях в виде нескольких изоэнзимов, локализованных в различных клеточных единицах — пероксисомах, митохондриях и цитоплазме (8, 9). Хлоропласты не содержат НАД-зависимой МДГ (6). Учитывая светочувствительность пероксисомальных ферментов, мы поставили задачу выяснить реакцию растительной МДГ на свет, в случае положительной реакции — определить разницу в светочувствительности МДГ, связанной с пероксисомами и митохондриями.

Объектом исследования служили зеленые листья 11—14-дневных проростков пшеницы Альбидум 43, выращенных в факторостатных условиях при t 25° и фотопериоде 16 час. Растительный материал измельчали и затем растирали в среде выделения (10). Гомогенат отжимали через 2 слоя полотна и центрифугировали при 270 g 10 мин. Надосадочную жидкость центрифугировали при 2000 g 10 мин. и затем при 10 000 g 20 мин. Осадок, полученный при последнем центрифугировании, ресуспендировали в 35% сахарозо-фикольном растворе и по 1 мл суспензии наносили на вершину ступенчатого сахарозо-фикольного градиента, состоящего из 6 слоев следующих концентраций сахарозы (в %): 60; 52; 50; 47; 45; 35. Концентрация фикола во всех растворах была 2,5% от содержания сахарозы. Градиент центрифугировали 3,5 часа при 100 000 g. После ультрацентрифугирования полученные фракции собирали в отдельные пробирки. Все процедуры проводили на холоду, при температуре 2—4°. В каждой фракции градиента определяли белок по Лоури (11). В качестве ферментов — маркеров пероксисом и митохондрий определяли активность каталазы (12) и цитохромоксидазы (13).

При определении активности МДГ в реакции восстановления оксалоацетата реакционная смесь содержала 1,5 мл 0,1 M Na—P-буфера pH 7,4; 0,1 мл 0,05% тритона X-100; 0,1 мл $2 \cdot 10^{-2}$ M оксалоацетата, нейтрализованного до pH 7,4; 0,1 мл $3,5 \cdot 10^{-3}$ M НАД-Н, приготовленного на 1% растворе NaHCO_3 . Для реакции окисления малата в состав реакционной смеси включали малат (0,1 мл, 0,35 M) и НАД (0,1 мл, $1 \cdot 10^{-2}$ M). Конечный объем смеси в прямой и обратной реакции 2 мл. В том и другом случае реакцию инициировали добавлением 0,1 мл суспензии соответствующей фракции градиента.

Для определения светочувствительности МДГ часть пробирок с реакционной смесью и суспензией освещали лампами ЛБ-30 (мощность свето-

всего потока $18\,000$ эрг/см²·сек), другую часть оставляли в темноте. Время экспозиции для реакции восстановления оксалоацетата 5 мин., для окисления малата 2 мин. При проведении реакции температуру поддерживали на оптимальном для данной реакции уровне 25° . Реакцию останавливали 2 способами: быстрым охлаждением смеси до 0° или внесением в нее *n*-ХМБ — ингибитора МДГ. Активность фермента измеряли спектрофотометрически по изменению содержания в реакционной смеси НАД-Н при 340 нм и выражали в единицах активности МДГ на 1 мг белка с поправкой на неэнзиматическое окисление НАД-Н. Результаты были обработаны статистически методом попарных сравнений. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (¹⁴).

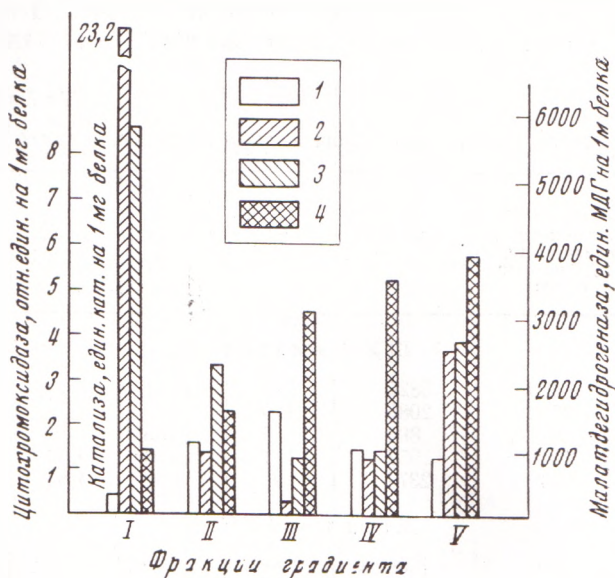


Рис. 1. Специфическая активность ферментов по фракциям градиента. 1 — цитохромоксидаза, 2 — каталаза, 3 — малатдегидрогеназа (ЩУК → малат), 4 — малатдегидрогеназа (малат → ЩУК)

В результате ультрацентрифугирования суспензии, содержащей смесь клеточных органелл, на ступенчатом сахарозно-фикольном градиенте получили 5 фракций. На рис. 1 показана ферментная активность полученных фракций. На основании распределения активности каталазы на градиенте установили локализацию пероксисом на границе раздела слоев с концентрациями сахарозы 60 и 52%. О высокой степени чистоты пероксисомной фракции свидетельствовала ее низкая цитохром-с-оксидазная активность и электронно-микроскопический контроль.

Значительная цитохром-с-оксидазная активность была обнаружена во 2-й, 3-й и 4-й фракциях градиента (границы раздела слоев с концентрациями сахарозы 52 и 50%, 50 и 47%, 47 и 45% соответственно). Основываясь на этом, можно было предположить наличие митохондрий во всех этих фракциях. Ферментная активность 5-й (надсадочной) фракции (слой с концентрацией сахарозы 35%) определяется ферментами, потерявшими связь с органеллами в процессе их разделения, и характеризуется высоким уровнем активности изучаемых нами ферментов.

Все фракции градиента обнаружили малатдегидрогеназную активность как в прямой, так и в обратной реакции. Фракция 1 имела самую низкую активность МДГ в реакции окисления малата (прямая) и самую высокую в реакции восстановления оксалоацетата (обратная). В противоположность

этому во фракциях 3 и 4 высокий уровень малатдегидрогеназной активности в прямой реакции сочетается с низким уровнем в обратной. Полученная картина распределения на ступенчатом градиенте активности МДГ в прямой и обратной реакции (рис. 1) позволяет считать, что в нашем случае работают по крайней мере два изоэнзима этого фермента.

Изоэнзимы МДГ, локализованные в различных клеточных единицах, отличаются функционально^(6, 7, 8). Митохондриальная МДГ эффективно катализирует окисление *L*-малата, в то время как цитоплазматическая и пероксисомальная формы — обратную реакцию. Следовательно, малатдегидрогеназная активность фракций градиента связана с присутствующими в них клеточными органеллами.

Инкубация на свету реакционной смеси, содержащей суспензию из соответствующей фракции ступенчатого градиента, вызывала изменение активности МДГ (табл. 1). Как видно, действие света было стимулирующим

Таблица 1

Активность малатдегидрогеназы на свету и в темноте

№ фракции градиента	\bar{X}_C — активность на свету, ед.н. МДГ на 1 мг белка	\bar{X}_T — активность в темноте, ед.н. МДГ на 1 мг белка	$\bar{\Delta}$	S_{Δ}^*	$t = \frac{ \bar{\Delta} }{S_{\Delta}}$	$P_{\Delta}, \%$
ЩУК → малат						
1	6440	5824	616	±181	3,38	≈99
2	2202	2088	114	±45	2,53	≈95
3	924	899	25	±185	0,14	≤95
4	1068	957	111	±56	1,98	≤95
5	2469	2378	91	±50	1,82	<95
Малат → ЩУК						
1	1000	1004	-4	±100	0,04	≤95
2	1371	1637	-266	±151	1,76	≤95
3	2796	2935	-139	±67	2,07	<95
4	3366	3563	-197	±87	2,26	<95
5	3885	3912	-27	±95	0,28	≤95

* S_{Δ} — вычислена методом попарных сравнений.

в реакции превращения оксалоацетата в малат (ЩУК — малат). Статистически достоверная фотостимуляция активности МДГ показана в 1-м слое (уровень достоверности ≈99%). С более низким уровнем достоверной вероятности (≈95%) возрастала под действием света малатдегидрогеназная активность 2-го слоя. В остальных слоях^(2, 3) мы наблюдали статистически незначимое, с уровнем достоверности значительно меньше 95%, возрастание активности фермента. В реакции превращения малата (малат — ЩУК) активность МДГ при действии света падает. Ингибирующее действие света выражено только в виде тенденции, так как различия в активности фермента в темноте (\bar{X}_T) и на свету (\bar{X}_C) статистически недостоверны ($P_{\Delta} < 95\%$).

Таким образом, мы обнаружили разницу в действии света на изоэнзимы малатдегидрогеназы, предположительно связанные с пероксисомами (ЩУК — малат) и митохондриями (малат — ЩУК). Возрастание активности МДГ в реакции ЩУК — малат не только во фракции 1, где, как отмечалось выше, сосредоточены пероксисомы, но и во фракции 2 объясняется, вероятно, присутствием в ней смеси митохондрий и пероксисом, ибо плотность слоя является промежуточной между зонами локализации этих органелл. Активность ферментов — маркеров указанных органелл во фрак-

ции 2 достаточно высока. Кроме того, активность МДГ прямой и обратной реакции примерно одинакова.

Возможно, что высокая чувствительность к свету МДГ, связанной с пероксисомами, является характерным свойством именно этого изоэнзима, что и отличает его от малатдегидрогеназы цитоплазмы и митохондрий. Это тем более вероятно, так как реакция ферментов микротелец на свет характеризует деятельность пероксисом⁽¹⁵⁾. В то же время не обнаружено достоверного увеличения на свету активности растворимой МДГ, находящейся во фракции 5 (табл. 1).

Сравнительные характеристики различных форм растительных МДГ приводятся в ряде работ^(6, 8, 9). Показано, что митохондриальная форма МДГ отличается от фермента пероксисом по оптимуму рН, электрофоретической и хроматографической подвижности, кинетическим свойствам, что послужило основанием для суждения о функциональных отличиях этих форм МДГ. Роль пероксисомальной МДГ может быть связана с транспортом водорода между микротельцами и другими клеточными единицами, в частности митохондриями. Эта система переокисления НАД-Н, связанная с кооперативным функционированием изоэнзимов МДГ, по-видимому, имеет весьма существенное значение для энергетике клетки, так как активность фермента, особенно формы, связанной с микротельцами, достаточно высока и энергия не растрачивается на конечное окисление⁽¹⁵⁾. Обнаруженная нами различная реакция пероксисомальной и митохондриальной форм малатдегидрогеназы на свет позволяет предполагать неоднозначность путей регулирования этих изоферментов и их участия в энергетике клетки.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 IV 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Zucker, Ann. Rev. Plant. Physiol., v. 23, 133 (1972). ² N. E. Tolbert, A. Oeser et al., J. Biol. Chem., v. 343, 5179 (1968). ³ B. Filner, A. O. Klein, Plant Physiol., v. 43, 1587 (1968). ⁴ А. А. Шахов, В. А. Зенченко и др., ДАН, т. 205, 495 (1972). ⁵ В. А. Зенченко, М. Б. Чурина, А. А. Шахов, Физиол. раст., т. 19, 752 (1972). ⁶ R. K. Yamazaki, N. E. Tolbert, Biochim. et biophys. acta, v. 178, 11 (1969). ⁷ V. Rocha, J. Ting, Plant. Physiol., v. 46, 754 (1970). ⁸ T. Asaki, M. Nishimura, J. Biochem., v. 73, 217 (1973). ⁹ W. Zschoche, J. Ting, Plant Physiol., v. 51, 1076 (1973). ¹⁰ Breidenbach, H. Beevers, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 27, 462 (1967). ¹¹ O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ¹² H. Luck, H. Bergmeyer, Methods in Enzymatic Analysis, 1965. ¹³ L. Smith, Methods of Biochemical Analysis, 1965. ¹⁴ Ю. А. Урманцев, Физиол. раст., т. 14, 342 (1967). ¹⁵ N. E. Tolbert, Ann. Rev. Plant Physiol., v. 22, 45 (1971).