Науковий вісник Ужгородського університету
Серія Біологія, Випуск 33, 2012: 25-28
© Чечуй О. Ф. , 2012

УДК 577.152: 582.736

РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ІЗОЦИТРАТЛІАЗИ В НАСІННІ *GLYCINE MAX L.* ПРИ ПРОРОСТАННІ ТА ВПЛИВ ІОНІВ КОБАЛЬТУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТУ

Чечуй О. Ф.

Регуляція активності ізоцитратліази в насінні Glycine max L. при проростанні та вплив іонів кобальту на активність ферменту. – О. Ф. Чечуй. *– Досліджено активність ізоцитратлізи в насінні Glycine max L. на першу, третю, п'яту та сьому добу проростання, а також вплив іонів кобальту на активність ферменту у зазначені терміни експерименту. Показано, що підвищення активності ізоцитратліази за дії іонів кобальту відбувається шляхом індукції ферменту. В роботі розглядаються можливі шляхи регуляції активності ізоцитратліази.*

Ключові слова*: Glycine max L., ізоцитратліаза, актиноміцин D, ліпіди, гліоксилатний цикл*
Адреса*: Харківський національній педагогічний університет імені Г.С. Сковороди, кафедра ботаніки, м. Харків, 61168, вул. Блюхера, 2, Україна;e-mail: chechui@mail.ru*

Regulation of activities of isocitratelyase in seeds of Glycine max L in germination, and influence the action of cobalt ions. – H. Chechui. *– Investigated the activity of isocitrate lyase in seeds of Glycine max L. on 24h, 72h, 120h, 168h in germination as well as the influence of cobalt ions on the activity of the enzyme in the specified time of the experiment. It is shown that the increase in the activity of isocitrate lyase for the actions of cobalt ions occurs by means of enzyme induction. The paper consider the possible ways of regulating the activity of isocitrate lyase.*

Key words*: Glycine max L., isocitrate lyase, actinomycin D, lipids, glyoxylate cycle*

Address*: G. S. Skovorody Kharkiv Nathional Pedagogical University, department botany, Kharkov, 61168, Bluchera str, 2, Ukraine; e-mail: chechui@mail.ru*

Вступ

Гліоксилатний цикл є скороченим циклом трикарбонових кислот і ланкою процесу глюконеогенезу, він т функціонує у олійних рослин на ранніх стадіях проростання насіння. Ізоцитратліаза (трео-Ds-ізоцитрат-гліоксилатліаза, КФ 4.1.3.1) є ключовим ферментом гліоксиалатного циклу, який каталізує реакцію альдольного розщеплення ізоцитрату на сукцинат та гліоксилат [1]. Для вивчення механізмів регуляції ферментів гліоксилатного циклу у даній роботі використана модельна система – насіння *Glycine max L.* в умовах проростання.

Внаслідок розширення сфери господарської діяльності й збільшення антропогенного тиску спостерігається значне забруднення довкілля речовинами техногенного походження. Серед найбільш вагомих забруднювачів довкілля є іони важких металів [2]. Есенціальні елементи, зокрема кобальт, в оптимальних концентраціях відіграють важливу роль як кофактори ферментативних реакцій, але у разі надлишкової їх кількості можуть завдавати шкоди рослинному організму [3].

Glycine max L. широко використовується як кормова, харчова та технічна культура. Біосинтез вуглеводів, необхідних для утворення біомаси олійних рослин, залежить від функціонування ферментів гліоксилатного циклу та глюконеогенезу [4]. Наявні наукові дані не дають повного уявлення щодо конкретних змін у функціонуванні ключових систем рослин за негативного впливу оточуючого середовища. Зокрема, лишається недостатньо вивченим вплив іонів металів на активність ферментів гліоксилатного циклу. Мета роботи – дослідити регуляцію активності ізоцитратліази в насінні *Glycine max L.* при проростанні та вплив іонів кобальту на фермент.

Матеріали та методи дослідження

Насіння при температурі 23/18ºС (день/ніч) у чашках Петрі у камерах фітотрону на фільтрувальному папері, змоченому водними розчинами Кобальту та Кадмію хлоридів. Завдяки наявності системи отворів у камерах підтримувався належний газообмін, коливання температур назовні та всередині камер складало 1

− 2 ºС. В експерименті використовували насіння *Glycine max L.*, яке було зовні не пошкоджене і однакове за розміром.

Перед тим, як помістити насіння у розчини, проводили зовнішнє знезарадження насіння шляхом занурення у розчин $NaHCO_3$ (ω=2,5) на 2 хвилини, після чого промивали 5 мМ розчином HCl впродовж 20-30 секунд, далі тричі промивали дистильованою водою. Насіння пророщували протягом п′яти діб. При аналізі використовували сім'ядолі *Glycine max L.* через одну, три та п′ять діб пророщування, а в експериментах з додаванням АкМ D – через одну, півтори та три доби. Гомогенати з сім'ядолей готували на 50 мМ трис – HCl-буфері рН 7,5, який містив 100 мМ MgCl2, 1 мМ ЕДТА та 5 мМ дітіотрейтолу (при дослідженні протезної активності використовували 20 мМ MgCl2, а дітіотрейтол виключали). Незруйновані клітини, їх уламки та ядра осаджували при 1300 g протягом 10 хв. Супернатант використовували для одержання фракцій мітохондрій (важких)-6000g, а також для одержання фракції мікротілець – 14000 g протягом 20 хв. Осад, який містив фракцію клітинних органоїдів (груба фракція мікротелець), руйнували шляхом занурення проб у рідкий нітроген та ресуспендували у 2 мл середовища виділення. Далі проводили повторне центрифугування при 14000 g протягом 15 хв. В супернатант переходили ферменти, зв'язані з мембранами гліоксисом. З метою досягнення необхідного розміру мікротілець проводили фільтрацію для крізь мембранні фільтри («Millipore», США) з діаметром пор 1,2, 0,8, 0,65 та 0,45 0,45 мкм [4]. Активність ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1.) визначали за методом Діксона та Корнберга [5] на спектрофотометрі при довжині хвилі 324 нм. Принцип методу ґрунтується на визначенні фенілгідразонгліоксилату, що утворився з ізоцитрату за дії ізоцитратліази. Середовище інкубації: 50 мМ Калій-фосфатний буфер, рН 7,4, при 25 ºС , до складу якого входили 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЕДТА, 5 мМ дітіотрейтол (ДТТ), 8 мМ D, L-ізоцитрату, 4 мМ фенілгідразин гідрохлориду та ферментна витяжка. Контрольна проба не містила ізоцитрату, а у холостій пробі був відсутній гомогенат. Інкубацію проводили 5 хвилин при температурі 25 ºС. Екстинкцію вимірювали через кожну хвилину. За одиницю ферментної активності приймали кількість ферменту, що утворює 1 нмоль гліоксилату за 1 хв. при 25 ºС. Коефіцієнт молярної екстинкції фенілгідразонгліоксилату – $1{,}7\times 10^{4}$ M^{-1} $см^{-1}$ [5]. Активність ферменту виражали у наномолях (нМоль) фенілгідразингліоксилату за 1 хв на 1 мг білка. Білок визначали за методом Лоурі.

Результати та обговорення

Аналіз одержаних результатів показав, що активність ізоцитратліази (ІЦЛ) збільшується в контролі в процесі дослідження (рис. 1). Так, на п'яту добу активність ІЦЛ підвищується в середньому в 1,62 рази відносно активності на першу добу. Підвищення активності ІЦЛ в контрольних дослідах узгоджується з даними інших авторів [7].

Таблиця 1. Активність ізоцитратліази в насінні Glycine max L. при проростанні за дії іонів кобальту, нмоль фенілгідразонгліоксилату /хв на 1 мг білка; M±m, n=5

Table 1. Activities of isocitrate lyase in seeds of Glycine max L. in germination under the action of cobalt ions, nM phenilhydrazoneglyoxilate /min in mg protein, M±m, n=5

Фактори впливу	Доба пророщування			
	1-а	3-я	5-а	7-а
Контроль	19,6±1,5	22,4±3,0	31,8±1,9 $^{\#}$	27,1±1,9$^{\#}$
Кобальт	21,2±1,4	37,2±1,7 $^{\#}$*	32,4±2,1$^{\#}$ *	31,6±1,8$^{\#}$*

Примітки. Тут і в табл. 2: * - $p < 0{,}05$ – відносно контролю; $^{\#}$ - $p < 0{,}05$ – відносно першої доби. В табл. 2 $^{\#\#}$ - $p < 0{,}05$ – відносно кобальту

Підвищення ІЦЛ активності в процесі проростання може віддзеркалювати утворення продуктів реакції даного ферменту − гліоксилату та малату, які є субстратами для глюконеогенезу, та використання вільних жирних кислот в реакціях глюконеогенезу, оскільки гліоксилатний цикл починається з β-окиснення жирних кислот, що відбувається в гліоксисомах олійних культур [1].

На сьому добу пророщування насіння *Glycine max L.* активність ІЦЛ зменшується на 38% по відношенню до показників на першу добу. За дії іонів кобальту активність ферменту знижується на 49,2% відносно активності ІЦЛ на першу добу проростання *Glycine max L.* та на 19,3% відносно контролю у цей термін експерименту. Активність ІЦЛ може гальмуватися інтермедіатами гліоксилатного циклу та циклу трикарбонових кислот, в основному, за типом конкурентного гальмування [8]. Інгібіторами ІЦЛ може бути сукцинат сукцинат, α-кетоглутарат, фумарат, оксалоацетат, малат, тобто інтермедіати гліоксилатного циклу. Інгібуючий ефект цих метаболітів важливий, оскільки гліоксилатний цикл має анаплеротичну природу і ІЦЛ є ключовим ферментом даного шляху. Зниження активності ІЦЛ на останньому терміні експерименту, тобто на сьому добу, може також частково бути наслідком мобілізації запасних ліпідів олійних рослин на ранніх термінах проростання насіння *Glycine max L.* [9].

Додавання іонів кобальту в поживне середовище не призводило до змін в активності ферменту на першу добу проростання насіння, а на третю добу спостерігається підвищення активності ІЦЛ в середньому в 1,66 рази відносно контролю і в 1,74 рази відносно першої доби. На п'яту добу експерименту активність ІЦЛ за дії іонів кобальту у *Glycine max L.* знаходиться на рівні третьої доби.

Рівень активності ключових ферментів регулюється різними метаболітами, в тому числі, активними формами оксисену АФО [10, 11]. Більш того, необхідно звернути увагу на той факт, що перша реакція β-окиснення жирних кислот в гліоксисомах, на відміну від такої у мітохондріях, каталізується ферментом ацил-КоА-оксидазою з утворенням гідрогену пероксиду [12]. Тому однією з причин підвищення активності ключового ферменту гліоксилатного циклу в олійних рослинах під впливом іонів Co^{3+} може бути збільшення продуктів ПОЛ. У нашій попередній роботі показано збільшення вмісту ТБК-активних продуктів як у контрольних зразках, так і за дії іонів іонів Co^{3+} [13].

Крім того, одним із механізмів регуляції активності ключових ферментів окремих метаболічних шляхів може бути індукція відповідних ферментів. Тому для з`ясування можливих шляхів підвищення активності ІЦЛ досліджено вплив інгібітору транскрипції мРНК актиноміцину D (АкМ D) на активність ІЦЛ за дії іонів Co^{2+}.

Таблиця 2. Вплив актиноміцину D на активність ізоцитратліази в насінні *Glycine max L.* при проростанні за дії іонів кобальту, нмоль фенілгідразонгліоксилату /хв на 1 мг білка; M±m, n=6

Table 2. The influence of AkM D on activity of isocitrate lyase in seeds of Glycine max L. in germination under the action of cobalt ions, nM phenilhydrazoneglyoxilate /min in mg protein, M±m, n=5

Доба пророщування	Контроль	$CoCl_2$	$CoCl_2$ + АкMD	АкМ D
1доба	19,4 ±1,2	21,8 ±1,3	22,0±1,3	19,1±1,4
1,5 доби	19,7±1,2	24,9±1,1	13,3±0,9*	11,9 ±1,0*
3 доба	21,8±1,3	36,6±1,5*#	28,1±1,6* ##	20,4±1,3

В таблиці 2 показано, що , що дія АкМ D на активність ключового ферменту гліоксилатного циклу ІЦЛ виявляється в гальмуванні активності ферменту в середньому в 1,67 разів у час пророщування насіння *Glycine max L.*, що дорівнює півтори доби, а на першу та третю добу не впливає.

Іони Co^{2+} не впливали на активність ІЦЛ на півтори доби пророщування, а при додаванні в середовище інкубації одночасно йонів Co^{2+} та АкМ D спостерігається гальмування активності ІЦЛ в середньому в 1,48 разів по відношенню до контролю. В даному випадку зрозуміло, що гальмування активності ІЦЛ за сумісної дії йонів Co^{2+} та антибіотика синтезу мРНК на півтори доби пророщування насіння відбувається за рахунок впливу АкМ D на синтез ферменту.

В роботі [14] показано, що збільшення рівня активності гліоксисомальних ферментів при проростанні насіння пов'язано з попереднім збільшенням рівня мРНК, що несе інформацію для цих ферментів, і це збільшення передує підвищенню активності гліоксисомальних ферментів з різницею в одну добу. Тому отримані нами дані щодо гальмування антибіотиком (актиноміцином D) активності ІЦЛ у термін, в який ще не було достовірного підвищення активності як в контролі, так і під впливом іонів кобальту відносно першої доби, що вкладаться в загальну картину синтезу ферментів гліоксисом [14]. Але вже на третю добу пророщування насіння АкМ D не впливав на активність ІЦЛ. Швидше за все, це пояснюється короткочасною дією даного антибіотика на активність ІЦЛ. Іони

Co^{2+} підвищують активність ІЦЛ на 3-тю добу проростання в середньому в 1,52 рази відносно контрольних показників та в 1,68 раз по відношенню до показників активності ІЦЛ на першу добу пророщування. На третю добу проростання насіння при додаванні АкМ D в середовище пророщування насіння одночасно з іонами Co^{2+} спостерігається зменшення активності ІЦЛ в середньому на 34 % рази відносно показників активності ІЦЛ при додаванні іонів Co^{2+}. Оскільки АкМ D не є абсолютним агентом, що діє тільки на рівни транскрипції, його дія може у деякій мірі проявлятися і на рівні трансляції. Таким чином, в наших експериментах показано, що іони Co^{2+} підвищують активність ІЦЛ на рівні експресії гену ІЦЛ.

Висновки

Таким чином, у результаті проведеної роботи показано існування декількох шляхів регуляції активності ключового ферменту гліоксилатного циклу – ізоцитратліази, що виявляється у зміні рівня активності упродовж першого тижню пророщування *Glycine max L.* Іони кобальту збільшують активність ізоцитратліази на третю добу проростання зі зберіганням рівню активності ферменту на тому ж рівні на п'яту добу, а на сьому – спостерігається зниження активності ферменту, що обумовлено дією специфічного білкового активатору, який викликає деградацію ферменту, що вивчається у даній роботі. Іони кобальту підвищують активність ізоцитратліази, що є наслідком їх впливу на рівні експресії ферменту.

1. Красильнікова Л. О. та ін. Біохімія рослин: навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. – Х.: Вид.група Основа, 2007. – 191 с.
2. Трахтенберг И. М. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты / И. М. Трахтенберг, В. С. Колесников, В. П. Луковенко// – Москва: Наука и техника, 1994. – С. 146 – 178.
3. Гуральчук Ж. З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії / Ж. З. Гуральчук. – К.: Логос, 2006. – С. 96 – 107.
4. Грядунова Г.П., Козлова Л.М., Литвинова Т.П. / Под ред. Тенцовой А.И. Руководство к практическим занятиям по заводской технологии лекарственных форм.- М.: Медицина, 1986. – 272 с.
5. Dixon G. Assay methods of key enzymes of glyoxylate cycle / G. H. Dixon, H. L. Kornberg // J. Biol. Chem. – 1959. – № 1. – P. 3–6.
6. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т. / Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 368 с.
7. Shnarrenberger C. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants / C. Shnarrenberger, W. Martin // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269. – P. 868 – 883
8. Медведев С. С. Физиология растений: Учебник / / СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. – С. 112 – 163.
9. Бездудная (Чечуй) Е. Ф. Динамика липидов в семенах сои при прорастании //Вісник Харків. національ. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Сер. Біологія – 2005. 1-2, № 709. – С. 22-27.
10. Тарчевский И.А. Стресс и катаболизм у растений: 52-е Тимирязевское чтение.- М.: Наука, 1993. – 80 с.
11. Адаптивні реакції рослин озимої пшениці різних екотипів за дії пероксиду водню / Л. М. Бацманова, Н.С. Грудіна, В. О. Сторожекно, М. М. Мусієнко // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. –№2. – С. 163 –168.
12. Hayashi H. T. Acyl-Coa-oxidase // J. Biol. Chem. – 1989, № 18. – P. 12715 – 12721.
13. Чечуй О.Ф. Вміст фенольних сполук в насінні *Glycine max L.* при проростанні за умов оксидативного стресу, спричиненого впливом іонів кобальту та кадмію // Вісник Ужгород. націон. ун-ту. Сер. Біологія. – 2011, вип. 30. – С. 197 – 200.
14. Hanson K.R. Development and decline of the glyoxylate cycle enzymes in watermelon seedlinds (*Citrullus vulgaris Schrad*.). Effects of D-actinomycin / K. R. Hanson // Z. Pflanzenphysiol. –1993. – № 3. – S. 405 – 414.

Отримано: 11 червня 2012 р.
Прийнято до друку: 21 листопада 2012 р.