

DOI: 10.31116/tsitol.2018.06-08

АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ВАКУОЛЯХ КЛЕТОК КОРНЕПЛОДОВ СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ

© О. Д. Нимаева,^{1,*} Е. В. Прадедова,¹ А. Б. Карпова,² Р. К. Салеев¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033, и

² Биолого-почвенный факультет Иркутского государственного университета, Иркутск, 664003;

* электронный адрес: sandra_ok@mail.ru

Основным местом локализации алкогольдегидрогеназы (АДГ, КФ 1.1.1.1) в клетках растений считается цитозоль. Однако довольно высокая активность этого фермента в реакции восстановления ацетальдегида обнаружена нами во фракциях вакуолей, изолированных из клеток корнеплодов столовой свеклы. Несмотря на то что в вакуолях активность АДГ (рассчитана на 1 мг белка) в реакции восстановления альдегида была довольно высокой (в среднем 160 нМ НАДН/мг), та же активность АДГ экстрактов ткани ее заметно превосходила (в среднем 300 нМ НАДН/мг). На специфичность ферментативной реакции указывали результаты ингибиторного анализа. Полное подавление активности АДГ происходило в присутствии 1.10-фенантролина, ингибирующее действие оказывали также парахлормеркурибензоат и 2-меркаптоэтанол. Оптимум pH для фермента в реакции восстановления альдегида составлял 8.0, а в реакциях окисления этанола — 9.0. Результаты исследования ферментативной активности в ПААГ после электрофореза продемонстрировали две изоформы АДГ в вакуолярных фракциях и три изоформы в тканевом экстракте. Лимитирующим фактором для активности АДГ может быть отсутствие косубстрата НАД(Н). Для изолированных вакуолей концентрация НАД(Н) оказалась относительно высокой (3.01 нМ НАД(Н) на 1 мг белка) по сравнению с тканевым экстрактом (2.75 нМ на 1 мг белка). Полученные результаты свидетельствуют о возможном функционировании АДГ в вакуолях клеток растений главным образом в качестве фермента, восстанавливающего альдегида.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, вакуоль, детоксикация.

Принятые сокращения: АДГ — алкогольдегидрогеназа, АФК — активные формы кислорода, НАД-МДГ и НАДФ-МДГ — соответственно НАД- и НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа, пХМБ — парахлормеркурибензоат.

Противостоять негативному воздействию неблагоприятных факторов растительным клеткам помогает центральная вакуоль (Keunen et al., 2013). Одна из важных функций этого компартмента — детоксикация эндо- и экзогенных цитотоксичных соединений. Внутри вакуоли происходит детоксикация ксенобиотиков, активных форм кислорода (АФК), альдегидов и др. (Coleman et al., 1997; Dixon et al., 1998). Несмотря на факты, подтверждающие аккумуляцию центральной вакуолю цитотоксичных соединений, механизмы их внутривакуолярной химической трансформации изучены недостаточно, по-прежнему мало информации о ферментах, вовлеченных в этот процесс (Coleman et al., 1997).

Вакуоль аккумулирует различные соединения, в том числе спирты, альдегиды и кетоны. Последние обладают высокой окислительной активностью и представляют определенную угрозу для клетки. В связи с этим их относят к эндогенным ядам (Dixon et al., 1998; Рощина, Рощина, 2012). Чрезмерное накопление альдегидов и кетонов приводит к развитию карбонильного стресса. Для регулирования их концентрации в различных компартментах клетки сосредоточены специализированные фер-

менты (Космачевская и др., 2015). Не исключено, что в депонирующем эти соединения вакуолярном компартменте присутствуют ферментативные системы, способные взаимодействовать с ними (Dixon et al., 1998). Ключевым ферментом, взаимодействующим с алканалями и спиртами, считается алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1, АДГ) (Tong, Lin, 1988). АДГ не только поддерживает равновесие между эндогенными спиртами и альдегидами, промежуточными продуктами метаболических процессов, но и регулирует соотношение окисленной и восстановленной форм НАД(Н) (Ашмарин, 2003). АДГ представляется наиболее подходящим кандидатом на роль ферментативной системы, способной восстанавливать альдегиды и таким образом регулировать их концентрацию в вакуолях. Несмотря на то что АДГ долгое время считалась ферментом цитозольной локализации, мы предприняли попытку определить ее активность в изолированных вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.).

Задача настоящей работы заключалась в выявлении альдегидредуктазной активности во фракциях изолированных вакуолей. Поскольку эта активность может быть

сопряжена с активностью АДГ, предстояло исследовать основные биохимические характеристики фермента, локализованного в вакуолях.

Материал и методика

Объектом исследования служили корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) сорта Бордо. Для экспериментов брали корнеплоды в период физиологического покоя. Корнеплоды хранили при 4 °С.

Выделение вакуолей из ткани корнеплодов проводили с помощью модифицированного макрообъемного метода (Салаяев и др., 1981). Фракцию изолированных вакуолей дополнительно очищали от примесей (пластид, ядер и клеточных стенок) в ступенчатом градиенте плотности (1.050, 1.080, 1.145 и 1.180 г/см³), составленном из матричных растворов 1 М КСl и 1.8 М сахарозы, содержащих 20 мМ Трис-НСl, рН 7.4 (Салаяев и др., 1981). Чистоту фракций контролировали под световым микроскопом NU-2E (Carl Zeiss, Германия) и с помощью биохимических методов (Прадедова и др., 2009).

Вакуолярные экстракты получали, разрушая изолированные вакуоли в гипотоническом растворе (0.1 М Na₂HPO₄/KH₂PO₄, рН 7.4). Лизат центрифугировали при 13 500 g 10 мин. Отбирали аликвоту для определения белка и в оставшуюся часть вносили 0.01 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) для стабилизации фермента (Биссвангер, 2010).

Экстракты из ткани корнеплода получали, используя тот же раствор. Соотношение ткани (масса, г) и раствора (объем, мл) составляло 1 : 3. Полученный гомогенат фильтровали и центрифугировали при 13 500 g 10 мин. Отбирали аликвоту для определения белка и в оставшуюся часть вносили 0.01 % БСА для стабилизации фермента (Биссвангер, 2010).

Спектрофотометрический метод определения активности АДГ. Активность в прямой реакции (реакции окисления) определяли по скорости окисления этанола и образования НАДН. Измерения проводили при длине волны 340 нм. Реакционная среда содержала 0.1 М Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (рН 9.0), 0.26 мМ НАД и 3 % этанола (Биссвангер, 2010). Активность АДГ в реакции восстановления ацетальдегида определяли в реакционной среде, содержащей 0.1 М Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (рН 8.0), 0.26 мМ НАДН и 3 мМ ацетальдегида.

Активность фермента рассчитывали с помощью коэффициента экстинкции ($\epsilon_{340} = 6.3 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и выражали в нмоль НАД(Н) на 1 мг белка за 1 мин. Белок определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

Определение оптимального значения рН для фермента проводили в тех же условиях и в том же реакционном растворе, в котором изменяли рН, в следующем порядке: 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 и 10.0.

Ингибиторный анализ АДГ. Для подавления активности фермента в реакционный раствор вносили следующие соединения: 10 мМ фенантролина (1.10-фенантролин, о-фенантролин), 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ парахлормеркурибензоата (пХМБ), 10 мМ тиомочевина и 1 мМ цианида калия.

Электрофорез белков в неденатурирующих условиях (нативный электрофорез) проводили в блоках градиентного полиакриламидного геля (ПААГ), взяв за основу описанный метод (Fiala et al., 2011). Градиентный ПААГ готовили на основе двух рас-

творов: 1) 3.5 % акриламида, 0.11 % бис-акриламида, 0.25 М аминокaproновой кислоты, 25 мМ бис-Триса, 0.046 % персульфата аммония и 0.046 % N,N,N',N'-тетраэтилметилendiамина (ТЕМЕД); 2) 13 % акриламида, 0.8 % бис-акриламида, 0.25 М аминокaproновой кислоты, 25 мМ бис-Триса, 0.038 % персульфата аммония и 0.033 % ТЕМЕД. Катодным буфером служил трицин-бис-Трисовый буфер (рН 7.0), содержащий 50 мМ трицина и 15 мМ бис-Триса. В состав анодного буфера входил 50 мМ бис-Трис, рН 7.0. По окончании электрофореза гели переносили в раствор для зимографического определения активности АДГ.

Определение активности АДГ в ПААГ. Гель помещали в свежеприготовленный раствор, содержащий 0.1 М Трис-НСl (рН 8.0), 0.1 мМ нитросинего тетразолия, 0.05 мМ феназинметасульфата, 0.01 мМ НАД и 0.5 % этанола (метанола, маннита и глутамата) (Левитес, 1986). Полученные электрофореграммы фотографировали с помощью системы Digi Doc-it Imaging System (Bio-Rad, США), после чего сканировали на сканере (Epson Perfection 2480 Photo).

Активность НАД- и НАДФ-малатдегидрогеназ (НАД-МДГ и НАДФ-МДГ соответственно), которые в настоящем исследовании рассматривали как маркерные ферменты цитозоля и пластид, исследовали с помощью традиционных подходов (Левитес, 1986). НАД(Н) определяли спектрофотометрически. Использовали комплекс реактивов NAD/NADH Quantification Kit (Sigma, США). Процедуру проводили согласно прилагаемому протоколу.

Исследования выполнены в 3—5 аналитических повторностях в 5—7 экспериментах. При статистической обработке материала использовали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение (Лакин, 1990).

Использованные реактивы: ацетальдегид, пХМБ, сахароза, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgCl₂, КСl, КОН, НСl, Н₃PO₄, NaOH, KCN, C₂H₅OH и CH₃OH классификации х. ч. (Россия); АДГ, пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, аминокaproновая кислота, БСА, глицин, нитросиний тетразолий, ЭДТА, Кумасси G-250, тиомочевина, трицин, 1.10-фенантролин и N-этилmaleимид (Sigma, США); 2-меркаптоэтанола (Merck-Schuchardt, Германия); акриламид, бис-акриламид, глутаминовая кислота, НАД, НАДН, маннит, персульфат аммония и феназинметасульфат (AppliChem, Германия); бис-Трис (Amresco, США); ТЕМЕД (Fluka, Швейцария).

Результаты и обсуждение

Зависимость АДГ клеток корнеплодов столовой свеклы от величины рН. За многолетний период исследования в растениях АДГ накоплен обширный фактический материал. Изоформы фермента выявлены в разных органах и тканях многих растений. Согласно данным из литературы, повышение активности АДГ в тканях растений сопряжено с прорастанием, созреванием плодов и гипоксией (Kimmerer, MacDonald, 1987; Kanellis et al., 1991; Perata, Alpi, 1991).

Общепринятые подходы для определения активности АДГ основаны на восстановлении НАД при окислении этилового спирта (реакция окисления) и на окислении НАДН при восстановлении ацетальдегида (реакция восстановления) (Биссвангер, 2010). АДГ любого происхождения отличается выраженной зависимостью от величини-

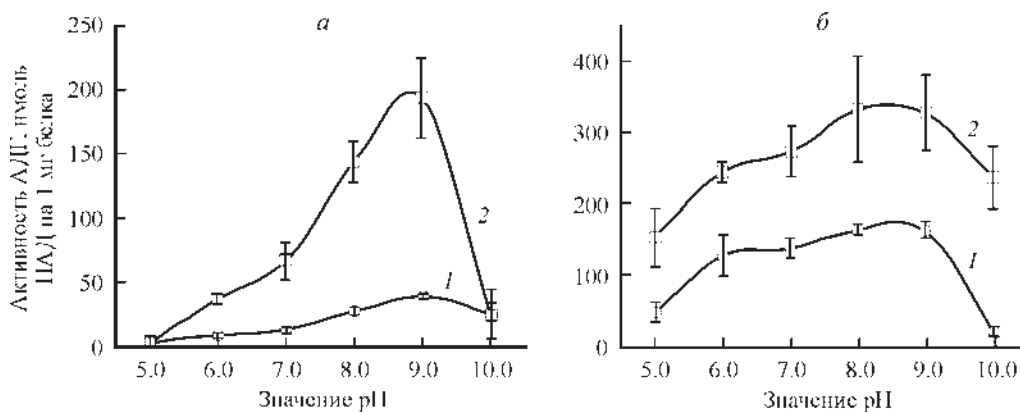


Рис. 1. Изменение активности АДГ изолированных вакуолей (кривая 1) и тканевого экстракта (кривая 2) у корнеплодов столовой свеклы в реакциях окисления (а) и восстановления (б) в зависимости от величины рН.

Здесь и на рис. 2, 4 показаны средние величины и стандартные отклонения.

ны рН среды. Оптимальными для фермента являются депротонирующие условия (Suseelan et al., 1987). В связи с этим следовало определить оптимальные значения рН для АДГ клеток корнеплодов столовой свеклы. Исследования проводили на экстрактах ткани корнеплодов.

Согласно полученным результатам, в реакции окисления для АДГ экстрактов ткани оптимальным было значение рН 9.0 (рис. 1, а, кривая 2), что соответствовало данным из литературы. Например, для АДГ из клубеньков бобовых оптимум рН приходился на 9.4, если субстратом служил спирт, а в случае, когда в качестве субстрата использовали ацетальдегид, оптимальными становились нейтральные условия (рН 7.0) (Spiteller, 2001). Для АДГ экстрактов ткани корнеплодов столовой свеклы с альдегидом в качестве субстрата в реакции восстановления оптимум рН также смещался к более низкому значению и приходился на 8.0 (рис. 2, б, кривая 2). По данным из литературы, у некоторых объектов оптимальные значения рН для АДГ были приближены к 8.0, но не в реакции восстановления, а в реакции окисления (Richardson, Finley, 2013). Обращала на себя внимание довольно высокая активность фермента корнеплодов столовой свеклы и при более низких значениях рН, а именно при 6.0 и 7.0.

Результаты исследования оптимумов рН для ферментативной активности вакуолярных экстрактов показали

ту же зависимость (рис. 1, а, б, кривая 1). Для фермента вакуолей в реакции окисления оптимальным был рН 9.0, а в реакции восстановления — 8.0. Заметно различалась ферментативная активность. По сравнению с активностью фермента из экстракта ткани она была крайне низкой в реакции окисления и относительно высокой в реакции восстановления. Уровни активности в реакции восстановления при рН 6.0, 7.0, 8.0 и 9.0 различались незначительно. Ранее нами было показано, что величины рН вакуолярного сока корнеплодов столовой свеклы варьируют в пределах от 5.5 до 6.8 (Нимаева и др., 2014). В связи с этим можно предположить, что внутри вакуолей в слабых условиях функционирование фермента в качестве альдегидредуктазы может быть довольно эффективным.

Активность АДГ (в реакции восстановления) в изолированных вакуолях обнаруживалась во всех экспериментах и была относительно высокой. Одновременное определение активности НАД- и НАДФ-МДГ (маркеры цитозоля) с помощью спектрофотометрии не дало положительных результатов (данные не приводятся). Отсутствие активности этих ферментов свидетельствовало о чистоте фракций изолированных вакуолей, которые не содержали примеси цитозольных белков.

Несмотря на многолетнее исследование АДГ, все еще мало фактов, которые могли подтвердить или опроверг-

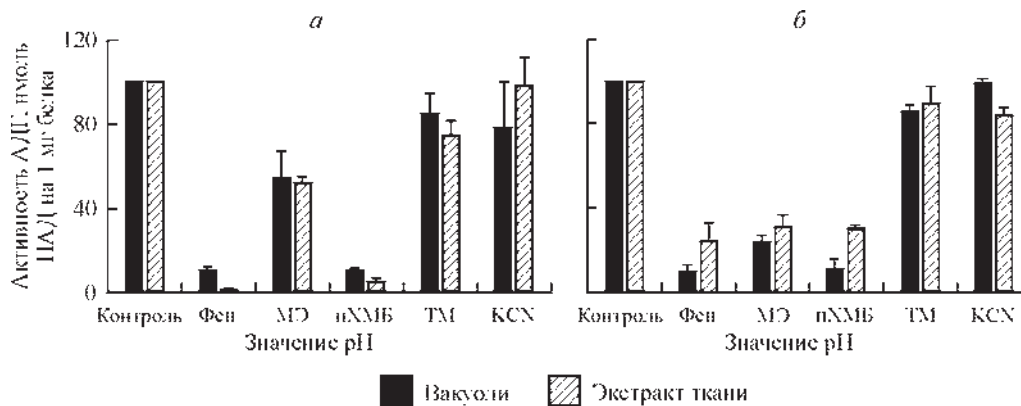


Рис. 2. Влияние ингибиторов на активность АДГ в реакциях окисления (а) и восстановления (б) в вакуолярной фракции и экстракте ткани корнеплодов столовой свеклы.

Ингибиторы: Фен — 1.10-фенантролин, МЭ — 2-меркаптоэтанол, пХМБ — пара-хлормеркурибензоат, ТМ — тиомочевина, KCN — цианид калия.

нуть присутствие этого фермента в вакуолях. Некоторые данные из литературы косвенно указывают на локализацию АДГ не только в цитозоле, но и в центральной вакуоли. Например, в работе, выполненной на изолированных вакуолях клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.), проводили многостадийную очистку фракций изолированных вакуолей. Однако многочасовая процедура не избавляла от активности АДГ, она присутствовала в вакуолярных фракциях, хотя и заметно снижалась (Darwen, John, 1989).

Наличие в вакуолях АДГ требует всестороннего исследования, тем более что в них выявляли дегидрогеназы из семейства АДГ. Например, в вакуолях клеток плода яблони (*Malus domestica* Borkh cv. Starkrimson) была обнаружена сорбитдегидрогеназа, которая окисляет сорбитол до d-фруктозы и восстанавливает НАД до НАДН (Wang et al., 2009). А с помощью метода протеомного анализа в вакуолях *Arabidopsis thaliana* обнаружена альдегиддегидрогеназа (Carter et al., 2004). Применяя тот же метод к вакуолям клеток дрожжей (*S. cerevisiae*), обнаружили АДГ, относящиеся к разным классам (ADH I и ADH II) (Sarry et al., 2007). Авторы предположили, что эти ферменты были перенаправлены в вакуоль из цитозоля, так как в более ранней работе на клетках *S. cerevisiae* другими авторами было показано, что АДГ в вакуолях может находиться в составе автофагосом, которые интенсивно образуются и транспортируются в вакуоль при неблагоприятных условиях обитания (Misuzu et al., 1994). Наряду с АДГ в вакуолях дрожжей выявили и другие дегидрогеназы — альдегиддегидрогеназу, глутаматдегидрогеназу, глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназу и др. (Hardiman et al., 2007; Sarry et al., 2007).

Результаты настоящей работы, которую проводили на различных корнеплодах на протяжении всего периода покоя (сентябрь—май) в течение 2 лет, свидетельствуют о постоянном присутствии АДГ в центральной вакуоли клеток корнеплодов столовой свеклы. Однако этих результатов недостаточно, чтобы считать АДГ конститутивным белком вакуолей.

Ингибиторный анализ. Известно, что на активность АДГ влияют хелатирующие соединения, а также соединения, взаимодействующие с сульфидрильными группами (SH-группами), так как фермент содержит металл (Zn) в активном центре, а его апофермент имеет множество SH-групп, количество которых зависит от вида АДГ (Suseelan et al., 1987). Ингибиторы АДГ — чаще всего ионы тяжелых металлов, пХМБ, о-фенантролин (его действие конкурентно по отношению к коферменту), дитизон, мочевины, тиомочевина, азиды, цианиды и гидроксилламин (Jobgen et al., 2006).

Для ингибиторного анализа использовали 1.10-фенантролин, 2-меркаптоэтанол, пХМБ, тиомочевину и цианид калия. Характер ингибирования АДГ клеток корнеплодов столовой свеклы в реакциях окисления и восстановления, который можно видеть на рис. 2, практически полностью соответствовал характеру ингибирования АДГ других растительных объектов (Suseelan et al., 1987). Полученные результаты позволили прийти к следующему заключению. Во-первых, АДГ клеток корнеплодов столовой свеклы, как типичные АДГ, в апоферменте содержит SH-группы. На это указывает ингибирующее действие пХМБ. Восстановление или поддержание в восстановленном состоянии этих SH-групп снижает активность фермента. Такое предположение можно сделать на основании ингибирующего действия 2-меркаптоэтанол.

Во-вторых, исследуемый фермент содержит атом металла. Практически полное подавление ферментативной активности отмечено в присутствии фенантролина — соединения, широко используемого в качестве ингибитора АДГ. Как хелатирующий агент, фенантролин служит эффективным ингибитором металлоферментов. В активном центре АДГ находятся атомы цинка и их связывание приводит к полной инактивации фермента (Sartorius et al., 1988). Например, АДГ кукурузы (*Zea mays* L.) содержит четыре атома цинка, два из которых расположены в активном центре, а два участвуют в ассоциации субъединиц в димерную молекулу фермента (Левитес, 1986).

Другие используемые ингибиторы были менее эффективными. Известно, что действие цианида зависит от концентрации, поэтому проявляется по-разному. Цианид соединяется с металлом, а также инактивирует активные группы фермента, например взаимодействуя с карбоксильной группой. В условиях нашего эксперимента цианид не оказывал заметного влияния на активность АДГ. Низкой эффективностью отличалась и тиомочевина. Это соединение тоже взаимодействует с ионами металлов в активном центре при определенной конформации апофермента (Андреева, 1987; Zheng, Hua, 1992).

Подавление ферментативной активности общепризнанными ингибиторами (1.10-фенантролином, 2-меркаптоэтанолом и пХМБ) позволяло рассматривать эту активность как специфичную для АДГ.

Изоферментный состав АДГ. В настоящее время АДГ хорошо изучена у человека, животных и грибов (Ашмарин, 2003; Зимин и др., 2012). Разнообразные АДГ по своей структуре разделены на три основных класса (I—III). В своем составе они могут иметь полипептидные цепи α , β , j , p и x , которые являются продуктами экспрессии пяти генетических локусов (АДГ 1—5). В состав АДГ-I входят субъединицы трех типов (α , β и j), которые формируют гомо- и гетеродимерные формы. АДГ-II является гомодимером, состоящим из полипептидных цепей типа p . Физиологическим субстратом для этого фермента служат альдегиды. АДГ-III состоит из двух одинаковых субъединиц типа x . Так же как и АДГ-II, имеет низкое сродство к этанолу. АДГ животных представлена в основном в форме димера. Некоторые ферменты дрожжей характеризуются тетрамерной формой (Зимин и др., 2012).

АДГ растений встречается главным образом в димерной форме. Белки АДГ могут кодировать несколько генов. Например, у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) обнаружены два структурных гена (*Adh 1* и *Adh 2*), кодирующих белки, которые формируют три изоформы. Две из них являются гомодимерами и одна — гетеродимером (Torres, 1976). У гексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) выявлены три структурных гена, кодирующих три субъединицы. Эти субъединицы ассоциируются в димеры всех возможных комбинаций. А в тетраплоидной пшенице (*Triticum turgidum* L.) структурные гены АДГ отвечают за синтез двух субъединиц, формирующих три изофермента (Langston et al., 1980).

Изоферментный состав АДГ можно установить с помощью зимографии (Левитес, 1986). Электрофорез белков мы проводили в неденатурирующих условиях, что позволяло сохранить их нативные свойства и ферментативную активность. Чтобы сохранять активность АДГ, тщательно подбирали условия электрофореза. Фермент из корнеплода столовой свеклы обладал высокой чувствительностью к химической природе буферных систем. В

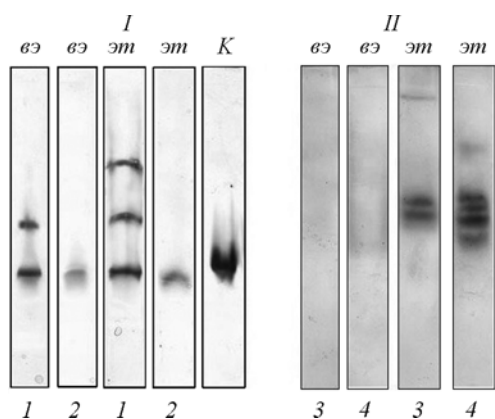


Рис. 3. Изоферментный состав АДГ (I), НАД-МДГ и НАДФ-МДГ (II) в ПААГ после электрофореза.

Столбцы: вэ — вакуолярный экстракт, эт — экстракт ткани, К — контроль (активность АДГ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с этанолом); 1, 2 — активность АДГ с этанолом и метанолом (маннитом и глутаматом) соответственно; 3, 4 — активность НАД-МДГ и НАДФ-МДГ соответственно.

частности, активность фермента снижалась в присутствии глицина, который используется в электродном буфере в системе Трис-аминометан/глицин. Буферная система бис-Трис/трицин, применяемая при электрофоретическом разделении белков в BNPAGE (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Fiala et al., 2011), оказалась наиболее щадящей для АДГ корнеплодов столовой свеклы. Однако кумасси G-250, используемый при таком электрофорезе, подавлял АДГ, поэтому был исключен из буферных систем. Следует отметить, что ни глицин, ни кумасси G-250 не оказывали сильного влияния на АДГ дрожжей *S. cerevisiae*, которая служила маркером ферментативной активности. Полученные нами результаты показали, что в клетках корнеплодов столовой свеклы АДГ представлена тремя изоформами. Две изоформы локализованы в вакуолях (рис. 3, I). В растениях довольно часто выявляют три изоформы АДГ. Однако их может быть меньше или, наоборот, больше. Например, АДГ кукурузы кодируется двумя несцепленными генами (*Adh1* и *Adh2*). Ген *Adh1* имеет несколько кодоминантных аллелей. Продукты разных аллелей и локусов ассоциируют, образуя гомо- и гетеромерные молекулы АДГ, имеющие различную электрофоретическую подвижность. Количество изоформ АДГ в проростках кукурузы варьирует от 1 до 3 в зависимости от исследуемой ткани, стадии развития растения и условий обитания (Schwartz, 1971; Левитес, 1986). В то же время в культуре клеток моркови (*Daucus carota* subsp. *Sativus*) выявлено 5 изоформ АДГ (Chourey, Widholm, 1980).

Нами показано влияние некоторых субстратов и ингибиторов на активность изоформ АДГ клеток корнеплодов столовой свеклы (см. таблицу). В качестве субстрата использовали не только этанол, но и метанол, маннит и глутамат (Левитес, 1986). Несмотря на то что при определении активности фермента было установлено, что метанол, маннит и глутамат не могут служить субстратом для АДГ (данные не представлены), зимография показала слабовыраженную активность одной из изоформ АДГ с этими соединениями (рис. 3, I). Следует отметить, что для проявления в геле ферментативной реакции с перечисленными соединениями требовалось более 1 ч, тогда как реакция с этанолом развивалась в течение

Влияние различных факторов на развитие реакции АДГ вакуолей и тканевого экстракта в ПААГ после нативного электрофореза

Испытуемые реагенты и условия	Изолированные вакуоли	Экстракт ткани
Субстраты:		
этанол	+	+
метанол	(+)	(+)
маннит	(+)	(+)
глутамат	(+)	(+)
Ингибиторы:		
глицин	(+)	(+)
1.10-фенантролин	—	—
KCN	(+)	(+)
ZnSO ₄	—	—
2-меркаптоэтанол	—	—
пХМБ	—	—
тиомочевина	(+)	(+)
ЭДТА	(+)	(+)
Условия:		
без НАД в буфере для экстракции белка	—	—
Продолжительный диализ (более 1 ч)	(+)	(+)

Примечание. «+» — ферментативная реакция развивается быстро (в течение 30 мин), «(+）」 — реакция развивается медленно (2 ч и более), «—» — реакция отсутствует.

15—30 мин. В присутствии глицина, KCN, тиомочевины и ЭДТА реакция протекала медленно, для ее проявления в ПААГ требовалось не менее 1 ч, что указывало на подавление реакции. Полное ингибирование наблюдали в присутствии ZnSO₄, 2-меркаптоэтанол и пХМБ (см. таблицу).

Следует отметить, что активность АДГ зависела и от некоторых условий (см. таблицу), например продолжительности диализа образцов, который необходим для проведения электрофореза в выбранной системе. При длительном диализе активность АДГ заметно снижалась. На активность влияли и такие условия, как наличие в сре-

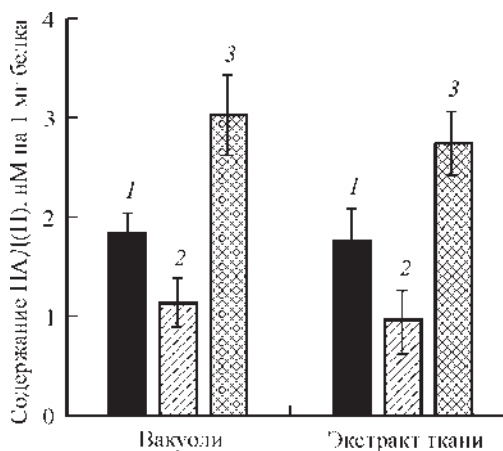


Рис. 4. Содержание НАД(Н) в вакуолях и экстрактах ткани корнеплодов столовой свеклы.

1 — НАД, 2 — НАДН, 3 — НАД(Н) общий.

де экстракции НАД и БСА, стабилизирующих фермент (Давыдов и др., 2012).

В образцах вакуолей и экстрактов ткани с помощью зимографии исследовали активность других белков цитозоля, а именно НАД- и НАДФ-МДГ. Результаты наглядно продемонстрировали отсутствие активности этих ферментов в изолированных вакуолях (рис. 3, II).

Определение НАДН. Косубстратом для АДГ служит НАД(Н). Ранее НАД(Н) выявляли в вакуолях клеток дрожжей (Hardiman et al., 2007). В связи с этим необходимо было определить содержание НАД(Н) в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы. Результаты анализа показали наличие НАД(Н) в вакуолярных фракциях (рис. 4). Его концентрация практически не отличалась от концентрации НАД(Н) тканевого экстракта. Эти данные указывают на возможность эффективного функционирования в вакуолях АДГ, а также других НАД(Н)-зависимых ферментов, выявляемых в этом компартменте (Carter et al., 2004; Hardiman et al., 2007; Jaquinod et al., 2007).

На основании проведенного исследования можно сделать заключение о том, что в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы присутствует фермент, по своим биохимическим характеристикам соответствующий АДГ. Две вакуолярные изоформы этого фермента обладают высокой активностью в реакциях восстановления альдегидов. Возможно, они служат важными элементами системы детоксикации вакуолей, защищающей клетку от повреждающего действия цитотоксичных эндогенных соединений.

Список литературы

- Андреева В. А. 1988. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. М.: Наука. 128 с. (Andreeva V. A. 1988. Enzyme peroxidase: participation in the protective mechanism of plants. Moscow: Science. 128 p.)
- Ашмарин И. П. 2003. Алкогольдегидрогеназа млекопитающих — объект молекулярной медицины. Успехи биол. химии. 43 : 3—18. (Ashmarin I. P. 2003. Alcohol dehydrogenase of mammals is an object of molecular medicine. Advances in Biol. Chem. 43 : 3—18.)
- Биссвангер Х. 2010. Практическая энзимология. М.: Бинном. Лаборатория знаний. 328 с. (Biswanger H. 2010. Practical Enzymology. Moscow: Binom. Laboratory Knowledge. 328 p.)
- Давыдов В. В., Божков А. И., Кульчицкий О. К. 2012. Физиологическая и патофизиологическая роль эндогенных альдегидов. Saarbrücken: Palmarium Acad. Publ. 240 с. (Davydov V. V., Bozhkov A. I., Kulchytsky O. K. 2012. The physiological and pathophysiological role of endogenous aldehydes. Saarbrücken: Palmarium Acad. Publ. 240 p.)
- Зимин Ю. В., Уланова А. А., Соловьева А. Г. 2012. Алкогольдегидрогеназа. Молекулярная и надмолекулярная регуляция. Фундаментальные исследования. 3 : 527—530. (Zimin Yu. V., Ulanova A. A., Solovieva A. G. 2012. Alcohol dehydrogenase. Molecular and supramolecular regulation. Fundamental Research. 3 : 527—530.)
- Космачевская О. В., Шумаев К. Б., Топунов А. Ф. 2015. Карбонильный стресс у бактерий: причины и последствия. Успехи биол. химии. 55 : 49—82. (Kosmachevskaya O. V., Shumaev K. B., Topunov A. F. 2015. Carbonyl stress in bacteria: causes and consequences. Biochemistry (Moscow). 80 : 1655—1671.)
- Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высш. школа. 350 с. (Lakin G. F. 1990. Biometrics. Moscow: Higher School. 350 p.)
- Левитес Е. В. 1986. Генетика изоферментов растений. Новосибирск: Наука, Сибирское отделение. 144 с. (Levites E. V. 1986. Genetics of plant isozymes. Novosibirsk: Science, Siberian Branch. 144 p.)
- Нимаева О. Д., Прадедова Е. В., Салыев Р. К. 2014. Активность и изоферментный состав пероксидазы вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы на разных фазах онтогенеза и при изменении условий хранения. Физиол. раст. 61 : 350—358. (Nimaeva O. D., Pradedova E. V., Salyaev R. K. 2014. Activity and isoenzyme composition of vacuolar peroxidase in the roots of red beet at different stages of development and upon changes in storage conditions. J. Plant Physiol. (Russian). 61 : 324—331.)
- Прадедова Е. В., Ишеева О. Д., Салыев Р. К. 2009. Супероксиддисмутазы вакуолей клеток растений. Биол. мембраны. 26 (1) : 5—14. (Pradedova E. V., Isheeva O. D., Salyaev R. K. 2009. Superoxide dismutase of plant cell vacuoles. Biochemistry (Moscow). Suppl. (Ser. A: Membr. Cell Biol.) 3 (1) : 24—32.)
- Рощина В. В., Рощина В. Д. 2012. Выделительная функция высших растений. Saarbrücken: Lambert Acad. Publ. 476 с. (Roshchina V. V., Roshchina V. D. 2012. Isolation function of higher plants. Saarbrücken: Lambert Acad. Publ. 476 p.)
- Салыев Р. К., Кузеванов В. Я., Хантагаев С. В., Копытчук В. Н. 1981. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений. Физиол. раст. 28 (6) : 1295—1305. (Salyaev R. K., Kuzevanov V. Ya., Khaptagaev S. B., Kopytchuk V. N. 1981. Isolation and purification of vacuoles and vacuolar membranes from plant cells. J. Plant Physiol. (Russian). 28 (6) : 1295—1305.)
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principal of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E. L., Girke T., Raikhel N. V. 2004. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. Plant Cell. 16 : 3285—3303.
- Chourey P. S., Widholm J. 1980. Tissue specific alcohol dehydrogenase isozyme variation in carrot: whole plant versus *in vitro* cultured cells. In Vitro. 16 : 571—574.
- Coleman J. O. D., Randall R. A., Blake-Kalff M. M. A. 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. TIPS. 2 : 144—151.
- Darwen C. W., John P. 1989. Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Plant Physiol. 89 : 658—663.
- Dixon D. P., Cummins I., Cole D. J., Edwards R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 1 : 258—266.
- Fiala G. J., Schamel W. W., Blumenthal B. 2011. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular. J. Vis. Exp. 48 : 567—572.
- Hardiman C., Sarry J.-E., Rea P. A. 2007. Searching for the source: determining NAD⁺ concentrations in the yeast vacuole. Penn McNair Res. 1 (1). https://repository.upenn.edu/mcnair_scholars/vol1/iss1/2/.
- Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jacquinod S., Hugovieux V., Bruley C., Garin J., Bourguignon J. 2007. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. Mol. Cell Proteomics. 6 : 394—412.
- Jobgen W. S., Fried S. K., Fu W. J., Meiningner C. J., Wu G. 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. J. Nutr. Biochem. 17 : 571—588.
- Kanellis A. K., Solomos T., Roubelakis-Angelakis K. A. 1991. Suppression of cellulase and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in avocado fruit mesocarp subjected to low oxygen stress. Plant Physiol. 96 : 269—274.
- Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., Van Den Ende W., Cuyppers A. 2013. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. Plant, Cell Envir. 36 : 1242—1255.
- Kimmerer T. W., MacDonald R. S. 1987. Acetaldehyde and ethanolbiosynthesis in leaves of plants. Plant Physiol. 84 : 1204—1209.
- Langston P. J., Pace C. N., Hart G. E. 1980. Wheat alcohol dehydrogenase isozymes: purification, characterization and gene expression. Plant Physiol. 65 : 518—522.

Misuzu B., Takeshige G., Baba N. 1994. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.* 124 : 903—913.

Perata P., Alpi A. 1991. Ethanol-induced injuries to carrot cells. The role of acetaldehyde. *Plant Physiol.* 95 : 748—752.

Richardson T., Finley J. W. 2013. Chemical changes in food during processing. Germany: Springer. 514 p.

Sarry J. E., Chen S., Collum R. P., Liang S., Peng M., Lang A., Naumann B., Dzierszynski F., Yuan C. X., Hippler M., Bea P. A. 2007. Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 274 : 4287—4305.

Sartorius C., Dunn M. F., Zeppezauer M. 1988. The binding of 1, 10-phenanthroline to specifically active-site cobalt (II)-substituted horse — liver alcohol dehydrogenase. A probe for the open-enzyme conformation. *Eur. J. Biochem.* 177 : 493—499.

Schwartz D. 1971. Dimerization mutants of alcohol dehydrogenase of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68 : 145—146.

Spiteller G. 2001. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp. Gerontol.* 36 : 1425—1457.

Suseelan K. N., Mitra R., Bhatia C. R. 1987. Purification and characterization of variant alcohol dehydrogenase isozymes from durum wheat. *Biochem. Gen.* 25 : 581—590.

Tong W.-F., Lin S.-W. 1988. Purification and properties of rice alcohol dehydrogenase. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* 29 : 245—253.

Torres A. M. 1976. Dissociation-recombination of intergenic sunflower alcohol dehydrogenase isozymes and relative isozyme activities. *Biochem. Gen.* 14 : 87—98.

Wang X.-L., Xu Y.-H., Peng C.-C., Fan R.-C., Gao X.-Q. 2009. Ubiquitous distribution and different subcellular localization of sorbitol dehydrogenase in fruit and leaf of apple. *J. Exp. Bot.* 60 : 1025—1034.

Zheng L.-Y., Hua L. 1992. Inhibition of alcohol dehydrogenase by thiol compounds. *FEBS Lett.* 300 : 251—253.

Поступила 19 II 2018

ALCOHOL DEHYDROGENASE ACTIVITY IN ISOLATED VACUOLES OF RED BEET ROOT CELLS

O. D. Nimaeva,^{1,*} E. V. Pradedova,¹ A. B. Karpova,² R. K. Salyaev¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk, 664033, and

² Faculty of Biology and Soil Science, Irkutsk State University, Irkutsk, 664003;

* e-mail: sandra_ok@mail.ru

The main localization place of alcohol dehydrogenase (ADH, KF 1.1.1.1) in plant cells is considered to be the cytosol. However, a rather high activity of this enzyme in the acetaldehyde reduction reaction (reduction reaction) was found in fractions of vacuoles isolated of red beet root cells. Despite the fact that the activity of ADH in the reduction reaction in vacuoles was quite high (on the average, 160 nM NADH / mg protein), the activity of ADH tissue extracts markedly exceeded it (on the average, 300 nM NADH / mg protein). The specificity of the enzymatic reaction was indicated by the results of inhibitory analysis. Complete suppression of ADH activity occurred in the presence of 1.10-phenanthroline, para-chloromercuribenzoate. 2-Mercaptoethanol also had an inhibitory effect. The pH optimum for the enzyme in reduction reaction was pH 9.0, and in ethanol oxidation reactions (oxidation reaction) was pH 8.0. The results of the study of enzymatic activity in PAGE after electrophoresis demonstrated two isoforms of ADH in the vacuolar fractions and three isoforms in the tissue extract. The limiting factor for ADH activity may be the absence of cosubstrate NAD(H). For isolated vacuoles, a relatively high concentration of NADH (3.01 nM NAD (H)/mg protein) was established, compared to tissue extract (2.75 nM / mg protein). The results indicate the possible functioning of ADH in the plant cell vacuoles, mainly as an aldehyde-reducing enzyme.

Key words: alcohol dehydrogenase, vacuole, detoxication.