

ORIGINAL ARTICLE

**LIGHT INFLUENCE ON SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN
MAIZE LEAVES**

V.N. Popov, A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin, Yu.A. Leonova

Department of Plant Physiology and Biochemistry, Voronezh State University, Voronezh, 394006, Russia

fax: (0732) 20-87-55, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Received July 13, 2005

Received in revised form August 2, 2005

Abstract— Photosynthesis and respiration participates in energy production by plants under different light conditions. It looks quite important to provide a balanced regulation of these processes. It was shown in the presented study that succinate dehydrogenase activity drops down in intact leaves under intensive light. There is no direct influence of light on purified enzyme. It was found that low concentrations of ATP (2 - 5 μM) activate succinate dehydrogenase (SDH) but concentrations more than 30 μM inhibit it. Presented data supports the idea that enzyme regulation is provided by oscillations of cell metabolite concentrations.

Key words: Mitochondria – respiration – succinate dehydrogenase – light – regulation

ORIGINAL ARTICLE

**ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ****В. Н. Попов, А. Т. Епринцев, Д. Н. Федорин, Ю. А. Леонова***Воронежский государственный университет, Воронеж. 394006, Воронеж, Университетская пл., д.1. Воронежский госуниверситет*

fax: (0732) 20-87-55, e-mail: bc366@bio.vsu.ru;

Поступила в редакцию 13 июля 2005 г.

Фотосинтез и дыхание дают энергию растениям в разных световых условиях. В связи с этим, очень важно обеспечить тонкую регуляцию этих процессов. В данной работе нами показано падение активности сукцинатдегидрогеназы в интактных листьях на свету. Прямого действия света на очищенный фермент не обнаружено. Показано, что малые концентрации АТФ (2 - 5 мкМ) активировали сукцинатдегидрогеназу (СДГ), высокие концентрации (более 30 мкМ) - ингибировали. Полученные данные позволяют предположить, что регуляция фермента осуществляется через интермедиаты клеточного метаболизма.

Key words: Mitochondria – respiration – succinate dehydrogenase – light – regulation.

Взаимосвязь фотосинтеза и дыхания является необходимой для координации энергетического метаболизма в фотосинтезирующих тканях. Интенсивность функционирования цикла трикарбоновых кислот на свету длительное время остается дискуссионным вопросом. Традиционно считалось, что темновое дыхание, окислительный пентозофосфатный путь (ОПФП), гликолиз и окислительное фосфорилирование ингибируются светом (Филиппова и др., 1982, 1989; Raghavendra and Vani, 1994). Однако в последнее время появились работы, показывающие, что активность цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) в ассимилирующих клетках не лимитируется светом (Мамулишина и Зубкова, 1995). Большинство авторов считают, что часть окислительных процессов ингибируется на свету, но ЦТК продолжает функционировать, обеспечивая субстратом биосинтетические процессы (Шумилова и др., 1967; Заленский и др., 1985).

Несомненный интерес для исследования механизмов действия света на ферменты ЦТК представляет изучение прямого действия этого фактора на сукцинатдегидрогеназную систему. СДГ (сукцинат: убихинон оксидоредуктаза) – это мембранный белковый комплекс, одновременно обеспечивающий функционирование ЦТК и ЭТЦ (электронтранспортной цепи), и поэтому изучение влияния смешанного света на

функционирование цикла Кребса позволит выявить определенные механизмы регуляции окислительных процессов на ферментативном, мембранном и метаболическом уровнях. Целью нашей работы являлось изучение влияния света на активность сукцинатдегидрогеназной системы и выяснение его механизма в зеленых листьях кукурузы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали листья 7-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) с. "Воронежская 76", выращенные гидропонным методом с интенсивностью света 25 Дж/(м² с), 50 Дж/(м² с) и в полной темноте, при температуре 20°C и 14-часовом световом дне.

Растения, выращенные при интенсивности света 25 Дж/(м² с), являлись контрольными. Выращенные таким образом в течение 7 дней растения помещались в экспериментальные условия: для избыточного освещения (интенсивность фотосинтеза выходит на плато) использовали интенсивность света 50 Дж/(м² с); для создания условий темноты растения помещали в специализированную камеру со светонепроницаемыми стенками. Этилированные растения получали путем их выращивания в полной темноте. Для исключения влияния света на проведение опыта с этилированными растениями, все манипуляции с ними, по разрушению тканей, проводили в

темноте в специализированной установке.

Активность фермента, в серии опытов по влиянию света на проростки растения кукурузы, измеряли в гомогенате из листьев кукурузы. Для этого использовали среду выделения следующего состава: 50 мМ Трис-НСI буфер, (рН 7.5), содержащий 1 мМ ЭДТА, 10 мМ КСI, 1 мМ MgCl₂, 0,4 М сахарозы.

Далее, исследования влияние света на изолированную молекулу фермента и влияние интермедиатов клеточного метаболизма на активность сукцинатдегидрогеназы проводились на очищенном препарате СДГ.

Для очистки фермента применяли 4-х стадийную схему очистки. Навеску растительного материала (6г) гомогенизировали в соотношении 1: 5 со средой выделения описанной выше. Выделение митохондрий осуществляли дифференцированным центрифугированием (Землянухин и Землянухин, 1996). Осадок, содержащий в основном митохондрии и микротельца, ресуспендировали в 1 мл среды, содержащей 10 мМ фосфатный буфер (рН 7.8), 0,01% тритон Х-100, 20 мМ сукцинат натрия. Фракционирование сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Из митохондриальных белков выделяли 20-60 % фракцию насыщения сульфатом аммония. Полученный ферментативный препарат наносили на колонку, заполненную сефадексом G-25, для освобождения от низкомолекулярных примесей. Элюцию осуществляли 10 мМ фосфатным буфером (рН 7.8), содержащим 20 мМ сукцинат натрия, со скоростью 15-20 мл в час. Ионообменную хроматографию проводили на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенную 30мМ фосфатным буфером (рН 7.8), содержащим 30 мМ КСI. Фермент десорбировали с колонки ступенчатым градиентом концентрации КСI в среде элюирования. При этом фермент десорбировали 75 мМ КСI в 20 мМ фосфатном буфере (рН 6.2), содержащем 20 мМ сукцинат.

Активность СДГ определяли методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом (Cooper and Beevers, 1969). Активность фермента рассчитывали по падению оптической плотности среды спектрофотометрирования при длине волны 600 нм, обусловленному обесцвечиванием ДХФИФ в ходе его восстановления (Cooper and Beevers, 1969).

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 микромоль продукта за 1 мин при 25°C. Общее количество белка определяли по методу Лоури (Котляр, 1990).

Неденатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Davis (Davis, 1994). Разделяющий гель содержал Трис-НСI, рН 8,3, ТЕМЕД, акриламидную смесь (30 % АСА / 0,8 % МВА), персульфат аммония.

Концентрирующий гель содержал Трис-НСI рН 6,7, ТЕМЕД, акриламидную смесь (10 % АСА / 2,5 % МВА). Концентрация концентрирующего геля составляла 6 %, а разделяющего - 12,5 %.

Идентификацию белка проводили нитратом серебра по следующей методике:

1. Фиксация. Гель помещали в раствор, содержащий 50 % ацетона, 1,5 % ТХУ, 0,2 % формальдегид. Отмывали водой 5-10 мин.
2. Гель помещали в 50 % ацетон на 5-10 мин. После этого отмывали водой несколько раз.
3. После этого пластику геля инкубировали в 0,02 % растворе тиосульфата натрия 1 мин., после чего отмывали водой в течение 5 мин.
4. На следующей стадии гель помещали на 8 мин. в раствор, содержащий 0,2 % нитрата серебра и 0,1 % формальдегида. После, отмывали водой 3 – 5 раз по 2 мин.
5. Проявление геля проводили в растворе, содержащем 0,7 % бикарбоната натрия, 0,01 % формальдегида. Окраску геля осуществляли до появления полос, после чего помещали его в 7 % уксусную кислоту.

Электродный буфер представлял собой смесь 0,5 М Трис-глицинового буфера рН 8,3. Напряжение электрического тока подбиралась из расчета 5 мА на 1 слот.

Опыты проводили в 3-4 кратной биологической повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Для подтверждения достоверности результатов определений применяли методы вариационной статистики. Обсуждаются различия статистически достоверные при $p < 0.05$ (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение влияния света на активность СДГ в зеленых листьях кукурузы

Зеленые контрольные растения кукурузы поместили в условия интенсивного освещения (50 Дж/(м² с), при этом наблюдалась следующая картина. Как следует из рис. 1 в течение первых суток активность СДГ в листьях проростков кукурузы уменьшилась в 1.4 раза по отношению к контрольным растениям, выращенным при интенсивности света 25 Дж/(м² с). У контрольных растений, помещенных в темноту, интенсивность работы СДГ увеличилась в 1,6 раза. Максимальная активность фермента наблюдалась на вторые сутки инкубации в темноте и была в 2.5 раза больше по сравнению с контролем (25 Дж/м² с). При инкубации растений в условиях повышенной освещенности (50 Дж/м² с) происходило постепенное снижение активности СДГ, которое составило для кукурузы 50%.

Влияние светового режима на активность СДГ в листьях кукурузы, экспонируемой в условиях «свет-темнота»

При помещении зеленых проростков кукурузы, подвергшихся 24-часовой инкубации в темноте, в условия интенсивного освещения наблюдалась следующая картина. В первые полчаса инсоляции происходило возрастание активности СДГ в 1.35 раза (рис. 2). Затем в течение следующих двух часов происходило резкое снижение активности фермента. Активность СДГ из листьев кукурузы понизилась на 58% относительно контроля (темнота). Далее активность фермента стабилизировалась, и после 9 часов интенсивного освещения составила 51 % от контроля.

Динамика активности исследуемого фермента в процессе зеленения этиолированных проростков представлена на рис. 3. Видно, что в этиолированных проростках кукурузы при их освещении наблюдается значительное падение активности СДГ, что, по-видимому, связано со снижением роли цикла Кребса как поставщика восстановленных коферментов (НАДН) в связи инициацией фотосинтетического процесса.

Так после 48 часов экспозиции растений на свету, активность фермента составляла 47% от контрольного уровня.

Влияние света на активность изолированного препарата СДГ

Из литературных данных известно, что флавиновые ферменты, к числу которых относится СДГ, способны поглощать видимый свет в области 390 – 475нм. Поэтому одним из возможных механизмов фоторегуляции активности СДГ нами рассматривалось непосредственное действие смешанного света на изолированную молекулу фермента.

С целью получения чистого ферментативного препарата была проведена 4-х стадийная очистка СДГ из листьев кукурузы. Результаты типичной очистки представлены в таблице 1. СДГ из листьев кукурузы была очищена в 73 раза с выходом 26%. Удельная активность ферментативного препарата составила 4.7 ФЕ/мг белка.

С помощью электрофореза в полиакриламидном геле и окраски белка нитратом серебра было показано, что после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-фрактогеле получен гомогенный фермент, о чем свидетельствует наличие одной полосы на геле с $R_f = 0,41$ (рис. 4).

Для выяснения механизма действия света на активность СДГ чистый ферментативный препарат в виде раствора, полученный из листьев кукурузы, выдерживали в течение 5 мин при различной интенсивности освещения.

Во всех вариантах опытов (при освещении 50 Дж/(м² с), 25 Дж/(м² с)) достоверных различий в активности фермента не было выявлено.

Влияние АТФ на активность сукцинатдегидрогеназы

Для выяснения косвенного действия света на

СДГ, через продукты фотосинтеза, было изучено действие АТФ на активность фермента. Известно, что АТФ является регулятором работы ЭТЦ и дыхания в целом (Котляр, 1990; Vinogradov *et al.*, 1980). В ходе экспериментов установлено, что АТФ оказывает активирующее действие на окисление сукцината ферментом сукцинатдегидрогеназой (рис. 5). Активность СДГ измеряли в среде с тремя различными концентрациями сукцината. В среде, содержащей 2 мМ сукцината, максимальное увеличение активности наблюдали при концентрации АТФ, равной 5 мкМ. Активность СДГ при этом возрастала в 1.9 раза. При дальнейшем повышении концентрации АТФ обнаруживали понижение активности ниже контрольного уровня. При количестве сукцината в среде 5 мМ пик активности приходился на концентрацию АТФ, равную 2 мкМ. Активность СДГ возрастала в 2.3 раза. При содержании 10 мМ сукцината в среде также наблюдали активацию СДГ при концентрации АТФ, равной 2 мкМ. Активность исследуемого фермента возрастала в 3 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Свет является ключевым фактором, регулирующим биоэнергетику зеленых растений. Интенсивность протекания фотосинтетических и дыхательных процессов в клетке должна быть сбалансированной и определяться световым режимом.

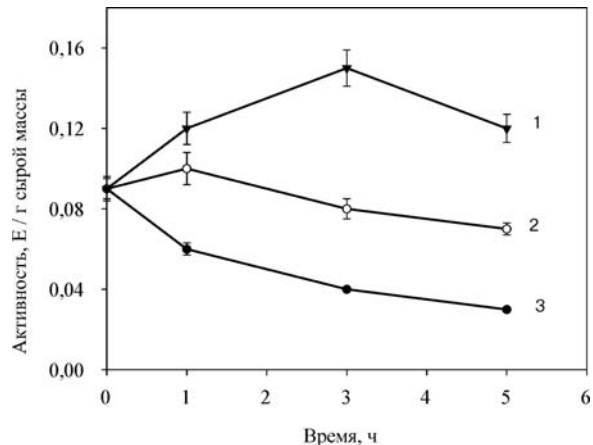


Рис. 1. Влияние интенсивности света на активность неочищенного препарата из зеленых листьев кукурузы: 1 – зеленые проростки, помещенные в темноту; 2 – освещение 25 Дж/(м² с) (контроль); 3 – освещение 50 Дж/(м² с).

Полученные нами данные по влиянию светового режима на активность ключевого фермента цикла Кребса и компонента электронтранспортной цепи митохондрий СДГ в зеленых растениях позволили показать, что его активность снижается при интенсивном освещении. Данный фермент сохраняет 40-50% своей активности при высокой освещенности, насыщающей фотосинтетическую ЭТЦ, когда

основным источником энергии являются хлоропласты. Неполное ингибирование может объясняться тем, что митохондрии в клетке обеспечивают не только синтез АТФ и восстановленных пуриновых нуклеотидов, но и множественные анаэробические реакции, в частности синтез некоторых аминокислот, пигментов, вторичных метаболитов (Гудвин и Мерсер, 1986). Торможение интенсивным светом сукцинатдегидрогеназной реакции, скорее всего, связано с тем, что по мере увеличения интенсивности и активации

реакций фотофосфорилирования роль дыхания в общем энергетическом обеспечении клетки резко снижается.

Особый интерес представляет двукратное увеличение активности СДГ в первые минуты после перехода от темноты к свету. Активация работы фотосинтетической ЭТЦ при переходе растений на свет требует увеличения скорости работы цикла Кальвина (Cooper and Beevers, 1969). Вероятно, в этих условиях в клетке происходит активация ЦТК для метаболизации

Таблица 1.

Очистка СДГ из листьев кукурузы.

Стадия	Количество белка, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	94.8±4,74	5.76±0,3	0.061±0,004	100	1
Митохондрии	5.25±0,26	1.95±0,10	0.371±0,019	34	6,08
Фракционирование сульфатом аммония 20-60% насыщения	2.19±0,11	1.47±0,07	0.672±0,034	26	11.02
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	0.57±0,03	0.70±0,03	1.235±0,062	12	20.25
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-фрактогеле	0.34±0,02	1.51±0,07	4.467±0,223	26	73.23

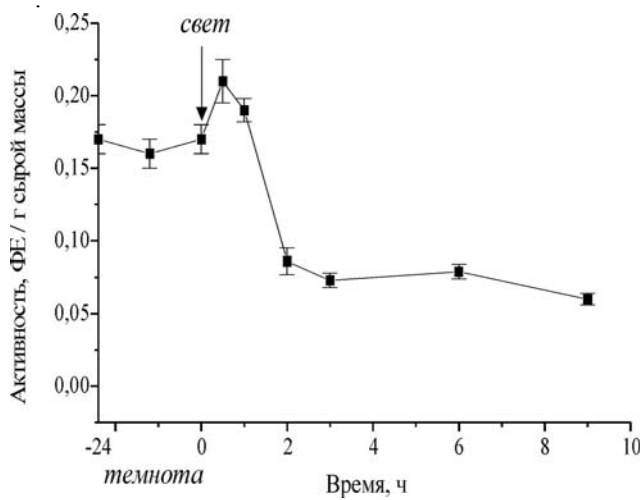


Рис. 2. Динамика активности СДГ при переходе темнота-свет в листьях 7-дневных проростков кукурузы

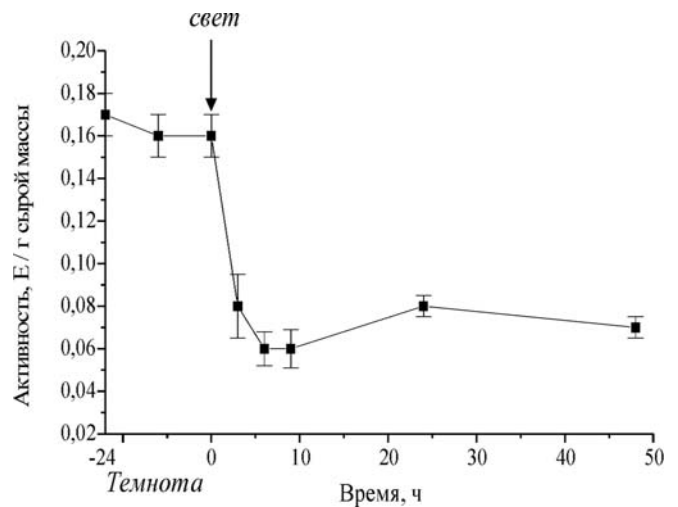


Рис. 3. Изучение активности СДГ при зелении этиолированных 7-дневных проростков кукурузы..



Рис.4. Неденатурирующий электрофорез очищенного препарата СДГ из листьев кукурузы.

запасных органических кислот (в первую очередь цитрата, так как малат может мобилизовываться при помощи системы малик-энзимов) и их превращения в триозы через фосфоенолпируват по глюконеогенетическому пути.

Принципиально важным является выявление механизмов регуляции активности СДГ при изменении светового режима. Изучение влияния света разной интенсивности на электрофоретически гомогенный препарат СДГ не привело к достоверным изменениям активности фермента, что позволяет исключить возможность прямого регуляторного действия света.

Одним из ключевых параметров, характеризующих биоэнергетику клетки, является изменение соотношения АТФ/АДФ. Накопление АТФ подавляет митохондриальное дыхание при концентрации более 10 мкМ, что может объясняться феноменом так называемого “дыхательного контроля”, когда при дефиците АДФ и избытке АТФ увеличивается мембранный потенциал и затрудняется движение электронов к терминальному акцептору по ЭТЦ (Скулачев, 1990). С другой стороны, Affourtit и др. (Affourtit et al., 2001) показали, что АТФ в концентрациях (10-150 мкМ) является активатором окисления сукцината растительными митохондриями, стимулируя сукцинатдегидрогеназу. Эти данные были получены при добавлении АТФ к изолированным митохондриям, когда доступность фермента определяется системой транспорта нуклеотидов, а мы показали активацию очищенного препарата СДГ только

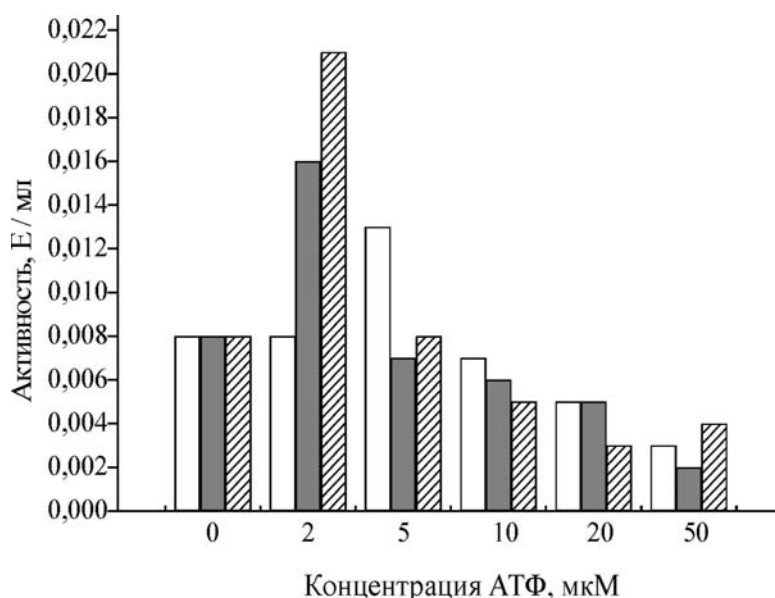


Рис.5. Влияние разных концентраций АТФ на активность очищенной сукцинат-дегидрогеназы при концентрации сукцината в среде 2 мМ (первые столбцы), 5 мМ (вторые столбцы) и 10 мМ (третьи столбцы).

малыми концентрациями (2–5 мкМ) АТФ, тогда как дальнейшее повышение концентрации АТФ до 50 мкМ и выше снижает активность фермента. Ранее с использованием методов быстрого фракционирования органелл было показано, что концентрация АТФ при интенсивном освещении может подниматься с десятков микромолей до 1 мМ (Gardstrom and Wigger, 1988; Igamberdiev *et al.*, 1998). Таким образом, одним из механизмов изменения активности СДГ при изменении освещенности может быть вариация концентрации АТФ.

Еще одним возможным механизмом изменения активности СДГ может быть участие специальных фоторецепторных систем, характерных для растений. Это могут быть криптохромы, чувствительные к синему и ближнему ультрафиолетовому свету, NPH1 рецептор, контролирующий фототропизм и чувствительный к синему свету и семейство фитохромов, рецептирующих красный и дальний красный свет, изменяющих концентраций цАМФ и цГМР и регулирующих экспрессию ряда генов (Fankhauser, 2001). Однако в настоящее время еще нет достоверных данных о специфичном воздействии на СДГ света различной длины волны.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о том, что активность сукцинатдегидрогеназы зависит от светового режима, снижаясь при интенсивной освещенности более чем в 2 раза. Возможно, влияние света опосредовано через изменение концентрации АТФ, обеспечивающего

одновременную регуляцию таких важных процессов как дыхание и фотосинтез.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 04-04-48344-а)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гудвин, Т., Мерсер, Э. (1986) Введение в биохимию растений: В 2 т. // Пер. с англ. А.О. Ганаго и др., Под ред. В.А.Кретовича. М.: Мир.
- Заленский, О.В., Зубкова, Е.К., Мамушина, Н.С. и др. (1985) О метаболических связях между циклом Кальвина и циклом Кребса. *Физиол. и биохим. культурных раст.*, **17(3)**, 253–256.
- Землянухин, А.А., Землянухин, Л.А. (1996) Большой практикум по физиологии растений. Учеб. пособие. Воронеж: Изд-во Воронежского университета. 188 с.
- Котляр, А.В. (1990) Активация комплекса I в реакции окисления НАДН и в H-зависимом восстановлении НАД сукцинатом. *Биохимия*. **55(2)**, 195–200.
- Лакин, Г.Ф. (1990) Биометрия. М.: Высш. шк., 351 с.
- Мамушина, Н.С., Зубкова, Б.К. (1995) Функционирование основных этапов темного дыхания на свету у C₃ растений с разным сезонным ритмом. *Физиология раст.*, **42(1)**, 30 – 37.
- Рубин, А.Б., Кренделева, Т.Е. (2003) Регуляция первичных процессов. *Успехи биологической химии*. **43**, 225–266.
- Скулачев, В.П. (1990) Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. Биохимия мембран. М.: Высш. школа.
- Филиппова, Л.А., Мамушина, Н.С., Заленский, О.В. (1982) О функционировании основных этапов темного дыхания во время фотосинтеза. *Ботан. журнал.*, **67(9)**, 1169 – 1178.
- Филиппова, Л.А., Мамушина, Н.С., Зубкова, Б.К. (1989) Развитие представлений о взаимосвязи фотосинтеза и дыхания. В: Эколого-физиологическое исследование фотосинтеза и дыхания растений. Л.: Наука, С. 168 – 183.
- Шумилова, А.А., Федосенко, А.А., Степанова, А.М. (1967) Влияние света на функционирование цикла Кребса в листьях кукурузы. *Биол. науки*, **9**, 87.
- Affourtit, C., Krab, K., Leach, G.R., Whitehouse, D.G. and Moore, A.L. (2001) New insights into the regulation of plant succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **276(35)**, 32567–32574.
- Cooper, T.G. and Beevers, H.J. (1969) Biol. Chem. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.* **244(13)**, 3507–3513.
- Davis, B.J. (1994) Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404–427.
- Fankhauser, C. (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11453–11456.
- Gardeström, P. and Wigge, B. (1988) Influence of photorespiration on ATP/ADP ratios in the chloroplasts, mitochondria, and cytosol, studies by rapid fractionation of barley (*Hordeum vulgare*) protoplasts. *Plant Physiol.*, **88**, 69–76.
- Igamberdiev, A. U., Hurry, V., Krömer, S. and Gardeström, P. (1988) The role of mitochondrial electron transport during photosynthetic induction. A study with barley (*Hordeum vulgare*) protoplasts incubated with rotenone and oligomycin. *Physiol. Plant.*, **104**, 431–439.
- Raghavendra, A.S. and Vani, T. (1994) Links high mitochondrial activity but incomplete engagement of the cyanide-resistant alternative pathway in guard cell protoplasts of pea. *Plant Physiol.*, **105(4)**, 1263–1268.
- Vinogradov, A.D. Gavricov, V.G. and Gavricova, E.V. (1980) Studies on the succinate dehydrogenating system. 2 Reconstruction of succinate-ubichinon reductase from the soluble components. *Biochem. and Biophys. Acta*. **545(1)**, 13–27..