

УДК 577.151.32

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОФЕРМЕНТОВ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

© 2022 г. А. Т. Епринцев¹, *, Д. Н. Федорин¹, О. Х. Флорес Каро¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Воронежский государственный университет”, Воронеж, 394018 Россия

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 07.04.2022 г.

После доработки 04.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

При использовании многостадийной очистки сукцинатдегидрогеназы (СДГ) получены препараты в высокоочищенном состоянии. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel позволила разделить изоферменты СДГ1 и СДГ2 из листьев кукурузы в норме и при воздействии солевого стресса. Удельная активность полученных препаратов СДГ колебалась от 0.623 до 1.095 Е/мг белка, при этом выход составлял от 15.36 до 20.71%. Сравнительный анализ значений K_m , V_{max} и рН-оптимумов изоферментов СДГ показал незначительные изменения скорости реакции и сродства к субстрату у изоферментов, полученных из проростков, инкубированных в условиях солевого стресса. Увеличение значений K_m указывало на снижение сродства к субстрату у изоферментов (СДГ2), что может вызывать изменение метаболических реакций при адаптации клетки к стрессовому воздействию.

Ключевые слова: *Zea mays*, сукцинатдегидрогеназа, изоферменты, солевой стресс, константа Михаэлиса

DOI: 10.31857/S0555109922060034

Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и дыхательная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) являются важными компонентами клеточного энергетического метаболизма и играют важную роль не только в синтезе АТФ, но и в различных процессах адаптации и развития у растений [1]. Одним из ключевых ферментов, участвующих в обоих процессах, связывающих ЦТК с ЭТЦ, является сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1). СДГ катализирует реакцию окисления сукцината до фумарата в ЦТК за счет гидрофильных субъединиц А и В, в ЭТЦ переносит электроны в пределах дыхательного комплекса, восстанавливая убинон до убинола межмембранными субъединицами С и D [2]. Кроме того, СДГ принимает участие в глюконеогенезе, обеспечивая метаболизм сукцината, образованного в глиоксилатном цикле [3]. Поскольку СДГ является ферментом, участвующим в функционировании нескольких метаболических процессов клетки, как катаболических, так и анаболических, большое значение приобретает наличие молекулярных форм фермента, обеспечивающих координацию этих процессов. Показано, что в щитках кукурузы на ранних стадиях развития семян присутствуют четыре изофермента СДГ [4]. По мере развития в семенах происходит изменение состава

молекулярных форм СДГ как в щитке [4], так и в листьях. При нормальных условиях роста обнаруживаются только две формы [5].

Механизмы регуляции функционирования СДГ-системы при различных стрессовых воздействиях на растения остаются малоизученными, а их понимание позволяет определить роль, которую играют изоферменты в адаптационных процессах у растений. Известно, что при солевом стрессе избыточное количество ионов Na^+ вызывает осмотический стресс, нарушающий метаболизм, нормальную физиологическую деятельность, процессы фотосинтеза и дыхания [6]. Особое значение в адаптации к стрессу играют ферментные системы, участвующие в энергетическом и конструктивном метаболизме. В частности, показана роль малатдегидрогеназной системы и фумаратгидратазы в метаболизме митохондрий в листьях кукурузы в условиях хлоридного засоления [7, 8]. Изучение биохимических особенностей, кинетических свойств изоферментов СДГ позволяет оценить адаптивную реакцию клеточного метаболизма на воздействие стрессового фактора на уровне ферментов.

Цель работы – получение высокоочищенных препаратов изоферментов сукцинатдегидрогена-

Таблица 1. Очистка сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы, выращенной в стандартных условиях ($n = 3, p < 0.05$)

| Стадия | Белок, мг | Общая активность, Е | Удельная активность, Е/мг белка | Выход, % | Степень очистки |
|--|-----------|---------------------|---------------------------------|----------|-----------------|
| Гомогенат | 31.420 | 0.425 | 0.014 | 100 | 1 |
| Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20–60% | 5.689 | 0.312 | 0.055 | 73.41 | 3.93 |
| Гель-фильтрация на сефадексе G-25 | 3.756 | 0.285 | 0.076 | 67.06 | 5.43 |
| Хроматография на ДЭАЭ-Sephacel | 0.085 | 0.088 | 1.035 | 20.71 | 73.93 |
| | 0.074 | 0.081 | 1.095 | 19.06 | 78.21 |

зы из листьев кукурузы и изучение их основных кинетических характеристик.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали 14-дневные растения кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные гидропонным способом при температуре 20°C и 12-часовом световом дне и интенсивности освещения 25 Дж/м². Солевой стресс моделировали инкубацией проростков в 150 мМ растворе NaCl в тех же условиях выращивания. Контрольные растения инкубировались в воде.

Активность СДГ определяли в гомогенате листьев кукурузы спектрофотометрическим методом по падению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 600 нм в течение 5 мин при 25°C в результате обесцвечивания 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) в ходе его восстановления. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 мкМ продукта за 1 мин при 25°C [9].

Содержание белка в пробе определили по методу Лоури [10].

Для получения высокоочищенных препаратов СДГ использовали 3-стадийную схему очистки. Все операции проводили при температуре 4°C. На первой стадии навеску растительного материала (1.0 г) гомогенизировали в соотношении 1 : 5 в среде следующего состава: 50 мМ Трис-HCl буфер, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0.4 М сахара. Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя марли, затем центрифугировали в течение 5 мин при 1300 g. К супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония до 20% насыщения. Полученный осадок отделяли центрифугированием 20 мин при 12000 g. В супернатант вносили сульфат аммония до 60% насыщения и вновь центрифугировали 20 мин при 12000 g. Осадок ресуспендировали в 2 мл среды, содержащей: 10 мМ фосфатный буфер, pH 7.8, 0.01%-ный тритон X-100, 20 мМ сукцинат натрия.

Полученный ферментный препарат наносили на колонку (1.5 × 20 см), заполненную сефадексом G-25 ("Pharmacia", Швеция), для освобождения от

солей и низкомолекулярных примесей. Элюцию осуществляли 10 мМ фосфатным буфером, pH 7.8, содержащим 20 мМ сукцинат натрия, со скоростью 30 мл/ч. Собранные активные фракции наносили на колонку (1.5 × 15 см) с ДЭАЭ-Sephacel ("Sigma-Aldrich", США), предварительно уравновешенную 30 мМ фосфатным буфером, pH 7.8, содержащим 30 мМ KCl. Десорбцию фермента осуществляли линейным градиентом концентрации KCl от 0.03 до 0.2 М с 20 мМ фосфатным буфером, pH 6.2, с 20 мМ сукцинатом натрия.

Гомогенность активных фракций СДГ оценивали электрофоретическим методом [1]. Для специфического проявления на активности СДГ использовали тетразолиевый метод со средой следующего состава: калий-фосфатный буфер – 0.1 М, pH 7.5, 0.1 М сукцинат натрия, 0.5 мг/мл нитросинего тетразолия и 1 мг/мл феназинметасульфата [12].

Для выявления молекулярной массы полученных препаратов СДГ использовали гель-хроматографию на колонке (2 × 40 см) с сефадексом G-200 ("Pharmacia", Швеция) [12]. Свободный объем колонки определяли с помощью голубого декстрана ("Serva", ФРГ).

Определение величины константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости (V_{max}) для изоферментов СДГ из листьев кукурузы проводили по методу Лайнуивера-Берка в системе двойных обратных координат [12].

Определение pH-оптимума проводили по графику зависимости активности фермента от различных значений pH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из гомогената листьев контрольных растений кукурузы, выращенных в условиях солевого стресса получены гомогенные препараты СДГ в результате проведения 3-стадий очистки. Результаты представлены в табл. 1 и 2.

После десорбции фермента с ДЭАЭ-Sephacel линейным градиентом KCl (30–200 мМ) были получены два препарата в опыте и контроле, обладающих активностью сукцинатдегидрогеназы. Изо-

Таблица 2. Очистка сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы, выращенной в условиях засоления ($n = 3, p < 0.05$)

| Стадия | Белок, мг | Активность СДГ, Е | Удельная активность, Е/мг белка | Выход, % | Степень очистки |
|---|-----------|-------------------|---------------------------------|----------|-----------------|
| Гомогенат | 41.256 | 0.625 | 0.015 | 100 | 1 |
| Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20, 60% | 22.654 | 0.396 | 0.017 | 63.36 | 1.13 |
| Гель-фильтрация на сефадексе G-25 | 16.856 | 0.294 | 0.018 | 47.04 | 1.2 |
| Хроматография на ДЭАЭ-Sephacel | 0.154 | 0.096 | 0.623 | 15.36 | 41.33 |
| | 0.095 | 0.104 | 1.095 | 16.64 | 73.00 |

ферменты, выделенные из гомогената листьев кукурузы, выращенной в обычных условиях, имели удельные активности: 0.623 первый и 1.095 Е/мг белка второй, при этом степень очистки составила 41.33 и 73.00, выход – 15.36 и 16.64% соответственно. Удельная активность СДГ из листьев растений, подвергнутых солевому стрессу, составила 1.035 Е/мг для первого изофермента и 1.095 Е/мг белка для второго, степень очистки 73.93 и 78.21, при выходе – 20.71 и 19.06% соответственно.

Изоферменты СДГ, полученные как из листьев контрольных растений, так и выращенных в присутствии 150 мМ NaCl, отличались по степени сорбции на колонке с ДЭАЭ-Sephacel (рис. 1). ДЭАЭ-Sephacel является слабым анионообменником и имеет положительный заряд. По данным литературы теоретическая изоэлектрическая точка (pI) СДГ равна 6.34, а значения pI зависят от анализируемого изофермента [13]. В среде с pH выше изоэлектрической точки белки проявляют отрицательный суммарный заряд и связываются с анионообменником. СДГ проявляла наибольшую стабильность и каталитическую активность в диапазоне pH от 7.0 до 8.0, что выше pI фермента. Результаты исследования показывают, что СДГ1 контрольных растений и СДГ1 из растений, подвергшихся солевому стрессу, десорбировалась с колонки ДЭАЭ-Sephacel при концентрации KCl 81.0 мМ и 89.5 мМ соответственно. Второй изофермент из контрольных растений элюировался при концентрации 149 мМ KCl, а из растений в условиях солевого стресса элюирование происходило при 166 мМ KCl (рис. 1). Эти различия в величине концентрации для десорбирования изоферментов СДГ из листьев кукурузы предполагают различие их поверхностного заряда. Увеличение концентрации KCl, необходимой для десорбции изоферментов с ионообменника ДЭАЭ-Sephacel, соотносится с изменением их заряда в отрицательную сторону, что является характерным для растений, подвергшихся солевому стрессу, чему способствует также подщелачивание матрикса митохондрий таких растений [14].

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле с применением общего проявления белка нитра-

том серебра подтвердил гомогенность полученных препаратов всех четырех изоферментов. При проявлении наблюдали только одну белковую полосу в каждом образце активных фракций, полученных после очистки на ДЭАЭ-Sephacel (рис. 2а). При проведении специфического проявления препаратов изоформ на активность СДГ, выделенных их контрольных растений и выращенных в условиях засоления, были получены по 2 полосы, с электрофоретической подвижностью для первого изофермента – 0.34 и 2 полосы для второго –

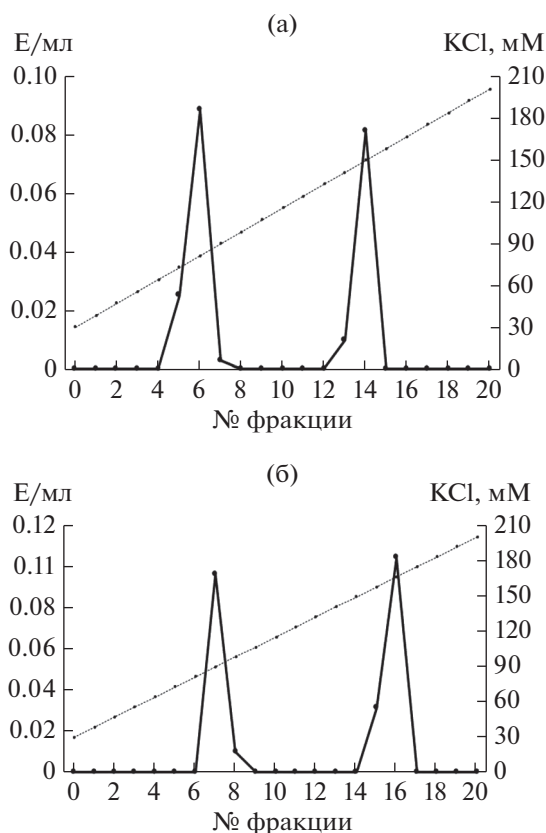


Рис. 1. Профиль элюции с колонки ДЭАЭ-Sephacel изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы: а – контрольные растения, б – растения, подвергшиеся действию 150 мМ хлорида натрия.

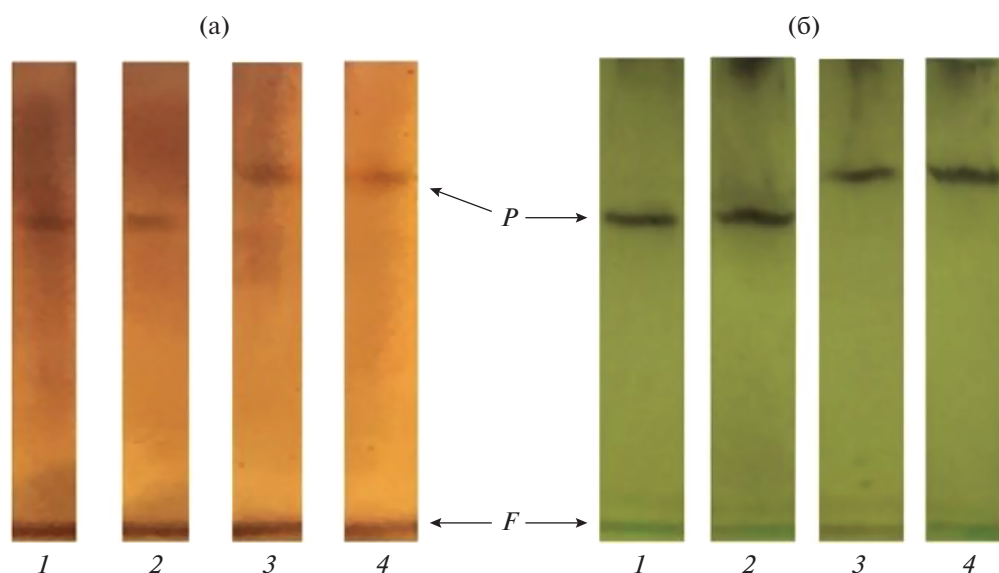


Рис. 2. Электрофорез очищенных фракций СДГ из листьев кукурузы (а) и специфическое проявление на активность (б). 1 – СДГ1 контроль, 2 – СДГ1 NaCl, 3 – СДГ2 контроль, 4 – СДГ2 NaCl.

0.23 (рис. 2б). На этом основании можно сделать вывод о том, что в листьях кукурузы после засоления присутствуют изоферменты с одинаковой электрофоретической подвижностью СДГ1 и СДГ2.

При проведении гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200 были установлены молекулярные массы выделенных изоформ СДГ из контрольных растений и растений, подвергшихся солевому стрессу. Величина молекулярной массы изоформ из контрольных и опытных растений совпадала и для СДГ1 составила 105 кДа, а для СДГ2 – 134 кДа.

Полученные результаты согласуются с данными предыдущих исследований, согласно которым показано наличие двух изоферментов СДГ в листьях кукурузы [5], в листьях гороха [15], а также в корнях сладкого картофеля [16]. Эти две формы являются конститутивными и различаются по своей структурной организации: первая – гетеродимерный изофермент (СДГ1), а вторая – гетеротетрамерный (СДГ2) [17].

Были изучены кинетические свойства K_m , V_{max} и pH оптимумы каждого изофермента, полученного из контрольных и опытных растений кукурузы.

Два изофермента СДГ из листьев проростков кукурузы проявляли сходные кинетические свойства как в контроле, так и в проростках в условиях кратковременного солевого стресса. Для изофермента СДГ1 значение константы Михаэлиса составило 1.08 мМ, что незначительно отличалось от K_m фермента, полученного из растений, подвергнутых стрессу – 1.13 мМ (табл. 3). Величины K_m для второго изофермента СДГ в опыте и кон-

троле имели достоверные различия и составляли 1.23 и 1.18 мМ соответственно. Полученные значения K_m для изоферментов СДГ контрольных образцов указывают, что СДГ2 проявляла несколько меньшее сродство к субстрату по сравнению с СДГ1. Эта тенденция сохранялась и у изоферментов, полученных из листьев проростков в условиях солевого стресса. Результаты проведенного анализа кинетической характеристики исследуемых изоферментов свидетельствуют о большем сродстве к субстрату изофермента СДГ1, что, вероятно, обуславливает его большую кинетическую активность.

При расчете V_{max} для изоферментов СДГ из листьев кукурузы в норме и в условиях засоления анализируемая величина изменялась для обеих форм фермента. Величина V_{max} как для СДГ1, так и СДГ2 в экспериментальных растениях увеличилась в 1.17 и 1.27 раза соответственно (табл. 3). Таким образом, данные по V_{max} для изоформ СДГ свидетельствовали об увеличении каталитической активности при воздействии 150 мМ хлорида натрия на кукурузу.

Изменения величин K_m и V_{max} обоих исследуемых изоферментов СДГ при воздействии на растения солевого стресса возможно объясняются модификациями их белковых компонентов, обусловленные изменением pH матрикса митохондрий [14], что находит отражение в кинетике реакции [18]. Анализ величины V_{max}/K_m изоформ СДГ свидетельствует, что наибольшее сродство к субстрату проявляли ферменты растений в условиях воздействия на них солевого стресса. Значения V_{max}/K_m для СДГ1 и СДГ2 из контрольных

Таблица 3. Значения k_m и V_{max} по сукцинату для изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы

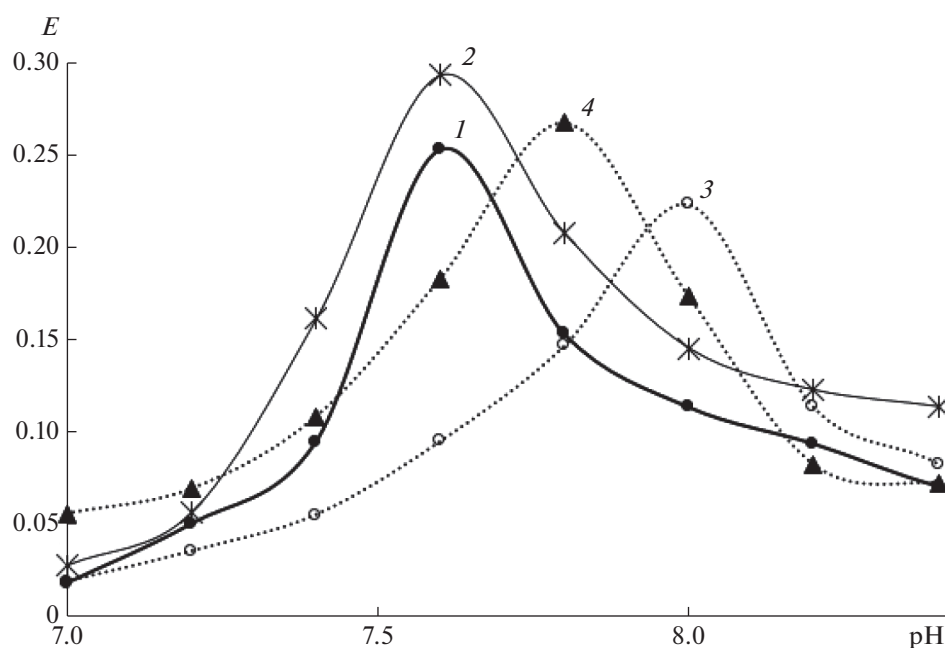
| СДГ Изофермент | K_m , мМ | V_{max} , мкмоль/мин | V_{max}/K_m |
|-------------------------|-----------------|------------------------|---------------|
| СДГ1 Контроль | 1.08 ± 0.03 | 0.174 ± 0.005 | 0.16 |
| СДГ2 Контроль | 1.18 ± 0.01 | 0.233 ± 0.002 | 0.20 |
| СДГ1 24 ч NaCl [150 мМ] | 1.13 ± 0.04 | 0.204 ± 0.008 | 0.18 |
| СДГ2 24 ч NaCl [150 мМ] | 1.23 ± 0.06 | 0.296 ± 0.015 | 0.24 |

растений были в 1.17 и 1.27 раза соответственно ниже, чем у изоформ из растений при воздействии солевого стресса, что свидетельствует о большем родстве к сукцинату изоформы СДГ2. Кроме того, при повреждении, в том числе и при солевом стрессе, происходит некоторое изменение субстратной специфичности, делая возможными дополнительные метаболические реакции, некоторые из которых имеют потенциальное физиологическое значение [19, 20]. Показано, что в условиях солевого стресса происходит модуляция величины рН цитозоля мембранных органоидов клетки, в том числе за счет перераспределения вакуолярного пула протонов [21]. Изменение значений рН матрикса митохондрий сказывается на конформационных состояниях белковых компонентов изоферментов СДГ, что находит отражение в изменении родства к субстрату.

Изменение рН влияет на структуру белка, а снижение активности фермента за пределами оптимального рН определяется природой аминокислот в активном центре, который подвергается

протонированию и депротонированию, а также конформационными изменениями, вызванными ионизацией аминокислот. Изучение зависимости активности изофермента СДГ от рН среды показало, что достоверных различий между опытными и контрольными образцами по изоферменту СДГ1 нет. Максимальная активность фермента для СДГ1 наблюдалась при рН 7.6 и в контроле и фракциях фермента, полученных из растений, подвергнутых солевому стрессу. Оптимальное значение рН для СДГ2 понизилось с 8.0 рН до 7.8 рН после воздействия солевого стресса в течение 24 ч (рис. 3).

Таким образом, применение разработанной схемы очистки СДГ, включающей ионообменную хроматографию, позволило получить изоформы исследуемого фермента в высокоочищенном состоянии. Два изофермента СДГ1 и СДГ2 десорбировались с ДЭАЭ-Sephacel при различных концентрациях хлорида калия, что предполагает различие в организации их полипептидов, в частности, по-

**Рис. 3.** pH-оптимум для изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы. 1 – СДГ1 контроль, 2 – СДГ1 NaCl, 3 – СДГ2 контроль, 4 – СДГ2 NaCl.

казано, что молекулярная масса изоформы СДГ1 составляет 105 кДа, а для СДГ2 — 134 кДа.

Сравнительный анализ полученных значений K_m и значений рН-оптимума изоферментов СДГ из листьев кукурузы в контрольных растениях и при воздействии 150 мМ хлорида натрия, показал незначительное снижение каталитической активности изоферментов, полученных из проростков, инкубированных в условиях солевого стресса. Наблюдаемое увеличение значений K_m указывало на небольшое снижение сродства к субстрату у этих двух изоферментов, что может быть необходимым для протекания дополнительных метаболических реакций при адаптации клеточного метаболизма к условиям стресса [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Che-Othman M., Millar A.H., Taylor N.L.* // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. № 12. P. 2875–2905.
2. *Huang S., Millar A.H.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2013. V. 16. № 3. P. 344–349.
3. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Wu T.L., Makhmud A.S., Popov V.N.* // Rus. J. Plant Physiol. 2012. V. 59. P. 299–306.
4. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Florez O., Puglla M.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 1. P. 34–37.
5. *Федорин Д.Н., Карабутова Л.А., Покусина Т.А., Епринцев А. Т.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 4. С. 544–549.
6. *Kaiwen G., Zisong X., Yuze H., Qi S., Yue W., Yanhui C. et al.* // Plant Signaling & Behavior. 2020. V. 15. № 9. e1832373. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1832373>
7. *Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Федорина О.С.* // Известия РАН. Серия биологическая. 2021. № 1. С. 65–72.
8. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 11. e6012. <https://doi.org/10.3390/ijms22116012>
9. *Popov V.N., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U.* // FEBS Letters. 2010. V. 584. № 1. P. 199–202.
10. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
11. *Davis B.J.* Disc electrophoresis. Method and Application to Human Serum Protein // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. V. 121. P. 404–427.
12. *Епринцев А.Т., Ву Т.Л., Селиванова Н.В., Хасан Хамад А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 6. С. 600–605.
13. *Schilling B., Murray J., Yoo C.B., Row R.H., Cusack M.P., Capaldi R.A., Gibson B.W.* // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1762. № 2. P. 213–222.
14. *Sun Y., Liang W., Cheng H., Wang H., Lv D., Wang W. et al.* // Plant Signal Behav. 2021. V. 16. № 3. e1856546. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1856546>
15. *Федорин Д.Н., Епринцев А.Т.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2018. Т. 18. № 4. С. 563–567.
16. *Hattori T., Asahi T.* // Plant & Cell Physiol. 1982. V. 23. P. 515–523.
17. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N.* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. V. 56. № 2. P. 179–184.
18. *Collin J., Tseng C.-Y., Zocchi G., Tlustý T.* // PLoS One. 2014. V. 9. e101442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101442>
19. *Piedrafita G., Keller M.A., Ralser M.* // Biomolecules. 2015. V. 5. P. 2101–2122.
20. *Nagy P., Lechte T.P., Das A.B., Winterbourn C.C.* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 31. P. 26068–26076.
21. *Kader M.A., Lindberg S.* // Plant Signal Behav. 2010. V. 5. № 3. P. 233–238.

Purification and Some Kinetic Characteristics of Succinate Dehydrogenase Isoenzymes from Corn Leaves under Salt Stress

A. T. Eprintsev^{a, *}, D. N. Fedorin^a, and O. Kh. Flores Karo^a

^a Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

When using multistage purification of succinate dehydrogenase (SDH), its preparations were obtained in a highly purified state. Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel was the key step that made it possible to separate isoenzymes of the studied enzyme from corn leaves in normal conditions and under salt stress. The specific activity of the resulting SDH preparations ranged from 0.623 to 1.095 U/mg protein, with the yield ranging from 41.33 to 78.21%. Comparative analysis of the obtained K_m values and the pH optimum of the obtained succinate dehydrogenase isoenzymes shows a slight decrease in the activity of isoenzymes obtained from seedlings incubated under salt stress. An increase in K_m values indicates a decrease in the affinity for the substrate in these two isoenzymes, which may cause the transformation of metabolic reactions during cell adaptation to stress.

Keywords: *Zea mays*, succinate dehydrogenase, isoenzymes, salt stress, Michaelis constant