

QURAQLIĞIN *AMARANTHUS CRUENTUS* L. YARPAQLARINDA NAD-MALAT DEHİDROGENAZANIN KATALİZ ETDİYİ REAKSIYALARIN KİNETİK PARAMETRLƏRİNƏ TƏSİRİNİN MÜQAYİSƏLİ TƏDQIQI

Babayev H.Q.

AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, AZ1073, Bakı, Mətbuat pr., 2,
e-mail: babayev_hg@yahoo.co.uk

Amaranthus cruentus L. yarpaqlarında quraqlığın təsirindən NAD-malat dehidrogenaza (l-malate-NAD-oksidoreduktaza, NAD-MDH, EC 1.1.1.37) fermentinin kinetik parametrlərinin dəyişməsi tədqiq edilmişdir. *Amaranthus cruentus* L. yarpaqlarını çiçəkləmə fazasında su stressi və quraqlıq şəraitində yarpaqların assimilyasiyaedici toxumalarının subhüceyrə fraksiyalarında Laynuiver-Berk üsulu ilə MDH-nin kataliz etdiyi düzünə və əksinə gedən reaksiyaların kinetik sabitləri (K_m) və reaksiyanın maksimal sürətləri (V_{max}) təyin edilmişdir. MDH sistemi fermentlərinin katalitik xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi ilə bağlı tədqiqatların nəticələri bu fermentin kinetik reaksiyalarının Mixaelis-Menten mexanizminə uyğun olaraq baş verdiyini göstərir.

Açar sözlər: *Amaranthus cruentus* L, NAD-MDH, kinetik parametrlər, quraqlıq

Giriş

Quraqlıq dünyada kənd təsərrüfatına zərər vuran ən başlıca abiotik stres faktoru hesab olunur. Onun səviyyəsi fizioloji, biokimyəvi və həmçinin molekulyar bioloji prosesə göstərdiyi təsirdən və bitkinin quraqlıq stressinə qarşı adaptasiya qabiliyyətindən asılıdır [9, 8, 23]. Bitkilərin məhsuldarlığını və stabilliyini məhdudlaşdıran başlıca xarici mühit faktoru su stressidir [7]. Fotosintez və hüceyrənin böyüməsi quraqlığın təsirinə məruz qalan ilkin proseslərdəndirlər [11,10]. Quraqlıq şəraitində bitki toxumalarında suyun çatışmazlığı ağızciqların bağlanması gətirib çıxarır ki, nəticədə CO₂-nin udulması azalır və bu da fotosintezə mənfi təsir göstərir [20,21, 10].

Fermentlər 2 əsas funksiyanı yerinə yetirirlər: onlar biokimyəvi reaksiyaları kataliz edirlər və həm də maddələr mübadiləsinin tənzimləyiciləridirlər [3]. Bitki toxumaları malat və oksaloasetatın qarşılıqlı çevrilməsini, NAD-ın reduksiya və oksidləşməsi ilə birlikdə kataliz edən NAD-MDH-nin çoxsaylı izoformalarına malikdirlər. Bitkilərdə müxtəlif genlərlə kodlaşan bu izoformalar fərqli kinetik xüsusiyyətlərə, subhüceyrə paylanmasına və fizioloji funksiyalara malikdirlər [15]. MDH-nin reaksiyası dönən olduğu üçün oksalasetatın (OAA) kəskin azalması baş verir. *In vivo* reaksiyanın istiqaməti substrat/məhsul nisbətindən və redoks vəziyyətdən asılı olduğu üçün fizioloji şəraitdən asılı olaraq hətta eyni bir toxumada da dəyişə bilər.

MDH-lar bir çox vacib katabolik və anabolik metabolizm yollarında iştirak edirlər. Bitki hüceyrəsi ilə əlaqədar olan MDH-ların müxtəlif molekulyar formaları koenzim spesifikliyinə, subhüceyrə lokalizasiyasına və bioloji funksiyalarına görə bir-birlərindən fərqlənirlər [15, 31].

MDH sistemi fermentlərinin katalitik xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi ilə bağlı tədqiqatların nəticələri [30, 25] bu fermentin kinetik reaksiyalarının Mixaelis-Menten mexanizminə uyğun olaraq baş verdiyini göstərir. Düzünə və əksinə gedən reaksiyalarda əvvəlcə koferment fermentin fəal mərkəzi ilə birləşərək onu aktiv vəziyyətə gətirir, daha sonra aktivləşmiş ferment öz substratı ilə birləşərək davamsız ferment-substrat kompleksi əmələ gətirir [16,13,18]. Bir çox müəlliflər göstərir ki, fermentin malata və OAA-a uyğunluğu NAD⁺ və NADH-la müqayisədə daha yüksəkdir [26,29]. Müxtəlif mənbələrdən homogen alınmış NAD-MDH izoformalarının kinetik parametrlərini müqayisə etdikdə məlum olur ki, malatin katalitik çevrilməsi reaksiyası OAA-a nisbətən az effektivdir [5], bu isə fermentin katalitik xüsusiyyətləri ilə bağlıdır. Məlumdur ki, MDH düzünə və dönər reaksiyada kinetik parametrlərinə görə biri digərindən fərqlənən iki müxtəlif konformasiyon vəziyyətə keçir [1]. Orta müddətli Tryptofan fluoresens zülalların köməyi ilə ətraf

mühitdə triptofan qalıqlarına qarşı həssaslıq MDH-nın konformosion vəziyyətlərinin dəyişməsinin öyrənilməsi nəticəsində məlum olmuşdur ki, birbaşa reaksiya 10,9 ms, əks reaksiya 2,6 mc davam edir. Düzünə reaksiyanın tədqiqi onu göstərir ki, malatdan elektronların NAD⁺-a daşınması üçlü ferment-koferment-substrat kompleksi yarandıqdan sonra baş verir. Bu keçiddən sonra katalitik prosesin sürəti kəskin azalır, nəticədə malatın oksidləşməsində MDH-nın katalitik effektivliyinin azalmasına gətirib çıxarır. Dönər reaksiyanın tədqiqi zamanı isə tamamilə fərqli hal müşahidə olunmuşdur. Müəyyən olunmuşdur ki, reaksiya zamanı oksaloasetatın çevrilməsi MDH-nın strukturunda baş verən konformasiyon dəyişkənliklə heç bir əlaqəsi yoxdur. Mühitə substrat əlavə olunan kimi kimyəvi çevrilmə başlayır və bir neçə fermentativ dövr ərzində stabil sürətlə davam edir.

Satar və onun əməkdaşlarının *Sphaerotilus natans* bakteriyasının D-507 ştammindən və siçovulun qara ciyərindən elektroforetik təmiz aldıkları MDH izoformalarının kinetik parametrlərinin təyini zamanı müəyyən olunmuşdur ki, fermentin K_m-ləri hər iki obyektə substratla uyğunluğu OAA-ya görə çox, malata görə isə aşağı yaxınlığa malikdir [6].

Belə bir fikir vardır ki, malatın, OAA-ın və NADH-ın yüksək qatılıqları fermentin aktivliyini inhibirləşdirir. Müəlliflər bunu effektiv olmayan ferment-substrat kompleksinin əmələ gəlməsi (məsələn, MDH-malat-NADH), məhlulda bu substratların qatılığının artması nəticəsində gec parçalanan (MDH-NADH-OAA) komplekslərin əmələ gəlməsi ilə izah edirlər [26].

Bəzi müəlliflərin fikrincə OAA-ın yüksək qatılığından ferment inhibirləşmir [18, 23]. Malatın yüksək qatılığı NAD-MDH-a aktivləşdirici təsir göstərir. *Toxocara canis*-dən alınmış NAD-MDH NADH-ın qatılığı artıq olduqda inhibirləşmir [22]. *Pseudomonas stutzeri*-dən alınan NAD-MDH fermenti isə aktivləşməyə və inhibirləşməyə qarşı çox davamlıdır.

Müxtəlif mənbələrdən alınmış MDH-ların izoformaları mühitin pH dəyişməsindən asılı olaraq müxtəlif katalitik aktivlik göstərilir. Məhlulun pH-ı mühüm faktorlardan olub, zülal molekulunun vəziyyətini müəyyənləşdirir. O molekul daxilində yüklərin paylanmasına, fermentin funksional qruplarının ionlaşma dərəcəsinə təsir göstərir. Yüklərin paylanması ferment substrat əlaqəsinə, fermentin aktivliyinə təsir edir. Mühitin pH dəyişməsi turşu və qələvi əsaslı qrupların dissosiasiya sabitinin dəyişməsinə və onun təsir mexanizminin pozulmasına səbəb olur. pH-ın çox kiçik diapazonda belə dəyişməsi zülallarının xarakterik xüsusiyyətlərinin və parametrlərinin dəyişməsinə səbəb olur [4].

Malatdehidrogenazanın kataliz etdiyi düzünə və dönən reaksiyanın pH optimumları bir-birinə qətiyyən uyğun gəlmir və MDH hidrogen ionlarının daha aşağı qatılıqlarında OAA-ın maksimal sürətlə malata çevrilməsini təmin edir. Tədqiqatçılar düzünə və dönən reaksiyaların pH optimumunun fərqli olmasının səbəbini MDH substratlarının oksidləşmə və reduksiyasının iki müxtəlif konformasiyon vəziyyəti, katalitik aktda iştirak edən amin turşusu qalıqlarının funksiyonallığındakı fərqlərlə əlaqələndirirlər [1].

Beləliklə MDH-nın OAA-ın reduksiyası istiqamətində gedən reaksiyasında p_H_{op} 6,0-8,5 intervalında yerləşir [19, 17]. MDH-nın malatın oksidləşməsi istiqamətində gedən reaksiyasında isə p_H_{op} 9-11-ə bərabərdir. Bundan əlavə bəzi ədəbiyyat məlumatlarında OAA-ın malata reduksiya reaksiyasının p_H_{op}-nün 8,5-9,4 aralığında olduğu qeyd olunmuşdur.

Material və metodlar

Tədqiqat obyektini olaraq 30-35 günlük amarant (*Amaranthus cruentus* L.) bitkisinin yarpaqlarından istifadə olunmuşdur. NAD-MDH-nın subhüceyrə paylanmasını öyrənmək məqsədilə amarant yarpaqlarından assimilyasiyaedici toxumalar-mezofil (MH) və ötürücü topaların örtük hüceyrələri (ÖTH) mexaniki üsulla ayrılmış və təmizlənmişdir. Assimilyasiyaedici toxumaların bir-birindən ayrılması üçün Edwards və Gardestromun [14] qarğıdalı yarpaqları üçün işləyib hazırladıkları üsul obyektə uyğun olaraq modifikasiya olunaraq istifadə edilmişdir [2].

Assimilyasiyaedici toxumaların ayrılması üçün yarpaqlar gövdədən ayrılmış, distillə suyu ilə yuyulmuş, 2-3 mm ölçüdə eninə istiqamətdə kəsilərək xırda seqmentlərə bölünmüşdür. Alınmış seqmentlər 25 mM HEPES buferində (pH 7,8), 0,3 M saxaroza, 1 mM EDTA, 15-20 mM 2-

merkaptetanol tərkibinə malik olan bufer məhlulunda (bufer A) MPW-302 (Polşa) mexaniki dezintegratorunda əvvəlcə 4 san müddətində 7000 dövr/dəq sürəti ilə fırladılmaqla homogenizasiya olunmuşdur. Alınan homogenat əvvəlcə 4 qat kaprondan süzüləndən sonra məsamələrinin diametri 80 μm olan Şotov qıfında filtrasiya edilmişdir. Filtrat MH-dən, mezqa adlanan qalıq hissə isə MH və ÖTH-i ilə birlikdə ötürücü topaların qarışığından ibarətdir. Filtratın 15 dəq müddətində 300g-də çökdürülməsindən alınan çöküntüüstü maye MH-nin sitoplazmasından ibarətdir. Bu zaman MH-nin xloroplastları çöküntü fraksiyasında olur. Alınmış çöküntü əvvəlcə A buferi ilə yuyulmuş və onun üzərinə 10 ml saxarozasız A buferi əlavə olunmaqla 15 dəq müddətində 300 g-də şökdürülmüşdür. Bu şəraitdə osmotik şokla xloroplastların membran və stroma fraksiyaları alınmışdır.

Filtirdə qalan çöküntü (mezqa) A buferi vasitəsi ilə bir neçə dəfə yuyulmuş, suspenziyalaşdırılmış və əvvəlcə 60 san 6000 dövr/dəq, onun ardınca 80 san 8000 dövr/dəq sürəti ilə homogenizasiya olunmuşdur. Alınan ekstraktın məsamələrinin diametri 211 μm olan Şotov qıfında filtrasiya olunmasından əmələ gələn filtrat MH və ÖTH-nin homogenatlarının qarışığından ibarətdir. Çöküntü A buferində suspenziyalaşdırıldıqdan sonra əvvəlcə 60 san 6000 dövr/dəq, onun ardınca isə 15 san 8000 dövr/dəq sürəti ilə homogenizasiya olunmuşdur. Homogenizasiyadan alınan ekstraktın məsamələrinin diametri 211 μm olan Şotov qıfında filtrasiyasından alınan filtrat 20 dəq müddətində 10000g-də sentrifüqalaşdırılmışdır. Alınan çöküntüüstü maye ÖTH-nin sitoplazmasından, çöküntü isə ÖTH-nin xloroplastlarından ibarətdir [2]. Çöküntü saxarozasız A buferində suspenziyalaşdırılmış, sonra isə 20 dəq müddətində 10000g-də çökdürülmüşdür. Bu zaman xloroplastların membranı və stroması bir-birindən ayrılmış olur. Subhüeyrə fraksiyaları ilə təcrübələr aparmaq üçün MH və ÖTH-nin xloroplastlarını ən azı 2 saat 0,6%-li Triton X-100 məhlulunda saxlamaq lazımdır. Bu üsulla təmizlənmiş assimilyasiyaedici toxumaların hər bir subhüeyrə fraksiyalarında NAD-MDH fermentinin aktivliyi tədqiq olunmuşdur.

Subhüeyrə fraksiyaları almaq üçün amarant yarpaqları 0,3 M saxaroza, 1 mM EDTA, 15-20 mM merkaptetanol tərkibli 25 mM HEPES buferində (pH 7,8) (bufer A) homogenizasiya olunduqdan sonra işlər davam etdirilmişdir. Sonda MH-nin və ÖTH-nin sitozol və xloroplast fraksiyaları. Hər 2 assimilyasiyaedici toxumanın mitoxondri fraksiyalarının alınması üçün işlər davam etdirilmişdir.

Assimilyasiyaedici toxumaların ayrılması zamanı MH-nin və ÖTH-nin əmələ gələn ilkin filtratları yarı bölünmüşdür. Bunların bir hissəsi MH və ÖTH-nin və onların subhüeyrə fraksiyalarının (sitozol, xloroplast) alınmasına, digər hissəsi isə həmin toxumalardan mitoxondrilərin ayrılmasına sərf olunmuşdur. Növbəti mərhələdə filtratlar 2,15 dəq müddətində 5000g-də sentrifüqalaşdırılmışdır. Alınan çöküntü atıldıqdan sonra çöküntüüstü maye 2,5 dəq müddətində 27000g-də yenidən sentrifüqalaşdırılaraq çökdürülmüşdür. Çöküntüüstü maye atıldıqdan sonra sentrifüqa probirkasının dibində qalan çöküntünün (o mitoxondrilərdən ibarətdir) üzərinə 0,3 M saxaroza, 1 mM EDTA, 15-20 mM merkaptetanol tərkibli 25 mM HEPES buferində (pH 7,8) məhlulu əlavə edilərək 2,5 dəq müddətində 27000g-də təkrar sentrifüqalaşdırılmışdır. Alınan çöküntülər MH və ÖTH-nin təmiz mitoxondrilərindən ibarətdir. Mitoxondri çöküntüləri üzərinə yenidən 0,3 M saxaroza, 0,2% BSA, 4-5 mM sistein, 1mM EDTA, 25 mM Hepes, pH 7,8 və 0,1% Triton X-100 məhlulu əlavə etdikdən və 1 saat gözlədikdən sonra alınan alekvat yenidən çökdürülmüşdür. Bu zaman MH və ÖTH-nin mitoxondrilərinin membranları və stromaları bir-birindən ayrılmışdır.

Amarant bitkisinin vegetasiyasının çiçəkləmə öny, çiçəkləmə və toxum yetişmə fazalarında yuxarıda qeyd olunan üsulla alınmış MH və ÖTH və onların subhüeyrə fraksiyalarında – mitoxondrial, sitozol və xloroplastlarda NAD-MDH aktivliyi tədqiq olunmuşdur.

NAD-MDH fermentinin aktivliyi spektrofotometrik (Ultrospec 3300 pro, Amersham, USA) üsulla təyin olunmuşdur [25]. Reaksiya mühiti 10 mM OAA, 10 mg/ml qara malın zərdab albumini (BSA), 10 mM MgCl_2 (2 M), 12 mM NAD·H və 5-10 μl ferment preparatı olan 100 mM, pH 8,0, Tris-HCl buferindən ibarətdir. NAD-MDH reaksiyası reaksiya mühitinə substrat (10 mM OAA) əlavə etməklə başlayır. Spektrofotometrik ölçmələr 1,0 ml həcmli spektrofotometrik küvyetlərdə aparılmışdır. Küvyetdəki NAD·H-in miqdarı 340 nm dalğa uzunluğunda 1 dəqiqə ərzində bu

birləşmənin molyar qatılığının optiki sıxlığının azalmasına əsasən təyin edilmişdir. NAD-MDH aktivliyi aşağıdakı düstura əsasən hesablanmışdır:

$$A = \Delta OP \cdot V / \varepsilon \cdot b \cdot \tau$$

A – beynəlxalq sistemdə aktivlik, ΔOP -optiki sıxlığın bir dəqiqə ərzində dəyişməsidir, B – reaksiya mühitinin həcmi (ml), τ -reaksiyanın gedişinə sərf olunan zamandır, ε – ekstinksiyanın millimolyar ekvivalentidir. O, NAD-MDH-nin kofermenti olan NAD^+ və NADH üçün 340 nm dalğa uzunluğunda maksimum udulma zamanı $6,22 \text{ mM} \cdot \text{sm}^{-1}$ -ə bərabərdir, b – reaksiya mühitinə əlavə olunan ferment ekstraktının həcmidir (μl).

Həll olan zülalin ümumi miqdarı 610 nm dalğa uzunluğunda spektrofotometrik üsulla 0,12%-li Coomassie Brilliant Blue G-250 məhlulunun köməyi ilə təyin olunmuşdur. Dərəcəli ayrının qurulması üçün BSA istifadə edilmişdir [26].

Nəticələr və onların müzakirəsi

Məlumdur ki, biokimyəvi reaksiyaların sürəti fermentin substratının qatılığından çox asılıdır [13]. Amarant bitkilərinin inkişafının çiçəkləmə fazasında su stressi və quraqlıq şəraitində yarpaqların assimilyasiyaedici toxumalarının subhüceyrə fraksiyalarında Laynuiver-Berk üsulu ilə MDH-nin kataliz etdiyi düzünə və əksinə gedən reaksiyaların kinetik sabitləri (K_m) və reaksiyanın maksimal sürətləri (V_{max}) təyin edilmişdir və alınan nəticələr cədvəldə öz əksini tapmışdır.

Cədvəldən görüldüyü kimi amarant bitkisinin MH-nin sitozolunda kontrolda $K_mOAA=6,5$ mM, $V_{max}OAA=80,7$ EU/mq zülal, quraqlıqda $K_mOAA=5,3$ mM, $V_{max}OAA=91$ EU/mq zülal olduğu halda MH-nin mitoxondrilərində kontrolda $K_mOAA=4$ mM, $V_{max}OAA=30,8$ EU/mq zülal, quraqlıqda $K_mOAA=3$ mM, $V_{max}OAA=40,1$ EU/mq zülal təşkil etmişdir.

Amarantın ÖTH-də $V_{max}OAA$ MH-dəki $V_{max}OAA$ -dan həmişə yüksək olmuşdur. Quraqlığın təsirindən normal bitkilərlə müqayisədə bu fərq daha da artmışdır. Amarantın MH-nin subhüceyrə fraksiyaları arasında sitozol fraksiyada V_{max} mitoxondri fraksiyasına nisbətən ~2 dəfə çox olmuşdur. Amarant yarpaqlarında MH ilə ÖTH-nin sitozol fraksiyalarında kontrol və quraqlıq variantlarında K_m və V_{max} -lar təqribən bir-birlərinə bərabər olsalar da ÖTH-nin mitoxondri fraksiyasında $V_{max}OAA$ MH-nin mitoxondri fraksiyasına nisbətən ~3-4 dəfə yüksək olmuşdur (Cədvəl 1).

Cədvəl 1

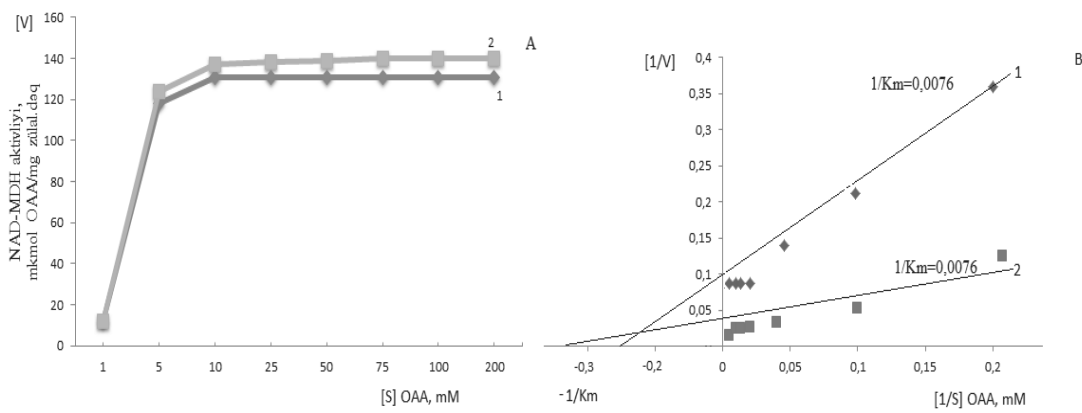
Quraqlığın amarantın ontogenezinin çiçəkləmə fazasında yarpaqların MH və ÖTH-nin subhüceyrə fraksiyalarında NAD-MDH-nin kataliz etdiyi reaksiyanın kinetik parametrlərinə təsiri

Toxuma	Fraksiya	Variant	OAA (1-100 mM)		Malat (5-100 mM)		NADH (1-50 mM)		MgCl ₂ (1-50 Mm)		ATF (0,1-3 mM)	
			K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
MH	Sit	K	6,5	80,72	17	101	7,8	80	3,9	42	1,5	38
		Q	5,3	91,03	20	185	8,0	130	4,2	99	2,1	98
	Xlp	K	3,1	12,02	9	22	12,5	71	6,5	13,6	3,0	10,5
		Q	3,5	9,53	11	19,5	10	62	6,3	10,6	2,8	9,32
	Mit	K	4,0	30,8	12,5	205	8,5	140	2,8	128	1,3	127,1
		Q	3,0	40,01	11,4	219	10,0	160	4,0	134	1,2	131,2
ÖTH	Sit	K	5,12	80,76	13,5	123	7,4	80,1	4,8	79,1	1,25	75
		Q	5,99	100,2	12,5	149	7,5	99,0	4,5	99,1	2,25	96
	Xlp	K	8,0	23,03	11,5	35,0	15	24	4,2	22,8	1,6	21,6
		Q	7,0	23,61	11,8	42,2	12,3	34	4,06	20,96	1,4	20,6
	Mit	K	6,5	134,2	14,3	230	9,0	140	4,7	131,2	1,2	127
		Q	4,9	141,7	15,2	239	8,0	160	6,0	137,9	0,9	133,6

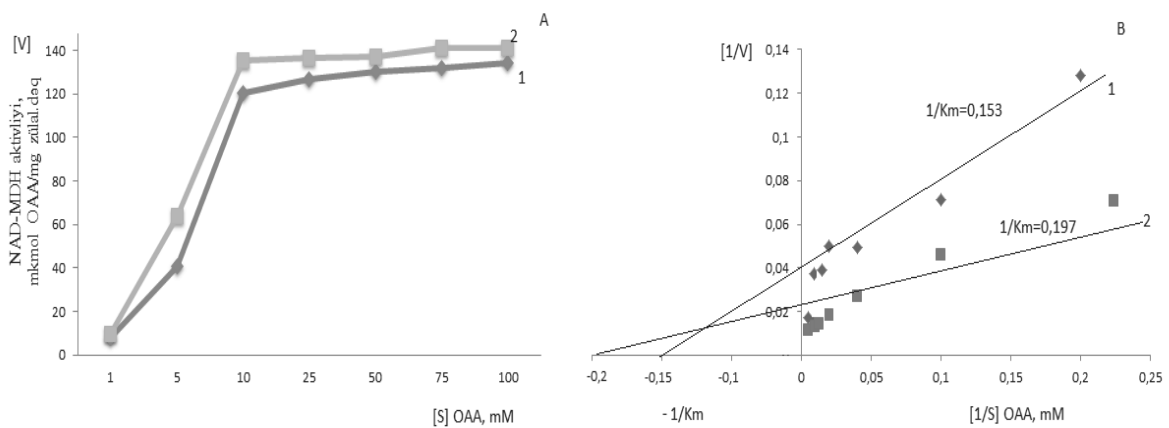
Amarantın ÖTH-də kontrolda sitozolda $K_mOAA=5,1$ mM, $V_{max}OAA=80,7$ EU/mq zülal, quraqlıqda $K_mOAA=5,99$ mM, $V_{max}OAA=100,2$ EU/mq zülal olduğu halda ÖTH-nin mitoxondrilərində kontrolda $K_mOAA=6,5$ mM, $V_{max}OAA=134,2$ EU/mq zülal, quraqlıqda $K_mOAA=4,9$ mM, $V_{max}OAA=141,7$ EU/mq zülal olmuşdur (Cədvəl 1).

Alınan nəticələr MDH-nin OAA-a qarşı yüksək, malata qarşı isə aşağı həssaslığının olduğunu göstərir ki, bu da başqa müəlliflərin nəticələri ilə uyğunluq təşkil edir. Müəlliflər göstərir ki, malata qarşı fermentin aşağı həssaslığa malik olması malatın katalitik çevrilməsi zamanı fermentin konformasiya dəyişkənliyi ilə əlaqədardır [29, 6].

Birinci və ikinci şəkillərdə amarant yarpaqlarının assimilyasiyaedici toxumalarında-MH və ÖTH-nin mitoxondrial fraksiyalarında NAD-MDH-nin kataliz etdiyi reaksiyaların sürətlərinin substratın qatılığından asılılığı verilmişdir. Əgər biz bu 2 qrafiki nəzərdən keçirsək görərik ki, MDH reaksiyasının sürəti düzünə gedən reaksiyanın substratı olan OAA-nın qatılığından ciddi asılıdır. Bu asılılıq MH-nin mitoxondrial fraksiyasında daha qabariq özünü göstərir. Belə ki, MH-nin mitoxondrilərində quraqlıq variantlarda K_m -in azalması, uyğun olaraq, V_{max} -ların artmasına səbəb olmuşdur (Şəkil 1, Cədvəl). Bu hadisə o vaxt baş verir ki, OAA-nın qatılığı 10 mM-a bərabər olsun.



Şəkil 1. Oksalasetatın müxtəlif qatılıqlarının amarant yarpaqlarında MH-nin mNAD-MDH-nin aktivliyinə təsirinin kinetikasi. 1-kontrol, 2-quraqlıq, A-Mixaelis-Menten, B-Laynuiver-Berk. Bu isə o deməkdir ki, NAD-MDH reaksiyası zamanı ferment-substrat kompleksinin əmələ gəlməsi və reaksiyanın məhsullarına parçalanması asan baş verdiyindən reaksiya sürətli baş verir. Quraqlığın təsirindən bu proses daha da sürətlə həyata keçirilir.



Şəkil 2. Oksalasetatın müxtəlif qatılıqlarının amarant yarpaqlarında ÖTH-nin mNAD-MDH-nin aktivliyinə təsirinin kinetikasi. 1-kontrol, 2-quraqlıq, A - Mixaelis-Menten, B-Laynuiver-Berk.

Cədvəl və 2-ci şəkildən aydın görünür ki, ÖTH-nin mitoxondri fraksiyalarında reaksiyanın sürəti də OAA-nın qatılığı ilə tənzim olunur. Hər 2 toxuma tipində, mitoxondrilərdə düzünə gedən reaksiyanın sürəti artır və raksiya məhsulu olan malat əmələ gəlir. Malatın müəyyən bir qatılığında o repressor kimi təsir göstərərək reaksiyanın sürətinin azalmasına səbəb olur.

Mitochondrial fraksiyada NAD-MDH reaksiyasının kinetik parametrlərinin, xüsusilə K_m və V_{max} -ların müsbət istiqamətdə dəyişməsi, quraqlıqda K_m -lərin azalması və V_{max} -ların artması çox güman ki, fermentin mitoxondrilərdə daşdığı funksiya ilə bağlıdır. Belə ki, mitoxondrilərin stromasında Krebs tsikli reaksiyalarının axıra qədər getməsi üçün malatın OAA, malatın piruvata, OAA-nın malata və s. çevrilmə reaksiyalarını kataliz edən NAD-MDH fermentinin aktivləşməsinin orqanizmlərdə adaptiv reaksiyaların yaradılmasında çox böyük əhəmiyyəti vardır.

Ədəbiyyat

1. **Блюменфельд Л.А.**, Плешанов П.Г. Единичные циклы прямой ферментативной реакции на примере МДГ // Биофизика, 1986. Том 30, № 5, с. 760-763.
2. **Гулиев Н.М.**, Бабаев Г.Г., Байрамов Ш.М., Алиев Д.А. Очистка, свойства и локализация двух форм карбоангидразы листьев *Amaranthus cruentus* L. // Физиология растений, 2003, Т.50, № 2, с.213-219
3. **Диксон М.**, Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982, Том 3, 906 с.
4. **Коэн Ф.** Регуляция ферментативной активности. М.: Мир, 1986, 144 с.
5. **Пинейру де Корвалью М.А.А.**, Землянухин А.А., Епринцев А.Т. Малатдегидрогеназа высших растений. Воронеж. Гос. Ун-та, 1991, 216 с.
6. **Сатар А.Ф.**, Парфенова И.В., Мальцева Е.В., Фалалева М.И., Епринцев А.Т. Кинетические характеристики тетрамерной формы малатдегидрогеназы, полученной с использованием ионообменной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. Т. 10. Вып. 2, с. 231-236.
7. **Araus, J. L.**, Slafer, G. A., Reynolds, M. P., and Royo, C. Plant breeding and water relations in *C3* cereals: what should we breed for? // Ann. Bot London. 2002, vol. 89, p. 925–940.
8. **Atkinson C.J.**, Policarpo M, Webster AD, Kingswell G. Drought tolerance of clonal *Malus* determined from measurements of stomatal conductance and leaf water potential // Tree Physiol. 2000, vol. 20, №8, p. 557-563.
9. **Bulbotko G.V.** The effect of the physical properties of soils on the development of the root system of apple trees // Soviet Soil Sci. USSR, 1973, vol. 5, p. 219-224.
10. **Chaves M.M.**, Flexas J., Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell // Annals of Botany, 2009, vol. 103, p. 551–560
11. **Chaves M.M.**, Oliveira M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture // Journal of Experimental Botany, 2004, vol. 55, p. 2365–2384.
12. **Cornish-Bowden A.** Fundamentals of enzyme kinetics. Wiley-Blackwell, New York, USA, 2012, 510 p.
13. **Drmotva T.**, Novotny J., Gould G.W., Svoboda, P., Milligan G. Visualization of distinct patterns of subcellular redistribution of the thyrotropin-releasing hormone receptor-1 and gqalpha/G11alpha induced by agonist stimulation // Biochem. J. 1993, vol. 40(Pt 2), p. 529–538.
14. **Gardeström Per** and Edwards Gerald Isolation of Mitochondria from Leaf Tissue of *Panicum miliaceum*, a NAD-Malic Enzyme Type C_4 Plant // Plant Physiol, 1983, vol. 71, p. 24-29.
15. **Gietl C.** Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles // Biochimica et Biophysica Acta, 1992, vol. 1100, p. 217–234.
16. **Goward C.**, Nicholls D. Malate dehydrogenase: a model for structural, evolution and catalysis // Protein Science, 1994, vol. 3, p. 1883-1888.

17. **Irwin S.A.**, Patel B., Idupulapati M., Harris J.B., Crisostomo R.A., Larsen B.P., Kooy F, Willems P.J., Cras P, Kozlowski P.B., Swain R.A., Weiler I.J., Greenough W.T. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination // *Amer. J. Med. Genet.*, 2001, vol. 98, № 2, p. 161-167.
18. **Kim L.**, Liu J., Kimmel A.R. (). The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification // *Cell*.1999, vol. 99, p. 399–408.
19. **Lang-Unnasch N.** Purification and properties of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase // *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992, vol. 50, p. 17–25.
20. **Lawlor D.W.**, Cornic G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants // *Plant, Cell and Environment*, 2002, vol. 25, p. 275-294.
21. **Lawlor D.W.**, Tezara W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes // *Annals of Botany*, 2009, vol. 103, p. 543– 549.
22. **Mancini A.**, Buschini A.M., Restivo F.M., Rossi C., Poli P. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants // *Plant Sci.*, 2006, vol.170, № 4, p. 845-852.
23. **Massonnet E.C.**, Serge R, Erwin D, Regnard JL Stomatal regulation of photosynthesis in apple leaves: Evidence for different water-use strategies between two cultivars catherine // *Ann. Bot.*2007, vol. 100, №6, p.1347-1356
24. **Mikulasova D.**, Kollarova M., Miginiac-Maslow M., Decottignies P., Jacquot J.P., Kutejova E., MemikN., Egyudova I., Musrati R., Horecka T. Moller I. M., Rasmusson A. G. NAD(P)H oxidation on the inner surface of the inner mitochondrial membrane // *PhysiologiaPlantarum*, 1990. vol. 79, Fasc. 2, Part 2.
25. **Minarik P.**, Tomaskova N., Kollarova M., Antalík M. Malate dehydrogenase-structure and function // *Gen. Physiol. Biophys.*, 2002, vol. 21, p. 257-265.
26. **Mottram J.C.**, Graham H.C. Purification of particulate malate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Leishmaniamexicana* // *Biochemica et Biophysica*, 1985, vol. 827, № 3
27. **Scheibe R.**, Stitt M. Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation, QA reduction and O₂ evolution in spinach leaves// *Plant Physiol. Biochem*,1988, vol. 26, p. 473–481.
28. **Sedmak J.J.**, Grossberg S.E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250 // *Analytical Biochemistry*, 1977, vol. 79, p.544-552
29. **Vessal M.**, Bambaearov N., "Partial-purification and comparison of the kinetic-properties of ovine liver echinococcus-granulosus hydatid cyst fluid malate-dehydrogenase and the cytoplasmic enzyme from the host liver" // *Comparative biochemistry and physiology. B. Comparative biochemistry*, 1994, vol. 107, №3, p. 447-451
30. **Wisemann M.S.** et al. Rat liver mitochondrial malatedehydrogenase: purification? Kinetic properties, and role in ethanol metabolism // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, vol. 290, № 3, p. 191-196.
31. **Yu Ding**, Qing-Hu Ma. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat // *Biochimie*, 2004, vol. 86, p. 509-518.

Бабаев Г.Г.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАСУХИ НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ НАД-МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗОЙ В ЛИСТЬЯХ *AMARANTHUS CRUENTUS* L.

Изменение кинетических параметров НАД-МДГ (L-малат-НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.37) изучали в условиях засухи *Amaranthus cruentus* L., отличающихся по продуктивности и засухоустойчивости. График Лайнуивера-Берка был использован для определения кинетического параметра (K_m) и максимальной скорости (V_{max}) прямой и обратной реакции, катализируемой этим ферментом в субклеточной фракции ассимилирующих тканей листьев *Amaranthus cruentus* L. в фазе цветения при водном стрессе. Результаты исследования каталитических свойств ферментов МДГ системы показали, что кинетические реакции НАД-МДГ протекают по механизму Михаэлиса-Ментена.

Ключевые слова: *Amaranthus cruentus* L., НАД-МДГ, кинетические параметры, засуха

Babaev H.G.

COMPARATIVE STUDY EFFECTS OF DROUGHT ON THE KINETIC PARAMETERS OF NAD-MALATE DEHYDROGENASE REACTION IN LEAVES OF *AMARANTHUS CRUENTUS* L.

Effects of drought on the kinetic parameters of NAD-MDH (L-malate-NAD-oxidoreductase, NAD-MDH, EC 1.1.1.37) have been investigated *Amaranthus cruentus* L. with contrasting productivity and drought tolerance. The Lineweaver-Burk plot was used for the determination of the kinetic parameter (K_m) and maximal rate (V_{max}) of the direct and reverse reactions catalyzed by MDH in the subcellular fraction of leaf *Amaranthus cruentus* L. assimilating tissues in the anthesis phase under water stress. The study of the MDH system enzymes showed that kinetic reactions of the enzyme of NAD-MDH follow the Michaelis-Menten mechanism.

Keywords: *Amaranthus cruentus* L, NAD-MDH, kinetic parameters, drought

Redaksiyaya daxil olma tarixi: 4.XII.2018