

## ZMIANY AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY GLUTAMINIANOWEJ (GDH) W ODPOWIEDZI NA GŁODZENIE WĘGLOWODANOWE I OBECNOŚĆ METALI CIĘŻKICH

*Teresa Lehmann, Patrycja Kramarska, Joanna Smoląg, Lech Ratajczak*

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu

### Wstęp

Jak wykazano ostatnio, cukier stanowi nie tylko ważne źródło energii i szkieletów węglowych w procesie wzrostu i rozwoju roślin, ale może też pełnić ważną rolę w regulacji aktywności metabolizmu [KOCH 1996; SMEEKENS 1998; YU 1999]. Metaboliczna regulacja ekspresji genów uznawana jest powszechnie jako główny mechanizm kontroli genów we wszystkich stadiach rozwojowych roślin. Prace JANG'A i SHEEN'A [1997] oraz SHEEN'A i in. [1999] wykazały, że cukier może być regulatorem ekspresji licznych genów w roślinach poprzez mechanizm represji katabolicznej, opisaną dla bakterii [SAIER 1989] i drożdży [GANCEDO 1992]. Mechanizm ten polega na tym, że przy dostępie cukru w komórkach hamowana jest ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów katabolizujących inne substraty węglowe niż cukier (np. białka, aminokwasy, tłuszcze).

Jednym z enzymów, którego aktywność wyraźnie wzrasta przy braku cukru, jest dehydrogenaza glutaminianowa (GDH) [ROBINSON i in. 1992; JAMES i in. 1993; MORKUNAS i in. 2000]. GDH jest enzymem indukowalnym, którego ekspresja ujawnia się szczególnie pod wpływem amoniaku i niektórych aminokwasów [SRIVASTAVA, SHING 1987]. Zmiany w aktywności GDH wywoływane są także przez szereg innych czynników środowiskowych, takich jak: np. temperatura, zasolenie, stres wodny, metale ciężkie czy atak patogenów. Mimo, że każdy z wymienionych czynników działa w odmienny sposób, przypuszcza się, że podstawowy mechanizm odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska jest podobny. W tym aspekcie GDH może być traktowana jako enzym markerowy, monitorujący zmiany w pierwotnym metabolizmie roślin.

W prezentowanych badaniach porównywano wpływ cukru, kadmu (Cd) i ołowiu (Pb) na aktywność oraz spektrum form molekularnych GDH w izolowanych osiach zarodkowych łubinu.

### Materiał i metody

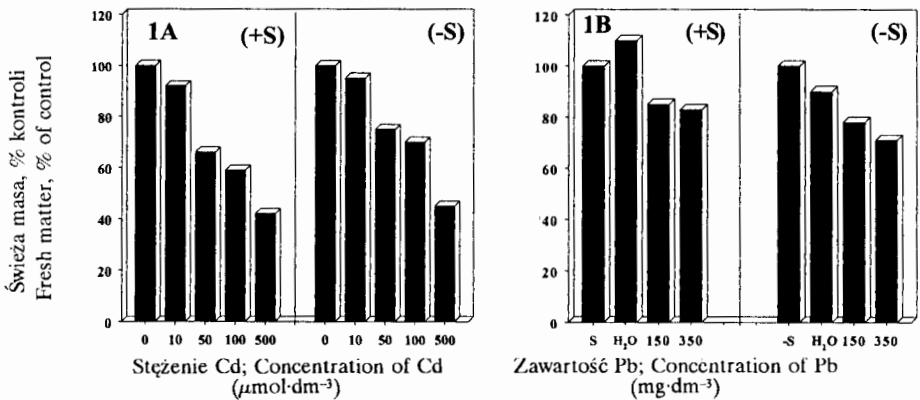
Doświadczenia przeprowadzono na osiach zarodkowych łubinu żółtego *Lupinus luteus* L. odmiany Juno. Nasiona poddawano wstępnej sterylizacji powierzchniowej, zalewano sterylną wodą i pozostawiano w termostacie (25°C). Po 6 godz.

nasiona przenoszono do szalek Petriego i pozostawiano na 18 godzin dalszego pęcznienia. Ze spęczniałych nasion izolowano osie zarodkowe usuwając okrywę nasienną i liście. Wyizolowane osie zarodkowe umieszczano po 4 sztuki na sterylnych podpórkach bibułowych, które wprowadzono do sterylnych probówek nad powierzchnię pożywki HELLERA [1954] na 48 godzin. Stosowano dwa warianty hodowli: osie zarodkowe hodowane na pożywce Hellera z sacharozą 60 mmol·dm<sup>-3</sup> (+S – kontrola, tzw. „osie odżywione”) oraz na pożywce Hellera bez dodatku cukru (-S – tzw. „osie głodzone”). Wpływ kadmu (Cd) badano dodając do pożywek Cd(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> w stężeniach 0 (kontrola), 10, 50, 100 i 500 μmol·dm<sup>-3</sup>. W przypadku osi zarodkowych traktowanych jonami ołowiu (Pb<sup>2+</sup>) inkubowano je wstępnie 24 godziny na pożywkach z cukrem (+S) lub bez dodatku cukru (-S), po czym przenoszono na kolejne 24 godziny na wodę, wodę z dodatkiem 150 i 350 mg Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·dm<sup>-3</sup>.

Aktywność GDH (EC 1.4.1.2-4) oznaczano we frakcji mitochondrialnej izolowanej wg metody NISHIMURA i in. [1982]. Aktywność aminacyjną enzymu (NADH-GDH) oznaczano spektrofotometrycznie wg DUKE'A i in. [1976]. W oznaczeniach aktywności dezaminacyjnej (NAD-GDH) stosowano metodę wg WATANABE i in. [1992]. Aktywność enzymu wyrażano jako ilość μmoli NAD<sup>+</sup> lub NADH powstałą w ciągu 1 minuty, przypadającą na 1 mg białka. Zawartość białka oznaczano wg BRADFORD [1976]. Analizy wzorów izoenzymatycznych GDH wykonano metodą elektroforezy w warunkach natywnych na 6% żelu poliakrylamidowym wg LAEMMLI [1970]. Aktywność enzymu ujawniano na żelu stosując mieszaninę inkubacyjną wg CZOSNOWSKIEGO [1974].

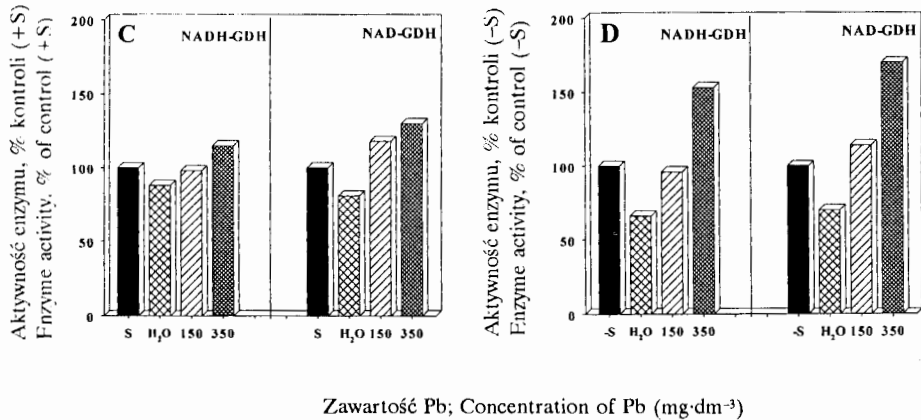
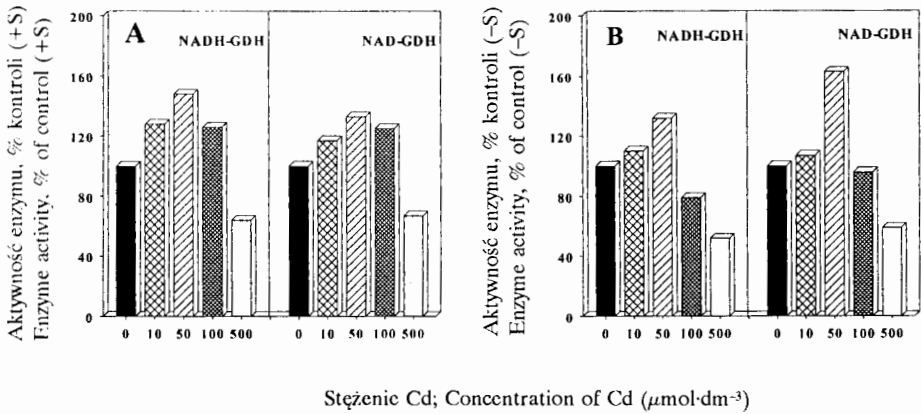
## Wyniki

Stwierdzono, że pod wpływem jonów Cd<sup>2+</sup> i Pb<sup>2+</sup> następuje wyraźne ograniczenie przyrostu świeżej masy osi zarodkowych zarówno odżywionych (+S), jak i poddanych głodzeniu cukrowcowemu (-S), (rys. 1). Dotyczyło to szczególnie jo-



Rys. 1. Przyrost świeżej masy (św.m.) osi zarodkowych łubinu, rosnących na pożywkach z cukrem (+S) i bez cukru (-S) oraz z dodatkiem Cd<sup>2+</sup> (1A) i Pb<sup>2+</sup> (1B). Za 100% przyjęto masę osi w pożywkach odpowiednio (+S) i (-S)

Fig. 1. Accumulation of fresh matter (FM) for embryos of lupine grown *in vitro* on medium with sucrose (+S) or without sucrose (-S) and treated with Cd (1A) or Pb (1B)



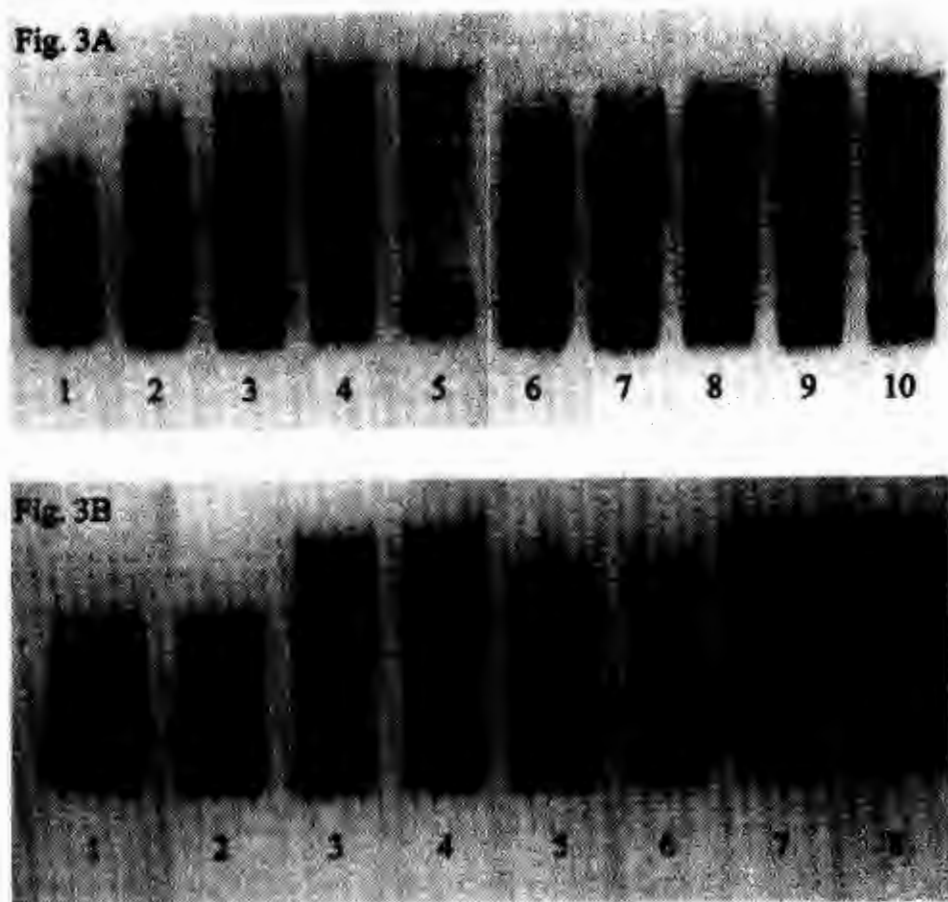
NADH-GDH – dehydrogenaza glutaminianowa (aktywność aminacyjna); glutamate dehydrogenase (aminating activity)  
 NAD-GDH – dehydrogenaza glutaminianowa (aktywność dezaminacyjna); glutamate dehydrogenase (deaminating activity)

Rys. 2. Zmiany aktywności NADH-GDH i NAD-GDH w osiach zarodkowych łubinu, rosnących w obecności Cd na pożywkach z cukrem (+S) – A i bez cukru (-S) – B oraz w obecności Pb na pożywkach z cukrem (+S) – C oraz bez cukru (-S) – D

Fig. 2. Changes in NADH-GDH and NAD-GDH activity in embryos of lupine grown on media with sugar (+S) or without sugar (-S) and treated with Cd (A, B) and Pb (C, D)

nów  $\text{Cd}^{2+}$ , które w stężeniu  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  w obu wariantach pożywek powodowały około 50% spadek masy osi. Toksyczność obu jonów przejawiała się także w deformacjach morfologicznych rosnących osi, które w zakresie wyższych testownych stężeń Cd ( $500 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i zawartości Pb ( $350 \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) były znacznie skrócone i zgrubiałe. Przeprowadzone oznaczenia aktywności enzymu wykazały, że obecność cukru w pożywce (+S) obniża aktywność NADH-GDH i NAD-GDH do ok. 60% w stosunku do pomiarów w osiach głodzonych (-S). Po podaniu do obu wariantów pożywek jonów  $\text{Cd}^{2+}$  lub  $\text{Pb}^{2+}$  obserwowano wyraźny, ale

zróznicowany wzrost aktywności GDH (rys. 2). Kadm w stężeniach 10–50  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  stymulował w osiach zarodkowych odżywionych głównie aktywność NADH-GDH (ok. 50% w stosunku do kontroli, +S), zaś w osiach głodzonych wyższa była aktywność dla NAD-GDH (ok. 30% w stosunku do kontroli, –S). Wyższe stężenia Cd (100 i 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) obniżały aktywność enzymu w obu wariantach pożywek. Podobnie obecność jonów ołowiu w pożywkach stymulowała aktywność enzymu. Dotyczyło to szczególnie osi zarodkowych poddanych głodzeniu (–S), gdzie obserwowano 53% wzrost aktywności NADH-GDH i 70% wzrost aktywności NAD-GDH.



Rys. 3. Wzory izoenzymatyczne dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) we frakcji mitochondrialnej izolowanej z osi zarodkowych łubinu, rosnących w obecności: (+S or –S) and Cd (3A), (0, 10, 50, 500  $\mu\text{mol Cd}(\text{SO}_4)_2\cdot\text{dm}^{-3}$ ) na pożywkach: (+S) 1–5 i (–S) 6–10 (3B) – jonów Pb (0,  $\text{H}_2\text{O} + 150 \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O} + 350 \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{dm}^{-3}$ ) na pożywkach: (+S) 1–4 i (–S) 5–8

Fig. 3. Variations of GDH isoenzymatic pattern according to the trophic conditions (+S or –S) and Cd (3A), (0, 10, 50, 500  $\mu\text{mol Cd}(\text{SO}_4)_2\cdot\text{dm}^{-3}$ ) and Pb (3B), (0,  $\text{H}_2\text{O} + 150 \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O} + 350 \text{ mg Pb}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{dm}^{-3}$ ) treatments. (3A) –  $\text{Cd}^{2+}$ ; lanes: 1–5 embryos grown on (+S); 6–10 embryos grown on (–S) (3B) –  $\text{Pb}^{2+}$ ; lanes: 1–4 embryos grown on (+S); 5–8 embryos grown on (–S)

Analizy elektroforetyczne wykazały, że cukier modyfikuje także wyraźnie spektrum izoenzymatyczne GDH (rys. 3). W osiach zarodkowych rosnących na pożywce Heller'a bez dodatku cukru (-S) stwierdzono obecność ok. 22–23 izoenzymów GDH. W osiach zarodkowych odżywionych (+S) spektrum to było zredukowane do ok. 14 prążków. Potraktowanie osi zarodkowych odżywionych (+S) jonami  $Cd^{2+}$  lub  $Pb^{2+}$  indukowało 5–6 dodatkowych izoenzymów lokalizujących się w katodalnej części żelu, czyli tych, które zanikały w obecności samego cukru na pożywce. W osiach głodzonych modyfikacje te obejmowały raczej zmiany jakościowe niż ilościowe, przejawiające się zwiększoną intensywnością wybarwienia katodalnej części spektrum. Najwyższe z testowanych zawartości Pb ( $350 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) nadal powodowało indukcję nowych izoenzymów GDH, podczas gdy przy najwyższym testowanym stężeniu Cd ( $500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) obserwowano wyraźnie redukcję ilości form GDH.

## Dyskusja

W literaturze spotyka się szereg doniesień na temat zarówno regulacji ekspresji genów roślinnej GDH, jak również różnych możliwości modulacji aktywności już wytworzonego enzymu. Otrzymane przez autorów pracy wyniki wskazują, że głód węglowodanowy indukował dehydrogenazę glutaminianową w osiach zarodkowych łubinu żółtego. Dotyczy to zarówno aktywności enzymu, jak i form izoenzymatycznych. Usunięcie cukru z pożywki mogło spowodować uwolnienie genów GDH spod represji katabolicznej, czego przejawem był wzrost aktywności enzymu i pojawianie się nowych izoenzymów GDH. Indukcję GDH obserwowano także po potraktowaniu osi zarodkowych rosnących na pożywce z cukrem (+S) jonami  $Cd^{2+}$  lub  $Pb^{2+}$ . W tym przypadku wzrost aktywności aminacyjnej enzymu (NADH-GDH) może pośrednio wskazywać na nagromadzenie się w tkankach osi zarodkowych amoniaku. Amoniak uznawany jest za jeden z głównych induktorów aktywności GDH [SRIVASTAVA, SHING 1987]. Wzrost aktywności enzymu może być więc powodowany udziałem GDH w asymilacji amoniaku w miejsce mniej efektywnego w tych warunkach szlaku GS/GOGAT. Poparciem tej hipotezy może być stwierdzenie m.in. przez BOUSSAMA i in. [1999], GOUIA i in. [2000] hamujący wpływ kadmu na aktywność syntetazy glutaminowej (GS). Jednocześnie zmiany aktywności enzymu skorelowane były ze zmianami w spektrum form molekularnych enzymu. Stwierdzono, że obecność Cd i Pb indukowała pojawianie się nowych form izoenzymatycznych w spektrum GDH. Regulacja aktywności enzymu może być kontrolowana na różnych poziomach. Zmiany we wzorach form molekularnych są raczej wynikiem różnicowanej ekspresji genów dla poszczególnych podjednostek enzymu. Jak dotąd opisano szereg genów fotosyntetycznych, których ekspresja nasila się w obecności jonów metali ciężkich. Być może także i geny kontrolujące ekspresję białek GDH podlegają bezpośrednio lub pośrednio takiej modulacji.

Podsumowując można stwierdzić, że zarówno głód węglowodanowy, jak i obecność metali ciężkich (w tym Cd i Pb) wywołują u roślin szereg reakcji stresowych. W czasie stresu ograniczeniu ulega fotosynteza. Wynikające z tego ograniczenie cukrowców i zahamowanie syntezy białek może prowadzić do nadmiernej nagromadzenia się jonów amonowych. W tym aspekcie oba stosowane przez

nas czynniki stresowe mogły prowadzić do uruchomienia wspólnych lub podobnych przemian metabolicznych, których efektem końcowym była indukcja GDH.

### Literatura

- BRADFORD M.** 1976. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. 72: 248–254.
- BOUSSAMA N., OUARITI O., GHORBAL M.** 1999. *Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress.* J. Plant Physiol. 22(4&5): 731–752.
- CZOSNOWSKI J.** 1974. *Metabolism of excised embryos of *Lupinus luteus* L. An electrophoretic analysis of some dehydrogenases in cultured embryos as compared with the normal seedling axes.* Acta Soc. Bot. Pol. 43: 117–127.
- DUKE S.H., HAM G.E.** 1976. *The effect of nitrogen addition on  $N_2$ -fixation and on glutamate dehydrogenase and glutamate synthetase activities in nodules and roots of soybean inoculated with various strains of *Rhizobium japonicum*.* Plant Cell Physiol. 17: 1037–1044.
- GANCEDO J.** 1992. *Carbon catabolite repression in yeast.* Eur. J. Biochem. 206: 297–313.
- GOULA H., GHORBAL M.H., MEYER CH.** 2000. *Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on the other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean.* Plant. Physiol. Biochem. 38: 629–638.
- HELLER R.** 1954. *Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives in vitro.* Annu. Sc. Nat. Biol. Veg. 14(1).
- JAMES F., BROUQUISSE R., PRADET A., RAYMOND P.** 1993. *Changes in proteolytic activities in glucose-starved maize root tips. Regulation by sugar.* Plant. Physiol. Biochem. 31(6): 845–856.
- JANG J.-C., SHEEN J.** 1997. *Sugar senescing in higher plants.* Trends Plant Science 2: 208–214.
- KOCH K.E.** 1996. *Carbohydrate-modulated gene expression in plants.* Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 509–540.
- LAEMMLI U.K.** 1970. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227: 680–685.
- MORKUNAS I., LEHMANN T., RATAJCZAK L., TOMASZEWSKA B.** 2000. *The involvement of glutamate dehydrogenase in the adaptation of mitochondria to oxidize glutamate in sucrose starved pea embryos.* Acta Physiologiae Plantarum 22: 389–394.
- NISHIMURA M., DOUCE R., AKAZAWA T.** 1982. *Isolation and characterization of metabolically competent mitochondria from spinach leaves protoplasts.* Plant Physiol. 69: 916–920.
- ROBINSON S.A., STEWART G.R., PHILIPS R.** 1992. *Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures.* Plant Physiol. 98: 1190–1195.
- SAIER M.** 1989. *Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system.* Microbiol. Rev. 53: 109–120.

- SHEEN J., ZHOU L., JANG J. 1999. *Sugars as signaling molecules*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 410–418.
- SMEEKENS S. 1998. *Sugar regulation of gene expression in plants*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 230–234.
- SRIVASTAVA H.S., SHING R.P. 1987. *Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants*. *Phytochemistry* 26/3: 597–610.
- WATANABE M., NAKAYAMA H., WATANABE Y., SHIMADA N. 1992. *Induction of a specific isoenzyme of glutamate dehydrogenase during isolation and the first 48h of culture of Brassica napus leaf protoplasts*. *Physiol. Plantarum* 86: 231–235
- YU S-M. 1999. *Cellular and genetic response of plants to sugar starvation*. *Plant Physiol.* 121: 687–693.

**Słowa kluczowe:** dehydrogenaza glutaminianowa, łubin żółty, izoenzym, kadm, ołów, represja kataboliczna

### Streszczenie

Celem pracy było porównanie wpływu cukru i metali ciężkich (kadmu i ołowiu) na aktywność oraz spektrum form molekularnych dehydrogenazy glutaminianowej (GDH). Doświadczenia przeprowadzono na izolowanych osiach zarodkowych łubinu żółtego, rosnących w kulturze *in vitro* (48 godz.). Stosowano dwa warianty hodowlane: pożywka Heller'a z sacharozą (tzw. „osie odżywione” i pożywka Heller'a bez sacharozy (tzw. „osie głodzone”). Oba warianty traktowano jonami kadmu i ołowiu. Oznaczenia aktywności NADH-GDH (aminacyjnej) i NAD-GDH (dezaminacyjnej) wykazały, że cukier wyraźnie hamuje aktywność enzymu w stosunku do wariantu głodzonego. Potraktowanie osi jonami zarówno kadmu, jak i ołowiu indukowało w osiach odżywionych głównie aktywność NADH-GDH, zaś w osiach głodzonych wzrastała aktywność NAD-GDH. Analizy elektroforetyczne wykazały, że w obecności cukru następowała redukcja spektrum izoenzymatycznego GDH z ok. 22 form (osie głodzone) do ok. 14 form (osie odżywione). Izoenzymy te były indukowane ponownie w osiach odżywionych po dodaniu do pożywki kadmu lub ołowiu. W osiach głodzonych efektem obu metali były zmiany w intensywności wybarwienia poszczególnych izoenzymów. Uzyskane wyniki omawiane są w oparciu o mechanizm represji katabolicznej powodowanej przez cukier.

### CHANGES IN GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY (GDH) IN LUPINE AS A RESPONSE TO HEAVY METALS AND SUCROSE STARVATION

Teresa Lehmann, Patrycja Kramarska, Joanna Smolağ, Lech Ratajczak  
Department of Plant Physiology, A. Mickiewicz University, Poland

**Key words:** glutamate dehydrogenase, *Lupinus luteus*, isoenzyme, cadmium, lead, catabolic repression

### Summary

Embryos of lupine (*Lupinus luteus* L.) deprived of cotyledons were cultured for 48 h in Heller medium with or without sucrose. Cd and Pb stress were imposed by adding  $\text{Cd}(\text{SO}_4)_2$  and  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  to the nutrient solutions at various concentrations. The metal's effects on the glutamate dehydrogenase activity (GDH) were analysed in comparison to trophic conditions. Sucrose starvation of embryos increased the total activity of GDH as well as the isoenzyme pattern. Some isoenzymes were negatively affected by catabolic repression and induced by carbon starvation. Repression affected mainly the more cathodic bands which were predominant in non-repressed conditions. Exposure of sucrose fed (+S) and sucrose starved (-S) embryos to Cd and Pb treatment increased significantly the total activity of GDH (aminating and deaminating activities, NADH-GDH and NAD-GDH respectively). Additions of metals to sucrose fed (+S) embryos resulted in a marked enhancement of activity of cathodal isoenzymes of GDH. There were no significant changes in the number of isoenzymes between sucrose starved (-S) embryos treated either with Cd or Pb. The possible physiological role of GDH in regulation of metabolism of lupine embryos under stress conditions is discussed.

Dr Teresa **Lehmann**  
Zakład Fizjologii Roślin  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Al. Niepodległości 14  
61-713 POZNAŃ  
e-mail: lehmann@rose.man.poznan.pl