

УДК 581.143.6+577.151.5

А.В. НЕРКАРАЯН, Р.Р. ВАРДАПЕТЯН, А.Б. КИРАКОСЯН

## ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР

Определены общая активность и изоферментный состав лактатдегидрогеназы (ЛДГ) органов проростков и клеточных культур пшеницы, щиряцы и их соматического гибрида. Рассчитаны относительные активности изоферментов ЛДГ. Показано, что использование общепринятых методик в расчете активности и количественного соотношения отдельных изоферментов не позволяет выявлять истинные значения данных параметров. Показано, что количественные соотношения отдельных субъединиц (Н/М) отражают морфогенетические потенции индивидуальных и гибридных каллусных культур. Обсуждается возможность использования количественного и качественного изоферментного состава в качестве экспресс-теста морфогенетических потенций и регенерационных способностей клеточных культур.

Одним из направлений в исследованиях культуры клеток высших растений являются изучение особенностей метаболизма, сравнение физико-химических характеристик, интенсивностей их роста и развития. Соматическая гибридизация открывает возможность получения новых жизнеспособных гибридных форм между таксономически отдаленными видами растений. Ранее путем слияния протопластов нами были получены жизнеспособные межсемейственные гибриды пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и щиряцы (*Amaranthus retroflexus* C.) и показано, что полученные межсемейственные гибридные каллусы обладают высокой скоростью роста и имеют ряд морфогенетических и фенотипических особенностей, которые сохраняются при длительном пассировании [1].

Изучение общей активности и изоэнзимных спектров ряда ключевых ферментов у родительских видов и гибрида позволяет получать общую информацию о гибридности растений, развившихся из слившихся протопластов [2]. Однако такая информация нередко бывает весьма общей из-за того, что генетический контроль молекулярных форм большинства ферментов растений подробно не изучался; исключение в этом отношении составляет ряд ферментов, в том числе лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Другая сложность, возникающая при использовании изоэнзимных спектров для анализа гибридов, заключается в выраженной физиологической изменчивости тех или иных изоферментов и зависимости экспрессии кодирующих их генов от дифференцировки клеток. Тем не менее подобные исследования могут быть весьма информативными.

Существование ЛДГ в генетически детерминированных множественных

молекулярных формах, обладающих различными физико-химическими характеристиками, обеспечивает непрерывное протекание метаболических процессов в условиях и аэробного, и анаэробного метаболизма. Множественные молекулярные формы являются одним из необходимых факторов, обеспечивающих существование клетки как саморегулирующейся системы.

Известно, что множественные молекулярные формы ЛДГ животных [3, 4] и растений [5–7] образуются при ассоциации *in vivo* продуктов неаллельных генов *Ldh 1* и *Ldh 2*, кодирующих синтез субъединиц двух типов – Н и М. Спектр изоферментов ЛДГ соматических клеток большинства позвоночных, а также тканей двудольных и однодольных растений состоит из пяти фракций, количественное соотношение которых варьирует в зависимости от активности *Ldh 1* и *Ldh 2*. Изоферментный спектр ЛДГ клеток определяется не только активностью генов, кодирующих синтез субъединиц фермента, но и рядом других факторов. Каждый тип клеток имеет характерную скорость синтеза и распада изоферментов, чем и объясняется тканевая специфичность спектра ЛДГ. Показано, что изофермент М<sub>4</sub> в печени крыс синтезируется в 32 раза быстрее, чем в сердце, и в 13 раз быстрее, чем в скелетной мышце. Скорость распада этого изофермента в сердечной мышце в 10 раз выше, чем в печени, и в 22 раза выше, чем в скелетной мышце [4]. Скорость обоих процессов может варьировать в зависимости от степени дифференцировки клетки. Регулироваться она может как на уровне трансляции, так и на эпигенетическом уровне при действии модификаторов, изменяющих скорость диссоциации и реассоциации тетрамеров. Фенотипическое проявление активности генов, кодирующих синтез субъединиц ЛДГ, может быть обусловлено также работой генов-регуляторов [8,9], наличием факторов, избирательно инактивирующих определенные субъединицы [10], нарушающих гибридизацию М и Н субъединиц [7].

Все вышесказанное свидетельствует о лабильности регуляции синтеза ЛДГ, зависимости ее от параметров среды, а следовательно, и от состояния системы, в которой она имеет место.

Целью настоящей работы явились исследование общей активности и изоферментного состава ЛДГ клеточных культур пшеницы, щиряцы и их соматического гибрида, а также оценка возможности использования ЛДГ в качестве маркерного фермента для раннего определения их морфогенетических потенций.

**Материалы и методы.** В качестве объекта использовали корни и стебли проростков, а также суспензионные и каллусные культуры пшеницы (*T. aestivum*) и щиряцы (*A. retroflexus*). Суспензионные и каллусные культуры получали из 4-дневных проростков по методу [1]. Через 7 дней проводили пересев клеточных культур по 10 мл в новую питательную среду. При этом клеточные культуры сохраняли способность к регенерации до 8 месяцев.

Морфогенетический контроль проводили проверкой способности культур к повторной трансформации проростка [1]. Регенерацию растений из эмбриогенных каллусных тканей получали на среде, содержащей макро- и микросоли по MS [11], с добавлением тиамина – 1 мг/л, мио-инозитола – 80 мг/л, индолуксусной кислоты (ИУК) – 1 мг/л, зеатина – 1 мг/л (все реактивы фирмы “Sigma”), сахарозы – 3% и агар-агара – 0.7% при pH 5.8. Эмбриогенные каллусные ткани культивировали при 26°C, 70%-ной относительной влажности воздуха и постоянном освещении с интенсивностью 400лк. Сус-

пензионные культуры инкубировали на качалке при 100 об/мин.

Растительный материал (корни и стебли проростков) растирали в предварительно охлажденной ступке, добавляя 0.15 М трисНСI буфер, содержащий 10 мМ DTT и 1 мМ PMSF, рН 8.0, из расчета 0.2 мл на 100 мг влажного веса. Экстракцию проводили на магнитной мешалке в холодных условиях в течение 30 минут. Экстракт центрифугировали 20 мин. при 18000 g.

Клетки из суспензионной культуры осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. Осадок дважды промывали 0.15 М трисНСI буфером, рН 8.0, клетки разрушали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком, а экстракцию проводили в вышеописанных условиях.

Общую активность ЛДГ определяли в реакции восстановления пирувата Na в присутствии НАДН [12]. Разделение изоферментов проводили методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле по методу Дитц и Лубрано. Для выявления изоферментов ЛДГ проводили специфическое окрашивание гелей с использованием реакции окисления лактата Na в присутствии НАД [13]. После окрашивания последние фиксировали в 7% уксусной кислоте. Количественное соотношение изоферментов ЛДГ определяли после денситометрирования окрашенных гелей по соотношению площадей пиков на денситограммах.

Площади пиков рассчитывали по формуле  $S = \frac{a}{2} \log H$ , где H – высота, a/2 – полуширина, а S – площадь пика.

Содержание отдельных субъединиц рассчитывали по формуле [13]. Статистическая обработка проводилась по формуле  $A = M \pm m$ , где A – наиболее вероятное значение, M – среднеарифметическое значение, m – среднеквадратичная ошибка.

Относительную активность изоферментов определяли по формуле  $V_c = V_{\max} (e^{-K_a C} - 1)$ , где  $V_c$  – активность фермента при данной концентрации субстрата (C),  $V_{\max}$  – максимальная активность фермента, а  $K_a$  – коэффициент, характерный для конкретного фермента, численно равный  $K_m$  при

$$V_c = \frac{1}{2} V_{\max}.$$

Количество белка в экстрактах определяли по методу Лоури.

**Результаты и обсуждение.** Различия по спектру изоферментов между отдельными органами и тканями растений обычно связывают с существованием разных субстратов или (в более широком смысле) с особенностями обмена конкретного органа или ткани. По-видимому, это вполне оправдано, так как, хотя клетки всех тканей и несут одинаковую генетическую информацию, их нельзя представлять одинаковыми, поскольку синтез ферментных белков остается специфическим и строго регулируемым вследствие того, что соотношение активных и нефункционирующих генов в разных тканях неодинаково.

Известно, что множественные молекулярные формы ЛДГ генетически детерминированы и изменение количественного соотношения изоферментов, по-видимому, является фенотипическим проявлением изменения отношения активностей *Ldh1* и *Ldh2* [14, 15].

Используя значения активности и количественные соотношения отдельных изоферментов, можно получить приблизительное соотношение актив-

ностей *Ldh1* и *Ldh2*. Общим недостатком подобных исследований является то, что обычно не учитывается специфическая активность отдельных изоферментов. Это вносит существенную погрешность в определение активности отдельных генов. Определение истинной активности отдельных генов становится чрезвычайно актуальным при оценке жизнеспособности, генетических особенностей и морфогенетических потенций гибридных организмов.

В табл. 1 приведены значения  $K_M$  и относительной активности отдельных изоферментов ЛДГ с использованием двух различных субстратов – пирувата и лактата. Сравнение экспериментальных величин  $K_M$  для пирувата и лактата [12] с рассчитанными на основе полученных нами данных выявило существенные отличия в вышеуказанных параметрах отдельных изоферментов. Расчет относительных активностей отдельных изоферментов в определяемой общей активности ЛДГ показал, что в обоих случаях максимальную активность проявляет изофермент  $H_4$ , минимальную –  $M_4$ , а разница в активности достигает 2,85 и 4,69 раз для лактата и пирувата соответственно.

Таблица 1

Значения  $K_M$  и относительной к фракции  $M_4$  активности отдельных изоферментов ЛДГ

| ИФ       | Лактат |        |           | Пируват |        |           |
|----------|--------|--------|-----------|---------|--------|-----------|
|          | $K_M$  |        | отн. акт. | $K_M$   |        | отн. акт. |
|          | эсп.   | рассч. |           | эсп.    | рассч. |           |
| $H_4$    | 30.0   | 29.60  | 2.85      | 0.40    | 0.42   | 4.69      |
| $H_3M_1$ | 22.5   | 22.69  | 2.41      | 0.37    | 0.35   | 4.27      |
| $H_2M_2$ | 16.5   | 16.58  | 1.93      | 0.29    | 0.28   | 3.65      |
| $H_1M_3$ | 11.3   | 11.42  | 1.44      | 0.18    | 0.19   | 2.73      |
| $M_4$    | 7.5    | 7.43   | 1.00      | 0.07    | 0.06   | 1.00      |

Таблица 2

Процентное содержание изоферментов ЛДГ отдельных органов проростков и каллусных культур пшеницы и щирца

| ИФ       | Пшеница |      |         |      |        |      | Щирца  |      |         |      |        |      |
|----------|---------|------|---------|------|--------|------|--------|------|---------|------|--------|------|
|          | корень  |      | стебель |      | каллус |      | корень |      | стебель |      | каллус |      |
|          | рассч.  | эсп. | рассч.  | эсп. | рассч. | эсп. | рассч. | эсп. | рассч.  | эсп. | рассч. | эсп. |
| $H_4$    | 4.6     | 8.1  | 10.1    | 15.9 | 5.4    | 9.0  | 0      | 0    | 18.9    | 29.1 | 16.3   | 24.9 |
| $H_3M_1$ | 16.3    | 23.9 | 15.7    | 21.0 | 17.7   | 25.0 | 47.3   | 55.0 | 22.3    | 28.9 | 17.8   | 23.1 |
| $H_2M_2$ | 20.4    | 24.0 | 33.6    | 36.0 | 26.5   | 30.0 | 35.4   | 33.0 | 14.4    | 15.0 | 24.1   | 25.0 |
| $H_1M_3$ | 30.8    | 27.0 | 18.8    | 15.0 | 24.8   | 20.9 | 17.3   | 12.0 | 12.9    | 10.0 | 19.4   | 15.0 |
| $M_4$    | 27.9    | 17.0 | 21.8    | 12.1 | 25.6   | 15.1 | 0      | 0    | 31.5    | 17.0 | 22.3   | 12.0 |
| H/M      | 0.53    | 0.81 | 0.76    | 1.15 | 0.62   | 0.92 | 1.35   | 1.55 | 0.86    | 1.55 | 0.87   | 1.41 |

С учетом величин относительных активностей отдельных изоферментов рассчитано истинное процентное содержание последних в исследуемых объектах. Рассчитаны также отношения активности генов *Ldh1* и *Ldh2* (H/M) на основе экспериментального и расчетного изоферментных спектров ЛДГ (табл. 2).

Как видно из табл. 2, истинное количество отдельных изоферментов значительно отличается от получаемых общепринятыми методами величин. Так, если на денситограмме в изоферментном спектре ЛДГ корней проростков пшеницы изофермент  $H_4$  составляет 8,1% от общего содержания изоферментов, а  $M_4$  – 17,0%, то в расчетном изоферментном спектре их содержание соответственно – 4,6 и 27,9%. Столь значительные отличия свидетельствуют о необходимости учитывать относительные активности всех изоферментов для более точного расчета вклада каждого из них в общую активность ЛДГ. Значительны также различия в соотношении содержания отдельных субъединиц.

Существенные различия в содержании отдельных изоферментов ЛДГ в корнях и стеблях проростков указывают на достаточно высокую органоспецифичность фермента. Особенно отчетливо эта разница проявляется у ширицы, в корнях которой практически отсутствуют изоферменты  $H_4$  и  $M_4$ . Интересные закономерности проявляются при определении изоферментного спектра каллусных культур. Если содержание изоферментов в каллусных культурах пшеницы занимает промежуточное положение между их количествами в корнях и стеблях проростков, то в каллусных культурах ширицы они резко отличаются. Особенности проявляются также при сравнении истинных соотношений содержания отдельных мономеров. Так, величина количественного отношения мономеров ЛДГ в каллусных культурах пшеницы (0,62) занимает промежуточное положение между их величинами в корнях и стеблях проростков, а в каллусных культурах и стеблях проростков ширицы эти величины практически не отличаются (0,87 и 0,86 соответственно). Учитывая, что при регенерации каллусов пшеницы образуется полноценный организм, а каллусной культуры ширицы – побеговая культура, можно предположить, что количественное соотношение мономеров указывает на морфогенетические потенции *in vitro* культур.

Таблица 3

Содержание и активность отдельных изоферментов ЛДГ в каллусных культурах пшеницы, ширицы и их соматического гибрида

| ИФ       | Пшеница |       |       | Ширица |       |       | Гибрид |       |       |
|----------|---------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|          | %       | $A_1$ | $A_2$ | %      | $A_1$ | $A_2$ | %      | $A_1$ | $A_2$ |
| $H_4$    | 5.4     | 0.013 | 0.008 | 16.3   | 0.033 | 0.020 | 16.3   | 0.138 | 0.084 |
| $H_2M_1$ | 17.7    | 0.040 | 0.023 | 17.8   | 0.033 | 0.019 | 17.8   | 0.137 | 0.077 |
| $H_2M_2$ | 26.5    | 0.051 | 0.027 | 24.1   | 0.038 | 0.020 | 25.3   | 0.167 | 0.088 |
| $H_1M_3$ | 24.8    | 0.036 | 0.014 | 19.4   | 0.023 | 0.012 | 19.4   | 0.096 | 0.051 |
| $M_4$    | 25.6    | 0.013 | 0.013 | 22.3   | 0.010 | 0.010 | 21.2   | 0.038 | 0.038 |
| $\Sigma$ | 100     | 0.153 | 0.085 | 100    | 0.138 | 0.081 | 100    | 0.577 | 0.338 |
| H/M      | 0.62    |       |       | 0.87   |       |       | 0.89   |       |       |

$A_1$  и  $A_2$  – активность фермента при использовании в качестве субстрата пирувата и лактата соответственно

В результате соматической гибридизации пшеницы и ширицы нами были получены межсемейственные гибридные каллусные культуры, обладающие высокой скоростью роста и хорошими морфогенетическими потенциями [1]. Известно, что одним из наилучших критериев успешного получения

гибридных организмов являются общая активность и изоферментный спектр маркерных ферментов. Из полученных результатов следует, что ЛДГ обладает высокой видовой и тканевой специфичностью, что делает возможным ее использование в качестве ферментативного маркера для исследования гибридных организмов. В табл.3 приведены результаты исследования гибридных организмов и определения общей активности ЛДГ каллусных культур пшеницы, щиряцы и их соматического гибрида. У гибридного организма содержание изоферментов  $H_3M_1$ ,  $H_2M_2$  и  $H_1M_3$  практически не отличается от содержания их в донорских организмах. Наибольшие отличия наблюдаются во фракциях  $H_4$  и  $M_4$ , которые по своему содержанию полностью соответствуют каллусной культуре щиряцы. Необходимо также отметить, что гибридный каллус как своей морфологией, так и потенциями очень похож на каллус щиряцы. Об этом свидетельствует также количественное соотношение Н и М субъединиц.

Таким образом, из наших результатов следует, что как активность отдельных изоферментов ЛДГ, так и количественное соотношение Н и М субъединиц являются высокоспецифичными параметрами для каждого организма. При их расчетах необходимо учитывать специфическую активность каждого изофермента. Соотношение Н и М субъединиц в каллусных культурах указывает как на его морфогенетические потенции, так и на участие каждого донора в формировании гибридного организма. Эти результаты особенно ценны, поскольку регенерация очень длительный процесс (иногда несколько месяцев) и ее результаты можно прогнозировать, используя ЛДГ-тест.

*Кафедра биофизики*

*Поступила 14.09.2000*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Vardapetyan H.R., Kirakosyan A.B., Charchoglyan A.G., Tiratsuyan S.G., Alexanyan S.K. – Russian Journal of Plant Physiology, 1998, v.45, №5, pp.624–627.
2. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев, Наукова думка, 1984.
3. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Аронштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П. Генетика изоферментов. М.: Наука, 1977.
4. Fritz P.J., White E.L., Vesell E.S., Prullt K.M. – Nature, New. Biol., 1971, v.230, №12, pp. 119–122.
5. Good A., Crosby W. – Plant Physiol., 1989, v.90, pp. 860–866.
6. Hoffman N.E., Hanson A.D. – Plant Physiology, 1986, v.82, p.664–670.
7. Сафонова Е.Е., Губерниева Л.М., Волкова Н.М., Мамаев В.Б., Анненков Т.А. – Биохимия, 1978, т.43, №2, с. 268–273.
8. Russel E.S., McFarland E.C. – Ann. N.Y. Acad. Sci., 1974, v.241, pp.25–38.
9. Серов О.Л., Хлебодарова Т.М. – Генетика, 1973, т.9, №12, с. 45–48.
10. Nagamine M. – Chin. Chem. Acta, 1974, v.50, №1, pp.173–179.
11. Murashige T., Skoog F. – Physiol. Plant., 1962, v.15, pp. 473–497.
12. Asker N., Davies D.D. – Planta, 1984, v.161, pp. 272–280.
13. Неркарарян А.В., Паносян Г.А. – Биолог. ж. Армении, 1979, т.32, №4, с.337–345.
14. Bayle S.A., Yeung E.C. – Phytochemistry, 1983, v.22, №11, pp. 2413–2416.
15. Tihany K., Fontanell A., Talbot B., Thirion J.P. – Arch. Biochem. and Biophys., 1989, v.274, №2, pp.626–632.

ԼԱԿՏԱՏԴԵՀԻԴՐՈԳԵՆԱԶԻ ԻՉՈՖԵՐՄԵՆՏԱՅԻՆ ԿԱԶՄԸ ԵՎ  
ԿԱԼՈՒՍԱՅԻՆ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՄՈՐՖՈԳԵՆԵՏԻԿ  
ՀՆԱՐԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ամփոփում

Որոշվել են ցորենի և հավակատարի ծիլերի օրգանների և բջջային կուլտուրաների, ինչպես նաև դրանց ստմատիկ հիբրիդի լակտատդեհիդրոգենազի (ԼԴՀ) ընդհանուր ակտիվությունը և իզոֆերմենտային կազմը: Հաշվվել են ԼԴՀ-ի իզոֆերմենտների հարաբերական ակտիվությունները: Ցույց է տրվել, որ ակտիվության և առանձին իզոֆերմենտների քանակական հարաբերության որոշման համար ընդունված մեթոդների կիրառումը թույլ չի տալիս բացահայտել տվյալ բնութագրիչների իրական արժեքները:

Ցույց է տրվել, որ առանձին ենթամիավորների քանակական հարաբերությունները (H/M) արտացոլում են անհատական և հիբրիդային կալուսային կուլտուրաների մորֆոգենետիկ հնարավորությունները: Զննարկվում է բջջային կուլտուրաների մորֆոգենետիկ հնարավորությունների և ռեգեներացիոն ունակությունների որոշման համար որպես էքսպրես-տեստ իզոֆերմենտների քանակական և որակական կազմի օգտագործման հնարավորությունը:

A.V. NERKARARIAN, H.R. VARDAPETIAN, A.B. KIRAKOSIAN

LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES PATTERN AND  
MORPHOGENETIC POTENTIALS OF THE CALLUS CULTURES

Summary

Lactate dehydrogenase (LDH) total activity and isoenzymes pattern were determined in organs of germs and cell cultures of wheat, amaranth, as well as in their somatic hybrid. The LDH isoenzymes relative activities were calculated. It was shown that the application of common methods of assay of the individual isoenzymes activities and quantitative ratio does not permit to reveal the true value of these parameters. It was shown that the quantitative ratios of separate subunits (H/M) reflect the morphogenetic potentials of the individual and hybrid callus cultures.

The possibility of the application of isoenzymes quantitative and qualitative pattern as express test for cell cultures morphogenetic potentials and regeneration abilities determination was discussed.