

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)

На правах рукописи

Комарова Надежда Романовна

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ЛАКТАТА В РАСТЕНИЯХ
ПРИ НЕДОСТАТКЕ КИСЛОРОДА

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4 – Биохимия
1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Епринцев А.Т.

Воронеж 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Роль лактата в метаболизме	10
1.2. Метаболические механизмы адаптации растений к гипоксии	11
1.3. Особенности функционирования маркерных ферментов гипоксического стресса	14
1.3.1. Алкогольдегидрогеназа	14
1.3.2. Лактатдегидрогеназа.....	15
1.3.2.1. Общая характеристика лактатдегидрогеназы.....	15
1.3.2.2. Физико-химические свойства лактатдегидрогеназы.....	17
1.3.2.2.1. Молекулярная масса и величина субъединиц лактатдегидрогеназы.....	17
1.3.2.2.2. Функционирование активного центра лактатдегидрогеназы.....	17
1.3.2.2.3. Изоформы лактатдегидрогеназы	19
1.3.2.2.4. Кинетические свойства лактатдегидрогеназы	20
1.4. Особенности строения и функционирования L-лактат:цитохром с-оксидоредуктазы	21
1.4.1. Общая характеристика L-лактат:цитохром с-оксидоредуктазы.....	21
1.4.2. Реакция, катализируемая L-лактат:цитохром с-оксидоредуктазой	21
1.5. Возникновение фотодыхания и эволюция ЛЦО	22
1.5.1. Эволюция фотодыхательного метаболизма.....	22
1.5.2. Биогенез фермента гликолатоксидазы	29
1.5.3. Возможный путь эволюции лактатоксидазы	31
1.5.4. Дифференциация лактатоксидазы от других изоформ гликолатоксидазы.....	34
1.5.5. Взаимосвязь флавоцитохрома <i>b₂</i> дрожжей и семейства гликолатоксидаз шпината и арабидопсиса	36
1.5.5.1. Изоферменты гликолатоксидазы.....	38
1.5.5.2. Механизм ферментативного катализа гликолатоксидазы.....	39
1.5.6. Физико-химические и каталитические свойства ферментов семейства гликолатоксидазы.....	41
1.6. Молекулярные аспекты функционирования ферментов метаболизма лактата	43
1.6.1. Молекулярно-генетические особенности функционирования лактатдегидрогеназы в живых организмах	47
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	50
2.1. Объекты и методы исследований.....	50
2.1.1. Объекты исследований	50
2.1.2. Методы исследования.....	50
2.1.2.1. Культивирование микроорганизмов	50
2.1.2.2. Определение активности ферментов.....	51
2.1.2.3. Определение количества белка	53
2.1.2.4. Выделение и очистка лактатдегидрогеназы	53
2.1.2.5. Электрофоретические исследования.....	54
2.1.2.6. Определение рН оптимума каталитической активности ферментов	55
2.1.2.7. Определение величин констант Михаэлиса для ЛДГ и ЛЦО	55
2.1.3. Молекулярные методы исследования	55
2.1.3.1. Выделение геномной ДНК и суммарной клеточной РНК.....	55

2.1.3.2. Расчет концентрации РНК в пробе.....	56
2.1.3.3. Метод обратной транскрипции	56
2.1.3.4. Электрофорез нуклеиновых кислот	56
2.1.3.5. Подбор вырожденных и специфических праймеров	57
2.1.3.6. Проведение полимеразной цепной реакции	57
2.1.3.7. Секвенирование ПЦР-продукта	58
2.1.3.8. Проведение ПЦР-РВ.....	58
2.1.4 Статистическая обработка экспериментальных данных.....	58
2.2. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	59
2.2.1 Динамика активности ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО в листьях и корнях гороха в условиях гипоксии.....	59
2.2.2 Динамика активности СДГ в корнях и листьях гороха, экспонируемых в условиях гипоксии.....	62
2.2.3 Получение гомогенных препаратов исследуемых энзимов из листьев и корней гороха.....	64
2.2.3.1. Очистка ЛДГ из листьев и корней гороха.....	64
2.2.3.2 Определение гомогенности ферментного препарата	65
2.2.3.3 Определение молекулярной массы и субъединичного строения лактатдегидрогеназы	66
2.2.3.4. Определение значений K_m ЛДГ из листьев и корней гороха, подверженных кислородному голоданию	68
2.2.3.5 Определение значения константы субстратного ингибирования ЛДГ из листьев гороха.....	70
2.2.3.6 Влияние температуры на скорость реакции, катализируемой ЛДГ	71
2.2.3.7 Зависимость скорости реакции, катализируемой ЛДГ, от рН среды.....	72
2.2.4 Молекулярные исследования ЛДГ гороха.....	74
2.2.5 Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы.....	80
2.2.5.1 Этапы очистки ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев и корней гороха.....	80
2.2.5.2 Установление электрофоретической гомогенности препарата ЛЦО-подобной гликолатоксидазы	81
2.2.5.3. Определение K_m ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, экстрагированной из корней гороха.....	84
2.2.5.4 Определение рН оптимума для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев гороха ..	85
2.2.5.5 Определение температурного оптимума для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев гороха	87
2.2.6 Молекулярные исследования ЛЦО-подобной гликолатоксидазы гороха	88
2.2.7 Динамика активности ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО из сорго, выдержанного в условиях гипоксии методом затопления и при выходе из нее	90
2.2.8 Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев сорго	93
2.2.8.1 Получение гомогенного препарата ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго, экспонированных в условиях гипоксии и при выходе из нее.....	93
2.2.8.2 Определение молекулярной массы и субъединичного строения препарата ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго	94
2.2.8.3 Определение сродства к субстратам ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго.....	96
2.2.8.4 Физико-химические характеристики ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, экстрагированной из листьев сорго	97
2.2.8.5 Молекулярные исследования ЛЦО-подобной гликолатоксидазы сорго	98

2.2.9 Исследование активности лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной ГО у микроводоросли хлореллы.....	99
2.2.10 Экстракция и очистка ЛДГ из Хлореллы.....	100
2.2.10.1 Получение препаратов L-лактатдегидрогеназы.....	100
2.2.10.2 Электрофоретические исследования ферментативных препаратов L-ЛДГ	100
2.2.10.3 Определение кинетических характеристик для L-лактатдегидрогеназы хлореллы....	101
2.2.10.4 Определение рН оптимума для ЛДГ	101
2.2.10.5 Влияние АТФ на активность ЛДГ хлореллы	102
2.2.11 Определение активности гликолатоксидазы в ходе аэрирования суспензии.....	102
2.2.12 Получение гомогенных препаратов ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из хлореллы.....	103
2.2.12.1 Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из хлореллы.....	103
2.2.12.2 Определение гомогенности препарата гликолатоксидазы.....	104
2.2.12.3 Определение значений K_m для фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы	106
2.2.12.4 Определение рН оптимума для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	115
ПРИЛОЖЕНИЕ	138

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,
СИМВОЛОВ, ТЕРМИНОВ

АДГ – алкогольдегидрогеназа

ГО – гликолатоксидаза

ДНК – дизоксирибонуклеиновая кислота

K_m – константа Михаэлиса

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛЦО – L-лактат:цитохром *c*-оксидоредуктаза

МЕ — международная единица активности фермента

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)

НАДФ⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленная форма

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)

ФМН – флавиномононуклеотид

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

СССР – карбонил цианид *m*-хлорфенил гидразон

FAD – флавинадениндинуклеотид

ФС – флавоцитохром

PDB ID – идентификационный номер файла с расшифрованной структурой белка в базе данных Protein Data Bank

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Исследование возможных адаптивных реакций, обеспечивающих приспособление организмов к меняющимся условиям среды является одним из ключевых направлений развития физико-химической биологии. Изучение воздействия гипоксии на организмы занимает важное место среди множества вопросов и задач биохимической науки. Гипоксическая реакция связана с метаболизмом важных органических кислот, в частности с изменением метаболизма пировиноградной кислоты, что является ключевым этапом энергетического обмена у всех организмов. При участии лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) реализуется широко распространённый метаболический путь молочнокислого брожения, при функционировании которого пируват восстанавливается до лактата [125, 133]. При этом регенерируется НАД⁺, что позволяет протекать гликолизу и препятствует исчерпанию кофермента.

У некоторых организмов, находящихся на более низких ступенях эволюции, функционирует фермент L-лактат:цитохром-с оксидоредуктаза (ЛЦО, КФ 1.1.2.3). Фермент, катализирующий превращение лактата в пируват — ЛЦО обнаружен у бактерий и дрожжей. Важной особенностью ЛЦО является способность переносить электроны на цитохром *c* [34, 90].

У высших растений присутствует ряд ферментов из семейства оксидаз гидроксикислот, так, например, в растениях *Arabidopsis thaliana* функционирует три изоформы гликолатоксидазы, две из которых участвуют в фотодыхании, а третья – ГОЗ – лактатоксидаза или ЛЦО-подобная ГО (ГО, КФ 1.1.3.15) – способна превращать лактат в пируват (хотя и имеет сродство к гликолату), перенося при этом электроны уже на O₂. Фермент ЛЦО-подобная гликолатоксидаза относительно недавно был отделен от типичных гликолатоксидаз и представляет интерес, как «среднее» звено между гликолатоксидазой растений и L-лактат:цитохром-с оксидоредуктазой дрожжей. Ген данного фермента имеет сходство с генетическими последовательностями, кодирующими ЛЦО и ГО [116]. Немаловажно, что ЛЦО-подобная

гликолатоксидаза изучена лишь в растениях шпината и арабидопсиса [82, 130]. Весьма существенным является обнаружение нуклеотидной последовательности, схожей с ГОЗ арабидопсиса, на 94% у картофеля (*Solanum tuberosum*), на 98% у рыжика посевного (*Camelina sativa*), на 87% у репы (*Brassica rapa*).

Эволюция генных локусов *lox* и возникновение соответствующих ферментов были детерминированы необходимостью адаптации организмов к меняющимся условиям среды, в частности, к увеличению концентрации атмосферного O₂, вызванного возникновением оксигенного фотосинтеза и, в конечном итоге, способствовали формированию новых метаболических путей. Именно поэтому предметное исследование данных процессов имеет значимость для изучения общей картины эволюции энзимов.

Цель и задачи исследования. Целью являлось изучение биохимических и молекулярных механизмов регуляции энзимов, метаболизирующих лактат и пируват в растениях с разным типом обмена веществ при гипоксии. Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить динамику активности лактатдегидрогеназы в корнях и листьях гороха, сорго, экспонируемых в условиях дефицита кислорода;
2. Исследовать изменения активности фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у растений при смене гипоксических условий на нормоксию;
3. С помощью разработанной модифицированной схемы ферментативной очистки выделить электрофоретически гомогенные препараты ЛДГ и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из корней и листьев гороха и сорго, культивируемых в гипоксических условиях;
4. Получить электрофоретически гомогенные препараты данных ферментов – лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы;
5. Исследовать кинетические и физико-химические свойства ЛДГ, ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в растениях, экспонируемых при дефиците кислорода;
6. С помощью методов биоинформатики и данных Генбанка разработать

специфические праймеры для идентификации гена ЛЦО в исследуемых растениях;

7. Исследовать количественные показатели транскриптов генов, кодирующих ЛЦО-энзим в растениях, экспонируемых в гипоксии и нормоксии;

8. Предложить гипотетическую схему роли ЛЦО-подобной гликолатоксидазы и ЛДГ в адаптивной реакции клеточного метаболизма у растений в условиях гипоксии и нормоксии.

Научная новизна. В ходе работы впервые получены гомогенные препараты ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев и корней гороха, а также из листьев сорго. Очищена до гомогенного состояния лактатдегидрогеназа из корней и листьев гороха. Для обоих ферментов изучены кинетические и физико-химические характеристики в разных растениях. Исследована экспрессионная регуляция ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в растениях с разным типом обмена веществ. Предложена гипотетическая схема роли ЛЦО-подобной гликолатоксидазы и ЛДГ в адаптивной реакции растений на гипоксический стресс.

Практическая значимость. Получены препараты лактатдегидрогеназ, которые могут быть использованы в дальнейших научных исследованиях. Изучены кинетические характеристики ферментов, что может помочь в разработке методов их дальнейшего использования для энзиматического определения лактата. Для широкого использования в исследовательской практике рекомендуется разработанный специфический праймер ЛЦО растительного происхождения. Работа представляет фундаментальный интерес в связи с разработкой модели функционирования лактатдегидрогеназы у растений при гипоксии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изменение содержания кислорода в среде включает механизм синтеза фермента лактатдегидрогеназы в корнях и листьях растений гороха.

2. Одна из оксидаз семейства гидроксикислот способна окислять лактат в пируват у ряда растений и также включается в метаболизм при изменении содержания кислорода в среде.

3. Выделенные гомогенные препараты ЛДГ из листьев и корней гороха демонстрируют отличия кинетических и регуляторных характеристик, обусловленные их специфическим участием в процессах адаптивной реакции.

4. Полученные гомогенные препараты оксидаз показывают высокое сродство к лактату, что позволяет определить их роль в адаптивной реакции на гипоксию.

Апробация работы. Доклады по материалам диссертационной работы были представлены на университетских, региональных и международных конференциях. Их обсуждение проводилось на 19-ой международной конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015); Годичное собрание ОФР (Крым, 2017); посвященных памяти проф. Землянухина А. А. межрегиональных конференциях «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2016–2019); всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 2018), IX Съезде ОФР (Казань, 2019), отчетных конференциях научной сессии ВГУ «Эколого-физиологические и физико-химические основы взаимодействия биосистем различных уровней организации с окружающей средой» (Воронеж, 2019).

Публикации. Результаты данной диссертационной работы представлены в 12 публикациях: из них четыре – в печатных изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 138 страницах и включает: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (234 источника). Иллюстрационный материал представлен в виде 13 таблиц и 72 рисунка. В приложении содержится 7 таблиц и 19 рисунков.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль лактата в метаболизме

Лактат представляет собой небольшую α -гидроксикислоту, которая существует в двух стереоизомерных формах, D- и L-лактате. D-Лактат образующийся у эукариот, путем детоксикации глиоксалазы служит для удаления высокореактивного и токсичного соединения метилглиоксаля [78]. Это было показано для растений и дрожжей, а также млекопитающих [209]. Напротив, L-лактат обычно образуется при ферментативном восстановлении пирувата. L-Лактат является важным промежуточным звеном в процессе восстановления и регенерации повреждений и, особенно, мобильным топливом для аэробного метаболизма у млекопитающих [84]. Его производство усиливается в ответ на низкое содержание кислорода в растениях [45, 132], некоторых видах дрожжей [89, 149] и млекопитающих [103]. Взаимопревращение L-лактата и пирувата представляет собой окислительно-восстановительную реакцию, которая включает перенос электрона и, следовательно, требует окислительно-восстановительного партнера, так что, когда L-лактат окисляется до пирувата, окислительно-восстановительный партнер восстанавливается. Различные типы окислительно-восстановительных партнеров имеют различное сродство к электронам. Это, в свою очередь, влияет на термодинамику реакции и определяет ее направленность [1].

В природных экосистемах после подтопления паводковыми водами кислород быстро истощается в ризосфере из-за дыхания корней и аэробных микроорганизмов, что впоследствии приводит к потере функции корневой системы, и метаболические процессы, требующие кислорода, становятся сильно затрудненными [41]. Корни всех растений, исследованных до настоящего времени, обладают потенциалом как для спиртового, так и молочнокислого брожения [185]. Всплеск лактатной ферментации обычно происходит, когда ткани растения переводятся из нормоксических условий в гипоксические [187].

1.2 Метаболические механизмы адаптации растений к гипоксии

Растения и водоросли используют аэробное дыхание для производства энергии. Таким образом, требуется доступность кислорода, и изменения в его доступности приводят к резким метаболическим перестройкам [7, 24, 80]. В конечном счете, аэробные организмы погибают, если отсутствие кислорода продлевается. Более низкий уровень кислорода может быть результатом соответствующих условий окружающей среды, а также анатомических и тканевых ограничений. В течение жизни растения и водоросли подвергаются воздействию различных концентраций кислорода, которые могут варьироваться от полностью аэробного состояния (нормоксия) до дефицита кислорода (гипоксия) или полного отсутствия кислорода (аноксия) [64]. А чрезмерное количество осадков может привести к заболачиванию почвы или даже к полному погружению растений, что нанесет вред сельскохозяйственным культурам. В настоящее время, в контексте изменения климата, во всем мире наблюдается увеличение частоты наводнений [138].

При гипоксии или аноксии активируется серия быстрых и глубоких молекулярных и метаболических реакций, необходимых, чтобы выдержать такой стресс. Кислородная недостаточность ставит под угрозу производство АТФ и энергоснабжение. Это связано с тем, что кислород является конечным акцептором электронов в митохондриальном окислительном фосфорилировании, происходящем во время дыхания [91, 181]. При погружении доступность кислорода резко снижается, а его продуцирование путем фотосинтеза уменьшается из-за мутности воды. Снижение доступности света на затопленных заводях также ставит под угрозу производство углеводов с помощью цикла Кальвина [140]. Брожение необходимо, потому что митохондриальное продуцирование АТФ затруднено в отсутствие кислорода. В этих условиях растения должны полагаться на небольшое количество АТФ, которое все еще может быть получено в результате гликолиза [182]. Отсутствие митохондриального повторного окисления НАДН подвергает гликолиз риску остановки вскоре после того, как возникают условия с низким содержанием

кислорода, если только не активирован альтернативный механизм повторного окисления НАДН, т.е. брожение [124, 174]. В некоторых случаях отсутствия кислорода может возникнуть «эффект Пастера», при котором ускоряется потребление углеводов при увеличении гликолитического потока в 2–3 раза по сравнению с аэробным контролем [179]. В условиях дефицита кислорода растительный метаболизм предполагает использование пирувата в качестве исходного субстрата для переключения на два основных пути: спиртовое и молочнокислое брожение [80]. Почти во всех видах растений в условиях низкого содержания кислорода наблюдается быстрая активация лактатдегидрогеназы, которая катализирует восстановление пирувата в лактат [48, 131, 186 – 187]. Взаимодействие молочной и этанольной ферментации приводит к строгому контролю цитозольного рН клеток [48]. Дэвис с соавторами (Davis et al., 1964) предположили, что происходящее при молочнокислом брожении подкисление цитоплазмы создает оптимальные условия для активации ПДК. Это ускоряет продуцирование этанола и, таким образом, нивелирует для клеток вредное влияние закисления цитоплазмы [56, 74]. Изначально исследования нескольких видов, таких как томат, картофель, арабидопсис и рис, показали, что выработка лактата играет незначительную роль в реакциях с низким содержанием кислорода, поскольку лактат, как правило, вырабатывается только в первые часы стресса и легко выводится из клетки для предотвращения чрезмерного накопления этого соединения в цитозоле [32, 219]. Некоторые белки, такие, как индуцируемый гипоксией внутренний белок Noduline [49], были указаны в качестве участников процесса экстррузии лактата. Однако сообщалось об увеличении толерантности корней к гипоксии, когда ЛДГ была чрезмерно экспрессирована у растений арабидопсиса [78]. Фиксирующаяся при этом значительно более высокая активность ПДК, позволяет предположить, что пути молочной и этанольной ферментации взаимозависимы и что метаболизм лактата участвует в усилении выработки этанола.

Как правило наводнения создают бескислородные почвенные условия в течение 1-2 дней и до 2 недель. Такие условия препятствуют аэробному

дыханию, так что выживаемость корней становится зависимой от ферментативного метаболизма, из которых наиболее характерным путем является гликолиз этанола. Изменение характера экспрессии генов происходит в корнях, лишенных O_2 [63]. У кукурузы и других злаков индуцируется синтез определенных белков. Эти анаэробные белки включают АДГ, ПДК и несколько гликолитических ферментов, что подразумевает необходимость усиления или поддержания способности к гликолизу этанола во время дефицита O_2 . Прямые доказательства важности АДГ и гликолиза этанола во время гипоксии получены от мутантов *AdhI* кукурузы и ячменя [213, 215].

Относительно мало известно о ЛДГ или лактатной ветви гликолиза у растений, особенно в условиях с хроническим дефицитом O_2 . Хотя ЛДГ встречается в различных растительных тканях, часто в форме нескольких изоформ, в некоторых сообщениях предполагается, что ЛДГ отсутствует в анаэробных корнях. Однако, двух-четырекратный рост активности ЛДГ, обнаружен в корнях некоторых болотных растений и в слоях алейрона ячменя [68, 89, 102]. У животных образование лактата является основным средством регенерации $НАД^+$ при длительной гипоксии. Лактатный гликолиз, безусловно, может происходить в анаэробных корнях и в прорастающих семенах, хотя, возможно, только в виде кратковременного выброса сразу после перехода из аэробных в анаэробные условия [56].

Исследование [102] показывает, что активность лактатдегидрогеназы в корнях ячменя и других злаков увеличивалась в 20 раз в течение нескольких дней тяжелой гипоксии, достигая максимум около 2 мкМ в минуту на грамм сырой массы. У ячменя индукция активности ЛДГ была значимой при объемной доле кислорода 2,6% и наибольшей на уровне 0,06%, самой низкой протестированной концентрации, при 0° . По возвращении в аэробные условия индуцированная активность ЛДГ снижалась с видимым периодом полураспада 2 дня. Изоферментный профиль ЛДГ ячменя состоял из 5 полос, что соответствовало тетрамерному ферменту с субъединицами, кодируемыми двумя разными генами *ldh*. Изменения интенсивности окрашивания изозимов в

зависимости от уровня O_2 позволяли предположить, что один ген *ldh* был преимущественно экспрессирован при тяжелой гипоксии. Когда меченая глюкоза поступала в индуцированные корни в условиях гипоксии, лактат приобретал метку, но намного меньшую, чем этанол или аланин. Большая часть лактата ^{14}C секретировалась в среду, тогда как большинство других меченых анионных продуктов оставалось в корне. Ни гипоксическая индукция ЛДГ, ни секреция лактата корнями не предсказаны гипотезой Дэвиса-Робертса. Описанные результаты подразумевают, что роль ЛДГ в условиях гипоксии возрастает [55, 101]. Так в работе Энгвиста с сотр. (Engqvist M.K. [et al.], 2015) растения *Arabidopsis thaliana*, выращенные в гидропонной системе с принудительным аэрированием для обеспечения оксигенации среды, были подвержены гипоксии при прекращении барботирования воздуха и перемешивания среды. После старта эксперимента экспрессия гена – *ldh1* быстро увеличивалась в корнях, достигнув максимума спустя 4 ч от начала опыта, и оставалась на высоком уровне в течение всего гипоксического воздействия [84]. Ранее было установлено, что растительная ЛДГ также участвует в краткосрочном (4 ч) ответе на гипоксический стресс [56]. Позже, в дополнение к предполагаемой роли ЛДГ в краткосрочном ответе на дефицит кислорода, было предложено ее участие в адаптивной реакции в течение длительного (> 8 ч) периода воздействия на растение гипоксии. Так, у растений ячменя, пшеницы, кукурузы и ржи уровень активности ЛДГ остается повышенным в течение, по меньшей мере, 6 дней [87, 89, 102].

1.3. Особенности функционирования маркерных ферментов

гипоксического стресса

1.3.1 Алкогольдегидрогеназа

Алкогольдегидрогеназа - основной фермент, окисляющий этанол (КФ 1.1.1.1). Алкогольдегидрогеназы найдены в тканях животных (печени лошади), растениях (томатах и картофеле), грибах, дрожжах, бактериях и др. [180, 199].

Был обнаружен этанол в супернатантах культуры *Aspergillus fumigatus* через 48, 72 и 96 часов роста при гипоксии [106]. Активация фермента связана с гипоксической или бескислородной средой во многих организмах, включая патогенные для растений грибы, негативные дрожжи *Crabtree*, патогенные бактерии и даже растения [96, 233]. Для C_4 -растения сорго (*Sorghum bicolor* L.) характерен постоянный рост активности алкогольдегидрогеназы в «затопленных» корнях растений на протяжении 72 ч с момента возникновения гипоксических условий по сравнению с контрольной группой растений [25].

Для растений с C_3 -типом фотосинтеза, повышение активности алкогольдегидрогеназы не характерно, их отличает интенсификация работы лактатдегидрогеназы [10]. В условиях гипоксии многие организмы переходят от аэробного метаболизма к анаэробному, чтобы поддерживать свою функцию. Поскольку ЛДГ является одним из основных ферментов, продуцирующихся в анаэробных условиях, исследования показали, что гипоксические условия приводят к изменению её активности [105, 191].

1.3.2 Лактатдегидрогеназа

1.3.2.1 Общая характеристика лактатдегидрогеназы

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) катализирует реакцию взаимопревращения лактата и пирувата, протекающую совместно с восстановлением $НАД^+$ и окислением $НАДН$ соответственно (рис. 1).



Рис. 1. Реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой

Этот фермент занимает одно из ведущих мест в метаболизме, так как

пируват имеет ключевое положение в углеводном обмене, а регуляция соотношения количества НАД⁺ и НАДН влияет на скорость многих каталитических реакций. ЛДГ является одним из маркерных ферментов цитоплазмы и присутствует во всех органах и тканях человека. Это основной фермент, участвующий в молочнокислом брожении. У всех организмов он имеет тетрамерную форму (рис. 2).

ЛДГ широко распространена в природе, и присутствует в клетках бактерий, грибов, растений, животных и человека [25, 142, 150]. В детском возрасте активность фермента довольно высока, но с возрастом постепенно снижается. В последнее время ЛДГ привлекает новый интерес в связи с ее распространенностью в клинических опухолях, где высокая экспрессия часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом [222].

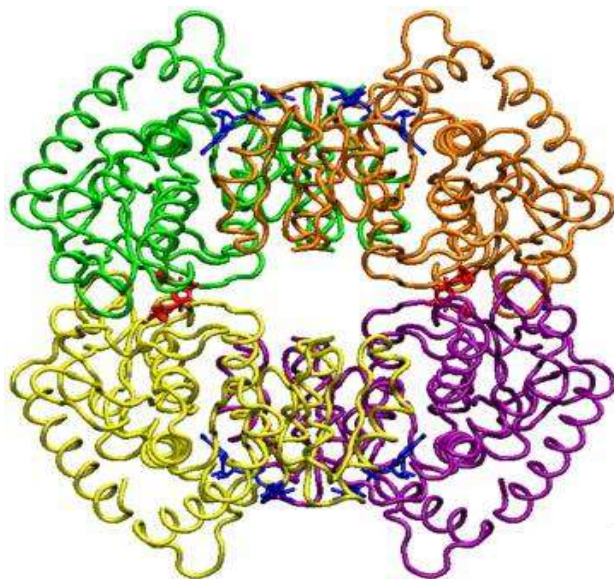


Рис. 2. Структурное представление ЛДГ из *Bifidobacterium longum* [39].

1.3.2.2 Физико-химические свойства лактатдегидрогеназы

1.3.2.2.1 Молекулярная масса и величина субъединиц лактатдегидрогеназы

В работе Хофмана и Хэнсона [101] электрофоретическое определение нативной молекулярной массы лактатдегидрогеназы из корней ячменя дало значение 157 кДа, что согласуется с результатами по изучению физико-химических свойств этого фермента из клубней картофеля: молекулярные массы обнаруженных энзимов составили 145 и 150 кДа [142, 178].

Проведение электрофореза в денатурирующих условиях и иммуноблоттинга позволило авторам Хофману и Хэнсону (Hoffman N.E. et al., 1986) оценить молекулярную массу субъединиц ячменной ЛДГ в 40 кДа, признав при этом лактатдегидрогеназу как гомотетрамер [101]. Аналогичные результаты были приведены другими авторами при изучении субъединичного строения ЛДГ из картофеля, где масса субъединиц составила 37 и 36.5 кДа соответственно [140, 178].

Величина молекулярной массы очищенной лактатдегидрогеназы из сои по данным Тиханьи с соавт. [187], составила 150 кДа, исследователи установили также, что целая молекула энзима собрана из субъединиц двух типов, со значениями молекулярной массы 37 кДа и 36 кДа соответственно [187]. Недиссоциирующий электрофорез и изоэлектрическое фокусирование ЛДГ сои показали пять тетрамерных изоферментов с pI между 6,0 и 6,5, что свидетельствовало о том, что эти изоферменты ЛДГ происходят из случайной ассоциации продуктов двух разных, но, скорее всего, родственных генов [20]. Аналогичные значения были представлены и для очищенной лактатдегидрогеназы из 30-дневных проростков риса, где значение молекулярной массы ЛДГ составило 160 кДа, а субъединиц – 39 и 38 кДа [187].

1.3.2.2.2 Функционирование активного центра лактатдегидрогеназы

Кристаллические структуры ЛДГ-А были описаны в присутствии ингибиторов [121]. Структуры показывают, что связывание НАДН вызывает небольшие конформационные изменения в петле активного сайта и прилегающей спирали. Сравнение с другими эукариотическими структурами апо-ЛДГ выявляет сохранение внутривитриальных взаимодействий (рис. 3). Субъединицы ЛДГ-А и ЛДГ-В одинаковы по размеру и их белковые последовательности идентичны на 75%, но имеют разные каталитические свойства; субъединица А (или М) преимущественно превращает пируват в лактат, тогда как для формы В (или Н) верно обратное [127]. ЛДГ-А сверхэкспрессируется во многих опухолях и поэтому становится привлекательной мишенью для открытия противоопухолевых препаратов.

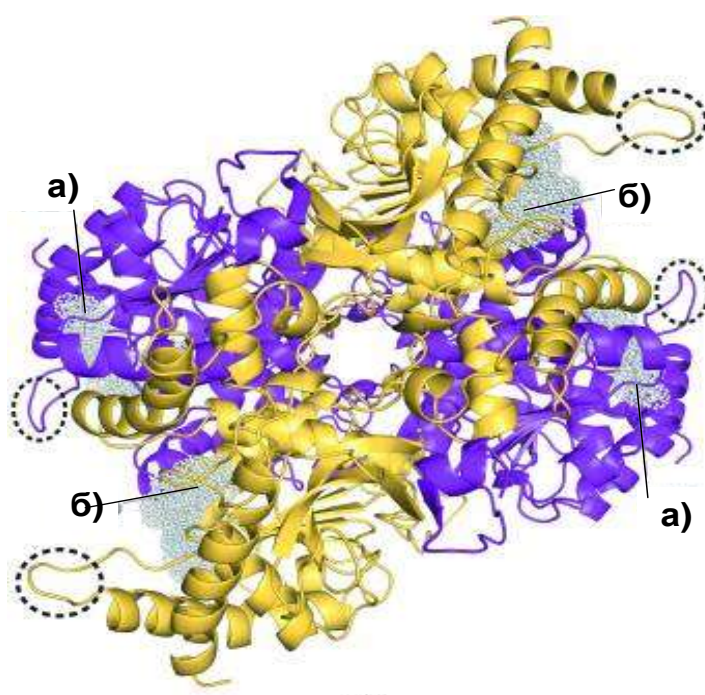


Рис. 3. Графическое изображение апоструктурного тетрамера ЛДГ-А с кристаллографически независимыми молекулами, изображенными фиолетовым и желтым соответственно. Петли активного сайта обведены кружком, а местоположение НАДН-связывающего кармана обозначено серыми сферами. а) обозначает «карман, связывающий адениновую группу», б) обозначает «карман,

связывающий

никотинамидную

группу»

[197]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4014127/>

ЛДГ является участником упорядоченного последовательного механизма, посредством которого соединение НАДН с сайтом связывания кофактора предшествует связыванию пирувата с сайтом связывания субстрата; за этим следует конформационное изменение, при котором петля активного сайта (остатки 96–111 в ЛДГ-В) замыкается над активным центром, образуя в значительной степени десольватированный тройной комплекс [171, 159, 198].

1.3.2.2.3 Изоформы лактатдегидрогеназы

Фермент ЛДГ достаточно хорошо изучен у млекопитающих и представлен пятью изоформами [4-6, 16, 19, 220], каждая из которых является тетрамером и состоит из четырех субъединиц двух типов, мышечной (muscle, М, А) и сердечной (heart, Н, В) локализации. Синтез этих субъединиц контролируется двумя генами — *ldh A* и *ldh B* [9, 70]. Их «становление» связано с необходимостью адаптации животных к изменяющимся условиям среды [46, 70]. Так, присутствие гомотетрамера ЛДГ-5 (4А) наиболее желательно в тех тканях, которые испытывают дефицит кислорода (то есть функционируют в анаэробных условиях) [21, 47].

У человека измерение активности ЛДГ используется в диагностических целях [118]. Так, ученый Турки с соавт. (Turki Y. [et al.], 2018) [216] установили, что процент ЛДГ 1 и ЛДГ 2 был значительно снижен у диабетиков, лиц с ожирением и группы лиц и с ожирением и с диабетом по сравнению с контрольными субъектами. Таким образом, исследователи предполагают возможность использования изоферментов лактатдегидрогеназы в качестве биомаркеров у пациентов с ожирением и / или диабетом [119, 215].

Данный фермент еще недостаточно широко изучен у растений. Одна из лактатдегидрогеназ растений напоминает мышечную лактатдегидрогеназу, будучи специфичной по отношению к L-форме молочной кислоты [83]. Но,

например, у *Chlorella* фермент образует как D-, так и L-форму молочной кислоты [48]. Фермент из животных тканей функционирует как с НАД⁺, так и с НАДФ⁺, но фермент из растений способен функционировать только с НАД⁺, а у дрожжей фермент напрямую связан с цитохромной системой.

Активность изоэнзима ЛДГ-А и экспрессия его белков наиболее значительно возрастали через 24 ч в клетках в условиях гипоксии. Однако белок ЛДГ-В оставался неизменным, а его мРНК уменьшалась [120]. Изоформа ЛДГ-А преимущественно превращала пируват в лактат и обнаруживалась в основном в плохо васкуляризированных тканях с низким содержанием кислорода. Однако изоформа ЛДГ-В была более активна в аэробных условиях, превращая лактат в пируват в хорошо оксигенированных тканях [127].

1.3.2.2.4 Кинетические свойства лактатдегидрогеназы

Сродство фермента к лактату сильно различается: минимальные значения константы Михаэлиса выявлены, например, у *Acinetobacter calcoaceticus* (83 мкМ), а для фермента, выделенного и очищенного из скелетных мышц ящерицы (*Agama stellio*) – 20 мкМ [3]. Сродство ЛДГ к пирувату в среднем выше, чем к лактату, но разброс наблюдается и здесь: у многих позвоночных K_m колеблется от 0,16 до 0,18 мМ: у томата 0,20 мМ, а у *Lactococcus lactis* она равна 77 мМ, для ЛДГ из мышц свиньи – 1,18 мМ [16]. В целом эукариотические ЛДГ отличаются более высоким сродством к пирувату, чем бактериальные.

В то же время значения константы Михаэлиса для НАДН у разных ферментов переменны: 0,007 – 0,5 мМ, более высокие значения являются исключением. Для НАД⁺ значения K_m выше, чем для НАДН: это может быть причиной более высокой активности фермента при катализе им прямой реакции. Интересно отметить, что величина данного показателя колеблется от 8 мкМ для ЛДГ из мышц кроликов до 77 мкМ – из клубней картофеля [122, 144] и от 15,6 до 40 мкМ для ЛДГ-5 из мозга свиньи и из мышц ящерицы соответственно [3, 69], а величина K_m для ЛДГ по НАД⁺ варьирует от 0,2 мМ из картофеля до 3,2 мМ из печени крыс [122, 226].

По данным авторов [117] в ходе очистки ЛДГ из сои фермент был элюирован двумя пиками, что говорит о присутствии у растения ее двух изоформ, для которых была характерна максимальная активность с лактатом при рН 6,8 и 9,5 соответственно.

1.4 Особенности строения и функционирования L-лактат:цитохром *c*-оксидоредуктазы

1.4.1 Общая характеристика L-лактат:цитохром *c*-оксидоредуктазы

L-лактат:цитохром *c*-оксидоредуктаза (флавоцитохром b_2 , FC b_2 КФ 1.1.2.3) – фермент, который принимает участие в реакции превращения лактата в пируват, где процесс сопряжен с восстановлением цитохрома *c*.

В ряде экспериментов были получены препараты ЛЦО из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [79]. Выявлено, что гены L-лактат:цитохром *c*-оксидоредуктазы имеют высокую степень сходства с одной изоформой гликолатоксидазы (*Arabidopsis thaliana*) [85]. В связи с широким распространением данного фермента у микроорганизмов и трансформации его структуры и частичного изменения функций у высших растений его подробное изучение является актуальной задачей современной биохимии.

1.4.2 Реакция, катализируемая L-лактат:цитохром *c*-оксидоредуктазой

Флавоцитохром b_2 , полученный из аэробных хлебопекарных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), был впервые выделен в частично очищенной форме Бахом с соавт. (Bach S.J. et al., 1946) [36]. Фермент был дополнительно очищен и кристаллизован [34]. Было показано, что цитохром b_2 был флавогемопротеином, содержащим компонент дезоксирибонуклеиновой кислоты, а также описаны некоторые физико-химические и кинетические свойства. Эти выводы были подтверждены и расширены (Guiard B., 1985) [89]. Было показано, что фермент легко модифицируется за счет потери компонентов флавина или

дезоксирибонуклеиновой кислоты или того и другого. А дегидрогеназная активность требует присутствия не нуклеиновой кислоты, а флавиновой группы [31]. Для фермента характерно существование одной рибофлавинфосфатной (флавин-мононуклеотидной) группы и одной протогемной группы на единицу с молекулярной массой 82 кДа. Никаких других металлов за исключением гем-связанного железа обнаружено не было [34]. Коэффициенты седиментации и диффузии указывают на молекулярную массу около 160 кДа и не дают прямых доказательств наличия равновесия между формами (мономер-димер) у фермента. Цитохром b_2 катализирует восстановление посредством лактата и некоторых других α -гидроксикислот – гексацианоферрата (III), метиленового синего, 2,6-дихлорфенолиндофенола и различных других красителей, феррицитохрома c и кислорода [35, 93]. Этот фермент уникален среди оксидоредуктаз, содержащих две органические группы, которые могут участвовать в переносе электронов с подложки на различные акцепторы, и поэтому следует ожидать, что кинетика реакций, катализируемых флавоцитохромом b_2 , будет демонстрировать сложности, не обнаруженные в других ферментативных системах.

В клетках *S.cerevisiae*, L-лактат производится во время аноксии, и после реоксигенации, флавоцитохром b_2 индуцируется и трансформирует L-лактат в пируват. Было указано [35, 93], что в флавоцитохроме b_2 ФМН-группа сперва связывается с субстратом, и затем переносится из этой группы в группу гема, возможно, по внутримолекулярному механизму. Соотношение темпов восстановления флавина возрастает на фоне снижения концентрации субстрата. Скорость расходования ФМН влияет на концентрацию субстрата.

1.5. Возникновение фотодыхания и эволюция ЛЦО

1.5.1 Эволюция фотодыхательного метаболизма

Эволюция фотореспираторного метаболизма началась у цианобактерий и привела к высококомпарментальному пути у растений. Биохимическое понимание фотодыхания у эукариотических водорослей, таких как глаукофиты,

родофиты и хлорофиты, важно для познания развития этого метаболического пути [97, 108].

Фотодыхание является важным процессом – оно неразрывно связано с фотосинтетической фиксацией CO_2 через Рубиско, которая катализирует карбоксилирование, а также оксигенацию [77, 167]. Во время карбоксилирования CO_2 включается в рибулозо-1,5-бисфосфат, что приводит к образованию двух молекул 3-фосфоглицерата (3-ФГА), которые входят в цикл Кальвина-Бенсона (ЦК) [232]. В реакции оксигеназы Рубиско рибулозо-1,5-бисфосфат принимает O_2 , давая одну молекулу 3-ФГА и одну молекулу 2-фосфогликолата (2-ФГ) [22, 42]. 2-ФГ представляет собой интермедиат, который метаболизируется исключительно фотореспираторным циклом C_2 [190]. В дополнение к основной функции фотодыхания, как пути запасания органического углерода, эффективная деградация 2-ФГ необходима для метаболизма растений, поскольку 2-ФГ действует, как мощный ингибитор многих ферментов в хлоропластной строме, таких, как триозофосфатная изомераза, фосфофруктокиназа и седогептулозо-1,7-бисфосфат-фосфатаза [26, 30, 65, 123, 207]. Следовательно, накопление 2-ФГ значительно снижает эффективность CO_2 -ассимиляции через нарушение ЦК и биосинтеза крахмала.

Интересно отметить, что фотореспираторный метаболизм диатомовых отличается от такового других фотосинтезирующих эукариот [50, 109]. Предполагается, по крайней мере, два пути для метаболизма гликолата: один встречается, главным образом, в митохондриях и сходен с фотореспираторным путем C_2 , а другой конвертирует гликолат через пероксисомальный глиоксилатный цикл [145]. Первым шагом в обработке фотореспираторного гликолата является его превращение в глиоксилат, где катализирующей реакцией ферментом может являться либо гликолатдегидрогеназа, либо гликолатоксидаза [218]. Биохимические исследования, проведенные авторами (Winkler U., Stabenau H., 1992), показывают, что диатомей используют гликолатдегидрогеназы для окисления гликолата [227], однако в геномах диатомовых водорослей были идентифицированы только

гликолатоксидазы [28]. При дальнейшем исследовании методом построения филогенетических деревьев было выявлено, что ген *gox1* диатомовых водорослей *Phaeodactylum Tricornutum* имеет значительное сходство именно с гликолатдегидрогеназами протеобактериального происхождения, а кодируемый им фермент локализован в митохондриях. Ген *gox2* из *Phaeodactylum Tricornutum* генетически тесно связан с гликолатоксидазами, а для фермента ГО2 характерна пероксисомальная локализация [11]. Для гликолатоксидаз характерно использование O_2 в качестве акцептора электронов. Они генерируют H_2O_2 , нечувствительны к цианиду и проводят вторичную реакцию с L-лактатом [72]. В отличие от этого, гликолатдегидрогеназы используют НАД⁺/НАДФ⁺ в качестве акцептора электронов, ингибируются цианидом и проводят вторичную реакцию с D-лактатом [72]. Биохимические исследования целых клеточных фракций и фракций органоидов диатомовых водорослей показали отсутствие продуцирования пероксида водорода, что согласуется с данными по некоторым видам диатомовых водорослей, использующих гликолатдегидрогеназу для генерации глиоксилата как в митохондриях, так и в пероксисомах [161-162, 228]. Гликолат также может участвовать в транспорте восстановительных эквивалентов и углеродных скелетов из хлоропласта в митохондрию при определенных условиях, а также может поддерживать механизмы рассеивания активной энергии в митохондриях. Анализ подтверждает, что цикл C_2 является неполным для диатомовых водорослей [28, 110]. Смысл этого вывода заключается в том, что фотореспираторный углерод первоначально перенаправляется в другие метаболические процессы, а не возвращается непосредственно в цикл Кальвина-Бенсона. Вместо этого трансаминазы работают совместно, производя предшественников для биосинтеза аминокислот. Этот альтернативный подход одновременно позволяет рассеивать энергию и повторно использовать углеродные скелеты в пределах одной и той же органеллы, и может быть особенно выгодным в экстремальных условиях, когда скорость фиксации углерода (и, следовательно, потребность пластиды в ЗФГ) низкая.

Кроме того, авторы предполагают, что пероксисомальные процессы могут быть связаны с фотореспираторным метаболизмом в диатомовых водорослях и это многокамерное разделение может обеспечить гибкость в реагировании на различные условия окружающей среды. Например, фотореспираторные процессы в митохондриях позволяют клеткам удовлетворять потребность в углеродном остоле для повторной ассимиляции азота, выделяемого из внутриклеточных запасов [146, 166]. Исследования, проведенные при выращивании диатомовых водорослей в условиях низкого содержания CO_2 , позволили установить, что в пероксисоме была существенно увеличена активность по окислению гликолата, как и скорость работы ферментов глиоксилатного цикла [228]. Это позволяет предположить, что во время дефицита углерода в клетках фотореспираторный гликолат превращается в малат, который может метаболизироваться через другие пути, сводя к минимуму потери углерода и энергии, связанные с циклом C_2 [226]. Использование транскриптомного анализа [61] при изучении дифференциального биохимического ответа в митохондриях и пероксисомах на умеренное и сильное фотодыхание [229] позволяет предположить, что первичная обработка фотореспираторного углерода, встречающаяся в митохондриях, и пероксисомная трансформация могут выступить в роли «перепускного клапана», когда условия существования становятся неблагоприятными.

Хорошо известно, что путь фотодыхания, посредством которого метаболизируется 2-ФГ [214], необходим для фотосинтеза у большинства растений [140, 180, 195]. Напротив, осуществление этого пути фотодыхания и его важность все еще обсуждаются для цианобактерий. Эти организмы были первыми, кто развил кислородный фотосинтез, а эндосимбиотическое поглощение древней цианобактерии привело к эволюции хлоропластов растений [80, 139]. В то же время, в отличие от растений, ранние исследования метаболизма 2ФГ цианобактерий показали либо отсутствие этого процесса, либо появление только на начальных стадиях, участвующих в образовании гликолата [48]. Это было трудно понять, потому что сродство цианобактериальной Рубиско к CO_2 значительно ниже, чем у фермента из C_3 -растений [49]. Сегодня общепризнанно, что

низкое сродство к CO_2 у Рубиско компенсируется эффективным механизмом концентрации неорганического углерода (C_i), который повышает концентрацию CO_2 в непосредственной близости от фермента [120, 173, 204]. Мутанты с нарушениями [27, 99, 113, 148] транспорта и внутреннего накопления C_i в карбоксисомах [33, 106 – 107], демонстрируют кажущуюся очень низкую фотосинтетическую аффинность к внешнему C_i и, таким образом, проявляют фенотип «высокого содержания CO_2 ». Эти результаты четко выявили важную функцию концентрации неорганического углерода для выживания цианобактерий в современной атмосфере и привели к формированию широко распространенного мнения о том, что оксигеназная активность Рубиско почти полностью подавлена у цианобактерий. Следовательно, метаболизм 2ФГ, непосредственного продукта оксигеназы, по-видимому, не является необходимым в этих организмах.

Эйзенхат и др. (Eisenhut M. [et al.], 2008) [209] представили доказательства совместного действия растительного цикла C_2 и бактериального глицератного пути [157, 168, 211] для метаболизма 2ФГ в цианобактериальном модельном штамме *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее *Synechocystis*) [33, 98, 111]. Мутанты *Synechocystis*, дефектные по определенным ферментам, проявляли задержку роста и накапливали промежуточные продукты фотореспираторного метаболизма уже в условиях высокого содержания CO_2 (воздух, обогащенный до объемной доли ϕ (CO_2), равной 5%). Однако, в отличие от растений C_3 , даже двойные мутанты в двух известных путях разложения 2ФГ, действующих в *Synechocystis* (в цикле C_2 и пути глицерата) были способны расти под воздействием CO_2 окружающей среды (с ϕ (CO_2) = 0,035%) [27, 146]. Эта способность была приписана действию механизма концентрирующего неорганический углерод, который подавляет образование и, следовательно, метаболизм 2ФГ. А также, эта способность может указывать на наличие дополнительных маршрутов для распада 2ФГ. Профили экспрессии генов, где сравнивались уровни мРНК в выращенных клетках, в условиях низкого и высокого содержания CO_2 выявили существование сотен C_i -регулируемых генов [137, 224]. Интересно, что некоторые из генов с повышенной регуляцией при низкой концентрации CO_2 кодируют ферменты, которые

образуют третий путь метаболизма 2ФГ, в котором через серию декарбоксилирования глиоксилат превращается в оксалат, затем в формиат и, наконец, в CO_2 .

Было однозначно показано, что активный метаболизм 2ФГ не только существует, но и необходим для роста цианобактерий в современной атмосфере, содержащей O_2 , несмотря на существование механизма концентрации неорганического углерода [76, 208]. Кроме того, существующая природа метаболизма 2ФГ и его встречаемость у всех современных цианобактерий подразумевает, что этот метаболизм уже существовал у древних цианобактерий и мог быть отправной точкой для эволюции фотореспираторного метаболизма 2ФГ в растениях после поглощения первичного цианобактериального эндосимбионта.

Для растений C_3 , как и для цианобактерий, также характерна первичная фиксация углерода за счет фермента рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы [37]. Следовательно, растения используют так называемый путь фотодыхания (или цикл C_2) [42, 155]. Как правило, фотореспираторный цикл является обязательным для растений C_3 -типа, потому что мутации на отдельных стадиях цикла C_2 приводят к высокому содержанию углекислого газа у CO_2 -требующих фенотипов, способных к этому циклу [58, 60, 194].

После открытия светоиндуцированного фотореспираторного газообмена [156, 217, 230] был создан широкий спектр фотореспираторных мутантов C_3 -растений: арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), ячменя (*Hordeum vulgare*), гороха (*Pisum sativum*) и табака (*Nicotiana tabacum*) для облегчения молекулярного анализа этого важного процесса. Эти мутанты продемонстрировали характерный фотореспираторный фенотип: они не могли расти в условиях окружающего воздуха, но могли существовать в присутствии дополнительных порций CO_2 [57, 134, 195, 205, 216]. Более поздние исследования фотореспираторных мутантов, использующих механизм концентрации углерода, таких как цианобактерии, красные и зеленые водоросли [62, 170, 201, 209], а также некоторых видов C_4 -растений [66, 100] подтвердили мнение о том, что фотореспирация является важным партнером фотосинтеза в богатой кислородом атмосфере

[203]. Подробные физиологическая и молекулярная характеристики всех этих мутантов позволили получить всеобъемлющую картину фотодыхания, включая биохимический путь, показывающий как фотодыхание встроено в сеть первичного метаболизма и взаимодействует со многими другими путями клеточного метаболизма [39, 158, 164, 165, 166-169, 171, 183, 217].

Таким образом, чтобы противодействовать фотодыханию, наземные растения, водоросли и цианобактерии создали различные механизмы концентрации (CO_2 -концентраты), которые направлены на увеличение концентрации CO_2 относительно O_2 у фермента Рубиско. Одним из таких механизмов является фотосинтез C_4 , который обнаружен в растениях, таких как кукуруза, сахарный тростник и травы саванны. Растения C_4 демонстрируют специализированную анатомию листьев: анатомию Кранца (рис. 1). Kranz (немецкий язык – венчик) относится к пучку клеток, который окружает центральную вену в пределах листа, которые, в свою очередь, окружены клетками мезофилла. Клетки мезофилла в таких листьях богаты ферментом фосфоенолпируваткарбоксилазой (ФЕП-карбоксилаза), который фиксирует CO_2 , образуя оксалоацетат. Оксалоацетат, образованный клетками мезофилла, восстанавливается до малата, используя НАДФН. Затем малат экспортируется из клеток мезофилла в клетки оболочки пучка, где он декарбоксилируется до пирувата, регенерируя, таким образом, НАДФН и CO_2 , которые используются Рубиско в цикле Кальвина. Пируват, в свою очередь, возвращается в клетки мезофилла, где он фосфорилируется с использованием АТФ для реформирования цикла Кальвина. Преимущество фотосинтеза C_4 состоит в том, что CO_2 накапливается при очень высокой концентрации в клетках оболочки пучка, что достаточно для эффективной работы Рубиско [114].

Фотодыхание, помимо возвращения углерода, служит дополнительной цели. Необходимость больших энергетических затрат, для рециркуляции фосфогликолата, также делает этот путь важным этапом в сокращении избыточной энергии и предотвращении повреждения реакционного центра [168, 212]. При высокой интенсивности света уменьшение мощности, генерируемой

световыми реакциями фотосинтеза, лимитирует способность ферментов, ассимилирующих углерод, регенерировать НАДФ⁺ [225]. Стрессовые условия, которые еще больше ингибируют углеродную фиксацию, могут усугубить дисбаланс, что приведет к чрезмерному сокращению фотосинтетической цепи переноса электронов, фотоингибированию и продуцированию активных форм кислорода [168].

Фотореспираторный метаболизм является одним из нескольких альтернативных электронных путей [226], служащих для предотвращения чрезмерной редукции фотосинтетических компонентов переноса электронов. Фотореспираторные интермедиаты, переносимые из хлоропласта, несут энергию, которая должна быть распределена на другие органеллы [59]. Убедительные доказательства исследований ингибиторов в *Phaeodactylum tricoratum* подтверждают роль митохондриальных процессов электронного транспорта в рассеивании избыточной восстановительной энергии в хлоропластах диатомовых водорослей [67, 115]. Кроме того, фотореспираторные интермедиаты в значительной степени зависимы и от других аспектов центрального метаболизма углерода и азота [167], включая синтез метаболитов, увеличивающих продукцию антиоксидантов [168].

1.5.2 Биогенез фермента гликолатоксидазы

Гликолатоксидаза (ЕС 1.1.3.15; гликолат:кислород-оксидоредуктаза; ГО) представляет собой пероксисомальный фермент, который превращает гликолат в глиоксилат с образованием пероксида водорода из O₂ посредством реакции, опосредованной флавинмононуклеотидом (ФМН). Этот фермент является членом суперсемейства α-гидроксикислот оксидаз, которое включает гидроксикислотные оксидазы с короткой и длинной цепью, лактатоксидазу и флавинсвязывающий домен дрожжевого флавоцитохрома *b*₂ [62].

В первой половине реакции гидроксильная группа субстрата окисляется и ФМН восстанавливается. Во второй половине восстановленный ФМН переокисляется кислородом и образуется перекись водорода. Фермент широко

распространен и был изучен в основном у млекопитающих и растений. В зеленых растениях гликолатоксидаза является одним из ключевых ферментов в фотореспирации, где окисляет гликолат до глиоксилата [142].

По-видимому, растительные и животные гликолатоксидазы (короткоцепочечные α -гидроксикислотные оксидазы) произошли от общего эукариотического предка ГО, который возник от бактериальной лактатоксидазы [173]. У млекопитающих ГО отвечает за выработку оксалата [185], являющегося потенциальным местом для терапевтических агентов для лечения первичной гипероксалурии [225], генетического заболевания, которое приводит к образованию крупных камней в почках вследствие отложения оксалата кальция. Производство эндогенного глиоксилата происходит в основном в пероксисомах и митохондриях. Важные источники глиоксилата, такие как гидроксипролин, также метаболизируются в гликолат. Пероксисомальный глиоксилат может быть результатом активности либо оксидазы D-аминокислоты на глицине, либо гликолатоксидазы на гликолате. Пероксисомальный глиоксилат обычно детоксифицируется глиоксилат-аминотрансферазой в пируват и глицин путем переаминирования аланином. Избыток глиоксилата в пероксисомах превращается в оксалат с помощью глиоксилоксидазы или переносится в цитоплазму, где он восстанавливается до гликолата с помощью глиоксилатредуктазы или окисляется до оксалата с помощью лактатдегидрогеназы (рис. 4) [103].

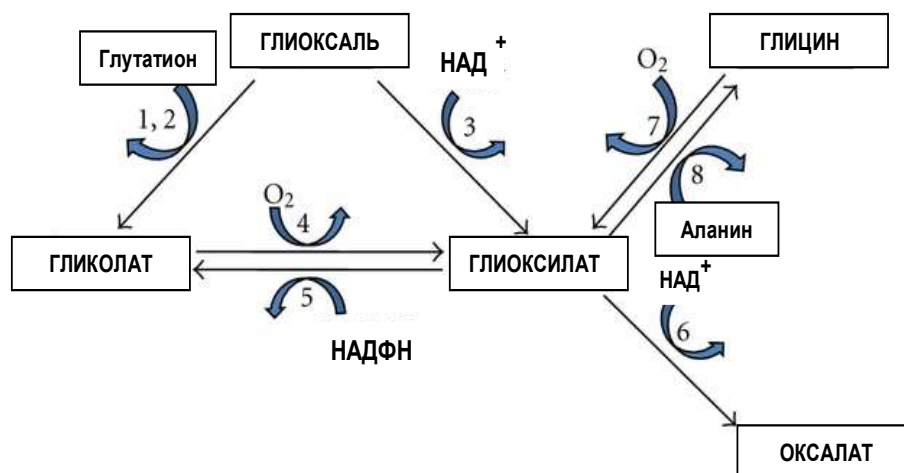


Рис. 4. Потенциальные механизмы синтеза оксалатов из глиоксаля. Ферменты включают (1) глиоксилазу I, (2) глиоксилазу II, (3) альдегиддегидрогеназу, (4) гликолатоксидазу, (5) глиоксилатредуктазу, (6) пероксисомальную глиоксилоксидазу/цитоплазматическую лактатдегидрогеназу, (7) D-аминокислотную оксидазу и (8) аланин:глиоксилат аминотрансферазы [184]

У растений ГО участвует в фотореспираторном цикле, катализируемом оксигеназой. Фотореспираторное окисление гликолата наземной растительностью представляет поток почти 3 пмоль / год и, таким образом, является одним из основных потоков в глобальном масштабе [75].

ГО играет важную роль в регуляции фотосинтеза растений и их стрессоустойчивости. Подавление активности ГО приводит к накоплению глиоксилата и ингибирует фотосинтез, тогда как избыточная экспрессия ГО обеспечивает улучшенный фотосинтез при высокой освещенности и большой температуре у риса [154].

1.5.3 Возможный путь эволюции лактатоксидазы

Увеличение атмосферного O_2 , синтезированного фотосинтезом, привело к формированию фотореспираторного метаболизма – процесса, в котором O_2 замещает CO_2 , с образованием токсичного соединения 2-фосфогликолата,

рециркулирующего в конечном итоге в 3-фосфоглицерат [39]. Этот процесс переработки имеет жизненно важное значение для успеха фотосинтезирующих организмов при нынешних высоких уровнях O_2 в атмосфере. Существенный вклад в понимание эволюции фотодыхания дало исследование Хаккенберга с соавт. (Hackenberg C. [et al.], 2011) [54].

Во время рециркуляции 2-ФГ в 3-ФГА гликолат превращается в глиоксилат с помощью гликолатоксидаз у наземных растений и гликолатдегидрогеназ у цианобактерий и зеленых водорослей. Был проведен поиск гомологов ГО в бактериях, водорослях и наземных растениях. У цианобактерий и водорослей были обнаружены гомологи хорошо охарактеризованного фермента ГО, экстрагированного из шпината (*Spinacia oleracea*). Этот результат подтверждают выводы Керна с соавт. (Kern R., Bauwe H., Nagemann M., 2011) [124], которые также сообщают, что ГО-подобные белки обнаружены в азотфиксирующих видах цианобактерий и что ген ГО у фотосинтетических эукариот находился в геноме цианобактериального эндосимбионта, давшего начало пластиде. Однако, учитывая, что зеленые водоросли и цианобактерии используют гликолатдегидрогеназы вместо ГО для сравнимой стадии фотореспирации, обнаружение генов, кодирующих ГО-подобные белки в их геномах, возникает вопрос: что делают гомологи ГО цианобактерий и водорослей и как они приобрели свои фотореспираторные функции у наземных растений?

Для решения этих вопросов были изучены очищенные родственные белки ГО из *Arabidopsis thaliana*, N_2 -фиксирующей цианобактерии *Nostoc* PCC 7120 и зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [202]. Все три белка проявляли оксидазную активность, белки *Nostoc* и *C. reinhardtii* предпочитали L-лактат над гликолатом и, следовательно, являются лактатоксидазами (ЛО, КФ 1.1.3.15).

ЛО-нулевой мутант *Nostoc* не проявлял нарушения роста, типичные для фотореспираторных мутантов. Был сделан вывод о том, что ЛО необходима для фиксации азота в присутствии кислорода [55]. Полагают, что ЛО действует как «поглотитель кислорода», который позволяет бактериям использовать атмосферный азот даже в атмосфере с высоким содержанием кислорода [81].

Учитывая тесную взаимосвязь между азотфиксирующими цианобактериями и пластидным эндосимбионтом, разумно предположить, что после эндосимбиоза кодированный пластидой фермент ЛО развивал в процессе эволюции гликолатоксидазную активность и стал выполнять важную роль в фотореспирации, заменив гликолатдегидрогеназы. Основываясь на сравнении последовательностей ЛО и ГО (рис. 5), авторы смогли мутировать лактатоксидазу из *Nostoc* так, что ее гликолатоксидазная активность увеличивалась, а лактатоксидазная уменьшалась, делая его более похожим на гликолатоксидазу. Возможное происхождение фотодыхания на основе ГО линии зеленых водорослей *Charophyta*, вероятно, сыграло важную роль в последующем появлении адаптированных к наземному образу жизни растений.

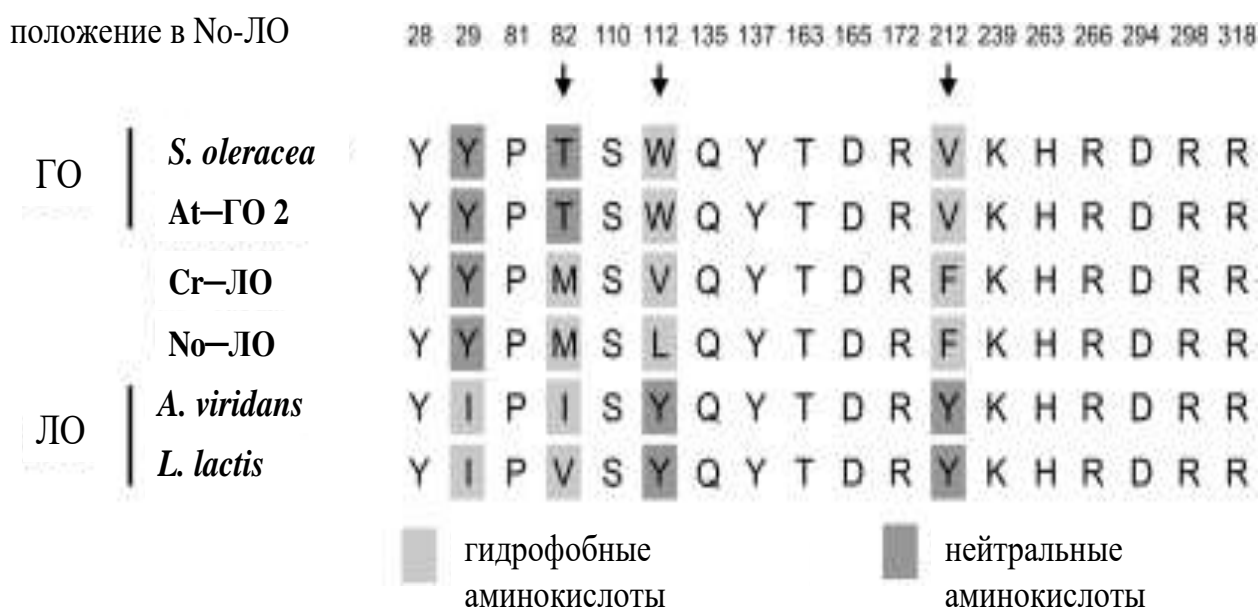


Рис. 5. Выравнивание активных сайтов ГО, ЛО и родственных белков. Серые остатки, вероятно, участвуют в связывании субстрата. Стрелками отмечены аминокислотные мутации в лактатоксидазе из *Nostoc*, которые переключают её активность на гликолатоксидазную [56]

В дополнение к функции поглощения O_2 , лактатоксидаза из *Nostoc* также может быть важна для перенаправления лактата, возникающего в результате анаэробного гликолиза, в глюконеогенез, аналогично известному циклу Кори у

млекопитающих [сформулированного в 1929 году как энергетический метаболический путь у животных, где атомы углерода глюкозы проходят по круговому маршруту: мышечный гликоген → лактат крови → печень (где происходит глюконеогенез) → глюкоза крови → глюкоза мышц → мышечный гликоген] [98]. Потребности в энергии этого процесса предполагают тогда сотрудничество гетероцист с фотосинтетическими клетками *Nostoc*. В обоих случаях образовавшаяся H_2O_2 может быть удалена рубредоксиноподобными белками, такими как RbrA. Эти белки используют в качестве восстановителя водород, который вырабатывается как побочный продукт фиксации азота [233]. Аналогично, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, продуцирующих перекись водорода, на первый план может выступить митохондриальная лактатоксидаза, которая способна использовать водород [160]. Но гипотеза о том, что ЛО представляет собой один из нескольких механизмов поглощения кислорода в *Nostoc*, нуждается в дополнительных исследованиях.

Таким образом, можно заключить, что цианобактерии, сохранившие свою способность к фиксации N_2 , могут использовать фермент лактатоксидазу, потребляющую кислород, в качестве одного из механизмов защиты нитрогеназы от кислородной инактивации. Наоборот, потеря нитрогеназы сопровождалась потерей генов *lox*. Указывает ли это на то, что первичный эндосимбионт все еще мог фиксировать N_2 , впоследствии потерявший эту способность? Можно считать, что фермент приобрел свою специфичность к гликолату и стал фотореспираторной ГО спустя некоторое время, прошедшее со времен существования последнего общего предка *Chlamydomonas* и наземных растений [151].

1.5.4 Дифференциация лактатоксидазы от других изоформ гликолатоксидазы

В корнях *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) Энгквист с соавт. (Engqvist M.K. [et al.], 2015) [84] идентифицировали паралоги гликолатоксидазы ГО1, ГО2 и ГО3, как предполагаемый фермент, метаболизирующий L- лактат, на основании их

гомологии с флавоцитохромом b_2 , оксидоредуктазой L-лактат-цитохрома c из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [147, 206]. В корнях растения L-лактат образуется в результате восстановления пирувата через L-лактатдегидрогеназу, но этот фермент не эффективен при катализе обратной реакции. Было обнаружено, что ГОЗ использует L-лактат с такой же эффективностью, что и гликолат; напротив, фотореспираторные изоформы ГО1 и ГО2, которые имеют сходные каталитические свойства, используют гликолат с гораздо более высокой интенсивностью, чем L-лактат [85]. Ключевым фактором, позволяющим ГОЗ более эффективно утилизировать L-лактат, по сравнению с ГО1 и ГО2, является 5-10-кратное снижение величины K_m для субстрата. Следовательно, только ГОЗ может эффективно метаболизировать L-лактат при низких внутриклеточных концентрациях. Эксперименты с изотопными трассерами, а также тесты на токсичность субстрата с использованием растений с потерей функции ГОЗ и сверхэкспрессором показывают, что L-лактат метаболизируется *in vivo* с помощью ГОЗ. Кроме того, ГОЗ обеспечивает нормальный рост дрожжевого штамма, не содержащего b_2 , который не может расти на L-лактате в качестве единственного источника углерода. ГОЗ присутствует преимущественно в зрелых и стаеющих листьях и корнях растений и, как правило, отсутствует в молодых фотосинтезирующих листьях. Это указывает на его важную роль преимущественно в гетеротрофных, а не автотрофных тканях, по крайней мере в стандартных условиях роста. У корней растений, выращенных в нормальных по содержанию кислорода условиях, потеря функции ГОЗ вызывает метаболические перестройки, которые отражают реакции дикого типа на выход из гипоксии. Таким образом, можно заключить, что ГОЗ является ферментом, который метаболизирует L-лактат до пирувата *in vivo* и предположить, что он может обеспечить поддержание низких уровней L-лактата после его образования в условиях нормоксии.

1.5.5 Взаимосвязь флавоцитохрома b_2 дрожжей и семейства гликолатоксидаз шпината и арабидопсиса

Флавоцитохром b_2 из дрожжей (ЕС 1.1.2.3) является тетрамерным ферментом, который несет один ФМН и один протогем IX, с Mg субъединицы – 57 кДа [90]. Он расположен в межмембранном пространстве митохондрий и катализирует окисление лактата в пируват. В этом процессе реакция восстановления ФМН имеет сходство с механизмом работы другой группы ферментов – оксидаз гидроксикислот [38], включая гликолатоксидазу. Однако во флавоцитохроме b_2 , ФМН окислен путем переноса его электронов через гемовую группу к цитохрому c , который является естественным акцептором электронов. Эта последовательность шагов приводит к переходному образованию – флавин-семихинону. Рентгеновская структура флавоцитрома b_2 из пекарских дрожжей была определена с разрешением 2,4 Å. N-конец 99-остатка образует отдельный гем-связывающий домен – ядро цитохрома b , которое является гомологичным и структурно схожим с цитохромом b_6 [168]. Было показано, что следующие 365 остатков складываются в восьмипочечный β/α цилиндр, который связывает ФМН и которому предшествует небольшой спиральный домен. Таким образом, можно сделать вывод, что структура флавоцитохрома b_2 похожа на структуру гликолатоксидазы (рис.6).



Рис. 6. Стереограмма наложенных друг на друга активных центров гликолатоксидазы (синим) и флавоцитохрома b_2 (желтым). Маленькая сфера за

флавином это скрытая молекула воды в гликолатоксидазе, которой нет в флавоцитохроме b_2 [135]

Аминокислотный сиквенс гликолатоксидазы демонстрирует сходство на 37% с последовательностью флавин-связывающего домена в флавоцитохроме b_2 , что указывает на то, что эти два белка гомологичны. Интересно, что, хотя они и показывают очень высокую степень структурного сходства ($0,93 \text{ \AA}$ отклонение для 311 атомов Ca), есть четкое различие в их связывании с ФМН, которое может составлять основу их различных режимов повторного окисления [197].

Авторы (Engqvist M.K. [et al.], 2015) [84] в своей работе отметили, что все пять белков из семейства L-гидроксикислот-оксидаз арабидопсиса показали более 35% идентичности с каталитическим доменом цитохрома b_2 (начиная с аминокислоты 203). В то время как у них полностью отсутствовала гомология с гем-связывающим доменом цитохрома b_2 – свидетельство того, что эти ферменты могут использовать другой акцептор электронов, чем гем (рис. 7).

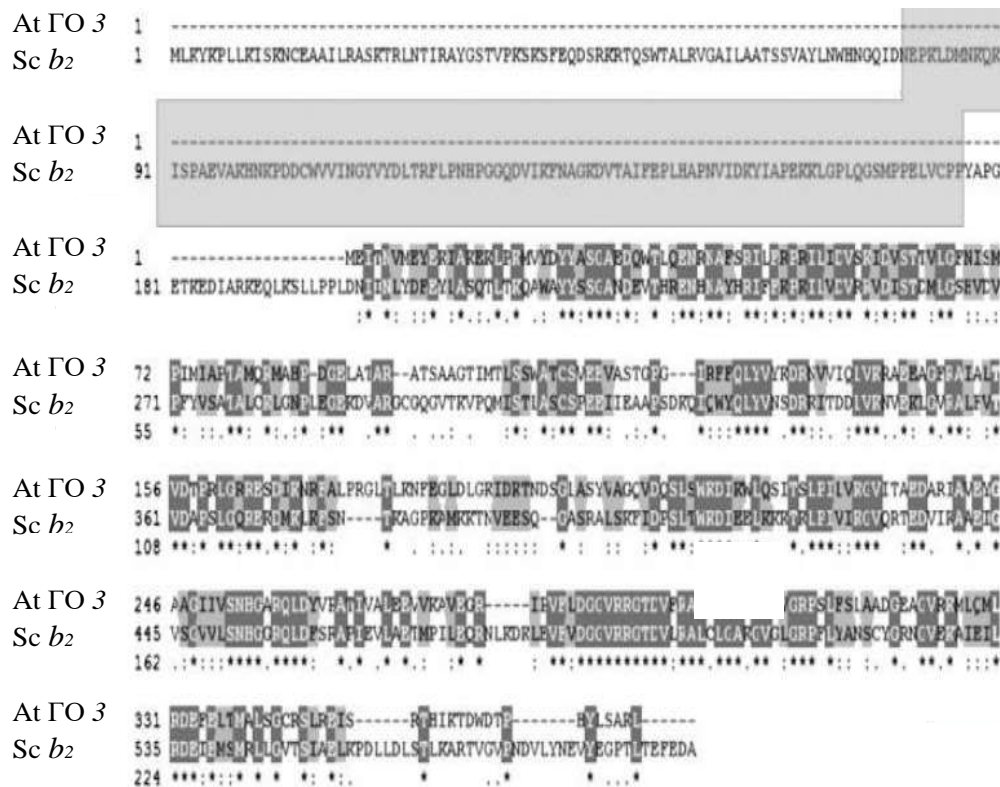


Рис. 7. Выравнивание цитохрома b_2 из *S. cerevisiae* (Sc b_2) с ГО3 арабидопсиса (At ГО3). Серая область показывает связывающий цитохром с домен b_2 [84]

1.5.5.1 Изоферменты гликолатоксидазы

Характеристики изоферментов ГО у растений изучены слабо. Было показано, что существует три типа изоферментов ГО, присутствующих в листьях риса, в том числе два из них являются гомоолигомерами, состоящими из субъединиц ГО1 или ГО4, а третий представляет собой гетероолигомер [44], состоящий из взаимодействующих субъединиц ГО1 и ГО4. Проанализирована их специфичность к субстратам с использованием неочищенного фермента. Найдено что для ГО1, ГО4 и гетероолигомера ГО1 +ГО4 характерна наибольшая активность с гликолатом в качестве субстрата, а также относительно высокая активность с глицератом и наименьшая активность с L-лактатом и глиоксилатом. В противоположность этому, ГО3 демонстрировала наивысшую активность с L-лактатом, при этом аналогичные свойства были обнаружены при использовании гликолата и глицерата. ГО5 была полностью неактивна ко всем протестированным субстратам. Согласно работе (Engqvist M.K. [et al.], 2015) [84], величина K_m по гликолату у ЛЦО-подобной гликолатоксидазы лежит в том же диапазоне, что и для ГО1 и ГО2, и составляет 144 мкМ в сравнении с 278 мкМ и 327 мкМ для ГО1 и ГО2 соответственно. Но исследуемую ЛЦО-подобную гликолатоксидазу отличает высокое сродство к субстрату лактату, составляющее 420 мкМ, что на порядок выше по сравнению с величинами K_m для фотореспираторных гликолатоксидаз равных 2.8 и 4.9 мМ [84].

Согласно исследованиям ряда авторов, молекулярные массы ГО варьируют в диапазоне 40-45 кДа. По результатам электрофоретических исследований гликолатоксидаз риса в денатурирующих условиях (SDS-PAGE анализ), который гарантирует чистоту для каждого изофермента, различные изоферменты имеют одинаковую молекулярную массу субъединиц около 40 кДа. Попутно отметим, что данный показатель для ГО из листьев арабидопсиса равнялся 43 кДа [84].

1.5.5.2 Механизм ферментативного катализа гликолатоксидазы

На сегодняшний день лучше всего охарактеризован фермент ГО по структуре, кинетике и биохимическим свойствам из листьев шпината (*Spinacia oleracea*). В его трехмерной структуре идентифицированы: Ser¹⁰⁶, Tyr¹²⁹, Thr¹⁵⁵ и Lys²³⁰ как важные остатки в стабилизации кофактора ФМН, тогда как Tyr²⁴, Tyr¹²⁹ и Arg²⁵⁷ участвуют в связывании субстрата. His²⁵⁴ необходим для катализа, так как он задействован в отрыве протона от атома гликолата C₂ [135]. Эта функция была обнаружена и в других членах суперсемейства оксидаз α-гидроксикислот, поскольку мутация эквивалентного остатка His (H373Q для флавоцитохрома *b*₂ и H290Q для лактатоксидазы) приводила к снижению активности и значений *K_m* субстрата или неактивных рекомбинантных белков [144]. Недавно установленная структура ГО в печени человека указывает на сохранение соответствия остатков активного сайта между ферментами растений и животных [196]. Для ГО был предложен механизм пинг-понга, состоящий из двух полуреакций. В восстановительной полуреакции, после обратимого образования комплекса между ферментом и гликолатом, протоны отводятся от гликолата C₂ и принимаются ФМН (рис. 8). Затем комплекс диссоциирует, глиоксилат высвобождается и восстановленный ФМН переокисляется кислородом, образуя перекись водорода [136]. Исследования с остановленным потоком при использовании рекомбинантной ГО, продуцируемой в пекарских дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*), позволили установить, что стадия восстановления ФМН ограничивает скорость катализа ГО [71].

Недавно новые достижения в спектроскопии были использованы для доказательства того, что восстановленный ФМН подвергается двухэтапному окислению в рекомбинантной ГО из печени человека (рис. 8) [163].

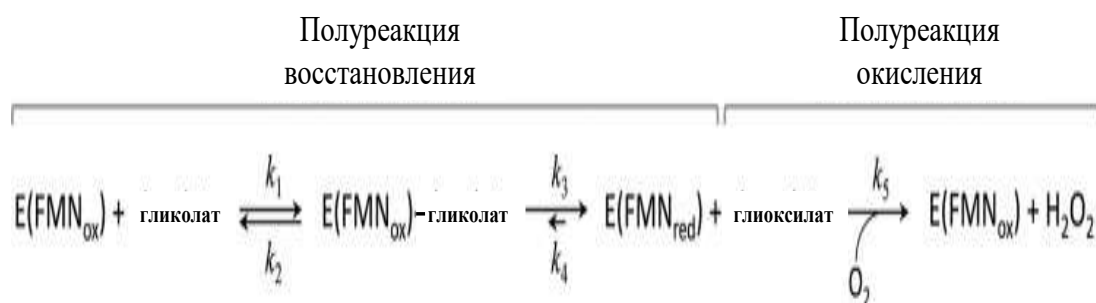


Рис. 8. Формальный механизм реакции, катализируемой гликолатоксидазой

Несмотря на современные знания о химической основе катализа ГО, остается неопределенность относительно природы переходных состояний вдоль восстановительной полуреакции. В литературе описаны два сценария (рис. 9), которые отличаются положением первого отдаленного протона. По принципу карбонийного механизма (рис. 9, а), боковая цепь ключевого остатка гистидина (His²⁵⁴ в шпинате ГО) отделяет альфа-протон от С₂ атома гликолата, что приводит к образованию отрицательно заряженного промежуточного соединения. Протон гидроксильной группы, присоединенный к атому С₂ гликолата, затем отводится к ФМН. При переносе водорода (рис. 9, б), два протона отщепляются согласованным образом от боковой цепи остатка гистидина, отводящей протон гидроксильной группы гликолата, и в то же время α-протон переносится на атом ФМН [70]. Два представленных механизма отличаются по природе первого протона, к которому присоединяется His²⁵⁴. В части б) (рис. 9) абстрагирование протонов от О₂ (гидроксил) и С₂ (α-протон) показаны в виде двух отдельных этапов, но они могут происходить в пределах одного и того же элемента реакции (асинхронная согласованная перегруппировка) [189].

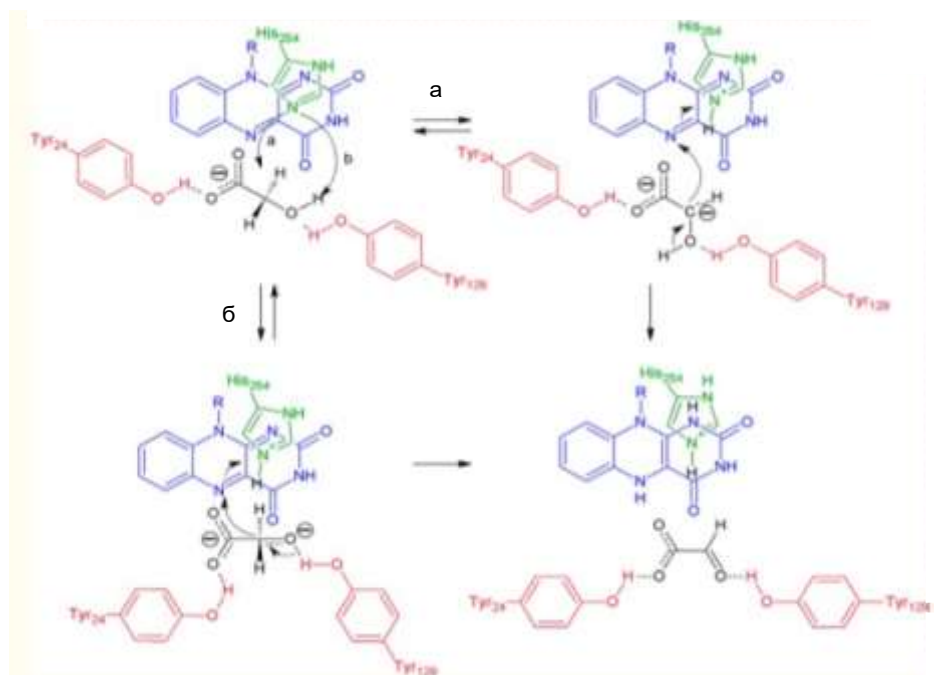


Рис. 9. Возможные механизмы депротонирования гликолата, катализируемого ГО: а) ступенчатый карбанионный механизм; б) согласованный перенос гидроида. Внутри активного сайта выделены: гликолат (черным), Tyr²⁴ и Tyr¹²⁹ (красным), His²⁵⁴ (зеленым) и изоаллоксазиновым кольцом ФМН (синим) [189]

1.5.6 Физико-химические и каталитические свойства ферментов семейства гликолатоксидазы

Фермент ГО был идентифицирован у растений, млекопитающих и содержит нековалентно связанный ФМН. Гликолатоксидазы были сгруппированы в суперсемейство α -гидроксикислотных оксидаз, которое включает среди прочего длинноцепочечную оксикислотную оксидазу, лактатоксидазу, манделатдегидрогеназу и флавинсвязывающий домен дрожжевого флавоцитохрома *b*₂. У растений ГО локализуется в пероксисоме фотосинтетических тканей, где она участвует в фотодыхании. У людей и других позвоночных, например у свиней, фермент находится в пероксисомах печени и почек и участвует в выработке оксалатов [178]. Это открытие вызвало значительный интерес к изучению механистических и структурных свойств человеческой ГО для потенциальной разработки терапевтических агентов,

нацеленных на лечение первичной гипероксалурии (генетического нарушения, при котором перепроизводство оксалата приводит к большим запасам оксалата кальция). При изучении профилей рН стационарных и предстабилизированных кинетических параметров ГО печени человека фермент показал механизм Ping-Pong Vi-Vi во всем диапазоне рН от 6,0 до 10,0. Образование комплекса фермент-субстрат благоприятно при значениях рН ниже 8,5, тогда как химическая стадия, на которой флавин восстанавливается гликолатом, проходит быстрее при значениях рН выше 7,0 [188]. Проведенный Чжаном с соавт. (Zhang Z. [et al.], 2017) [43] анализ исследуемых изоферментов из риса показал, что величина оптимального рН 7,8 была идентична для всех изозимов ГО, а оптимальная температура для ГО1 и ГО4, а также гетероолигомера ГО1 + ГО4 составляла 42° С, тогда как оптимальная температура работы ГО 3 равнялась 47° С. Отметим также, что для всех изоформ гликолатоксидазы арабидопсиса, в том числе и для ГО3 кривые рН-зависимой активности были в форме колокола, а оптимальные значения рН, определенные с использованием гликолата в качестве субстрата, соответствовали рН 7,5 [85].

Интересно, что предыдущие исследования показали различия между кинетическими параметрами ГО у видов растений C₃ и C₄. Гликолатоксидазы из C₄-растений способны иметь более низкую величину K_m для гликолата (10 мкМ для амаранта (*Amaránthus*) и 23 и 65 мкМ для клеток обкладки и мезофильных клеток кукурузы (*Zéa máys*), соответственно) по сравнению с C₃-видами (330 мкМ для семян тыквы (*Cucúrbita pépo*), 300 мкМ для гороха (*Pisum sativum*), 1 мМ для шпината (*Spinacia oleracea*), и 1,9 мМ для арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) [54, 84]. Обсуждаемые данные предполагают потенциальные различия в связывании субстрата и, возможно, в кинетике скорости реакции. Такие отличия в кинетических свойствах будут соответствовать адаптации к клеточным метаболическим условиям, то есть естественному более низкому содержанию гликолата в растениях C₄ из-за слабовыраженного фотодыхания [192, 210]. Кроме того, можно предположить, что фермент из C₃-видов будет иметь большую V_{max} для обеспечения

максимальной конверсии гликолата при высоких скоростях фотореспирации. Однако к настоящему времени получено еще мало данных, позволяющих сравнить каталитическую эффективность ферментов C₃- и C₄-растений, включая их идентификацию при действии ограничивающих факторов.

Чтобы прояснить природу механизма и возможные различия в химическом составе ферментов C₃- и C₄-растений, авторы [70] проанализировали кинетику рекомбинантных ферментов из этих организмов с использованием изотопных эффектов. Но существенных различий между ферментами из разных эволюционных групп растительных организмов не было обнаружено [101].

1.6 Молекулярные аспекты функционирования ферментов метаболизма лактата

В настоящее время появляется все больше информации по генетическому распределению ЛЦО-подобной лактатоксидазы внутри различных филумов бактерий. Ген *AvLcto / gox 3* [51] был обнаружен у *Pediococcus acidilactic* в семействе *Lactobacillaceae*, который является факультативным анаэробом с молочнокислым брожением. Также получен очищенный ферментативный препарат. В семействе *Lactobacillaceae* предположительная роль ЛЦО-подобной лактатоксидазы, по-видимому, заключается в адаптации бактерии к меняющимся окружающим параметрам при переходе из строго анаэробных условий к аэробным.

Исследование ряда штаммов *Bacillus coagulans* показало наличие двух типов ЛДГ (окисляющие L- и D-лактат) и ГОЗ. ГОЗ показывает низкий уровень экспрессии при экспоненциальной фазе роста, когда происходит накопление молочной кислоты. Однако, при избытке лактата в клетках было обнаружено увеличение экспрессии гена ГОЗ (*gox3*) Биохимический анализ продукта гена *gox3 Bacillus coagulans* показал, что ГОЗ имеет большее сродство к лактату, чем к гликолату и, вероятно, не может выступать в роли классической гликолатоксидазы [136].

Генетическое распределение генов форм белков семейства гликолатоксидаз среди водорослей и растений неоднородно. При секвенировании новых геномов Археопластид обнаруживается большое количество *gox*-подобных генов, субстратную специфичность которых можно определить только при их очистке. *Gox*-гены были проанализированы для *Cyanophora paradoxa* и *Spirogyra pratensis*, белки которых катализировали превращение как L-лактата, так и гликолата практически в равной степени. Это свидетельствует о возможном общем предке ЛЦО-подобной гликолатоксидазы и иных гликолатоксидаз у этой группы. При сравнении НК-последовательностей *Arabidopsis thaliana* и *Chlamydomonas* было выявлено, что *gox*-система, предпочитающая гликолат, скорее относится к ЛЦО-подобной гликолатоксидазе. Биохимическое сродство этого белка для указанных организмов к L-лактату значительно выше, чем к гликолату. Для клещевины отмечается работа сразу нескольких типов *gox*-генов при прорастании семян [208].

Наблюдается высокий уровень сходства генов у цианобактерий и хлорофитов, кодирующих ту гликолатоксидазу, которая имеет большее сродство к лактату, чем гликолату. При филогенетическом анализе они образуют отдельную группу от остальных генов *gox* всех Археопластид [234]. Существует два возможных сценария эволюции лактатоксидазы, или, иными словами, гликолатоксидазы 3 среди хлорофитов. Все ГО-подобные ферменты могут в некоторой степени использовать L-лактат и гликолат следовательно, в течение эволюционной истории они были оптимизированы, чтобы соответствовать определенным метаболическим требованиям. Эти сложных системах два фундаментальных процесса – фотодыхание и молочнокислое брожение определили набор генов *gox* и их регуляцию. В геноме водорослей чаще встречаются *gox1* и *gox2*, так как для них нет выраженной проблемы недостатка кислорода по сравнению с высшими растениями [104]. Ткани, которые испытывают его недостаток, к примеру корни, имеют более гибкую систему активирования генов *gox*-системы и, в частности, такого специфического гена, как *gox3*.

Ассимиляция экзогенного D, L-лактата дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* опосредуется несколькими ферментативными стадиями, в которых участвует транспорт D, L-лактата в клетку, окисление D, L-лактата до пирувата и последующий перенос электрона на цитохром *c* в митохондри. Окисление L-лактата катализируется флавоцитохромом b₂ (*cyb2*), кодируемым геном *cyb2*, тогда как D-лактат окисляется D-лактатдегидрогеназой (D-LD), кодируется ген *dld1*. Субстратная специфичность обоих ферментов в отношении D- и L-изомеров строго не перекрывается; *cyb2* окисляет только L-лактат с помощью ФМН как кофактор, тогда как D-LD катализирует окисление D-лактата исключительно в зависимости от ФАД как простетической группы [78].

Фермент L-лактатцитохром *c* оксидоредуктаза (флавоцитохром b₂, FC b₂) термотолерантных метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) термостабилен, в отличие от ферментной формы пекарских дрожжей, и является потенциально важным для биоаналитических технологий высокоселективных анализов L-лактата в биологических жидкостях и пищевых продуктах [53]. Его кодирует ген *HpCyb*.

Гликолатоксидаза произошла из бактериальной лактатоксидазы [170] и имеет аналогичный механизм реакции переноса гидрида с другими членами семейства α-гидроксикислот [69]. *Arabidopsis thaliana* содержит пять предполагаемых генов, кодирующих гликолатоксидазу *gox1* (At3g14420), *gox2* (At3g14415), *gox3* (At4g18360), *haox1* (At3g14130) и *haox2* (At3g114150). Протеомный анализ показал, что *gox1* и *gox2* являются основными изоформами *gox* в пероксисомах листьев *Arabidopsis thaliana* [172, 176, 221].

Недавно были охарактеризованы одиночные нокаут-мутанты *gox* для каждого гена *gox Arabidopsis*, но они не проявляли фотодыхательного фенотипа; однако они были более чувствительны к авирулентным штаммам *Pseudomonas syringae* [86]. Недавно было обнаружено, что *gox3* поддерживает окисление L-лактата в корнях арабидопсиса [85]. Присутствие *gox3* только в зрелых листьях растений анализировали с

помощью количественной ПЦР в ходе развития и старения, вызванного темнотой, с использованием целых розеток. Транскрипт *gox3* также непрерывно накапливается во время «старения» листьев, индуцированного темнотой, достигая максимума через 10 дней после переноса в темноту. В совокупности эти результаты показывают, что *gox3* играет более заметную роль в гетеротрофных тканях, чем в автотрофных. Линии РНК табака, нацеленные на *gox* с 10% -20% нормальной активности *gox* листа, проявляли фенотип замедленного роста и хлороз листьев [230]. У них наблюдалось снижение скорости фотосинтетического переноса электронов (ETR) на 70% и увеличение нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) на 30% при интенсивности света более 200 мкмоль фотонов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ [229]. Аналогичные результаты наблюдались для риса с индуцибельными антисмысловыми линиями, нацеленными на *OsGlo1* или *OsGlo4*, имеющего 40% и 20% нормальной активности *gox* соответственно. Они демонстрировали замедленный рост в воздухе, низкую чистую скорость ассимиляции CO_2 , снижение начальной активности Рубиско и более низкие состояния активации Рубиско [112, 200]. Следовательно, низкая активность *gox* в листьях приводит к сильному ингибированию фотосинтеза и роста, когда растения выращивают на воздухе или переносят из среды с высоким содержанием CO_2 на воздух, но мало что известно о лежащих в основе этих эффектов метаболических механизмах.

Филогенетическая реконструкция для эукариот подтверждает мнение о том, что все их ГО-подобные белки, скорее всего, произошли от прокариотических предков, вероятно, приобретенных от древних цианобактерий [107]. При этом родство между генами *gox*-системы эукариот и архей не наблюдается, вопреки существующей теории об их более близком филогенетическом положении. У архей по сравнению с растениями и прокариотами, не обнаруживается сложной системы генов *gox*. При этом интересно то, что их *gox*-гены вносят отдельный вклад в осуществление общего филогенетического реконструирования. Стоит отметить, также что гены *gox*-

системы грибов редко изучаются в сравнительном плане из-за высокой скорости генетической изменчивости, и это не позволяет проводить достоверное выравнивание, как последовательностей нуклеиновых кислот, так и аминокислотных последовательностей [12].

1.6.1 Молекулярно-генетические особенности функционирования лактатдегидрогеназы в живых организмах

Лактатдегидрогеназа – широко распространенный фермент у бактерий. Особый интерес вызывает генетическое разнообразие ЛДГ у семейства *Lactobacillaceae*. Ген ЛДГ выступает филогенетическим маркером для *Streptococci*, *Bifidobacteria*, *Staphylococci*, *Mycoplasmae*, *Lactobacillaceae* и некоторых актиномицетов. Систематика ЛДГ для этой группы основывается на наличии металл-независимых ЛДГ, тогда как для некоторых представителей *Lactobacilli* необходимо наличие марганца или кобальта [128].

При распределении ЛДГ в других бактериях не всегда обнаруживается филогенетическая однородность. К примеру, исследование состава бактерий рубцовой ткани на основе анализа генетической последовательности ЛДГ и 16S рРНК выявило значительное видовое разнообразие родов *Selenomonas* и *Megasphaera*. Идентичность генов ЛДГ для родов составила выше 97% (рис.10). Однако наблюдается явное несовпадение в топологии полученных деревьев. Это приводит к мысли о высоком проценте горизонтального переноса генетического материала [130].

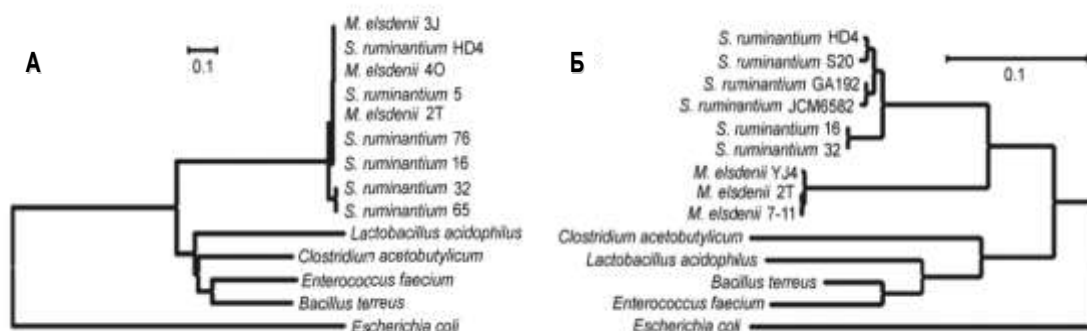


Рис. 10. Сравнение филогенетических деревьев на основе последовательностей аминокислот ЛДГ и 16s-rРНК *M. elsdenii* и *S. ruminantium*. Деревья были созданы с использованием алгоритма NJ. В качестве внешней группы использовались последовательности *Escherichia coli*

Другой типичной группой бактерий с возможностью к молочнокислому брожению является класс *Clostridia*. Свойства ЛДГ были наиболее полно изучены у *Clostridium thermocellum*. Для рода *Clostridium* наблюдается значительная вариабельность и состав генов ЛДГ. Это также объясняется высоким уровнем горизонтального переноса [143].

Наличие горизонтального переноса и отсутствие компартментов в клетке бактерий приводит к тому, что внутри рода некоторые виды содержат гены с низкой идентичностью. Однако, для эукариот наблюдается более консервативная корреляция в составе и функционале генов ЛДГ. Для *Saccharomyces cerevisiae* внутри генома существует два типа генов ЛДГ, которые кодируют свои субстратспецифичные ЛДГ. Реакцию с L-лактатом катализирует флавоцитохром b2, кодируемая геном *Cyb2*, тогда как D-лактат окисляется классической ЛДГ. Отмечается высокий уровень идентичности между геном *Cyb2* дрожжей и L-лактат дегидрогеназой некоторых бактерий. К примеру, для трех довольно генетически и филогенетически отдаленных видов *Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides* и *Acinetobacter calcoaceticus* схожесть L-лактат дегидрогеназы и *Cyb2* дрожжей достигает 70%. Однако, несмотря на наличие всех необходимых генов для взаимопревращения лактата у *S. Cerevisiae*, продукция лактата является для них невыгодной, так как эволюционно данная группа микроорганизмов осуществляет спиртовое брожение предпочтительно [6]. Совпадение по нуклеотидной и аминокислотной идентичности между дрожжевыми формами ЛДГ с растениями невелико и для определенных видов достигает 60%.

Три отдельных изофермента L-лактатдегидрогеназы были обнаружены в спящих клубнелуковицах шафрана *Crocus sativus L.* [125]. Авторы показали, изоферменты L-лактатдегидрогеназы экспрессируются на разных стадиях

развития клубнелуковиц. Множественность изоферментов, а также их последовательная экспрессия с тонкими различиями в кинетических параметрах отражают их важную роль в метаболизме. Происходящие в луковице изменения, такие как переключение с гипоксии в спящих клубнелуковицах на высокую окислительную активность корневых клубнелуковиц, напрямую связаны с работой НАДН-зависимой лактатдегидрогеназы, флавоцитохрома b2.

Растительная ЛДГ имеет значительные различия с таковыми у животных. Так для *Zea mays* уровень АК-идентичности с ЛДГ мыши и курицы достигает всего 50-52%. Также для кукурузы наблюдается крайне низкое сродство белковых последовательностей с некоторыми из видов бактерий *Bacillus caldotenax* и *Thermus caldophilis*, которое составляет всего 40 и 37% соответственно [231]. Однако выравнивание АК-последовательностей кукурузы с таковыми из ячменя показало высокий уровень сходства до 80% [7]. Обнаружено, что в генотипе ячменя встречается пять изоферментов, экспрессирующихся в корнях при гипоксических условиях [8]. Для картофеля также показано наличие ряда генов *ldh* [9, 141]. Исследование аминокислотной последовательности и каталитических свойств фермента для трех из них выявило высокий уровень сходства с ЛДГ животных. Для риса обнаруживается три гена изофермента *OsD-Ldh1*, *OsD-Ldh2* и *OsD-Ldh3*. Анализ их структуры и аминокислотной последовательности выявил, что только у *OsD-Ldh2* присутствуют все необходимые консервативные последовательности для осуществления ферментативной реакции [216].

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Объекты и методы исследований

2.1.1. Объекты исследований

Объектом исследования в данной работе служили корни и листья гороха (*Pisum sativum* L., сорт Амброзия), а также проростки сорго (*Sorghum sudanense* J.) – С₄-культуры, относящейся к семейству Злаки (*Poaceae*), выращенные гидропонным методом при температуре 25°C.

Для создания условий, имитирующих гипоксию, было выбрано прикорневое затопление проростков на 2-3 см. Спустя двое суток были проведены выделение и очистка фермента из затопленных растений [25, 40]. Для получения и очистки ЛЦО-подобной ГО – растения экспонировали на протяжении 3 суток в темноте [145].

В качестве дополнительного объекта использовали одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенные фототрофно, предоставленные из коллекции IPPAS Института физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева.

2.1.2 Методы исследования

2.1.2.1. Культивирование микроорганизмов

Культивирование зеленых водорослей *Chlorella vulgaris* осуществлялось при температуре 28°C и круглосуточном освещении в фотобиологическом аппарате «Флора-1». Организмы выращивали в аэробных и гипоксических условиях.

Среда, в которой культивировалась *C. vulgaris*, имела следующий состав (г/л): KNO₃– 5,0, MgSO₄*7 H₂O – 2,5, KH₂PO₄– 1,25, ЭДТА – 0,037, FeSO₄*7H₂O –

0,009; раствор микроэлементов: H_3BO_3 – $2,86 \cdot 10^{-3}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – $1,81 \cdot 10^{-3}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $2,22 \cdot 10^{-4}$, MoO_3 – $1,8 \cdot 10^{-5}$, NH_4VO – $2,3 \cdot 10^{-5}$).

Перед посевом в стерильную среду вносили растворы витаминов в концентрации $1,0 \cdot 10^{-3}$ г/л.

Для изучения влияния микроаэробных условий на активность ЛДГ, водоросли культивировали в колбах объемом 0,5 л. Колбы наполняли свежепрокипяченной средой культивирования (состав ее дан в разделе 2.1.2.1). Микроводоросли были разделены на две группы: одна из них культивировалась при нормальных уровнях кислорода, другая – микроаэробно. Микроводоросли в возрасте 10-14 дней суток подвергались пересеву. Активность ферментов измеряли спектрофотометрическим методом в супернатанте клеточного экстракта. Суспензии клеток получали путем центрифугирования культур в течение 15 мин при 8000g. Клетки отмывали 0,05 М трис-НСI-буфером (рН 7,8).

2.1.2.2 Определение активности ферментов

Ферментативные экстракты получали из листьев и корней которые гомогенизировали с охлажденным 50 мМ *Tris*-НСI-буфером (рН 7.4), содержащим 2 мМ КСI и 1 мМ MgCl_2 .

Активность фермента ЛДГ измеряли спектрофотометрически, при 340 нм по скорости окисления НАДН на спектрофотометре (“ЛОМО СФ-56”, Россия). Реакционные среды готовились добавлением к основному раствору (50 мМ *Tris*-НСI-буфер, откорректированного соляной кислотой до рН 7.4) объемом 2,0 мл соответствующих количеств необходимых компонентов 0,06 мМ НАДН, 1 мМ пирувата натрия. Обратную реакцию запускали добавлением пирувата натрия [25]. Активность ЛДГ в прямой реакции оценивали по изменению во времени D оптической плотности реакционной среды при прохождении через нее света при длине волны 340 нм. К основному раствору (приведенному выше) добавлялись следующие компоненты: 0,5 мМ НАД^+ , 25 мМ лактат натрия. За единицу ферментативной активности ЛДГ принимали количество фермента, которое в

течение 1 мин при 25° С образовывало (прямая реакция) или превращало (обратная реакция) 1 мкмоль НАДН.

Измерение активности ЛЦО-подобной ГО проводили в Tris-HCl-буфере, (рН 7,5) в присутствии лактата натрия (4,0 мМ), ЭДТА (0,50 мМ), флавиномононуклеотида (0,010 мМ), MgCl₂ (5,0 мМ) и фенилгидразина (4,0 мМ). Активность каждой фракции фермента, полученной при его очистке измеряли с обоими субстратами спектрофотометрически при длине волны 324 нм, при этом для исследования отбирали пробы, проявляющие более высокую активность с лактатом.

В качестве одного из ключевых ферментов ЦТК и маркерного фермента ЦТК для сопутствующих измерений была выбрана сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1). Метод основан на восстановлении дихлорфенолиндофенол в присутствии ФМС при ферментативном окислении сукцината [8]. Среда определения активности СДГ содержала: 30 мМ К₂НРО₄ буфер рН 7,8; 0,033% ФМС, 0,002% дихлорфенолиндофенол; 2 мМ азид натрия, сукцинат натрия и 0,1 мл клеточной фракции митохондрий, полученной методом дифференциального центрифугирования. Контролем ему служила среда без сукцината натрия. Измеряли снижение оптической плотности при длине волны 600 нм на спектрофотометре.

2.1.2.3 Определение количества белка

Общее количество белка, содержащегося в пробах, определяли по методу Лоури [175]. Метод основан на образовании комплексного окрашенного соединения в результате взаимодействия белка со щелочным раствором сульфата меди (биуретовая реакция) и вольфрамом и молибдатом натрия (реакция Фолина на тирозиновые и цистеиновые радикалы). Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 750 нм.

2.1.2.4 Выделение и очистка лактатдегидрогеназы

Для проведения исследований на электрофоретически гомогенных препаратах энзиматических характеристик ЛДГ была разработана и использована 4-х стадийная очистка фермента:

I. Стадия гомогенизации. Разрушение растительных клеток проводили при температуре не выше 4°C.

II. Стадия гель-фильтрации на сефадексе G-25. Образец ферментной вытяжки (не более 3 мл) пропускать через колонку (G-25 «Pharmacia») для освобождения от низкомолекулярных соединений. Процесс элюирования фермента проводили буферным раствором с показателем pH 8,5.

III. Ионообменная хроматография. Для проведения ионообменной хроматографии использовали ДЭАЭ-сефацел и осуществляли элюирование фермента в линейном градиенте концентрации хлорида натрия (150–350 мМ) в буферном растворе с показателем pH 8.5 (0,05 М трис-HCl).

IV. Стадия гель-хроматографии с использованием сефадекса G-200. Измерение свободного объема готовой колонки проводилось при пропускании 2 мл раствора голубого декстрана (0.2%). Объем образцов ферментов, вносившихся

в колонку (G-200 «Pharmacia»), не превышал 1.5 мл, а объем собираемых фракций составлял 1мл. В результате многоступенчатого процесса очистки на каждой стадии получаемая нами фракция была более богата выделяемым ферментом, о чем можно было судить по возрастающей величине удельной активности. В ходе очистки количество общего белка уменьшалось, поскольку происходила потеря исследуемого белка вместе с балластными белками.

Для осуществления каждой стадии очистки были подобраны оптимальные условия (состав и концентрация элюирующих смесей, последовательность и продолжительность отдельных стадий). Все стадии очистки проводили при температуре 2 – 4 °С.

2.1.2.5 Электрофоретические исследования

Электрофорез ЛДГ проводили в 8%-ном ПААГ по методу Девиса в неденатурирующих условиях [106]. Для создания градиента разделяющий гель (7%) полимеризовали в 1,5 М ТрисНСІ буфере (рН 8.8), концентрирующий 4% ПААГ полимеризовали в 0,5 М Трис-НСІ буфере (рН 6.8). Очищенные белковые фракции вносили в карманы на концентрирующий гель в количестве 5-6 мкг белка. Первые 60 минут электрофорез протекал при постоянной силе тока 15 мА, затем при постоянной силе тока 30 мА до достижения индикаторным красителем края геля. Процесс электрофоретического разделения белков проводили при температуре +2 - +4°С. Для окрашивания гелей применяли нитрат серебра [9, 73], для специфического определения фермента – тетразолиевый метод [143]. Молекулярную массу субъединиц определяли методом электрофореза в 12%-ном ПААГ в присутствии Ds-Na. В качестве белков-маркеров молекулярной массы использовали набор стандартных белков (кДа): b-галактозидаза (116.0), БСА (66.2), овальбумин (45.0), ЛДГ (35.0), REase Bspl98 (25.0), b-лактоглобулин (18.4) и лизоцим (14.4). Гели окрашивали нитратом серебра по методике [9].

2.1.2.6 Определение рН оптимума каталитической активности ферментов

Для определения рН оптимума готовили буферные растворы с диапазоном рН 5.5 – 9.4 и измеряли активность ЛДГ и МДГ спектрометрическим методом. Затем строили график зависимости активности ферментов от величины рН, пики на графиках указывают, какие значения рН являются оптимальными для осуществления каталитического процесса каждым из ферментов.

2.1.2.7 Определение величин констант Михаэлиса для ЛДГ и ЛЦО

Значение K_m определялось по пирувату и NADH для ЛДГ, а также по гликолату и лактату для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. Расчет проводился методом обратных координат Лайнуивера-Берка.

Константа Михаэлиса – это параметр, соответствующий концентрации субстрата (мМ), при которой скорость реакции составляет половину от максимальной. Для определения K_m сначала необходимо определить скорость реакции при различных концентрациях субстрата, по имеющимся значениям выделить наиболее высокую, которая будет являться максимальной скоростью реакции. При достижении максимальной скорости увеличение концентрации субстрата не оказывает влияния на скорость реакции.

Метод двойных обратных величин Лайнуивера-Берка [15, 18] основан на следующей закономерности: обратные величины двух равных исходных величин также равны. График строился следующим образом: значения $1/v$ откладывали на оси ординат, а на оси абсцисс – значения $1/[S]$. K_m/v – величина, равная наклону прямой. $1/v_{max}$ – отрезок, который отсекается на прямой оси ординат. На оси абсцисс отсекаемый отрезок равен величине, обратной K_m по модулю.

2.1.3 Молекулярные методы исследования

2.1.3.1. Выделение геномной ДНК и суммарной клеточной РНК

Геномную ДНК выделяли с использованием набора ПРОБА-ГС («ДНК-Технология», Россия) согласно рекомендациям производителя. Для выделения суммарной РНК применяли реагент ExtractRNA («Евроген», Россия).

2.1.3.2. Расчет концентрации РНК в пробе

Измерение концентрации суммарной клеточной РНК проводили на T70+UV-VIS-спектрофотометре («PG Instr. Lim.», Великобритания) при длинах волн 260 и 280 нм. Длина оптического пути кюветы 1 см. Для расчета значения величины концентрации РНК в растворе исходного образца была использована следующая формула (http://www.molbiol.ru/scripts/01_03.html):

$$C : (62,9 * A_{260} - 36 * A_{280}) * P,$$

где C – значение концентрации РНК (мкг/мл) в исходном растворе;

A_{260} – значение величины поглощения при 260 нм;

A_{280} - при 280 нм;

P – разбавление раствора исходного образца.

2.1.3.3. Метод обратной транскрипции

Синтез первой цепи комплементарной ДНК осуществляли при помощи фермента M-MULV-обратной транскриптазы («Ferm.», Литва) в результате проведения процесса обратной транскрипции РНК. В качестве затравочного был использован random-праймер.

2.1.3.4. Электрофорез нуклеиновых кислот

Для анализа и оценки качества выделенных ДНК и РНК проводился электрофорез в 1% геле агарозы («Helicon», Россия). Последующая визуализация

результатов осуществлялась с использованием трансиллюминатора с длиной волны 312 нм.

2.1.3.5. Подбор вырожденных и специфических праймеров

Разработку и подбор вырожденных праймеров осуществляли с помощью анализа определенных консервативных участков нуклеотидных последовательностей, выявленных путем выравнивания и сравнения известных последовательностей гена *ldh* и *glo* из растений (NCBI data base, <http://www.ncbi.nlm.nih.>) с использованием программного обеспечения «AliBee Multiple Alignment» (www.genebee.msu.su/service/malignreduced.html). Для исключения возможности образования димеров и элементов вторичных структур проводили проверку выбранных праймеров с использованием программы «FAST-PCR»:

прямой, 5' - TTCTYATYGCYGATCAYCT -3';

обратный, 5' - GGCAARCTSARRAACACTTC - 3'

Также и для лататоксидазы гороха :

прямой, 5' - HGCHCGBCAGCTRGAYTAYGT-3';

обратный, 5' - GCMARBGCCCTTRAASACRT- 3'.

Для лактатоксидазы сорго были подобраны специфические праймеры:

прямой, 5' - CGCACGCCAGCTAGATTATG-3';

обратный, 5' - CAAGGGCCTTAAACACGTCC - 3'.

2.1.3.6. Проведение полимеразной цепной реакции

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Терцик («ДНК-Т», Россия) с вырожденными и специфическими праймерами использовали набор реактивов AmpliSence («Helicon», Россия)

2.1.3.7. Секвенирование ПЦР-продукта

Определение нуклеотидной последовательности полученного ампликона гена *ldh* выполнено в лаборатории отдела ЗАО «Евроген», Россия. Секвенирование последовательности гена *ldh* у гороха проводилось на коммерческой основе в компании «Евроген», Россия.

К полученному участку гена *ldh* гороха были подобраны специфические праймеры,

прямой, 3' - ATG TTC AGG GGG GAG CA -5';

обратный, 3' - AAT AAT CGA CCG AGC CAA AC -5'.

2.1.3.8. Проведение ПЦР-РВ

Для осуществления ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали LightCycler 96 («Roche», Швейцария), красителем при проведении процесса реакции выступал SYBR Green I.

2.1.4 Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты проводили в 4-6 биологических повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. В таблицах и на рисунках приводятся данные типичных опытов, причем каждое значение есть среднее арифметическое из трех определений. Для определения достоверности результатов исследований применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента [14]. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p \leq 0,05$. Для построения графиков данные обрабатывались с помощью программ Excel 2010.

2.2. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.2.1 Динамика активности ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО в листьях и корнях гороха в условиях гипоксии

В ходе измерений определили, что в условиях гипоксии в корневой зоне лактатдегидрогеназная активность листьев гороха возрастает, доходя до максимального уровня ко вторым суткам с момента создания условий затопления, а её уровень поднимается в 8-9 раз по сравнению с контрольной группой растений (рис. 11).

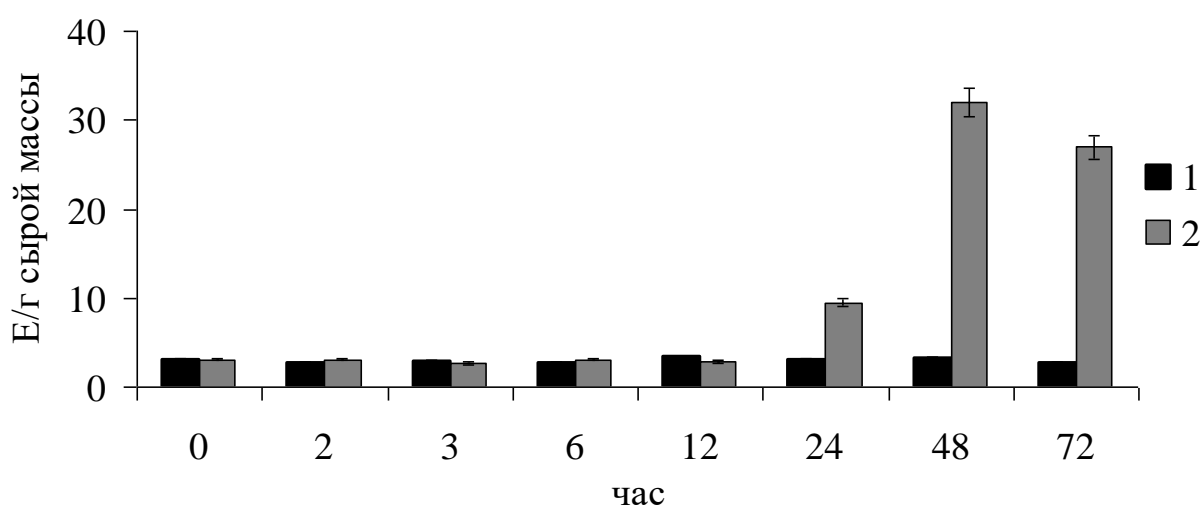


Рис. 11. Динамика активности ЛДГ в листьях гороха: 1) в контрольной группе растений, находящихся в стандартных условиях, и 2) в экспериментальной группе растений, находящихся под воздействием гипоксии

Несколько иная ситуация с изменением лактатдегидрогеназной активности обнаружена в корнях растений гороха (рис. 12). Резкое увеличение активности фермента наблюдается через 3 часа экспозиции, при этом следует отметить стремительное увеличение этого показателя. Максимальное значение он

достигает через сутки с момента начала эксперимента и его величина превышает значения активности ЛДГ в контрольной группе растений гороха в 5 раз (3 часа) и в 12 раз (24 часа).

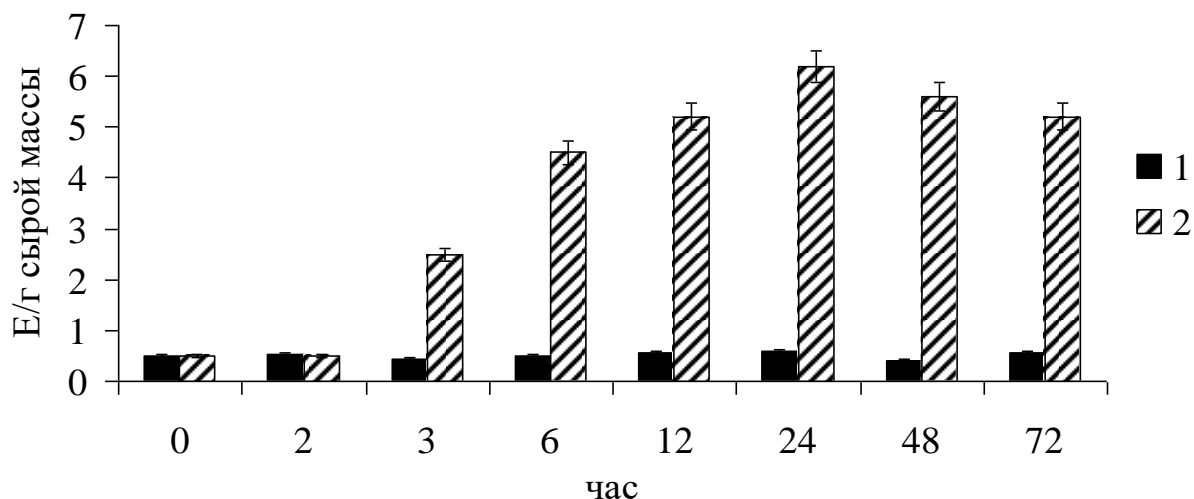


Рис. 12. Динамика активности ЛДГ в корнях гороха: 1) в контрольной группе растений, находящихся в стандартных условиях, и 2) в экспериментальной группе растений, находящихся под воздействием гипоксии

В то же время в корнях растений гороха (рис. 13), инкубированных в условиях недостатка кислорода, в момент возобновления аэрации, индуцируется активность ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. Усиление работы фермента было обнаружено уже через 6 часов с момента восстановления аэрации после экспонирования в условиях гипоксии. Величина активности фермента увеличилась в 5 раз по сравнению с данным показателем в контрольных растениях. В листьях гороха, инкубированных в тех же условиях, при восстановлении аэрации корней активация работы ЛЦО-подобной гликолатоксидазы происходила лишь через 12 часов, при этом активность сохранялась сутки, далее наблюдался ее спад (рис. 14).

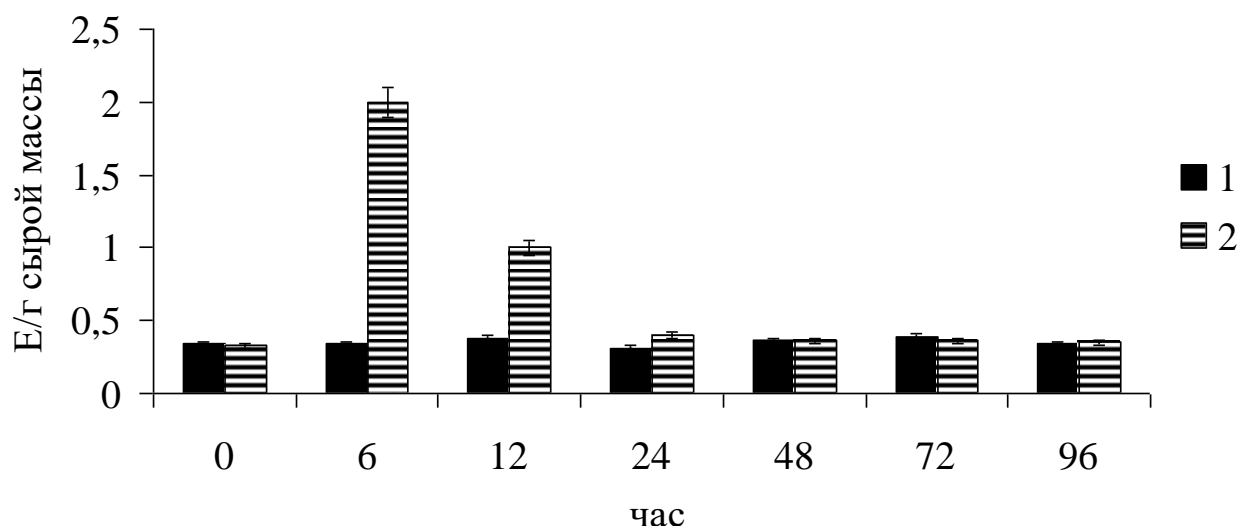


Рис. 13. Динамика активности ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в корнях гороха: 1) при гипоксии и 2) в момент возобновления аэрации

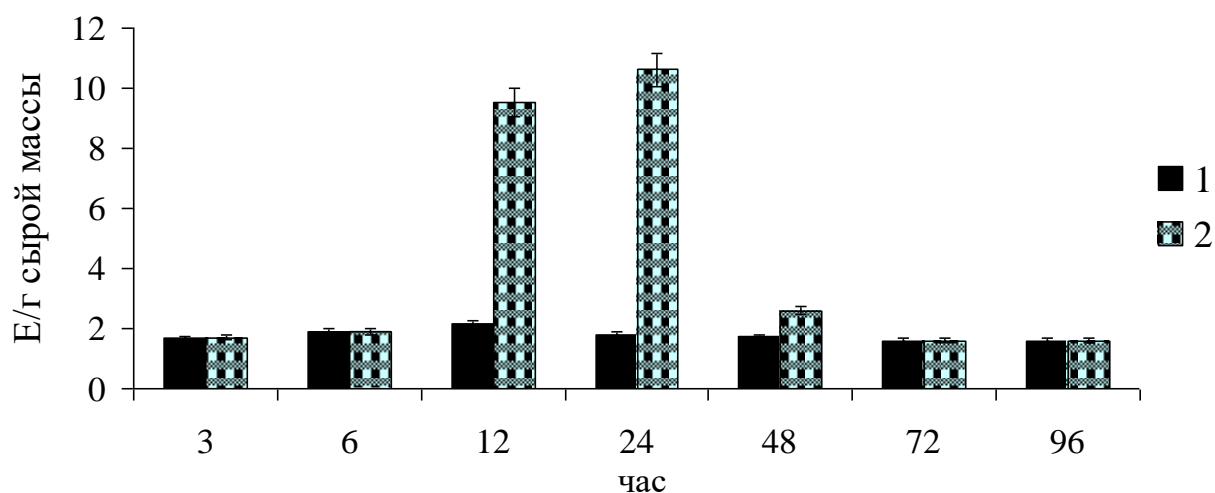


Рис. 14. Динамика активности ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в листьях гороха: 1) при гипоксии и 2) в момент возобновления аэрации

Как известно, во время воздействия гипоксии на растения повышается активность ряда ферментов. Так, для растений с C_4 -типом фотосинтеза рост активности ферментов спиртового брожения является характерной чертой. А у растений с C_3 -типом фотосинтеза во время стресса, вызванного дефицитом кислорода, преобладающим является молочнокислое брожение [48].

2.2.2 Динамика активности СДГ в корнях и листьях гороха, экспонируемых в условиях гипоксии

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1) – играет центральную роль в митохондриальном метаболизме как единственный фермент, который является компонентом и цикла трикарбоновых кислот, и цепи переноса электронов [8]. СДГ катализирует окисление сукцината в фумарат в матриксе митохондрий и переносит электроны на убихинон через митохондриальную внутреннюю мембрану. СДГ аллостерически регулируется связыванием оксалоацетата и активируется АТФ в процессе, который не включает фосфорилирование. В нашем исследовании использовали спектрофотометрическое определение активности сукцинатдегидрогеназы, чтобы удостовериться в наступлении адаптивной реакции на гипоксию, вызванную затоплением корней растений.

Полученные результаты изменения сукцинатдегидрогеназной активности в листьях и корнях экспериментальной группы растений свидетельствуют о резком снижении активности этого энзима и, следовательно, выключении цикла трикарбоновых кислот (рис. 15-16). Так, через 4 часа показатели работы СДГ в растениях контрольной группы оказались выше на 10% и 20 % в листьях и корнях гороха соответственно (рис. 15-16). Как видно из полученных данных, через 48 часов экспозиции активность ЛЦО-комплекса резко снижалась и достигала минимальных значений на четвертые сутки экспонирования гороха при недостатке кислорода.

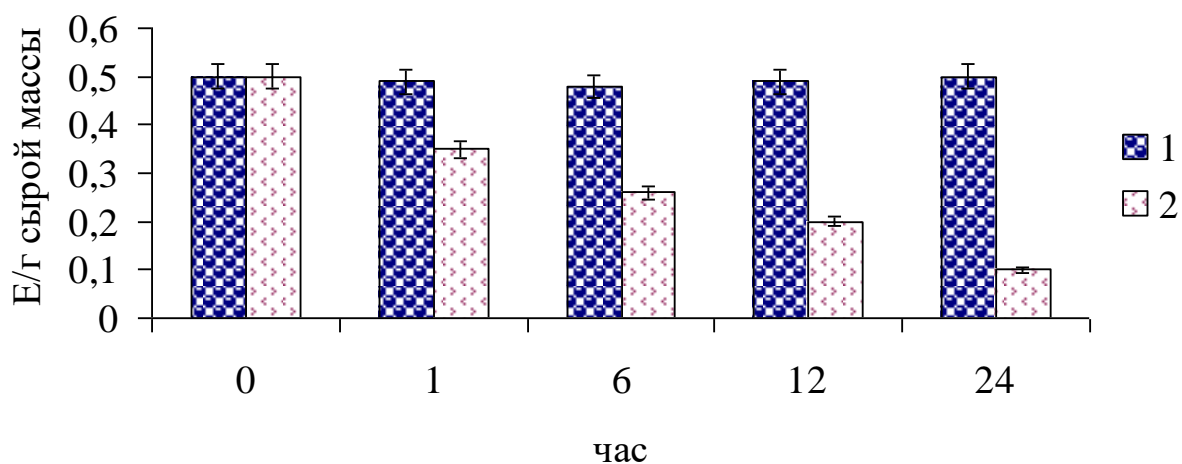


Рис. 15. Динамика активности сукцинатдегидрогеназы в листьях гороха: 1) в контрольных образцах и 2) в гипоксических

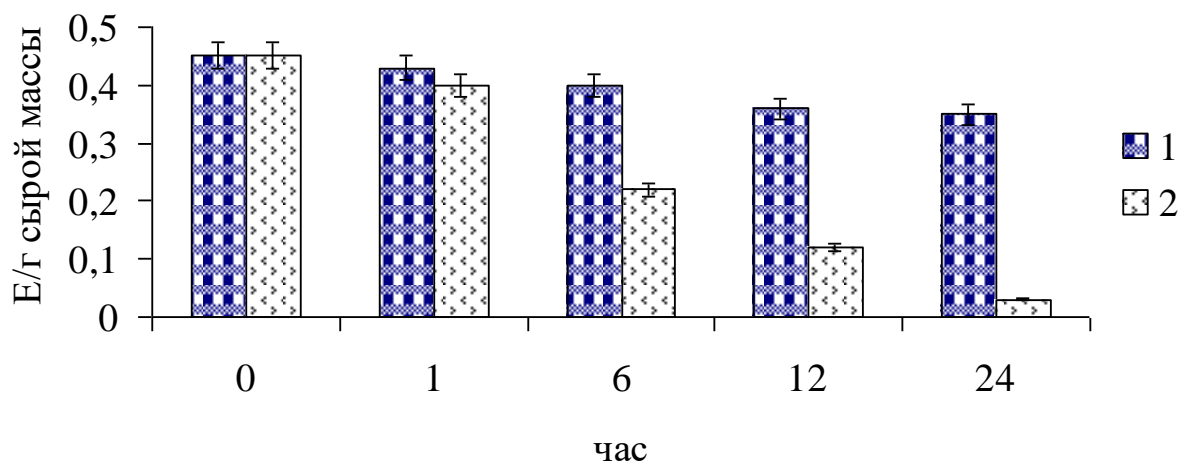


Рис. 16. Динамика активности сукцинатдегидрогеназы в корнях гороха: 1) в контрольных образцах и 2) в гипоксических

Нельзя не отметить, что такая тенденция сохранялась до конца эксперимента: активность фермента СДГ в листьях и корнях растений

контрольной группы превышала аналогичные показатели экспериментальной группы в несколько раз (рис. 15-16).

2.2.3 Получение гомогенных препаратов исследуемых энзимов из листьев и корней гороха

2.2.3.1. Очистка ЛДГ из листьев и корней гороха

Выделение фермента ЛДГ осуществляли в период его максимальной активности. Поэтому для получения ЛДГ в высокоочищенном состоянии использовали листья гороха на вторые сутки его экспозиции в условиях дефицита кислорода. Кроме того, использовали корни растений после выдержки их в условиях дефицита кислорода (48 ч экспозиции). Результаты типичных очисток ЛДГ из листьев и корней гороха приведены в таблицах 1 и 2 (Приложение).

В ходе многостадийной очистки был получен электрофоретически гомогенный препарат фермента ЛДГ из листьев гороха с высокими показателями удельной активности (41,9 Е/мг белка) и выхода (26,8 %) и степенью очистки 101,3. Важный вклад в получение гомогенного препарата был внесен использованием ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефацелле, позволивший увеличить степень удельной активности препарата более чем в 6 раз.

Для очищенного препарата лактатдегидрогеназы из корней гороха величины удельной активности, выхода и степени очистки соответствовали 80,5 Е/мг, 2,5 и 43,4. Наибольшее количество лактатдегидрогеназной активности было десорбировано с ионообменного носителя при элюции 320-350 мМ NaCl – для ЛДГ из корней гороха.

Из других объектов растительного происхождения лактатдегидрогеназа была получена с близкими характеристиками удельной активности, выхода и степени очистки. К примеру, ЛДГ из сои была получена с удельной активностью 2,64 Е/мг, выходом 56% и со степенью очистки $1,7 \cdot 10^4$, данный энзим, экстрагированный из репы оказался с большим показателем удельной активности

212 Е/мг, выходом – 64%, со степенью очистки $1,4 \cdot 10^4$; а фермент лактатдегидрогеназа, выделенная из картофеля обладал удельной активностью - 228 Е/мг, и выходом – 57% и со степенью очистки $1,1 \cdot 10^4$ [117, 153].

2.2.3.2 Определение гомогенности ферментного препарата

В ходе исследования по одному белковому компоненту с $R_f = 0,38$ для ЛДГ из листьев и $R_f = 0,41$ для ЛДГ из корней гороха (рис.19-20) было выявлено в ПААГ с помощью универсального окрашивания нитратом серебра. Для специфического проявления активности ЛДГ применялся тетразолиевый метод, показавший, что очищенный белок обладал лактатдегидрогеназной активностью (рис.19-20). Определение единственной полосы при окрашивании нитратом серебра подтверждает электрофоретическую гомогенность полученных препаратов ЛДГ из листьев (рис. 19) и корней (рис. 20) гороха.



Рис. 19. Электрофорез в ПААГ очищенной из листьев гороха лактатдегидрогеназы при рН 7,5, гели окрашены нитратом серебра (1) и специфическим тетразолиевым синим (2); F – фронт (бромфеноловый синий)

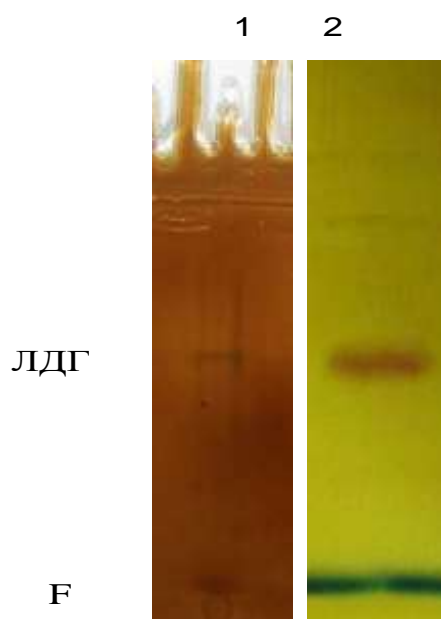


Рис. 20. Электрофорез в ПААГ очищенной из корней гороха лактатдегидрогеназы, гели окрашены: нитратом серебра (1) и специфическим тетразолиевым синим (2); F – фронт (бромфеноловый синий)

2.2.3.3 Определение молекулярной массы и субъединичного строения лактатдегидрогеназы

Сравнение значений молекулярной массы нативной ЛДГ, полученной гель-хроматографией на Сефадексе G-200 и величин этого показателя для пептидов ЛДГ, определенных методом Ds-Na-электрофореза (рис. 21-22) позволило установить четвертичную структуру исследуемого фермента. Молекулярная масса нативной молекулы фермента из листьев составила 148 кДа, из корней – 151 кДа (табл. 3). Значение этого показателя для одной субъединицы ЛДГ из листьев – 37,1 кДа, а для ЛДГ из корней гороха и 37,7 кДа. Следовательно, можно предположить, что ЛДГ из гороха представляет собой тетрамер. Молекулярная масса фермента, очищенного из сои, составила 140 кДа, а его субъединицы – 36 кДа. [117]. Также у проростков риса – молекулярная масса фермента составила

160 кДа, авторы показали (Rivoval J. [et al.], 1991), что молекула состоит из двух типов субъединиц с молекулярной массой 38 и 39 кДа [185].

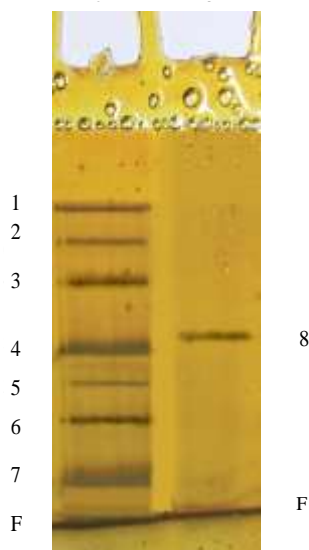


Рис. 21. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na очищенной из листьев гороха лактатдегидрогеназы (8). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 1- β -галактозидаза (116,0); 2-БСА (66,2); 3-овальбумин (45,0); 4-ЛДГ (35,0); 5-REase Bsp198 (25,0); 6- β -лактоглобулин (18,4); 7-лизоцим (14,4)

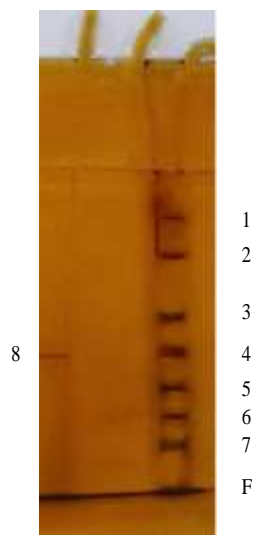


Рис. 22. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na очищенной из корней гороха лактатдегидрогеназы (8). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 1- β -

галактозидаза (116,0); 2-БСА (66,2); 3-овальбумин (45,0); 4-ЛДГ (35,0); 5-REase Bsp198 (25,0); 6-b-лактоглобулин (18,4); 7-лизоцим (14,4)

Таблица 3.

Значения молекулярной массы нативной молекулы ЛДГ из корней и листьев гороха и ее субъединиц, $n=4$, $p \leq 0,05$

Объект		Молекулярная масса, кДа		Количество субъединиц
		Нативная ЛДГ	Субъединица ЛДГ	
ЛДГ	из листьев <i>Pisum sativum</i> L.	148±4,4	37,1±1,1	4
	из корней <i>Pisum sativum</i> L.	151±4,5	37,7±1,1	4

2.2.3.4. Определение значений K_m ЛДГ из листьев и корней гороха, подверженных кислородному голоданию

Были изучены каталитические характеристики очищенного препарата ЛДГ. Определённое для ЛДГ значение константы Михаэлиса по пирувату оказалось низким: 15 мкМ (листья) и 35 мкМ (корни), что свидетельствует о высоком сродстве данного фермента к субстрату (рис. 23-24) (Приложение).

В ходе работы были получены экспериментальные данные, свидетельствующие о высоком сродстве ЛДГ листьев и корней гороха к НАДН, а

именно их значения составляли 71 и 63 мкМ соответственно, что подтверждает возможность эффективно реокислять гликолитический НАДН (рис. 25-26) (Приложение) [222]. В то же время близкие показатели ЛДГ можно встретить в литературных данных по другим объектам. Так, для фермента из мышц кроликов константа Михаэлиса равнялась 8 мкМ, а для картофеля – 77 мкМ [98, 152, 177]. В то же время у несерных пурпурных бактерий сродство к коферменту НАДН меньше, а значение показателя K_m для фермента, очищенного из *Rhodovulum st.*, составило 158 мкМ [2, 13, 14, 17].

Полученные результаты величин K_m ЛДГ для субстратов обратной реакции показали меньшее сродство к лактату и коферменту НАД⁺ по сравнению с пируватом и НАДН. Значение K_m фермента по лактату составило 3,6 мМ, по НАД⁺ – 1,2 мМ для ЛДГ из листьев (рис. 27-28) (Приложение) и 33 мМ по лактату, по НАД⁺ – 5,1 мМ для ЛДГ из корней (рис. 29-30) (Приложение). По данным научной литературы, величины констант Михаэлиса по субстратам ЛДГ сильно варьируют. Так, например, для растений томата K_m лактатдегидрогеназы по пирувату составляет 200 мкМ [181], а K_m по пирувату для ЛДГ из мышц кролика – 48 мкМ [99]. В то же время K_m фермента по лактату других объектов варьирует. Например, для ЛДГ из мышц кролика эта величина составила 553-853 мкМ [98] и 1100 мкМ для картофеля [148]. Интересно, что для НАД⁺ кофермента реакции, проводимой лактатдегидрогеназой в прямом направлении, значение K_m из картофеля составило 200 мкМ и 3200 мкМ - для энзима из печени крыс [23, 152]. Полученные результаты приведены в сводной таблице 4.

Таблица 4.

Значения констант Михаэлиса для ЛДГ из листьев и корней гороха по различным субстратам

Объект (<i>Pisum sativum</i> L.)	K_m по лактату, мМ	K_m по пирувату, мкМ	K_m по НАД ⁺ , мМ	K_m НАДН, мкМ
Листья	3.6±0.1	15±0.5	1.17±0.04	71±2.1
Корни	33±0.9	35±1.0	5.1±0.15	63±1.9

2.2.3.5 Определение значения константы субстратного ингибирования ЛДГ из листьев гороха

О возможном сдвиге реакции, катализируемой очищенным ферментативным препаратом в сторону утилизации пирувата, свидетельствует низкий показатель константы субстратного ингибирования – 1,15 мМ (рис. 31) (Приложение). Авторы (Ezzatollah Keyhani [et al.], 2004) [125] установили, что для исследуемого энзима из клубнелуковиц крокуса обыкновенного со спящими почками максимальная активность наблюдалась при 570 мкМ субстрата; после этого наблюдали ингибирование субстрата и активность снижалась на 40% при концентрации субстрата 750 мкМ. Для клубнелуковиц с 10-дневным укоренением максимальная активность наблюдалась при 280 мкМ концентрации субстрата; после этого наблюдали ингибирование субстрата: активность снижалась на 55% при концентрации субстрата 700 мкМ [125].

2.2.3.6 Влияние температуры на скорость реакции, катализируемой ЛДГ

Термостабильность ЛДГ была исследована при различных температурах (15-60°C). Температурный оптимум для лактатдегидрогеназы из листьев гороха при восстановлении пирувата также составил 40°C, а при окислении лактата – 45°C (рис. 32). Несколько отличаются данные показатели для ЛДГ из корней гороха: 37°C при восстановлении пирувата и 42°C при окислении лактата (рис. 33). Температурные оптимумы лактатдегидрогеназы из разных организмов, как правило, находятся в пределах 30-60°C [126, 129, 152]. Однако установлено, что для ЛДГ из растительных объектов (картофель, томат) температурный оптимум составляет около 40°C. Лактатдегидрогеназа очищенная из *Lactobacillus easyi* была полностью инактивирована лишь повышением температуры с 60 до 70 °С, когда фермент разбавляли 0,05 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,0) [89].

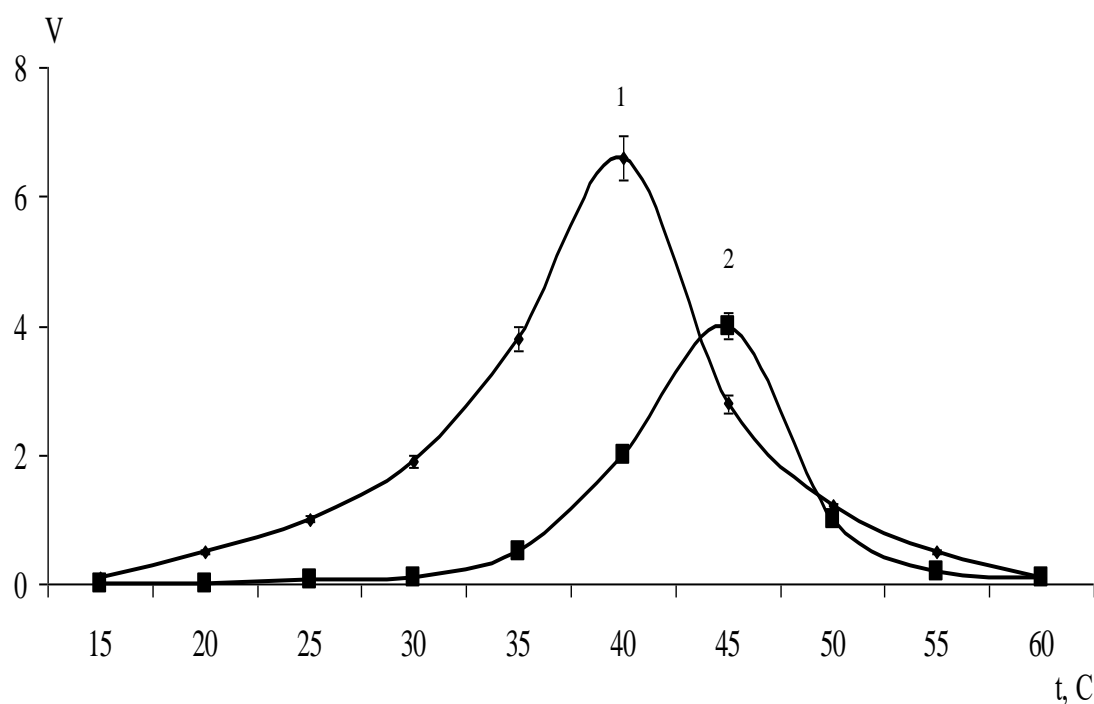


Рис. 32. Влияние температуры на скорость реакции, катализируемой ЛДГ из листьев гороха: при восстановлении пирувата (1) и при окислении лактата (2)

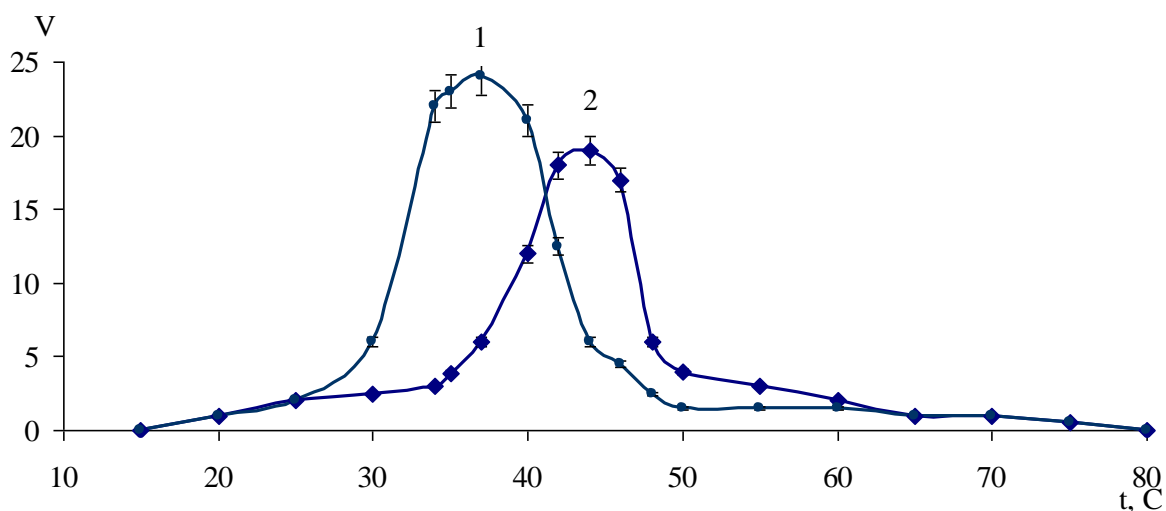


Рис. 33. Влияние температуры на скорость реакции, катализируемой ЛДГ из корней гороха: при восстановлении пирувата (1) и при окислении лактата (2)

2.2.3.7 Зависимость скорости реакции, катализируемой ЛДГ, от pH среды

В ходе данного исследования лактатдегидрогеназы гороха была показана зависимость активности фермента от концентрации ионов водорода. Оптимумы значений данного показателя для прямой реакции составили 7,5 для ЛДГ из листьев и 7,2 для этого фермента из корней гороха (рис. 34-35). Результаты исследования действия этого фактора на обратную реакцию для ЛДГ из листьев и корней гороха показаны на рис 34-35. Анализ полученных данных свидетельствует, что величины оптимальных значений pH в обратной реакции сдвинуты в щелочную сторону и составляют 8,8 для листьев и 8,2 для фермента из корней (рис. 34-35). Согласно литературным данным, в щелочной среде *in vivo* равновесие реакции смещено в сторону образования пирувата, а при pH 7.0 – реакция осуществляется в противоположном направлении [68]. Как известно, pH оптимум данного фермента лежит в нейтральных зонах у большинства исследованных организмов [191], а по мере изменения pH происходит изменение ионизации групп активного сайта и субстрата, что может влиять на скорость реакции. Так, например, для исследуемого энзима из скелетных мышц ящерицы *Agama stellio* оптимальный pH для прямой реакции (пируват в лактат) составлял 7,5, а для обратной реакции (лактат в пируват) был 9,2 [3]. У очищенного

фермента ЛДГ из растений ячменя и картофеля оптимальное значение рН для катализа прямой реакции было 7,0, а в обратной реакции наблюдались различия, так оптимальный уровень рН для лактатдегидрогеназы, экстрагированной из растений ячменя, составил 9,5, а для лактатдегидрогеназы, очищенной из картофеля – 9,0 [101].

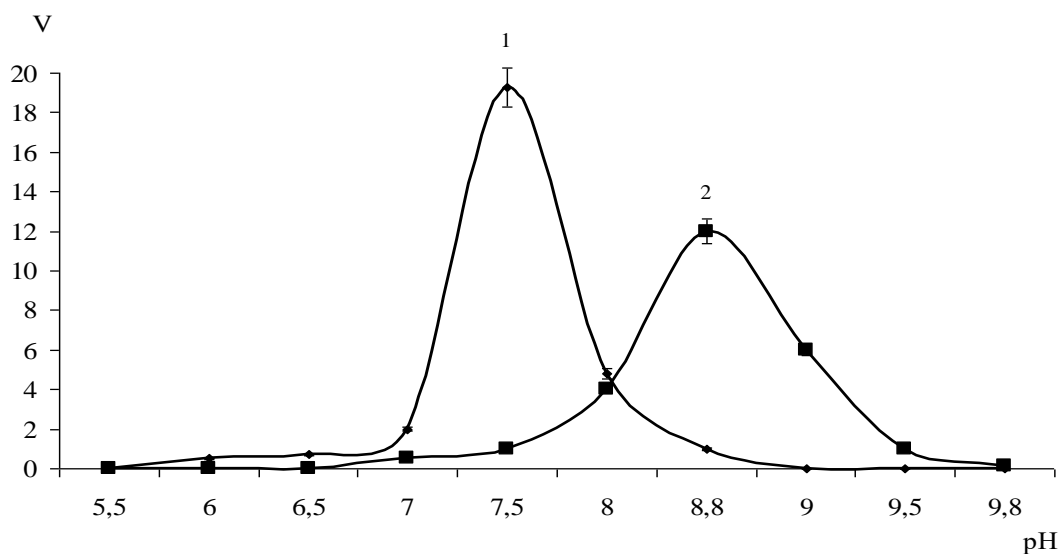


Рис. 34. Зависимость скорости реакции от рН среды для ЛДГ из листьев гороха: при восстановлении пирувата (1) и при окислении лактата (2)

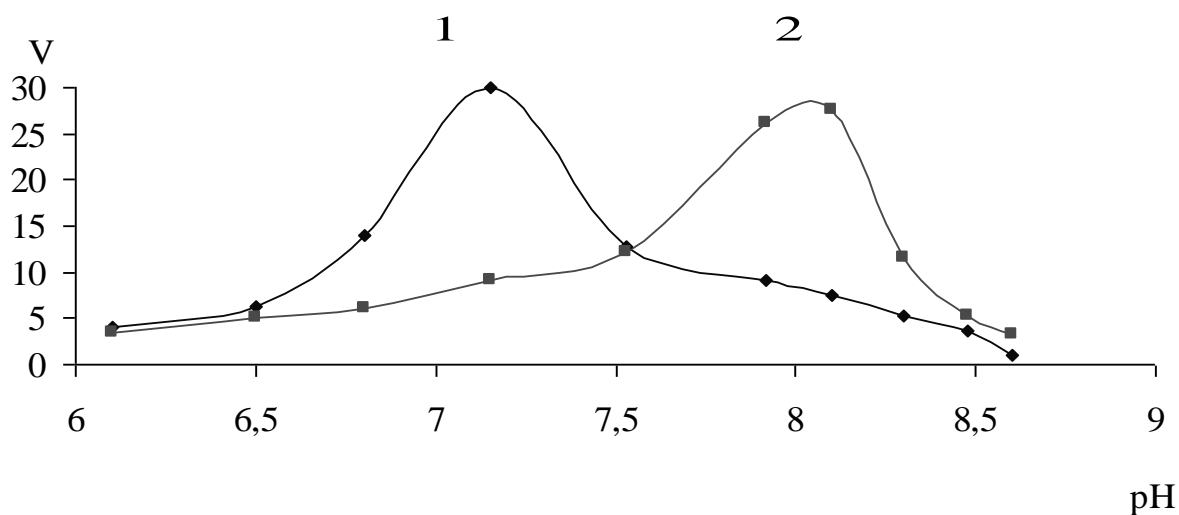


Рис. 35. Зависимость скорости реакции от рН среды для ЛДГ из корней гороха: при восстановлении пирувата (1) и при окислении лактата (2)

2.2.4 Молекулярные исследования ЛДГ гороха

Для подбора вырожденных праймеров использовались аминокислотные последовательности Ldh представителей семейства Бобовые, доступные в базе данных KEGG. Выравнивание последовательностей проводили при помощи Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Для подбора праймеров выбирали участки последовательностей, совпадающие у всех представителей семейства. Участки последовательностей, подходящих для подбора праймеров, выделены желтым на рисунке 36.

```

XP_020218095.1    MHKSGSSSALGPGGLDLTQAFFKSIIMNAAPSSPTKRHNKISVVGAGNVGMAIAQTILTQD    60
XP_003549909.1    MHKSASGSTLGPGLDLTQAFFRPITNAAPPSPTRHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD    60
XP_014506104.1    MHKSASGSTLGPGLDLTQAFFKPIANAAPPSTTKQHTKISVIGVGNVGMIAQTILTQD    60
XP_017420849.1    MHKSASGSTLGPGLDLTQAFFKPIITNAAPPSTTKQHTKISVIGVGNVGMIAQTILTQD    60
XP_003608731.1    MHKSGSGSTLGPDGLDLTQAFFKPIISNAAPPSPTRHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD    60
XP_004516830.1    MHKSGSASALGPGGLDLTQVFFKSIISNAAPPSSLSKRQTKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD    60
XP_015961820.1    MHKSPSGSTLGPGLDLTQAFFRPITNAAPPSPTRQTKISVIGVGNVGMIAQTILTQD    60
                    **** *.*:***.*****.**: * **** * :*:.*****:*.*****
                    *

XP_020218095.1    LTDELALVDIAIPEKLRGEMLDLQHA AFLPRTKIHASTDYAVTAGSDLCIVTAGARQING    120
XP_003549909.1    LTDELVLVDNTNDKLRGEMLDLQHA AFLPRTKINSSADSSVTAGSDLCIVTAGARQIVG    120
XP_014506104.1    LTDELVLVDNTNADKLRGEMLDLQHA AFLPRTKIHSSDSSVTAGSDLCIVTAGARQIPG    120
XP_017420849.1    LTDELVLVDNTNADKLRGEMLDLQHA AFLPRTKIHASTDSSITAGSDLCIVTAGARQIAG    120
XP_003608731.1    LTDELVIVDNKPKLRGEMLDLQHA AFLPRVKINSSVEYSVTVAGSDLCIVTAGARQIGG    120
XP_004516830.1    LTDELVIVDNKPKLRGEMLDLQHA AFLPRVKINSSVEYSVTVGSDLCIVTAGARQIAG    120
XP_015961820.1    LTDELVLIDNKDDKLRGEMLDLQHA AFLPRTKIYASVDYAVTAGSDLCIITAGARQNAG    120
                    *****.:* :*****.*****.* * :*:. :*.*****:***** *
                    *

XP_020218095.1    ESRLNLLQRNVTLFQKII PPLVGHSPDTILLIVSNPVDVLSYVAWKLSGFPSNRVIGSGT    180
XP_003549909.1    ESRLNLLQRNLSLFRAII PPLVRYSPDTILLIVSNPVDILTYVAWKLSGFPSNRVIGSGT    180
XP_014506104.1    ESRLNLLHRNLSLFRAII PPLVRHSPDTLLIVSNPVDILTYVAWKLSGFPSNRVIGSGT    180
XP_017420849.1    ESRLNLLQRNLSLFRAII PPLVHSPDTLLIVSNPVDILTYVAWKLSGFPSNRVIGSGT    180
XP_003608731.1    ESRLNLLQRNLSLFKAIIPPLARYSPETVLIIVSNPVDVLTYYIAWKLSGFPSNRVIGSGT    180
XP_004516830.1    ESRLNLLQRNLSLFKAIIPALARYSPHTVLLIVSNPVDVLTYYIAWKLSGFPSNRVIGSGT    180
XP_015961820.1    ESRLNLLQRNLSLFKAIIPPLARYSPQTVLLIVSNPVDVLTYYIAWKLSGFPSNRVIGSGT    180
                    *****.:**:* * * . :**.* * :*****:*.*****:*****
                    *

```

XP_020218095.1	NLDSSRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSSVALWSSISVGGVPLVLSFLEKQEIAYE	240
XP_003549909.1	NLDSSRFRFLIADHLDLNAQDVQAYIVGEHGDSSVALWSSISIGGVPLVLSFLESQHIGYE	240
XP_014506104.1	NLDSSRFRFLIADHLDVNAQDVQAYIVGEHGDSSVALWSSISVGGVPLVLSFLDKQQIPYE	240
XP_017420849.1	NLDSSRFRFLIADHLDVNAQDVQAYIVGEHGDSSVALWSSISVGGVPLVLSFLDKQQIPYE	240
XP_003608731.1	NLDSSRFRFLIADHLQVNAQDVQACIVGEHGDSSVALWSSISIGGIPVLSFLEKQQIAYE	240
XP_004516830.1	NLDSSRFRFLIADHLEVNAQDVQACIVGEHGDSSVALWSSISIGGVPLVLSFLEKQQIAYE	240
XP_015961820.1	NLDSSRFRFLIADHLDVNAQDVQAYIVGEHGDSSVALWSSISIGGVPLVLSFLEKQQIAYE ***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****	240
XP_020218095.1	REMLEKIHKEVIQGAYEVISLKGYSWAIGYSVANLARSILRNQRRVHPVSVLAKGFYGI	300
XP_003549909.1	KETLENIHKSVIDGAYEVIKRGYSWAIGYSVANLARSFIRDQRKIHPVSVLAKGFYGI	300
XP_014506104.1	KETLENIHKSVDVDSAYEVIKRGYSWAIGYSVANLARSILRDQRKIHPVSVLAKGFYGI	300
XP_017420849.1	KETLENIHKSVDVDSAYEVIKRGYSWAIGYSVANLARSILRDQRKIHPVSVLAKGFYGI	300
XP_003608731.1	KETLENIHKTIVINSAYEVIKRGYSWAIGYSVANLARSILRDQRKIHPVSVLAKGFYGI	300
XP_004516830.1	KETLENIHKTIVINSAYEVIKRGYSWAIGYSVANLARSILRDQRKIHPVSVLAKGFYGI	300
XP_015961820.1	KETLENIHKAVIDSAYEVIKRGYSWAIGYSVANLARSILRDQRKIHPVSVLAKGFYGI :* **:* ** * : : . ***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****	300
XP_020218095.1	DGGEVFLSLPAQLGRGGVLGVTNVHLTEESQRLRDSANTILEVQNQLAI	350
XP_003549909.1	DG-EVFLSLPALVGRGGVLSVTNVHLNNEETQRLKDSAKTILEVQTQLGI	349
XP_014506104.1	DG-EVFLSLPAQLGRGGILGVTNVHLNLEETQRLVDSAKTILEVQTQLGI	349
XP_017420849.1	DG-EVFLSLPAQLGRGGILGVTNVHLNLEETQRLVDSAKTILDMQIQLGI	349
XP_003608731.1	GDVEVFLSLPAQLGRGGVLGVTNVHMNKEEQRLRDSAKTILEVQTQLGI	350
XP_004516830.1	GDDEVFLSLPAQLGRGGVLGVTNVHMNEEQRLRDSAKTILEVQTQLGL	350
XP_015961820.1	GN-EVFLSLPAQLGRGGVLGVTNVHLNNEELQRLRDSAKTILEVQTQLDL .. ***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****	349

Рис. 36. Выравнивание аминокислотных последовательностей *Ldh* представителей семейства Бобовые. Желтым выделены участки, подходящие для подбора вырожденных праймеров

Перевод аминокислотной последовательности в нуклеотидную осуществлялся при помощи программы Gene Runner. Запись последовательностей полученных праймеров проводилась с использованием международного кода IUPAC. Последовательности полученных праймеров приведены в таблице 5.

Таблица 5.

Последовательности вырожденных праймеров, 5'-3'

Название праймера	Последовательность
Ldh_F1	TTCCTYATYGCYGATCAYCT
Ldh_R1	GGCAARCTSARRAACACTTC
Ldh_F2	ATGGCCATHGCYCARACCATCCT
Ldh_F3	CTCCGYGGCGARATGYTYGA
Ldh_R2	AGRTGATCRGCRATRAGGAA

Выделение ДНК производили с помощью набора diaGene для выделения ДНК (Диа-М, Россия). Оценку чистоты полученных ПЦР-продуктов осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле (рис. 37).

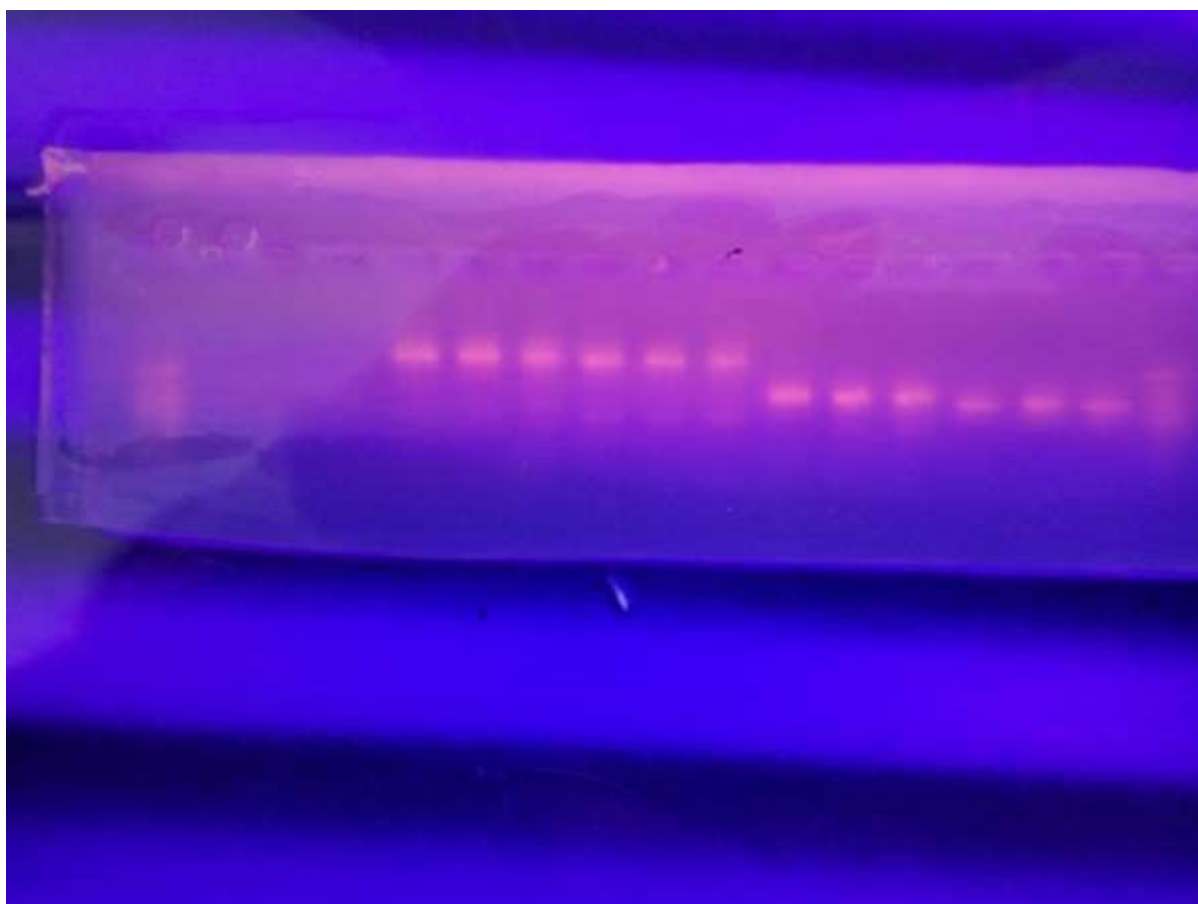


Рис. 37. Электрофореграмма ПЦР-продуктов

Элюция ПЦР-фрагментов из геля проводилось при помощи набора Cleanup Standard («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя.

Секвенирование последовательности гена *ldh* у гороха проводилось на коммерческой основе в компании Евроген, Россия.

К полученному участку гена *ldh* гороха были подобраны специфические праймеры, которые в дальнейшем использовались для определения нормализованного уровня мРНК.

Выделение РНК производилось с использованием набора ExtractRNA («Евроген», Россия) согласно прилагаемому протоколу. 500 мкг изолированной РНК использовалось для получения кДНК с помощью MMLV обратной транскриптазы (Евроген, Россия) на термоциклере Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf, США) согласно протоколу. Количественный ПЦР-анализ осуществлялся на термоциклере CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). Нормализованный уровень экспрессии рассчитывался по формуле $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$. В качестве референсов использовались гены *18s*. Последовательности праймеров исследуемых генов представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Последовательности специфических праймеров, 3'-5'

Название праймера	Последовательность
18s_pis_F	CTT CTG GAA GGG ATG CAT TT
18s_pis_R	AGG CCA CTA TCC TAC CAT CG
LDH_pis_F	ATG TTC AGG GGG GAG CA
LDH_pis_R	AAT AAT CGA CCG AGC CAA AC

Был секвенирован участок гена *ldh* гороха. Для секвенирования использовались два прямых и три обратных праймера. Полученные последовательности приведены ниже.

>1R

CCAAGGATCAACTCCCTCCGTTGAATACTCCGTCACCGCCGGCTCTGATCTGTGTATCGTTACCGCCGG
TGCACGACAGATAGCGGATGAGTCCAGGCTTAACSTTCTCCAGAGGAACSTTGCTCTTTTCCAGGGAATTATACC
CSTTCTGGCCCGTTACTCGCCGAAACGATTCTCATAATCGTGTCTAACCCCGTTGACGTTCTCACCTATATCGC
ATGGAAGCTTTCCGGGTTTCCATCCAACCGGATCATCGGGTCGGGAACCAATTTGGATTCGTCTCGCTTTCSTTT
CCTCCTTGCTGATCACCTCCAGGTCAATGCGCAGGATGTTCAAGTCATTCTCATTTTCTTTCATGGATGCTTTGA
AATTCAGTGGTAGGATTTATGGAAATCATAAACAAAGTATATGATACAT

>2F

CAACTCCTTCCGTTGAAATACTCCGTCACCGCCGGCTCTGATCTGTGTATCGTTACCGCCGGTGCACGA
CAGATCGCGGATGAGTCCAGGCTTAACSTTCTCCAGAGGAACSTTGCGCTTTTCCAGGGAATTATACCCGTTCTG
GCCCCGTTACTCGCCGAAACGATTCTCATAATCGTGTCTAACCCCGTTGACGTTCTCACCTATATCGCATGGAAG
STTTCCGGGTTTCCATCCAACCGGATCATCGGGTCGGGAACCAATTTGGATTCCTTCTCGCTTTCGTTTCCCTCCT
GCTGATCACCTCCAGGTCAATGCGCAGGATGTTCAAGTCATTCTCATTTTCTTTCATGGATGCTTTGAGATTTCA
CTGGAATGATTTATGTAAGTTATAAACAAAGTATTTGATACATGTTTGACGAAATGACCGAATGAACTAATAATA
TTTAAGTT

>2R

TCCGGTGTGCTTTTCACTTATATTGCATGTAAGCTTTCCGGGTTTCCCTTCCAACCGGATCATCGGTTCCG
GGAACCAATTTGGATTTGTCTTTCTTTTGTTCCTCCTTGATGATCACCTCCAGGTCAATGCGCAGGATGTTCA
GTCATTATCATTTTCTTTCATGGATGCTTTGAGATTTCACTGGAATGATTTATGTAAGTTATAAACAAAGTATTT
GATACAAGTTTGCAGAAATGACCGAATGAATTAATAATATTTAAGTTGAAGGAGTAATTTTCAAGTTTGTATATGG
GTTTTGCAGGCATGCATAGTAGGGGAGCATGGGGATAGTTCAGTGGCATTATGGTCAAGTATTAGCGTTGGGGT
GTTCCCTGTTCTGAGTTTTTTGGAGAAACAACAAATTGCTTATGAGAAAGAAACGCTGGAGAATATACACAAGAAA
GTGATTGACAGTGCTTATGAAGTCATCAATCTAAAAGGCTACACTTCATGGGCTATCGGGTACTCTGTGGCTAGT
TTGGCTCGGTTCGATTATTAGGGATCAAAGAAAGATCCACCCTGTGTC

>3F

CCGACAAGCTCCGCGGCGAGATGCTCGACSTTCCAGCACGCTGCTGCTTTTCTCCCCGCGTCAAGATCA
ACTCCTCCGTTGAATACTCCGTCACCGCCGGCTCTGATCTGTGTATCGTTACCGCCGGTGCACGACAGATAGCGG
ATGAGTCCAGGCTTAACSTTCTCCAGAGGAACSTTGCTCTTTTCCAGGGAATTATACCCGTTCTGGCCCGTTACT
CGCCGAAACGATTCTCATAATCGTGTCTAACCCCGTTGACGTTCTCACCTATATCGCATGGAAGCTTTCCGGGT
TTCCATCCAACCGGATCATCGGCTCGGGAACCAATTTGGATTCGTCTCGCTTTCGTTTCTCATCGCCGATCACC
TGAA

>3R

TTTAATGGCCATTGCTCAGACCATCCTCACTCAAGACCTCACTGACGAGCTCGTTCTTGTCGATAACAA
 ACCCGACAAGCTCCGCGGCGAGATGCTTGACCTTCAGCACGGTGGTGCTTTCTTCCCCCGCGTCAAGATCAACTC
 CTCCGTTGAATAATCCGTCACCGCCGGCTTTGATCTGTGTATTGTTACCGCCGGTGCATGACAGATAGCGGATGA
 GTCCAGGCTTAACCTTCTCCAGAGGAACCTTGCGCTTTTCCAGGGAATTATACCCGTTCTGGCCAGTTACTTGCC
 GGAAACGATTCTCATAATCGTGTCTAACCCCGTTGACGTTCTCACSTATATCGCATGGAAGCTTTCCGGGTTTCC
 ATCCAACCGGATCA

К секвенированному участку гена были подобраны специфические праймеры для определения уровня мРНК.

Было определено изменение уровня мРНК гена *ldh* в течение трех суток в корнях гороха в условиях гипоксии. Через 2 часа после начала инкубации в условиях гипоксии уровень мРНК значительно увеличивался относительно контроля (в 6,31 раза), к 12 часам он немного снижался (был в 4,94 раза выше контроля), практически та же величина наблюдалась на 24 часа инкубации (4,5), а через 2 дня еще немного снижался и практически не изменялся через три дня (составлял 3,39 и 2,86 на 2-й и 3-й день, соответственно) (рис. 38 б).

В листьях гороха наблюдалась другая картина. Первые 6 часов уровень мРНК *ldh* падал (составил 0,26 и 0,91 относительно контроля на 2 и 3 часа, соответственно). К 6 часу уровень мРНК возрастал в 3,61 раза относительно контроля. Через 12 часов после начала инкубации наблюдался резкий рост уровня мРНК (в 72,4 раза выше контроля), и оставался таковым на протяжении суток, а на вторые сутки уровень мРНК снова падал и был лишь в 2,98 раза выше контроля (рис. 38 а).

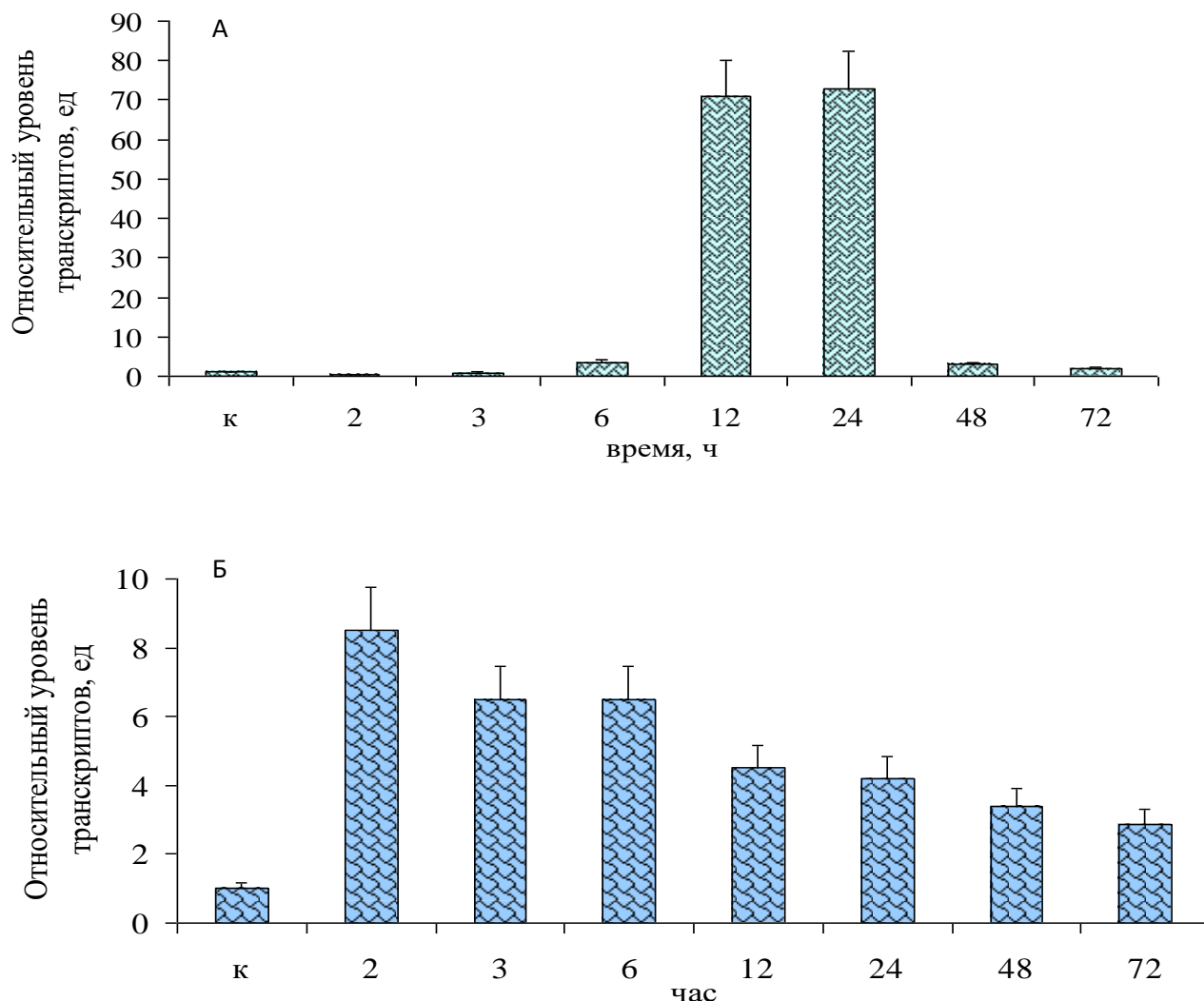


Рис. 38. Нормализованный уровень мРНК гена *ldh*: в листьях (А) и корнях (Б) гороха, инкубированного в гипоксических условиях

2.2.5 Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы

2.2.5.1 Этапы очистки ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев и корней гороха

Для выполнения цели исследования представляло интерес выделение фермента на пике его активности. Поэтому, для получения препарата ЛЦО-подобной ГО в высокоочищенном состоянии использовали корни гороха на третьи сутки его экспозиции в условиях дефицита кислорода в момент перехода от гипоксии к нормоксии. Результаты типичной очистки ЛЦО-подобной ГО из корней гороха приведены в таблице 7 (Приложение). Для экстракции данного фермента из листьев гороха, образцы из растений, инкубировались в

гипоксических условиях на протяжении 3 суток. Экспозиция осуществлялась в темноте для исключения активности других изоформ гликолатоксидазы. Через 24 часа с момента возобновления аэрации – наблюдалась сильная активация работы ЛЦО-подобной ГО. Результаты типичной очистки ЛЦО-подобной ГО из листьев гороха приведены в таблице 8 (Приложение).

В ходе пятистадийной очистки был получен электрофоретически гомогенный препарат фермента с показателями удельной активности 36,6 Е/мг белка, выхода 18 % (из корней гороха) и степенью – 65; 143,6 Е/мг белка, выхода 11,5 % и степенью – 95 (из листьев гороха); 274 Е/мг белка, выхода 13,8 % и степенью – 143 (из листьев сорго). Важный вклад в получение гомогенного препарата был внесен использованием ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефацеле. Наибольшее количество активности энзима было десорбировано с носителя элюцией 175 мМ NaCl. Для корней гороха десорбция ЛЦО-подобной ГО осуществлялась хлоридом натрия в концентрации 150 мМ NaCl (табл. 7) (Приложение).

2.2.5.2 Установление электрофоретической гомогенности препарата ЛЦО-подобной гликолатоксидазы

С помощью универсального окрашивания нитратом серебра был выявлен в ПААГ один белковый компонент с $R_f = 0,63$, для исследуемого фермента, как из корней, так и из листьев гороха (рис. 39-40). Электрофорез в ПААГ позволил установить единственную белковую полосу с $R_f = 0,6$ для препарата из листьев сорго. Наличие ЛЦО-активности очищенного белка было продемонстрировано специфическим проявлением тетразолиевым методом (рис. 41-42). Полученные результаты свидетельствуют о том, что очищенный препарат был электрофоретически гомогенен и обладал специфической ЛЦО-активностью.

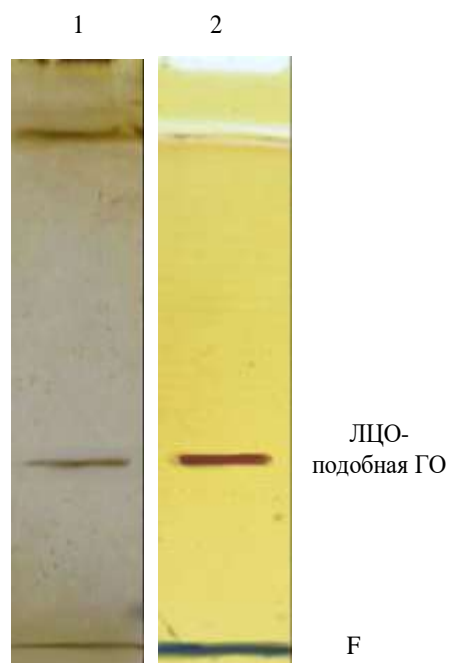


Рис. 39. Электрофорез в ПААГ очищенной ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из корней гороха, гели окрашены нитратом серебра (1) и специфическим тетразолиевым синим (2); F – фронт (бромфеноловый синий)

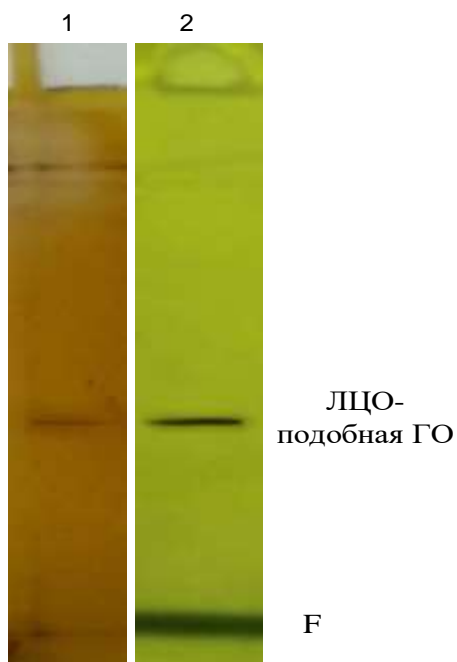


Рис. 40. Электрофорез в ПААГ очищенной ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев гороха при, гели окрашены нитратом серебра (1) и специфическим тетразолиевым синим (2); F – фронт (бромфеноловый синий)

Определение величин молекулярной массы нативной ЛЦО-подобной гликолатоксидазы и ее пептидов было осуществлено методами гель-хроматографии на Сефадексе G-200 и Ds-Na-электрофореза. Анализ полученных данных позволяет установить следующие значения молекулярной массы: $178 \pm 5,3$ кДа для нативного энзима из корней гороха. Результаты электрофоретических исследований позволили идентифицировать молекулярную массу одной субъединицы, которая равнялась $44,5 \pm 1,34$ кДа. Для ЛЦО-подобной ГО из листьев гороха были получены аналогичные величины молекулярной массы нативной молекулы и субъединицы ЛЦО-подобной ГО [23, 152].

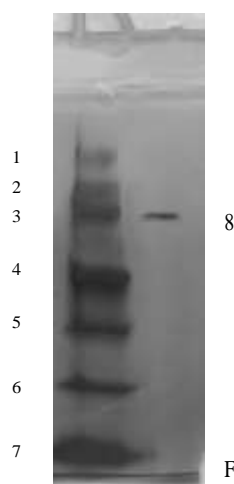


Рис. 41. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na очищенной из корней гороха ЛЦО-подобной ГО (8). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 1- β -галактозидаза (116.0); 2-БСА (66.2); 3-овальбумин (45.0); 4-ЛДГ (35.0); 5-REase Bsp198 (25.0); 6- β -лактоглобулин (18.4); 7-лизоцим (14.4)

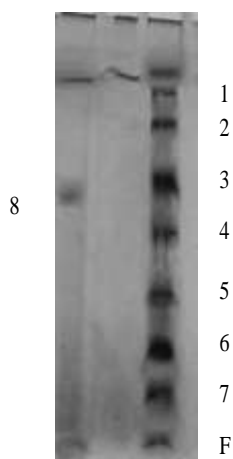


Рис. 42. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na очищенной из листьев гороха ЛЦО-подобной ГО (8). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 1-β-галактозидаза (116.0); 2-БСА (66.2); 3-овальбумин (45.0); 4-ЛДГ (35.0); 5-REase Vsp198 (25.0); 6-β-лактоглобулин (18.4); 7-лизоцим (14.4)

2.2.5.3. Определение K_m ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, экстрагированной из корней гороха

Значение константы Михаэлиса, определенной по лактату, для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из корней гороха оказалась равной 360 мкМ, а по гликолату 181 мкМ (рис. 43-44) (Приложение). Для сравнения аналогичный показатель для растений арабидопсиса равен 420 мкМ [85].

В ходе эксперимента были определены величины констант Михаэлиса для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев гороха, где этот показатель по лактату составил 240 мкМ, и 600 мкМ при измерении по гликолату (рис. 45-46) (Приложение).

По данным ряда авторов, изучавших ЛЦО-подобную ГО, K_m по лактату в растениях риса составила 470 мкМ, а в арабидопсисе величина данного показателя равна 420 мкМ [43, 85] (табл. 9).

Таблица 9.

Сводная таблица величин K_m по разным субстратам для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы для листьев корней гороха

Объект (<i>Pisum sativum</i> L.)	K_m по лактату, мМ	K_m по гликолату, мкМ
Листья	0,24±0,01	0,6±0,02
Корни	0,36±0,005	0,18±0,01

Так, в работе (Engqvist M.K.M [et al.], 2015) [84] установлено, что все изоферменты гликолатоксидазы показывали высокую каталитическую активность с гликолатом, но различия были обнаружены при использовании L-лактата: классические гликолатоксидазы имеют очень низкую эффективность при использовании L-лактата в качестве субстрата – в 22 и 31 раза ниже, чем с гликолатом. А ЛЦО-подобная изоформа гликолатоксидазы Арабидопсиса имеет высокие показатели афинности и к лактату и к гликолату, что свидетельствует о том, что она может использовать L-лактат с такой же эффективностью, как и гликолат, в отличие от фотодыхательных изоформ ГО1 и ГО2, которые используют гликолат с гораздо более высокой эффективностью [85].

2.2.5.4 Определение pH оптимума для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев гороха

Оптимальные значения рН среды были определены в диапазоне действия буфера Tris-HCl (5,0-9,5) и составил: 7,2 для работы фермента ЛЦО-подобной ГО из листьев гороха при использовании лактата в качестве субстрата и 6,8 – для ЛЦО-подобной ГО из корней при использовании лактата в качестве субстрата (рис. 47-48). Известно, что для гликолатоксидазы, экстрагированной из растений с С₃-типом метаболизма (пшеница), оптимальная концентрация ионов водорода в среде соответствует рН 7,8, а для фермента из С₄ растения (кукуруза) несколько ниже и составляет 7,6. Интересно отметить, что у ЛЦО-подобной гликолатоксидазы активность выше при более щелочном значении близком к 8,0 [11].

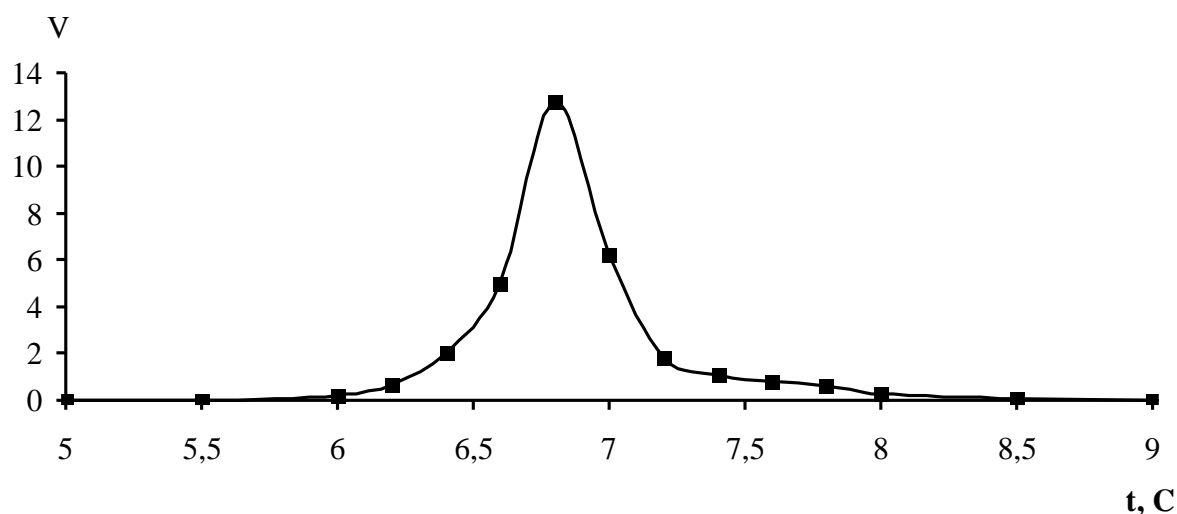


Рис. 47. Зависимость скорости реакции от рН среды для ЛЦО-подобной ГО из корней *Pisum sativum* при использовании лактата в качестве субстрата

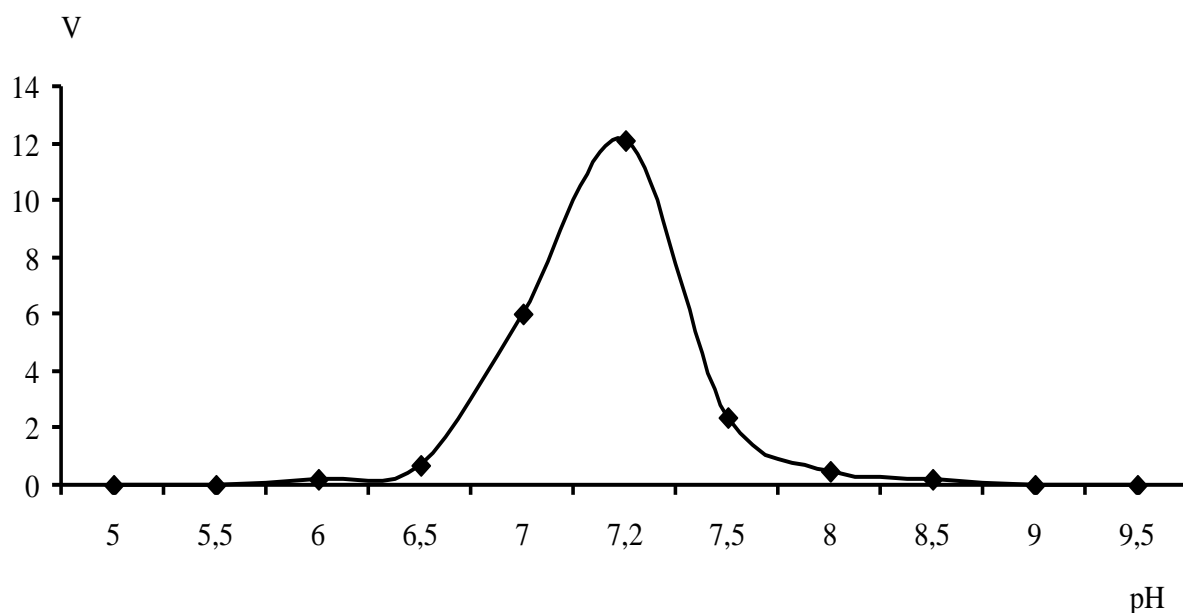


Рис. 48. Зависимость скорости реакции от pH среды для ЛЦО-подобной ГО из листьев *Pisum sativum* при использовании лактата в качестве субстрата

2.2.5.5 Определение температурного оптимума для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев гороха

Оптимальные показатели температуры для работы изучаемого фермента измерялись в интервале 20° – 75° С. Интересным является тот факт, что температурный оптимум ЛЦО-подобной ГО из корней несколько выше, чем для этого же фермента, выделенного из листьев, и составил 50° С (рис. 49) при использовании гликолата в качестве субстрата, относительно 48° С [19] (рис. 50).

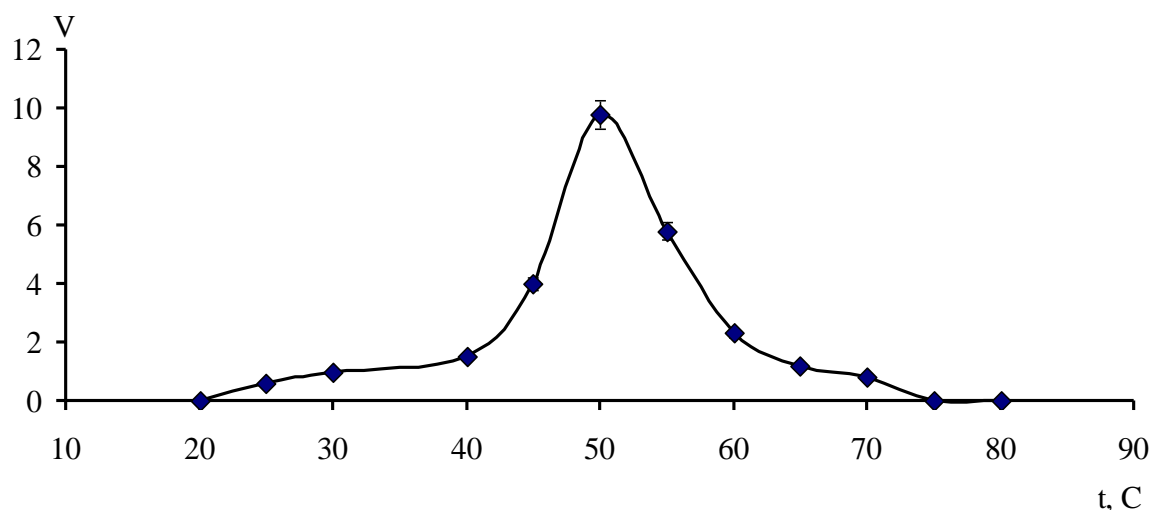


Рис. 49. Зависимость скорости реакции от температуры среды для ЛЦО-подобной ГО из корней *Pisum sativum* при использовании лактата в качестве субстрата

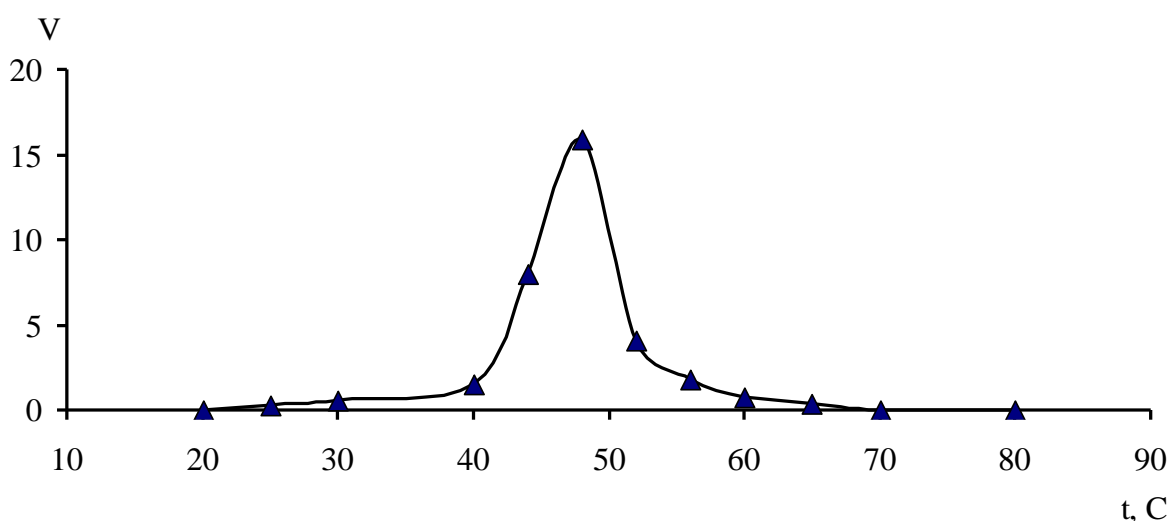


Рис. 50. Зависимость скорости реакции от температуры среды для ЛЦО-подобной ГО из листьев *Pisum sativum* при использовании лактата в качестве субстрата.

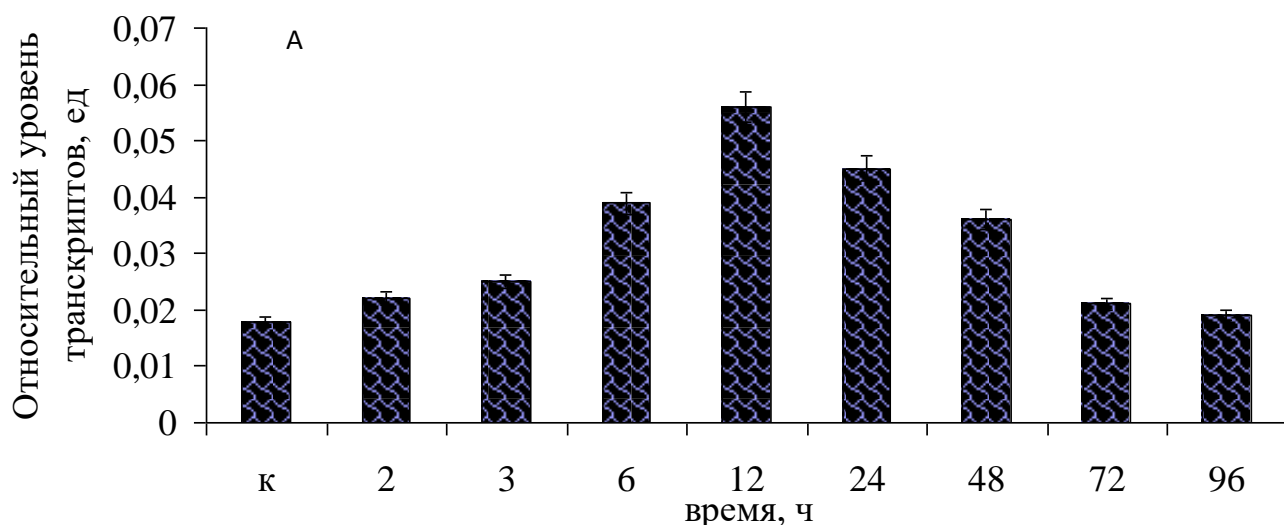
2.2.6 Молекулярные исследования ЛЦО-подобной гликолатоксидазы гороха

Для подбора вырожденных праймеров использовались аминокислотные последовательности Ldh представителей семейства Бобовые, доступные в базе данных KEGG. Выравнивание последовательностей проводили при помощи Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Для подбора праймеров

выбирали участки последовательностей, совпадающие у всех представителей семейства.

С применением метода ПЦР-РВ продемонстрирована зависимость изменения содержания мРНК для гена, кодирующего ЛЦО-подобную гликолатоксидазу, от времени выдержки растений в нормальных по содержанию кислорода условиях, после воздействия гипоксии (рис. 51).

Результаты исследования показали, что в листьях растений гороха наблюдался плавный рост экспрессии к 12 ч с момента перехода к нормоксии, при этом максимальный уровень составил 0,056 ед., что выше контрольного показателя в 3 раза. Далее происходил плавный спад, и к 96 ч с момента инкубации в нормоксических условиях уровень транскриптов практически совпадал с контрольным значением. В корнях растений гороха происходил существенный подъем экспрессии *glo* по сравнению с данным показателем из листьев. Уже через 3 часа наблюдалось резкое увеличение относительной концентрации транскриптов, которая составила 1 ед., что превышало в 34 раза значение контроля. Высокие показатели сохранялись на протяжении 12 часов, а спустя 24 часа с момента возобновления нормоксических условий был заметен спад уровней транскриптов гена *glo*, и через 48 ч относительный уровень транскриптов превышал контрольный показатель лишь в 2,7 раз, а спустя 72 ч – в 2 раза.



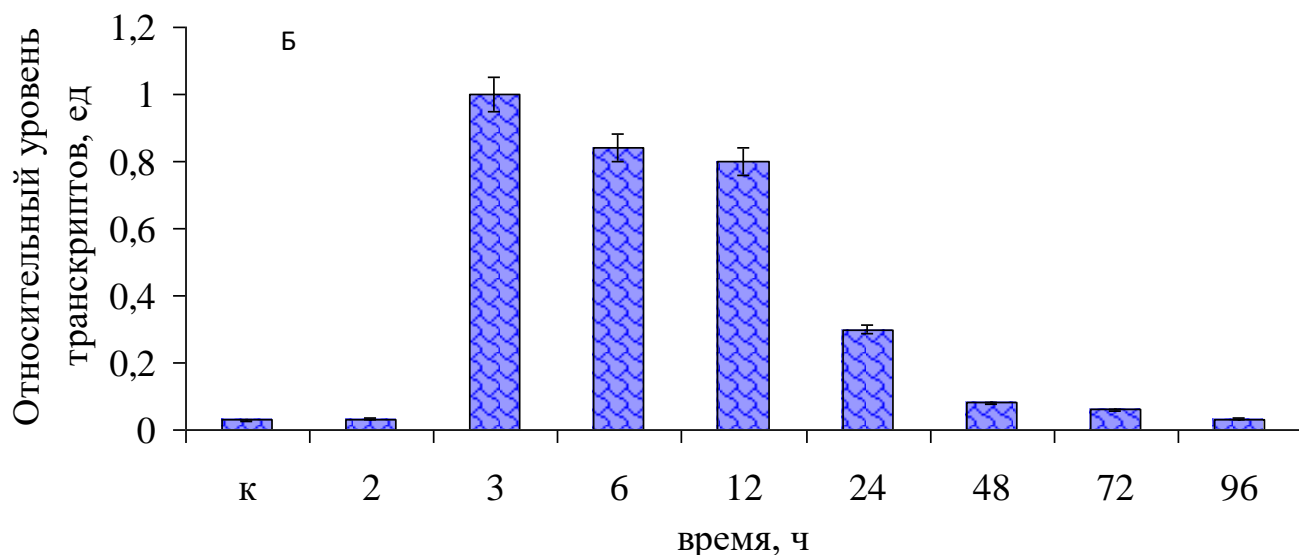


Рис. 51. Нормализованный уровень мРНК гена *glo*: в листьях (А) и корнях (Б) гороха, после возобновления аэрации

2.2.7 Динамика активности ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО из сорго, выдержанного в условиях гипоксии методом затопления и при выходе из нее

Лактатдегидрогеназная активность также инициируется и в листьях сорго, корни которого инкубировались в гипоксических условиях. При этом на вторые сутки была установлена максимальная активность работы фермента, превышающая более чем в два раза уровень активности контрольных растений (рис. 52). Незначительная активация фермента в корнях сорго при гипоксии наступает через 3 часа в экспериментальной группе растений, а через 2 суток она превышает в 2.5 раза показатели контрольной группы (рис. 53).

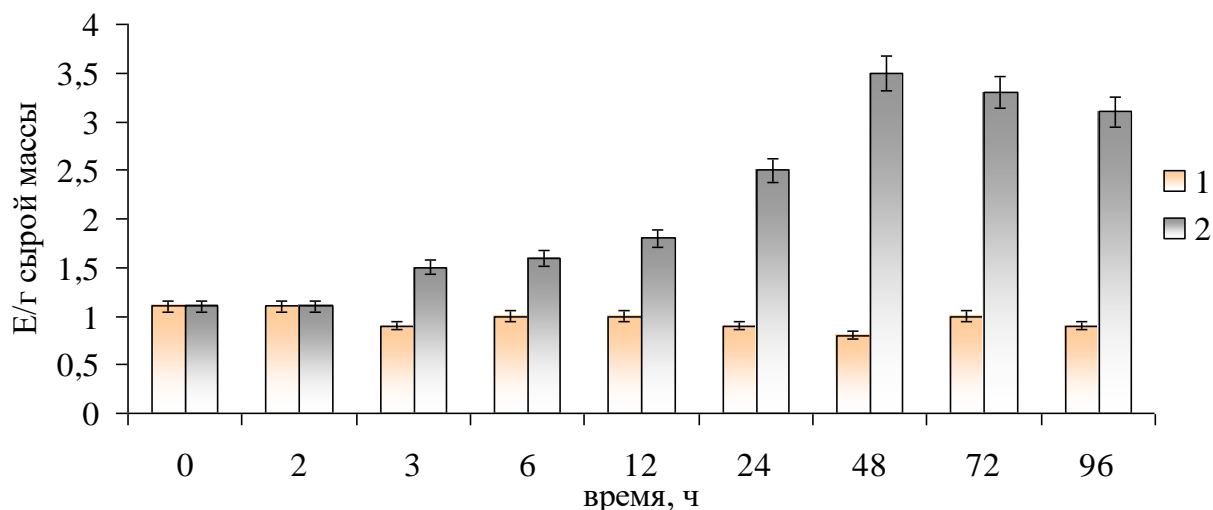


Рис. 52. Динамика активности ЛДГ в листьях сорго: 1) в нормоксических условиях (контроль) и 2) в гипоксии (эксперимент)

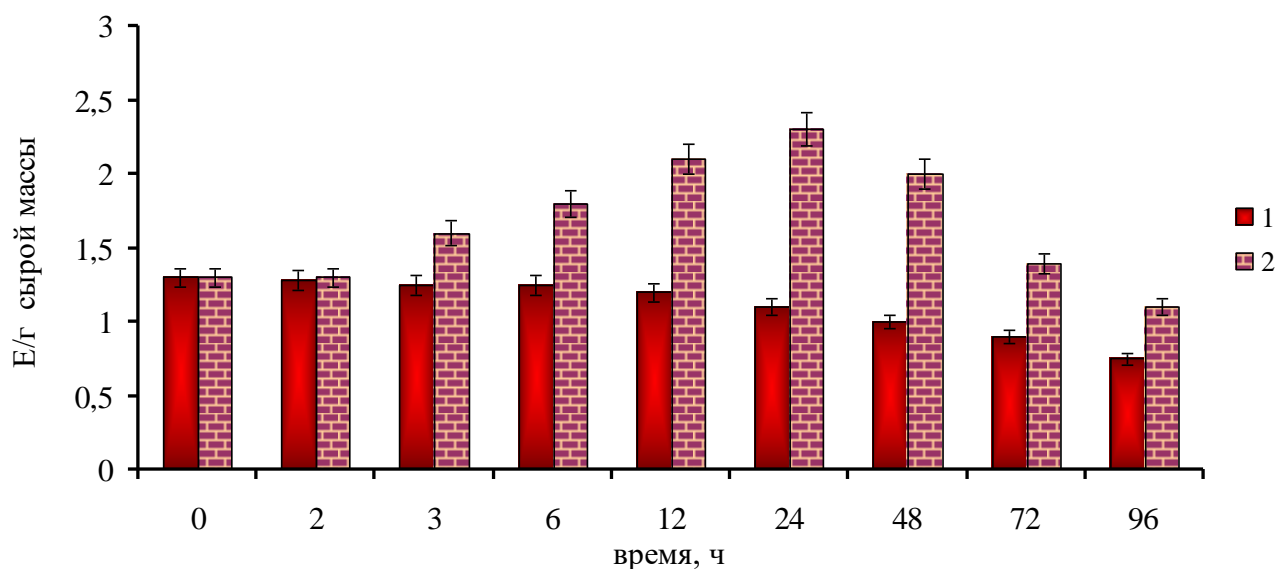


Рис. 53. Динамика активности ЛДГ в корнях сорго: 1) в нормоксических условиях (контроль) и 2) в гипоксии (эксперимент)

В то же время в корнях растений сорго, инкубированных в условиях недостатка кислорода, в момент возобновления аэрации, индуцируется активность ЛЦО-подобой гликолатоксидазы. Работа фермента интенсифицируется спустя 6 часов с момента восстановления нормоксических условий на смену гипоксии, при этом активность фермента увеличилась в 5 раз в экспериментальной группе

растений. Интересным является тот факт, что реакция корней на нормоксию более стремительная и уже через 12 ч достигается максимум активности (рис. 54).

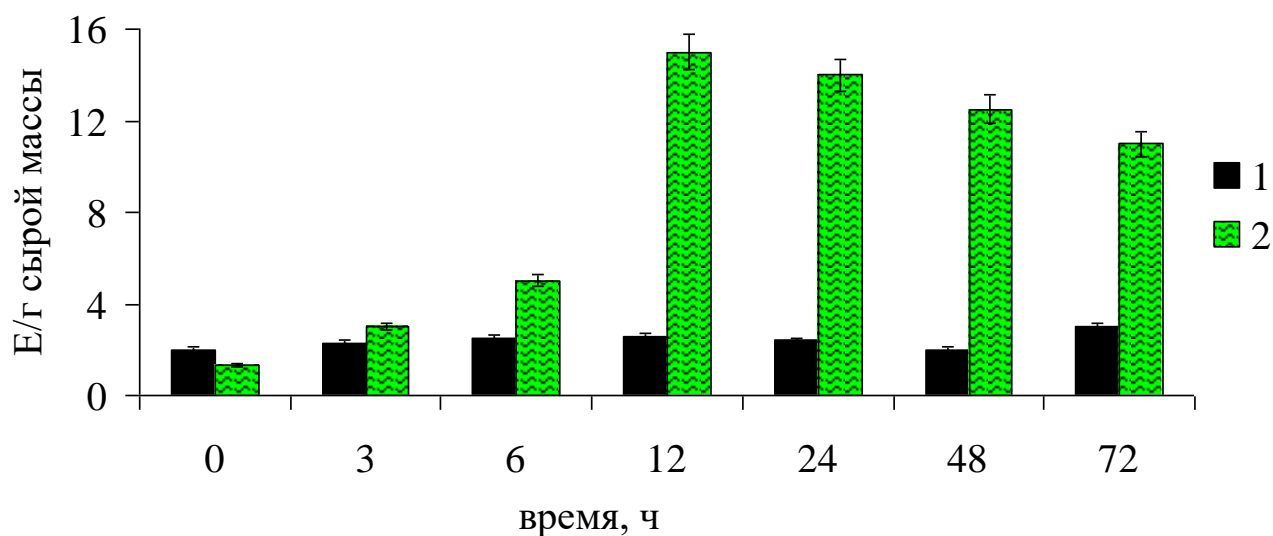


Рис. 54. Динамика активности ЛЦО-подобной ГО в корнях сорго: 1) выдержанных в гипоксических условиях (контроль), и 2) во время возобновления нормоксических условий (эксперимент)

Повышение активности фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы уже было установлено уже через 6 часов после перехода растений в нормоксические условия. Максимум активности ЛЦО-подобной ГО в листьях сорго – наблюдался через сутки с момента восстановления доступа кислорода к корням, а далее снизился на вторые сутки, тем не менее, превышая контрольные показатели в 5 раз (рис. 55). В корнях растений интенсификация работы ЛЦО-подобной гликолатоксидазы наблюдалась также через 6 часов после выхода из гипоксии, но уровень активности превысил аналогичный показатель из листьев, в этой же временной точке, более чем в 2 раза. Через 12 часов нормоксии активность ЛЦО-подобной гликолатоксидазы поднялась более чем в 20 раз по сравнению с контролем (рис. 55). Интересно, что высокий уровень активности сохранялся, слегка снижаясь к четвертым суткам.

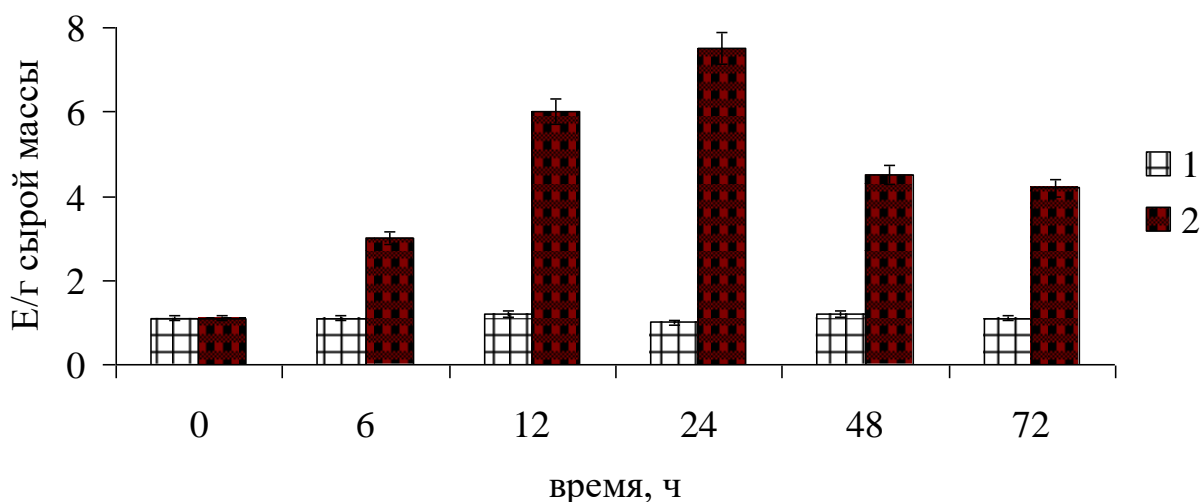


Рис. 55. Динамика активности ЛЦО-подобной ГО в листьях сорго: 1) выдержанных в гипоксических условиях (контроль), и 2) во время возобновления нормоксических условий (эксперимент)

2.2.8 Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев сорго

2.2.8.1 Получение гомогенного препарата ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго, экспонированных в условиях гипоксии и при выходе из нее

Для выполнения цели исследования представляло интерес выделение фермента на пике его максимальной активности. Поэтому для получения ЛЦО-подобной ГО в высокоочищенном состоянии использовали листья сорго на вторые сутки его экспозиции в условиях, нормальных по содержанию кислорода, после гипоксического воздействия в течение 40 ч. Результаты типичной очистки ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго приведены в таблице 10 (Приложение).

Наибольшее количество гликолатоксидазной активности с лактатом было десорбировано с носителя при элюции 150-200 мМ NaCl.

С помощью универсального окрашивания нитратом серебра было выявлено, что в ПААГ один белковый компонент с $R_f=0,6$ для *Sorghum sudanense* J. (рис. 56). Тетразолиевым методом для специфического проявления активности ЛЦО-

подобной ГО было показано, что очищенные белки обладали гликолатоксидазной активностью (рис.56).

Электрофоретически гомогенный препарат фермента ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго, полученный в ходе многостадийной очистки обладал следующими показателями: удельная активность - 274 Е/мг белка, степень -143,9 и выход - 13,8 %. Наибольшая эффективность при получении гомогенных препаратов фермента были связаны с использованием ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефацеле.

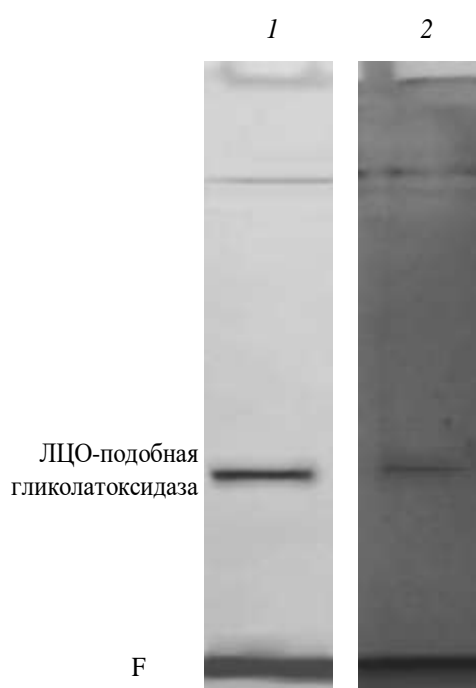


Рис. 56. Электрофорез в ПААГ очищенной ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев сорго: 1) гели окрашены нитратом серебра и 2) специфическое проявление тетразолиевым синим; F – фронт (бромфеноловый синий)

2.2.8.2 Определение молекулярной массы и субъединичного строения препарата ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго

В результате сравнения величин молекулярной массы очищенного методом

гельхроматографии энзима, и величины молекулярной массы его пептидов, определенных методом Ds-Na-электрофореза, была установлена четвертичная структура исследуемого фермента (рис. 57). Величины молекулярной массы молекулы энзима из листьев сорго и молекулярной массы субъединицы – составили $168 \pm 2,5$ и $42 \pm 21,3$ соответственно. Следовательно, можно заключить, что ЛЦО-подобная гликолатоксидаза из листьев сорго, по-видимому, имеет олигомерную структуру и представляет собой гомотетрамер (табл. 11).

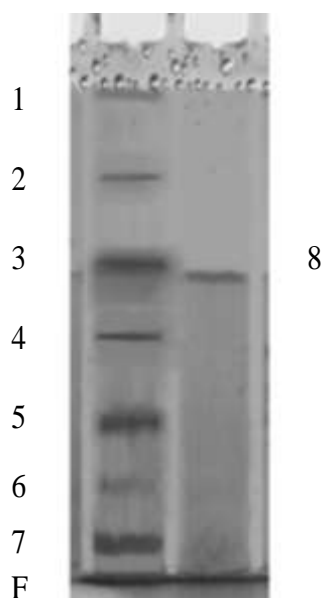


Рис. 57. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na очищенной из листьев сорго ЛЦО-подобной ГО (8). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 1- β -галактозидаза (116,0); 2-БСА (66,2); 3-овальбумин (45,0); 4-ЛДГ (35,0); 5-REase Bsp198 (25,0); 6- β -лактоглобулин (18,4); 7-лизоцим (14,4)

Значения молекулярной массы и субъединичное строение ЛЦО-подобной ГО у *Pisum sativum* L. и *Sorghum sudanense* J

Объект	Молекулярная масса, кДа	Количество субъединиц	Молекулярная масса субъединиц, кДа
<i>Pisum sativum</i> L. (корни)	178,0±2,5	4	44,5±1,8
<i>Pisum sativum</i> L. (листья)	180±2,7	4	45,0±1,9
<i>Sorghum sudanense</i> J (листья).	168,0±2,5	4	42,0±1,3

2.2.8.3 Определение сродства к субстратам ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго

Значения величин констант Михаэлиса по лактату и гликолату для ЛЦО-подобной ГО, экстрагированной из листьев сорго, распределились следующим образом: 140 мкМ и 800 мкМ для разных субстратов соответственно (рис. 58-59) (Приложение). Так, для гликолатоксидазы 1 арабидопсиса, кодируемой геном *gox1* величина K_m по лактату составляет $2\,753 \pm 165$ мкМ, а по гликолату - 278 мкМ. Еще более высокое значение K_m по лактату выявлено для гликолатоксидазы арабидопсиса, кодируемой геном *gox2*, которое составило $4\,905 \pm 241$ мкМ. В то

же время сродство к гликолату у этого изофермента чуть меньше, по сравнению с гликолатоксидазой 1 и составляет 327 ± 21 мкМ [85].

2.2.8.4 Физико-химические характеристики ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, экстрагированной из листьев сорго

Оптимальное значение pH среды было определено в диапазоне действия буфера Tris-HCl 5.0-9.0. Значение оптимальной величины составило 7,5 для работы фермента ЛЦО-подобной ГО из сорго (рис. 60). Величина показателя оптимальной температуры была выявлена путем измерения активности ЛЦО в интервале температур от 20° до 75° C. Как видно из полученных данных, значение этого важного показателя для исследуемого энзима из сорго равнялась 55° C (рис. 61). Ранее в работе других авторов (Zhang Z. [et al.], 2017) было установлено значение оптимального pH для этого энзима выделенного из риса, которое равнялось 7,8 [43]. Определение температурного оптимума этого фермента из этой культуры позволило выявить оптимальное значение этого показателя, которое составило 42° C [29, 43, 52].

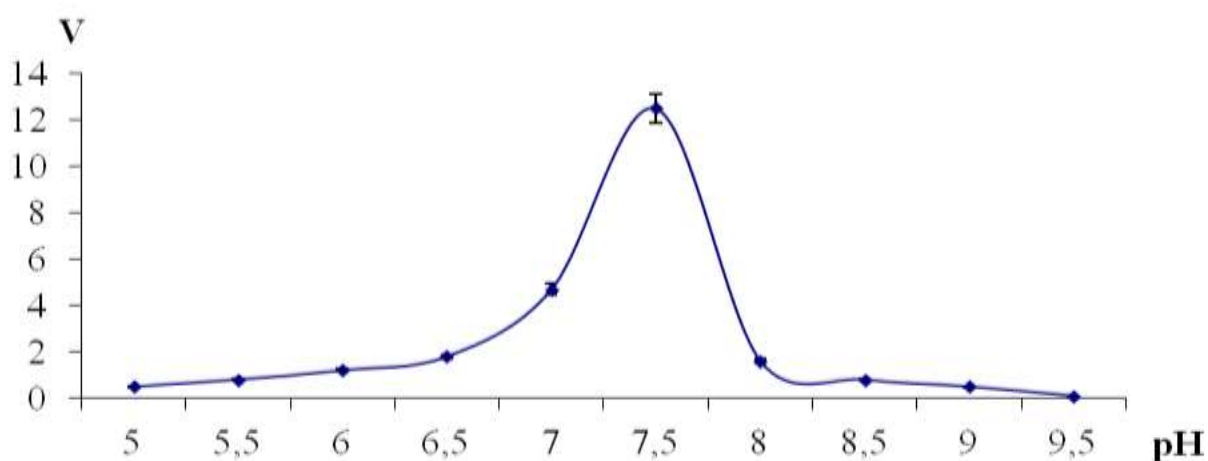


Рис. 60. Зависимость скорости реакции от pH среды для ЛЦО-подобной ГО из листьев *Sorghum sudanense* J. при окислении лактата

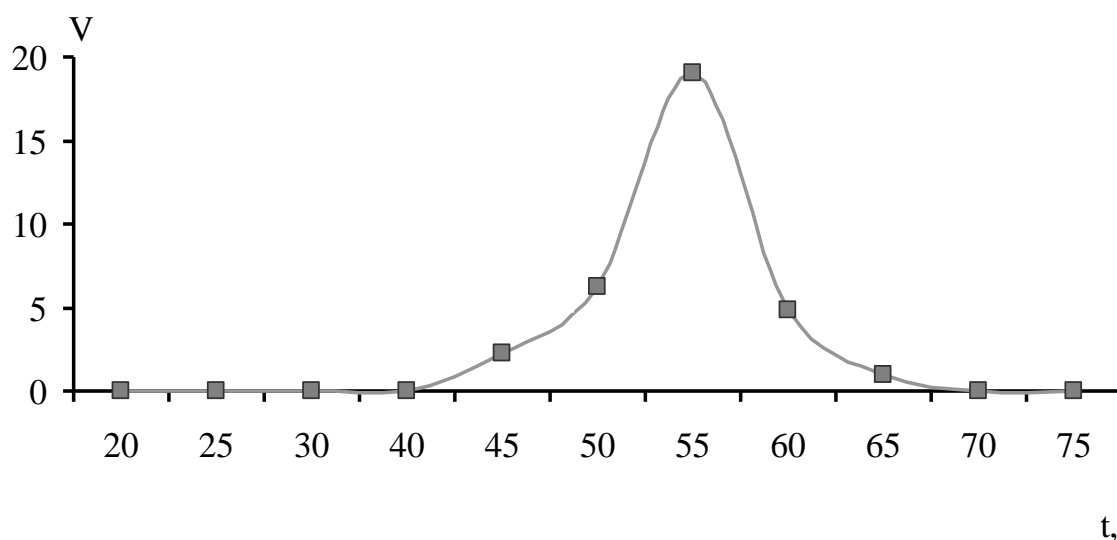


Рис. 61. Зависимость скорости реакции от температуры среды для ЛЦО-подобной ГО из листьев *Sorghum sudanense* J. при окислении лактата

2.2.8.5 Молекулярные исследования ЛЦО-подобной гликолатоксидазы сорго

Влияние перехода от гипоксических условий к нормоксическим оказывает четкое действие на активность ЛЦО-подобной изоформы гликолатоксидазы в листьях и корнях растений сорго (рис. 62). Так, и в корнях и листьях сорго наблюдалось повышение относительных уровней транскриптов *glo* при переходе от гипоксии к нормоксии. При этом в листьях сорго через 6 ч этот уровень нарастал в 1,8 раза, и достигал своего максимального значения через 12 ч, оставаясь высоким до конца первых суток. В то же время, в корнях сорго уже через 2 часа относительный уровень транскриптов возрастал в 29,5 раз. А спустя 12 часов достиг своего самого высокого значения в 1,16 ед., что выше контрольного показателя в 58 раз. Можно предположить, что ЛЦО-подобная изоформа гликолатоксидазы принимает участие в быстрой утилизации накопившегося лактата в момент восстановления кислородных условий после воздействия гипоксии.

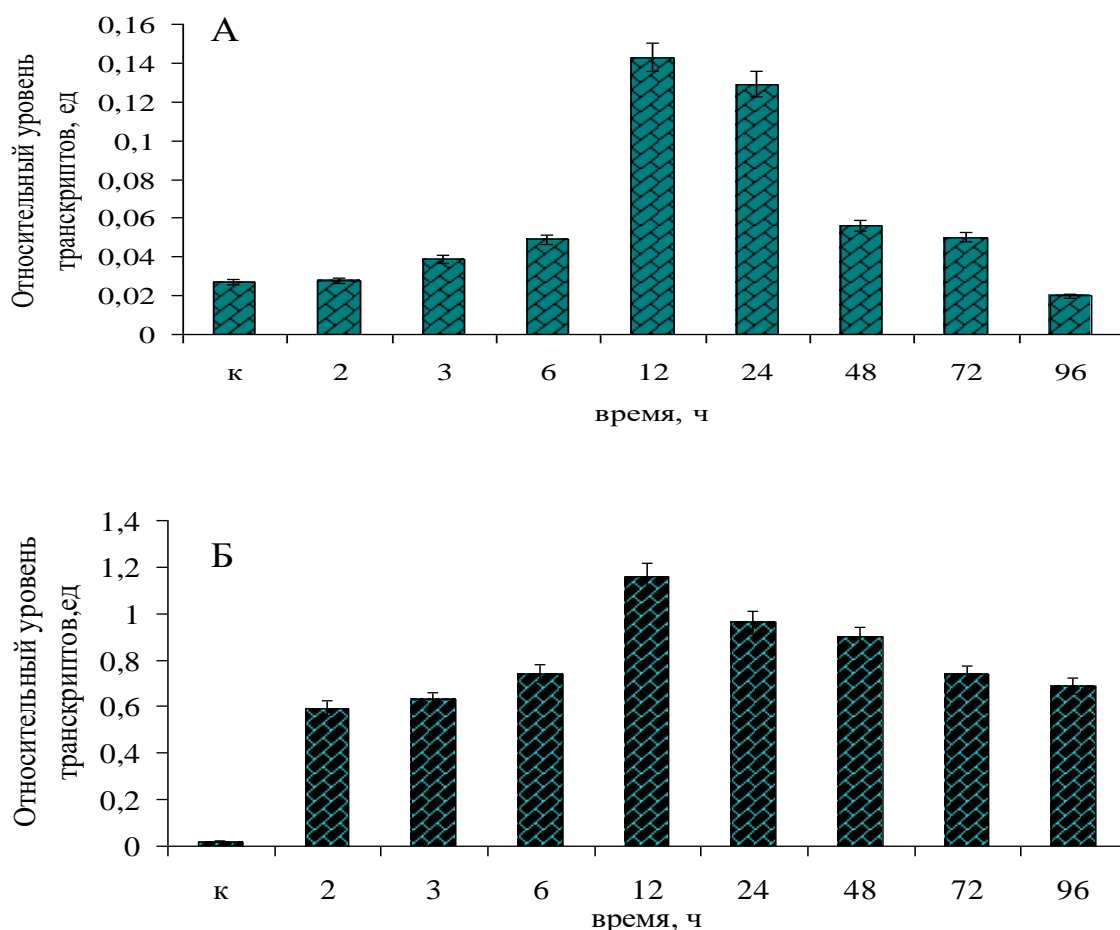


Рис. 62. Относительный уровень транскриптов гена *glo*: в листьях (А) и корнях (Б) сорго, после возобновления аэрации

2.2.9 Исследование активности лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной ГО у микроводоросли хлореллы

В ходе исследования было установлено, что активность лактатдегидрогеназы возростала в 2 раза на 14 сутки инкубации в микроаэробных условиях, по сравнению с контрольными образцами. В условиях аэрации микроводоросли наблюдали увеличение активности ЛЦО-подобной гликолатоксидазы спустя 24ч экспозиции.

2.2.10 Экстракция и очистка ЛДГ из Хлореллы

2.2.10.1 Получение препаратов L-лактатдегидрогеназы

Для получения препарата лактатдегидрогеназы из *Chlorella vulgaris* была проведена многостадийная очистка фермента. Микроводоросли для очистки были взяты на 14-е сутки их культивирования, так как активность лактатдегидрогеназы была максимальной.

Непосредственно после гомогенизации и центрифугирования биомассы клеток хлореллы осуществлялась экстракция фермента сульфатом аммония. Удельная активность на данной стадии – 2,5 Е/мг белка.

Гель-фильтрацию в колонке с сефадексом G-25 осуществлялась с целью освобождения от низкомолекулярных примесей. Удельная активность составила 2,6 Е/мг белка.

На следующем этапе работы проводили ионообменную хроматографию в линейном градиенте NaCl. Удельная активность на этой стадии – 15,8 Е/мг белка. Удалось получить препарат фермента с удельной активностью 15,8, показателем выхода – 21 и со степенью очистки 78,5 раз (табл. 12) (Приложение). Из других объектов лактатдегидрогеназа была получена с близкими характеристиками удельной активности, выхода и степени очистки, к примеру, ЛДГ из *Lactobacillus casei* была получена с удельной активностью – 2291, показателем выхода – 4,8, и со степенью очистки 76,4 раз [88].

2.2.10.2 Электрофоретические исследования ферментативных препаратов L-ЛДГ

В ходе электрофоретического анализа удалось установить, что ферментативный препарат ЛДГ, экстрагированной из хлореллы, получен в электрофоретически гомогенном состоянии. Электрофореграмма представлена на рисунке 63. Значение R_f составило 0,39 для ЛДГ.

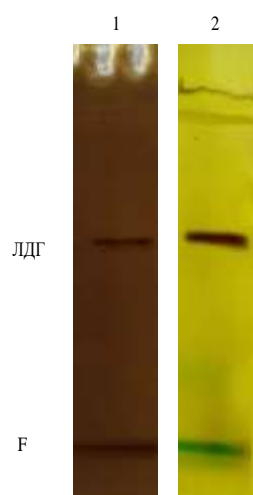


Рис. 63. Электрофореграмма ЛДГ из хлореллы: неспецифическое (1) и специфическое (2) проявление; F – фронт бромфенолового синего.

2.2.10.3 Определение кинетических характеристик для L-лактатдегидрогеназы хлореллы

Определение констант Михаэлиса по НАДН и пирувату для ЛДГ осуществлялось методом двойных обратных координат Лайнуивера-Берка. Значение K_m по пирувату – 0,25 мМ (рис. 64) (Приложение), по НАДН значение K_m составило 0,02 мМ (рис. 65) (Приложение). Исследуя литературные данные, можно сказать, что сродство фермента к НАДН достаточно высоко. Что касается сродства к пирувату, то полученное значение K_m превышает верхнюю границу значений, известных из литературы данных [94, 95].

2.2.10.4 Определение рН оптимума для ЛДГ

В ходе исследований удалось выявить оптимальные условия работы фермента ЛДГ, экстрагированного из хлореллы. Значение рН для прямой реакции ЛДГ составило 8,1 (рис. 66), таким образом, оптимальные условия работы ферментов в хлорелле находятся в щелочной области [193].

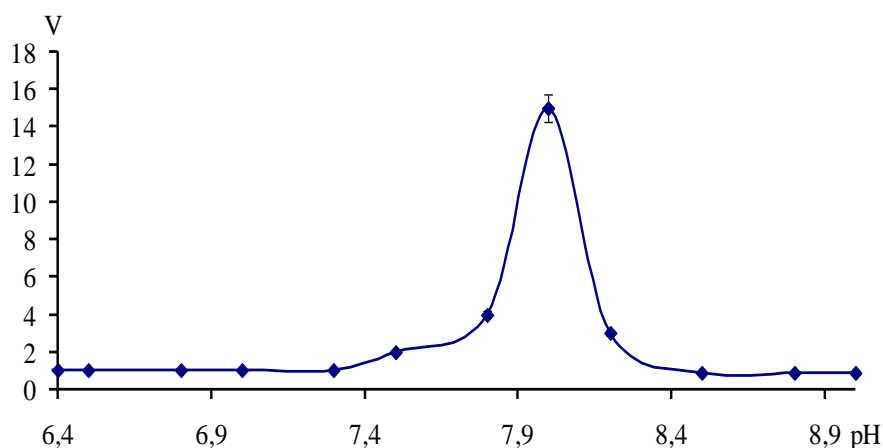


Рис. 66. Зависимость скорости реакции от pH среды для ЛДГ из хлореллы при восстановлении пирувата.

2.2.10.5 Влияние АТФ на активность ЛДГ хлореллы

Известно, что ЛДГ-5, которая активизируется в условиях гипоксии, ингибируется АТФ, в связи с чем было проведено исследование, свидетельствующее о принадлежности очищенного препарата к гомотетрамеру ЛДГ-5. При концентрации АТФ $0,57 \pm$ мМ достигается полное ингибирование фермента. Известно, что 6-фосфоглюконат, дигидроксиацетонфосфат, АДФ и АТФ проявляют сильное ингибирование при низких концентрациях на изучаемый фермент. Для лактатдегидрогеназы, выделенной из *Lactobacillus easyi* концентрация АТФ, вызывающая 50% -ное ингибирование была равной 0,75 мМ [88].

2.2.11 Определение активности гликолатоксидазы в ходе аэрирования суспензии

В ходе эксперимента, было установлено, что в суспензии, культивируемой на специальной качалке, создающей перемешивание культуры, в течение 5 минут была выявлена наименьшая активность фермента гликолатоксидазы при

использовании лактата в качестве субстрата реакции (рис. 67), В ходе дальнейшего эксперимента было выявлено отсутствие значительного прироста активности фермента в условиях без аэрации культуры. Наибольшее значение активности гликолатоксидазы было установлено через час в ходе эксперимента по культивированию суспензии хлореллы, также небольшой спад наблюдался через 12 часов с начала аэрации.

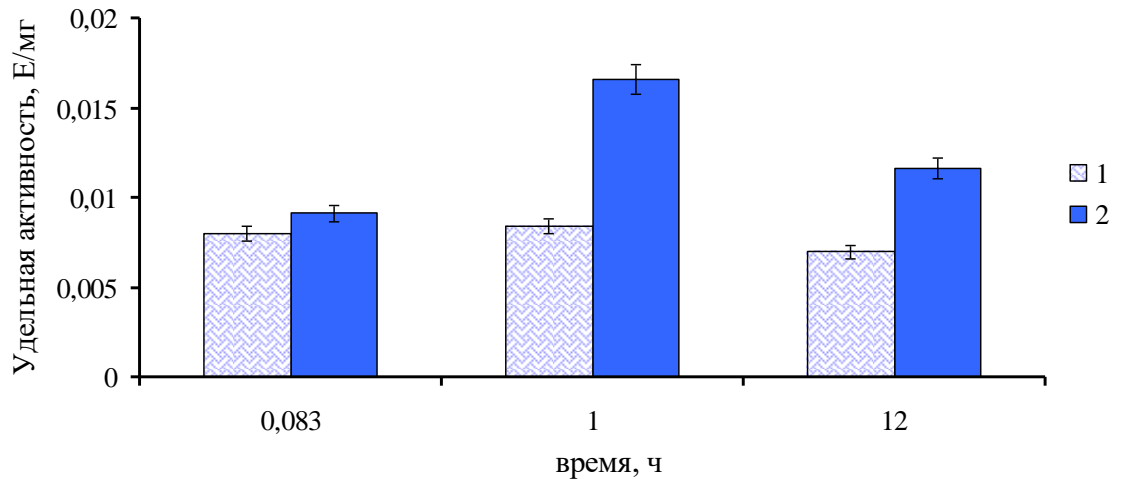


Рис. 67. Динамика активности гликолатоксидазы хлореллы: 1) в обычных условиях культивации и 2) при аэрации культуры

По аналогии с азотфиксирующими цианобактериями, нитрогеназа которых чрезвычайно чувствительна к кислороду [56], вероятно, одноклеточная водоросль хлорелла может использовать лактатоксидазу для снижения количества кислорода [193]. А также, данный механизм возможно служит для утилизации лактата с дальнейшим вовлечением пирувата в конструктивное русло глюконеогенеза.

2.2.12 Получение гомогенных препаратов ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из хлореллы

2.2.12.1 Экстракция и очистка ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из хлореллы

В ходе четырехстадийной очистки был получен очищенный препарат

гликолатоксидазы из зеленой водоросли хлореллы, выращенной аэробно при периодическом аэрировании на модифицированной среде Тамия. Результаты очистки фермента представлены в таблице 13 (Приложение).

В результате многоступенчатого процесса очистки на каждой стадии получаемая нами фракция была более богата выделяемым ферментом, о чем можно было судить по возрастающей величине удельной активности. В ходе очистки количество общего белка уменьшалось, поскольку происходила потеря исследуемого белка вместе с балластными белками.

Препарат гликолатоксидазы из хлореллы был очищен в 71.5 раз с удельной активностью $2,86 \pm 0,08$ Е/мг и показателем выхода – 8. Авторы (Iwamoto K. [et al.]) [115] получили аналогичные данные при очистке энзима из *Spatoglossum pacificum*: величина удельной активности соответствовала 22.4 Е/мг, выход – 16.2 и показатель степени очистки был равен – 1326.

2.2.12.2 Определение гомогенности препарата гликолатоксидазы

Для анализа ферментного препарата на гомогенность был проведен электрофорез в полиакриламидном геле. При этом универсальное окрашивание нитратом серебра и специфическое проявление тетразолиевым методом выявило одну белковую полосу фермента. Значение относительной электрофоретической подвижности (R_f) составило 0,47 (рис. 68). На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что очищенный ферментный препарат, выделенный из микроводоросли хлореллы, является электрофоретически гомогенным (рис. 68).

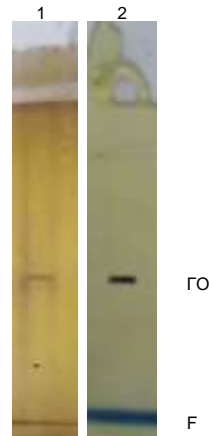


Рис. 68. Электрофорез в ПААГ очищенной гликолатоксидазы из хлореллы, гели окрашены нитратом серебра (1) и специфическим тетразолиевым синим (2); F – фронт (бромфеноловый синий).

Методом Ds-Na-электрофореза была определена величина R_f проявившейся полосы, которая составила 0.4 (рис. 69). Молекулярная масса отдельной субъединицы составила 42,66 кДа.



Рис.69. Электрофорез в ПААГ в присутствии Ds-Na очищенной гликолатоксидазы из хлореллы (8). Белки-маркеры молекулярной массы (кДа): 1 – β -галактозидаза E. Coli (116); 2 – бычий сывороточный альбумин (66,2); 3 – овальбумин (45,0); 4 – лактатдегидрогеназа сердечной мышцы (35,0); 5 – Bsp391 E.coli (25,0); 6 – β -лактоглобулин (18,4); 7 – лизоцим яичного белка (14,4).

Поскольку данные свидетельствуют о том, что функционирование фермента происходит подобно C₋₃ растениям можно полагать, что данный фермент является тетрамером. Фермент, выделенный из растений C₋₃ пшеницы, ячменя, шпината,

гороха и табака, имеет M_r в диапазоне 160 – 180 кДа и, вероятно, является гомотетрамером [84, 134].

2.2.12.3 Определение значений K_m для фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы

K_m определяли по графику Лайнуивера-Бэрка методом двойных обратных координат. K_m по гликолату из хлореллы составила 40мМ (рис. 70) (Приложение).

В исследованиях [85] было сделано предположение о том, что гликолатоксидаза может в качестве субстрата использовать не только гликолат, но и лактат. Данные были продемонстрированы для растительной клетки арабидопсиса, вследствие чего был выдвинут довод о том, что гликолатоксидаза, использующая лактат в качестве субстрата, является аналогом L-лактат: цитохром-с-оксидоредуктазы дрожжей, что было показано при сравнении аминокислотных и нуклеотидных последовательностей.

Чтобы проверить указанное выше предположение для гликолатоксидазы из зеленой водоросли хлореллы была определена K_m по лактату. Более низкое значение K_m для лактата – 3 мМ и значительно более высокие значения K_m для гликолата – 40 мМ (рис. 70-71) подтвердили гипотезу о том, что кодируется гликолатоксидаза с более высоким сродством к лактату, чем к гликолату. В соответствии с полученными данными был сделан вывод о том, что для фермента гликолатоксидазы зеленых водорослей лактат является таким же продуктивным субстратом как и для ЛЦО-подобной ГО растений.

По литературным данным, предоставленным по красным водорослям, в которых также присутствует фермент гликолатоксидаза было выявлено, что K_m по гликолату составила $0,9 \pm 0,2$ мМ, а для l-лактата $14,9 \pm 3,0$ мкМ. Для шпината значение K_m по гликолату составило 1мМ [114, 134].

2.2.12.4 Определение рН оптимума для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы

Был определен профиль рН-активности для гликолатоксидазы в диапазоне рН 5.5 – 8.85 (рис. 72). Максимальная активность для ГО из *Chlorella vulgaris* была найдена около рН 6.8, в то время как минимальная активность была найдена при рН 5.5. Наблюдалась устойчивая тенденция к росту с рН 6.4 до максимума на 6.8.

Сообщалось, что рН-оптимум для гликолатоксидазы в *Arabidopsis thaliana* составил 7.5 [85], для гликолатоксидаз бурых водорослей *Spatoglossum pacificum* У. был показан оптимальный рН 8,3 как для гликолата, так и для L-лактат, при этом активность фермента сохранялась около 80% в широком диапазоне рН для обоих субстратов: поддерживалась от 7,5 до 8,75 по гликолату и от 7,0 до 8,5 по L-лактату [115].

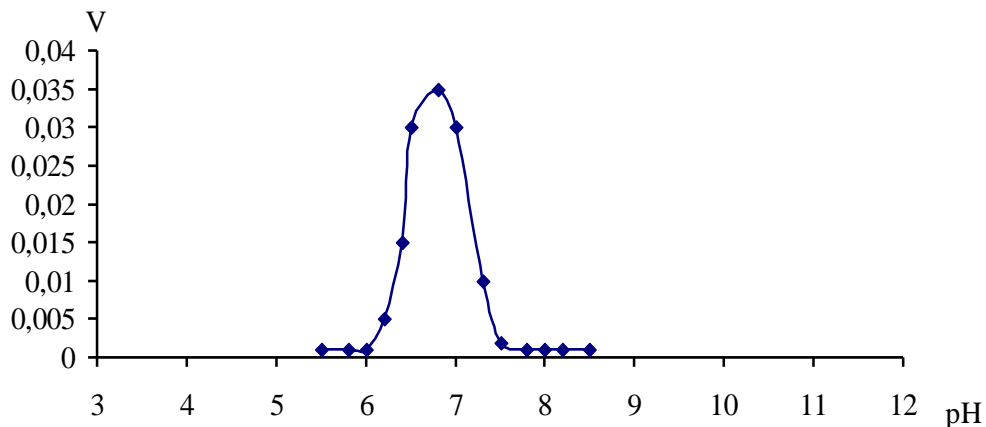


Рис. 72. Зависимость ферментативной активности гликолатоксидазы от рН среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой, играет важную роль в адаптивной реакции клеточного метаболизма к стрессовым условиям, в частности к недостатку кислорода. При затоплении корневой системы, возникает гипоксия, которая оказывает влияние на перестройку метаболизма [25]. Скорость работы цикла трикарбоновых кислот снижается, происходит усиление роли гликолиза. Немаловажно, что при затоплении аналогичные процессы происходят и в листьях растений, ввиду механического закрытия устьиц [25]. При гипоксии у растений с C_3 типом фотосинтеза быстро активизируется работа фермента лактатдегидрогеназы [7, 10]. Фермент способен восстанавливать малейшие порции пирувата, в виду высокого сродства к нему, этот процесс связан с реокислением гликолитического НАДН, данный процесс позволяет растению получать энергию, во время недостатка кислорода. Тем не менее, как следствие, лактат накапливается в цитоплазме клетки. И как мы полагаем, в момент восстановления доступа кислорода, фермент ЛЦО-подобная гликолатоксидаза способен утилизировать накопившиеся порции лактата, обладая высоким к нему сродством. Можно предположить, что во время эволюции фотосинтеза лактатоксидазы бактерий дали начало гликолатоксидазам растений. Одна из изоформ гликолатоксидазы обладает большим сходством с ЛЦО дрожжей, и выполняет несколько иную функцию, отличную от фотореспираторной, у многоклеточных организмов во время воздействия гипоксических условий.

Активация фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у растений с C_4 типом фотосинтеза происходит несколько быстрее, чем для C_3 растений. Интересным является, тот факт, что интенсивность работы ЛЦО-подобной ГО в корнях растения сорго высока, по сравнению с функционированием его же у растений гороха. В работе Энгвиста с сотр. (Engqvist M.K. [et al.], 2015) [84] была продемонстрирована роль ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у растений *Arabidopsis th.*: эксперименты с изотопным трассиром показали, что несмотря на высокое сродство к гликолату, L-лактат является предпочтительным субстратом

ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. Также, кинетический анализ показал, что этот изозим обладает высокой каталитической эффективностью с L-лактатом. Более того, ГОЗ может восстановить рост на L-лактате дрожжевого штамма, с нарушенной способностью к окислению L-лактата. Важно, что фермент не участвует в поддержании низкой концентрации L-лактата во время гипоксии. Вместо этого фермент способствует поддержанию низких уровней L-лактата (после его образования) при переходе к нормальным условиям по содержанию кислорода [84].

Для того чтобы изучить физико-химические и каталитические свойства исследуемых ферментов были разработаны эффективные схемы очисток, осуществляемые в 4-5 стадий, в результате которых были получены электрофоретически гомогенные препараты с высокими показателями удельной активности, степени и выхода. На данном этапе работы, представляют интерес высокие показатели сродства очищенной ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из исследуемых объектов к L-лактату. В работе авторов (Engqvist M.K.M [et al.], 2015) [84] было установлено, что все изоферменты гликолатоксидазы показали высокую каталитическую активность с гликолатом, но различия были обнаружены при использовании L-лактата: классические гликолатоксидазы имеют очень низкую эффективность при использовании L-лактата в качестве субстрата – в 22 и 31 раза ниже чем с гликолатом. А ЛЦО-подобная изоформа гликолатоксидазы арабидопсиса имеет высокие показатели афинности и к лактату и к гликолату, что свидетельствует о том, что она может использовать L-лактат с такой же эффективностью, как и гликолат, в отличие от фотодыхательных изоформ ГО1 и ГО2, которые используют гликолат с гораздо более высокой эффективностью [84].

Были установлены величины молекулярных масс очищенных ферментов. Очищенные энзимы из сорго и гороха представляли собой тетрамеры. Так, молекулярная масса очищенного энзима ЛДГ из гороха составляла для листьев: 148 кДа (M_r субъединицы – 37,1 кДа), и 151 кДа из корней (M_r субъединицы – 37,7 кДа). Аналогичные данные были получены и в работах других авторов:

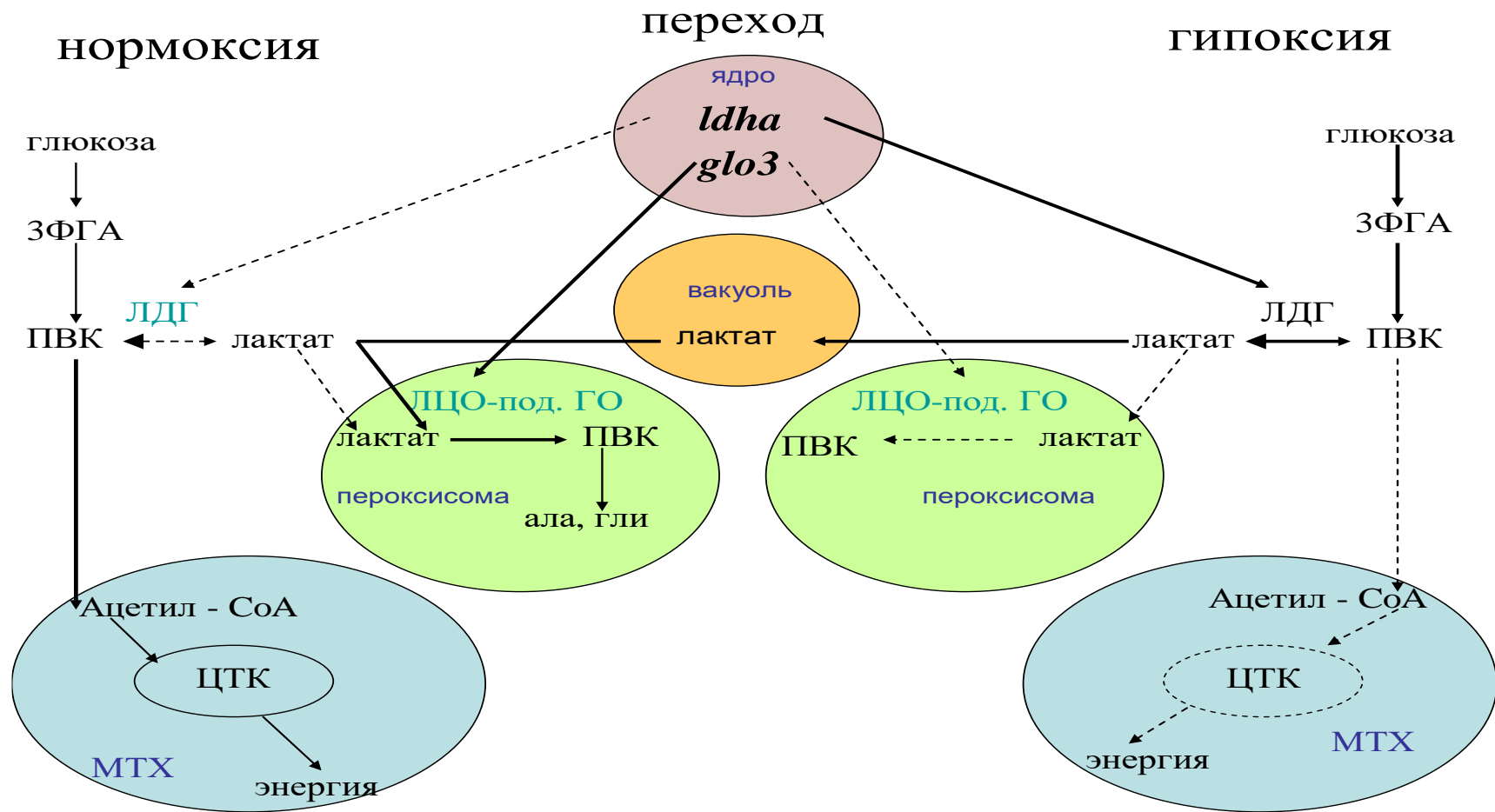
молекулярная масса нативного фермента, очищенного из сои составила 140 кДа, а M_r его субъединицы – 36 кДа [195], также у проростков риса – молекулярная масса целого фермента составила 160 кДа, с молекулярной массой субъединиц 38 и 39 кДа [185].

В ходе работы по изучению молекулярных аспектов функционирования фермента лактатдегидрогеназы, были проанализированы базы данных NCBI и KEGG, проведено выравнивание аминокислотных последовательностей семейства Бобовые, подобраны вырожденные праймеры. Был секвенирован участок гена *ldha* гороха. С помощью специфических праймеров определено изменение уровня мРНК гена *ldha* в ответ на гипоксию в корнях и листьях гороха. Так, уровень экспрессии *ldha* в корнях гороха возрастал через 2 часа, а в листьях небольшой рост экспрессии наблюдался уже после 6 часов гипоксического воздействия, и к 16 часам увеличивался в 70 раз. Полученные данные коррелируют с работами авторов по изучению реакции на гипоксию у растений *Arabidopsis th.* Где в ответ на индукцию гипоксического воздействия происходит рост экспрессии генов *adh* и *ldh* через 2 и 4 часа соответственно [84].

Результатом проведенной работы явилось получение данных о возможной трансформации группы ферментов оксидаз в процессе перехода от аноксигенного к кислородному фотосинтезу, ответвление в их работе при воздействии гипоксии на организм. Удалось проследить «родственную» связь между одним из древних ферментов – L-лактат:цитохром-с-оксидоредуктазой бактерий и одноклеточных грибов и ЛЦО-подобной изоформой гликолатоксидазы растений. Таким образом, показана важная роль лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в перестройке клеточного метаболизма растений в гипоксических условиях и при возобновлении аэрации. Была предложена гипотетическая схема адаптивной роли этих ферментов в метаболизме лактата при стрессовом воздействии гипоксии. Интересно отметить, что ей отводится важная роль защиты растений от избыточных количеств кислорода в момент перехода от условий гипоксии к нормоксии.

Таким образом, предлагается гипотетическая схема регуляции функционирования лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы на энзимологическом и экспрессионном уровнях в листьях кукурузы в гипоксических условиях и при переходе к нормоксии (рис. 12). Установлено, что гипоксия индуцирует активность лактатдегидрогеназного фермента, причем это осуществляется на уровне экспрессии гена *ldha*. Переход к нормоксии приводит к изменениям в функционировании ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. Ген, отвечающий за кодирование этого изофермента, увеличивает свою экспрессию, что обуславливает утилизацию повышенных концентраций лактата.

Рис. 72. Гипотетическая схема регуляции исследуемых ферментов в листьях гороха и сорго при переходе от гипоксии к нормоксии



(условные обозначения:

———— активация процесса
 - - - - - торможение процесса

МТХ – митохондрия
 ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
 3ФГА – глицеральдегид-3-фосфат
 ПВК – пировиноградная кислота

ВЫВОДЫ

1. Динамика изменения активности при гипоксии для растений гороха и сорго показывает, что максимальная активность ЛДГ наблюдалась в начальный период (24-48ч) гипоксии, а переход к нормоксии вызывал активацию фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, которая осуществлялась через 6 часов в корнях и через 12 часов в листьях гороха. Для устойчивого растения сорго интенсификация функционирования данного фермента при возобновлении аэрации происходила через 6 часов, как в листьях, так и в корнях.

2. С помощью многостадийной схемы очистки получены в электрофоретически гомогенном состоянии препараты лактатдегидрогеназы из листьев и корней гороха. Электрофоретические исследования подтвердили, что полученные препараты являются гомогенными, удельная активность ЛДГ из листьев и корней гороха составила 41,9 Е/мг белка и 80,5 Е/мг белка соответственно; степень очистки – 101,3 и 43,4; выход – 26,8 и 2.5%.

3. Получение электрофоретически гомогенных препаратов лактатдегидрогеназы позволило исследовать их физико-химические и каталитические характеристики. Сравнительный анализ величин молекулярной массы нативных молекул фермента и субъединичных пептидов позволяет заключить об олигомерном строении белковой молекулы фермента. ЛДГ является тетрамером, состоящим из четырех одинаковых субъединиц.

4. Установлено, что лактатдегидрогеназа из разных органов растения (из корней и листьев) сильно различается по сродству к субстрату. Так, например, установлено, что K_m по лактату составляет 3,6 мМ и 33 мМ для фермента, экстрагированного из листьев и корней соответственно. Исследование влияния рН водорода на активность лактатдегидрогеназы показало, что оптимальное значение рН для прямой реакции составляло 7,5 и для обратной – 8,8. Температурный оптимум для лактатдегидрогеназы из листьев гороха при восстановлении пирувата составил 40°C, а при окислении лактата – 45°C.

5. Применение модифицированной нами пятистадийной схемы очистки позволило очистить ЛЦО-подобную изоформу ГО из листьев и корней гороха, а также сорго до высокоочищенного или гомогенного состояния. Величина

удельной активности составила 144 Е/мг белка, степень очистки – 95,0, выход – 11,5. Аналогичные показатели для препарата фермента из корней гороха: удельная активность – 36,6 Е/мг белка, степень очистки – 65,0, выход – 18.

6. Была выявлена тетрамерная структура молекулы ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев и корней гороха. Структура олигомера состоит из четырех идентичных субъединиц с молекулярной массой 45 кДа.

7. Сравнительный анализ кинетических характеристик препаратов ЛЦО-подобной гликолатоксидазы показывает их различие в сродстве к субстрату и величинам оптимальных значений концентрации водорода. Так, наименьшее сродство к субстрату было обнаружено для фермента из листьев гороха (K_m – 240 мкМ) по сравнению с энзимом из корней (K_m – 360 мкМ). Величина оптимального уровня рН для работы фермента составила 7,2 (листья) и 6,8 (корни).

8. Секвенирование ампликона гена *ldha* и использование полученной нуклеотидной последовательности позволили разработать специфические олигонуклеотидные праймеры для гена лактатдегидрогеназы растений гороха. Проведенный сравнительный анализ величин относительных уровней транскриптов гена свидетельствует об активации экспрессии гена *ldha* в корнях гороха, в то же время интенсификация его работы в корнях происходит значительно раньше, чем в листьях.

9. На основе аннотированной последовательности в базе данных NCBI ЛЦО-подобной гликолатоксидазы растений сорго разработаны специфические праймеры и выявлены особенности экспрессии гена *glo* из *Pisum sativum* и *Sorghum sudanense* при переходе к нормоксии.

10. Предлагается гипотетическая модель роли ЛДГ и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в приспособлении клеточного метаболизма исследуемых растений к гипоксии и переходу к нормоксии. Показано участие ЛЦО-подобной ГО и ЛДГ у гороха и сорго в регуляции адаптивной реакции клеточного метаболизма к гипоксии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Активность малатдегидрогеназы в прорастающем зерне тритикале. / Чумикина Л.В. [и др.] // Физиология растений и генетика. – 2013. – Т. 45. № 5. – С. 451–455.
2. Активность L-лактат-цитохром С-оксидоредуктазы у галоалкалофильной бактерии *Rhodovulum steppense* штамма А-20s при различных типах питания / Ларченков В.М. [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: вып. 17. – Воронеж: 2015 г.
3. Аль-Джасаби С. Очистка и кинетические свойства лактатдегидрогеназы скелетных мышц от ящерицы *Agama stellio* / С. Аль-Джасаби // Биохимия (Москва). – 2002. – Т. 67. № 7. – С. 786–789.
4. Артюхов В.Г. Закономерности и особенности фотохимических превращений изоформ лактатдегидрогеназы: УФ-чувствительность их в присутствии биогенных аминов / Артюхов В.Г., Агишева Н.В., Наквасина М.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – № 4. – С.476-492.
5. Артюхов В. Г. Кинетические закономерности фотоинактивации лактатдегидрогеназы под действием УФ-излучения в условиях различного микроокружения / Артюхов В. Г., Лысенко Ю. А., Наквасина М. А. // Биофизика. — 2000. — Т. 45, №.3. — С. 427—431.
6. Артюхов В.Г. УФ-индуцированные изменения структурно-функциональных свойств изоферментов лактатдегидрогеназы крови в свободном состоянии и в присутствии серотонина / Артюхов В.Г., Агишева Н.В., Наквасина М.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999. – № 6. – С. 693-700.
7. Вартапетян Б.Б. Растения и кислородный стресс / Вартапетян Б.Б. // Вестник РАН. – 1993. – Т. 63, № 11. – С. 999–1009.
8. Выделение изоформ сукцинатдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы методом ионообменной хроматографии / Федорин Д.Н. [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2016. –Т. 16, № 4. – С. 544–549.
9. Генетика изоферментов / Корочкин Л.И. [и др.] – М.: Наука, 1977. – 275 с.

10. Действие гипобарической гипоксии на активность дегидрогеназ дыхательного и фотосинтетического метаболизма в проростках ячменя / Войцековская С.А. [и др.] // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2015. – Т. 49, № 1. – С. 64– 69.

11. Дмитриева Е.А. Регуляторные свойства и физиологическая роль изоформ гликолатоксидазы в листьях кукурузы: дис.канд.биол.наук. Вор.гос.университет, Воронеж, 2005.

12. Дэвени Т. Аминокислоты, пептиды и белки / Дэвени Т., Гергей Я. // – М.: Мир, 1976 г. – 368 с.

13. Кинетические характеристики лактатдегидрогеназы из ИЗ *Rhodovulum steppense* для прямой реакции / В. М. Ларченков, Н. Р. Комарова, Е. В. Ковалёва, А. В. Миткевич, М. И. Фалалеева, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация, 2018, № 3. С. 46 – 51.

14. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика. — М.: Физматлит, 2006. — 816 с.

15. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии: учебное пособие для студ. биол. спец. ун-тов / Г.А. Кочетов; под общ.ред. С.Е.Северина. – М.: Высшая школа, 1980 г. – 352с.

16. Наквасина М. А. Функциональные свойства иммобилизованных тетрамеров и субъединиц лактатдегидрогеназы в интактном состоянии и в условиях фотосенсибилизированного окисления / Наквасина М. А., Артюхов В. Г., Агишева Н. В. // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2012. – № 1. С. 121-126.

17. Получение гомогенной L-лактат: цитохром С-оксидоредуктазы из несерной пурпурной бактерии *Rhodovulum steppense* и исследование ее физико-химических и регуляторных свойств / Епринцев А.Т. [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 357– 361.

18. Практикум по физической химии. Методическое пособие для студентов биологического факультета МГУ, обучающихся по специальности «биофизика» /Т.М.Рощина и др. // Москва— 2010. — 91 с.

19. Применение ионообменной хроматографии для очистки гликолатоксидазы из листьев гороха (*Pisum sativum* L.) и сорго (*Sorghum sudanense* J.), исследование ее физико-химических и регуляторных свойств / Епринцев А.Т. [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2019. – Т. 19, №1. – С. 59–66.
20. Райдер К. Изоферменты. / Райдер К., Тейлор К. – М.: Мир, 1983. – 197 с.
21. Роль изоферментов лактатдегидрогеназы в адаптации млекопитающих Карелии Унжаков А.Р., [и др.] // Труды КарНЦ РАН. – 2007. – № 11. С. 118–126.
22. Семихатова О.А. Физиология дыхания растений. / Семихатова О.А., Чиркова Т.В. — СПб.: Издво СПбГУ, 2001. — 220 с.
23. Серов О.Л. Очистка и свойства изофермента лактатдегидрогеназы-5 из скелетных мышц и печени крыс / Серов О.Л., Нечаев Ю.С. // Биохимия. – 1972. – Т. 37, №6. – С. 1117–1125.
24. Чиркова Т.В. Физиологические основы устойчивости растений / Чиркова Т.В. – СПб.: Издво СПбГУ, 2002. — 240 с.
25. Activities of enzymes of fermentation pathways in the leaves and roots of contrasting cultivars of sorghum (*Sorghum Bicolor* L.) during flooding / Jain V. [et all] // *Physiol Mol Biol Plants*. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 241–247.
26. A cytosolic bypass and G6P shunt in plants lacking peroxisomal hydroxypyruvate reductase. / Li J. [et al.] // *Plant Physiol*. – 2019. – V. 180. P. 783–792.
27. Adaptation to low CO₂ level in a mutant of *Anacystis nidulans* R2 which require high CO₂ for growth. / Omata T. [et al.] // *Plant Physiol*. – 1987. – V. 83. № 4. P. 892–894.
28. A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. Kroth P.G. [et al.] // *PloS ONE*. – 2008 – 3:e1426
29. Alberty R.A. Standard apparent reduction potentials of biochemical half reactions and thermodynamic data on the species involved. / Alberty R.A. // *Biophys Chem*. – 2004. – Vol. 111, № 2. – P. 115–122.

30. Anderson L.E. Chloroplast and cytoplasmic enzymes. II. Pea leaf triose phosphate isomerases. / Anderson L.E. // *Biochim Biophys Acta*. – 1971. – V. 235. № 1. – P. 237–244.
31. Appleby C. A. Lactic dehydrogenase and cytochrome b₂ of baker's yeast. The deoxyribose polynucleotide component and the physicochemical properties of the crystalline enzyme. / Appleby C. A., Morton R. K. // *Biochem. J.* – 1960. – V. 75. – P. 258-269.
32. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides* // C.Gao [et al.] // *Applied Energy*. – 2010. - V. 87, № 3. P. 756-761.
33. A putative HCO₃⁻ transporter in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 / Bonfil D.J. [et al.] // *FEBS Lett.* – 1998. – V. 430. V. 236–240.
34. ARMSTRONG J.McD. Physicochemical studies on cytochrome b₂. Sedimentation, diffusion and electrophoresis of the crystalline deoxyribonucleoprotein. / ARMSTRONG J.McD., COATES J.H., MORTON R.K. // *Biochem. J.* – 1963. – V. 86, № 1. – P. 136–145.
35. ARMSTRONG J.McD. Physicochemical studies on cytochrome b₂. Some properties of modified forms of the enzyme and of the deoxyribonucleic acid component. / ARMSTRONG J.McD., COATES J.H., MORTON R.K. // *Biochem. J.* – 1963. – V. 88, № 2. – P. 266–276.
36. Bach S.J. Yeast lactic dehydrogenase and cytochrome b₂. / Bach S.J., Dixon M., Zerfas L.G. // *Biochem J.* – 1946. – V. 40, № 2. – P. 229–239.
37. Badger M.R. Kinetic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Anabaena variabilis*. / Badger M.R. // *Arch Biochem Biophys*. – 1980. – V. 201. № 1. – P. 247–255.
38. Balme A. On the rate of proton exchange with solvent of the catalytic histidine in flavocytochrome b₂ (yeast L-lactate dehydrogenase) / Balme A., Lederer F. // *Protein Sci.* – 1994. – V. 3, № 1. – P. 109–117.
39. Bauwe H. Photorespiration: Players, partners and origin. / Bauwe H., Hagemann M., Fernie A.R. // *Trends Plant Sci.* – 2010. – V. 15, № 6. – P. 330–1336.

40. Bean pod mottle virus: a new powerful tool for functional genomics studies in *Pisum sativum* / Meziadi C. [et al.] // *Plant Biotechnol J.* – 2016. – Vol. 14, № 8. – P. 1777–87.
41. Bowes G. Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. / Bowes G., Ogren W.L., Hageman R.H. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1971. – V. 45. № 3. P. 716–722
42. Cardona T. Origin and Evolution of Water Oxidation before the Last Common Ancestor of the Cyanobacteria / Cardona T., Murray J.W., Rutherford, A.W. // *Molecular Biology and Evolution journal.* — Oxford University Press. – 2015. — V. 32, № 5. — P. 1310—1328.
43. Catalytic and functional aspects of different isozymes of glycolate oxidase in rice. / Zhang Z. [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2017. – V. 17, №135. – P. 1–10.
- 44.Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in *Arabidopsis* with a focus on primary C- and N-metabolism / Mustroph A. [et al.] // *Plant, Cell & Environment* – 2014. — V. 37, № 10. — P. 2366—2380.
- 45.Characterization of a heat-tolerant *Chlorella* sp. GD mutant with enhanced photosynthetic CO₂ fixation efficiency and its implication as lactic acid fermentation feedstock / Lee T.M. [et al.] // *Biotechnology for Biofuels.* – 2017. – V. 10, №214. – P. 1–12.
46. Chen J. Interface Residues That Drive Allosteric Transitions Also Control the Assembly of l-Lactate Dehydrogenase / Chen J., D. Thirumalai // *J. Phys. Chem. B* – 2018. – Vol. 122, № 49. – P. 11195–11205.
47. Christopher M.E. Characterization of hypoxically inducible lactate dehydrogenase in maize. / M. E. Christopher, A. G. Good // *Plant Physiology.* – 1996. – V. 112. P. 1015–1022.
48. Choi W.G. Arabidopsis NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. / W.G. Choi, D.M. Roberts // *Journal of Biological Chemistry.* – 2007. –V. 282. P. 24209–24218.
- 49.Clarification of Photorespiratory Processes and the Role of Malic Enzyme in Diatoms / Davis A. [et al.] // *Protist.* – 2017. – V. 168. №1. P. 134-153

50. Colman B. Photosynthetic carbon assimilation and the suppression of photorespiration in the cyanobacteria / Colman B. // *Aquatic Botany*. – 1989. – V. 34. P. 211–231.

51. Comparative Studies of Lactate Dehydrogenases in Lactic Acid Bacteria FMN-dependent oligomerization of putative lactate oxidase from *Pediococcus acidilactici*. / Ashok Y. [et al.] // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15, № 2. – e0223870. doi: 10.1371/journal.pone.0223870. eCollection 2020.

52. Conserved defense responses between maize and sorghum to *Exserohilum turcicum* / Zhang X. [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2020. – V. 20, № 67. – P. 1–11.

53. Construction of *flavocytochrome b* 2-overproducing strains of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) / Dmitruk K. V. [et al.] // *Microbiology*. – 2008. – Vol. 77, № 2. P. 181–185. doi:10.1134/s0026261708020100

54. Cyanobacterial lactate oxidases serve as essential partners in N₂ fixation and evolved into photorespiratory glycolate oxidases in plants. Hackenberg C. [et al.] // *Plant Cell*. – 2011. – V. 23, № 8. – P. 2978–2990.

55. Davies D.D. The control of the production of lactate and ethanol in higher plants / Davies D.D., Grego S., Kenworthy P. // *Planta*. – 1974. – V. 118, № 4. – P. 297–310.

56. Davis B.J. Disc Electrophoresis 1. Background and Theory / Davis B.J., Ornstein L // *Ann. NY Acad. Sci.* 1964. V. 121. № 2. – P. 404–427.

57. Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions. / Engel N. [et al.] // *Plant Physiol*. – 2007. – V. 144. № 3. – P. 1328–1335.

58. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. / S. Suman [et al.] // *Sensors and Actuators B*. – 2005. – V. 107. P. 768–772

59. D-GLYCERATE 3-KINASE, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. / Boldt R. [et al.] // *Plant Cell*. – 2005. – V. 17. P. 2413–2420.

60. Diatom acclimation to elevated CO₂ via cAMP signalling and coordinated gene expression. / Hennon G.M.M. [et al.] // *Nat Clim Change*. – 2015. – V. 195. P. 761–765.

61. Diêp Lê K.H. Amino acid sequence of long chain alpha-hydroxy acid oxidase from rat kidney, a member of the family of FMN-dependent alpha-hydroxy acid-oxidizing enzymes. / Diêp Lê K.H., Lederer F. // *J Biol Chem*. – 1991. – V. 266, № 31. – P. 20877–20881.

62. Disruption of the glycolate dehydrogenase gene in the high-CO₂-requiring mutant HCR89 of *Chlamydomonas reinhardtii*. Nakamura Y. [et al.] // *Can J Bot*. – 2005. – V. 83, № 7. – P. 820–833.

63. Drew M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. / M. C. Drew // *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. – 1997. – V. 48. P. 223–250.

64. Efficient 2-phosphoglycolate degradation is required to maintain carbon assimilation and allocation in the C₄ plant *Flaveria bidentis*. / Levey M. [et al.] // *J Exp. Bot*. – 2019. – V. 70. № 2. P. 575–587.

65. Electrophilic catalysis can explain the unexpected acidity of carbon acids in enzyme-catalyzed reactions. / Gerlt A. [et al.] // *J. Am. Chem. Soc*. – 1991. V.113. P. 9667- 9669.

66. Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. / Bailleul B. [et al.] // *Nature*. – 2015. – V. 524. № 7565. P. 366-369

67. Enzymatic and thermodynamic profiles of a heterotetramer lactate dehydrogenase isozyme in swine. Goto Y. [et all] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2016. – Vol. 479, № 4. – P. 860–867.

68. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases (LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from *Xenopus*, pig, and rat. / Tsuji S [et all] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. – 1994. – V. 9, № 20. P. 9392–9396.

69. Experimental Evidence for a Hydride Transfer Mechanism in Plant Glycolate Oxidase Catalysis. / Dellerio Y. [et al.] // *J Biol Chem.* – 2015. – V. 290, № 3. P. 1689–1698
70. Expression of lactate dehydrogenase A and B genes in different tissues of rats adapted to chronic hypobaric hypoxia / Rossignol F.[et all] // *J. Cell Biochem. Physiology.* – 2003. – V. 89, № 1. P. 67–79.
71. Expression of spinach glycolate oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*: purification and characterization. / Macheroux P. [et al.] // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30, № 18. P. 4612–4619.
72. Felle H.H. pH regulation in anoxic plants. / H.H. Felle // *Annals of Botany.* – 2005. – V. 96. P. 519–532.
73. Fieldes M.A An explanation of the achromatic bands produced by peroxidase isozymes in polyacrylamide electrophoresis gels stained for malate dehydrogenase // *Electrophoresis.* – 1992. – V. 13. №. 1–2. P. 82–86.
74. Frederick S.E. The Occurrence of Glycolate Dehydrogenase and Glycolate Oxidase in Green Plants An Evolutionary Survey / Frederick S.E. , Gruber P.J., Tolbert N.E. // *Plant Physiol.* – 1973. – V. 52. № 4. P. 318–323.
75. Friend A.D. Terrestrial plant production and climate change. / Friend AD // *J Exp Bot.* – 2010. – V. 61, № 5. P. 1293–1309.
76. Frontiers, opportunities, and challenges in biochemical and chemical catalysis of CO₂ fixation. / Appel A.M. [et al]. // *Chem Rev.* – 2013. – V. 113. № 8. P. 6621–6658.
77. Functional analysis of lactate dehydrogenase during hypoxic stress in *Arabidopsis*. / R. Dolferus [et al.] // *Functional Plant Biology.* – 2008. – V.35. P. 131–140.
78. Functional replacement of yeast flavocytochrome b(2) with bacterial L-lactate dehydrogenase / Sakai H. [et al.] // *J Biosci Bioeng.* – 2010. – V. 110, № 3. – P. 269–272.
79. Geigenberger P. Response of plant metabolism to too little oxygen / Geigenberger P. // *Curr Opin Plant Biol.* – 2003. – Vol. 6, № 1. – P. 247–256.

80. Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. / Deusch O. [et. Al.] // *Mol Biol Evol.* — 2008. — V.4. P. 748-61.
81. Ghisla S. L-Lactate oxidase, in *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes.* / Ghisla S., Massey V. // Müller F. ed. — CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London. — 1991. — V. 2. P. 243-289.
82. Ghisla S. Mechanism of flavoprotein-catalyzed reactions. / Ghisla S., Massey V. // *J. Biochem.* — 1989. — V. 181. P. 1-17
83. Gladden L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium / L B Gladden // *J Physiol.* — 2004. — V. 558. №1. P. 5–30.
84. GLYCOLATE OXIDASE3, a Glycolate Oxidase Homolog of Yeast l-Lactate Cytochrome c Oxidoreductase, Supports l-Lactate Oxidation in Roots of Arabidopsis / Engqvist M.K. [et al.] // *Plant Physiol.* — 2015. — V. 169, № 2. — P. 1042–1061.
85. Glycolate oxidase isoforms are distributed between the bundle sheath and mesophyll tissues of maize leaves. / Popov V.N. [et al] // *J Plant Physiol.* — 2003. — V. 160, № 8. — P. 851–857.
86. Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis* / Rojas C.M. [et all.] // *The Plant Cell.* — 2012. — V. 24. P. 336-352.
87. Good A.G. Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue / Good A.G., Crosby W.L // *Plant Physiol.* — 1989. — V. 90, № 3. — P. 860–866.
88. Gordon G.L. Purification, Properties and Immunological Relationship of L(+)-Lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus casei* / Gordon G.L., Doelle H.W. // *Eur. J. Biochem.* — 1976. — V. 67. № 5. P. 543-545
89. Guiard B. Baker's Yeast Flavocytochrome b2 [L-(+)-Lactate Dehydrogenase] An Immunological Study of Structure and Function / Guiard B., Lederer F. // *Eur. J. Biochem.* — 1976. — V. 65, № 2. — P. 537–542.
90. Guiard B. Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2). / Guiard B. // *EMBO J.* — 1985. — V. 4, № 12. — P. 3265–3272.

91. Gupta, K.J. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. / K. J. Gupta, A. Zabalza, J. T. van Dongen // *Physiology Plantarum*. – 2009. – V. 137. P. 383–391
92. Haematin enzymes. / Nygaard A.P. [et al.] // Pergamon Press, Inc., New York. – 1961. – V. 2. – P. 544.
93. Halprin K.M. Lactate production and lactate dehydrogenase in the human epidermis. / Halprin K.M., Ohkawara A. // *J Invest Dermatol*. – 1966. – V. 47, № 3. – P. 222–229.
94. Hanan M.K. Comparative effects of autotrophic and heterotrophic growth on some vitamins, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, amino acids and protein profile of *Chlorella vulgaris* Beijerinck / M.K. Hanan // *Afr J Biotechnol*. – 2011. – V. 10. № 62. P.13514–13519.
95. Han X. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters / X.Han, M. Xiaoling, W.Qingyu // *Journal of Biotechnology*. – 2006. – Vol. 126, Issue 4: pp. 499-507.
96. Hepatic alcohol dehydrogenase deficiency induces pancreatic injury in chronic ethanol feeding model of deer mice. / Amer S.L. [et al.] // *Exp Mol. Pathol*. – 2018. – Vol. 104. № 1. P. 89-97.
97. Herrero A. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. / Herrero A, Flores E. // — 1st. — Caister Academic Press, 2008.
98. Hernández-Meza J.M. Trehalose Mediated Inhibition of Lactate Dehydrogenase from Rabbit Muscle. The Application of Kramers' Theory in Enzyme Catalysis / Hernández-Meza J.M., Sampedro J.G. // *J Phys Chem B*. – 2018. – V. 122, №15. – P. 4309–4317.
99. High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. / Zelitch I. [et al.] // *Plant Physiol*. – 2009. – V. 149. – P. 195–204.
100. High CO₂ requiring mutant of *Anacystis nidulans* R / Marcus Y. [et al.] // *Plant Physiol*. – 1986. – V. 82. P. 610–612.
101. Hoffman N.E. Purification and properties of hypoxically induced lactate dehydrogenase from barley roots. / Hoffman N.E., Hanson A.D. // *Plant Physiol*. – 1986. – V. 82, № 3. – P. 664–670.

102. Holmes R.P. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. / Holmes R.P., Assimos D.G. // *J Urol.* – 1998. – V. 160, №5. – P. 1617–1624.

103. Holmes R.S. Computational analyses of mammalian lactate dehydrogenases: Human, mouse, opossum and platypus LDHs / Holmes R.S., Goldberg E. // *Comput Biol. Chem.* – 2009. – V. 33, №5. – P. 379–385.

104. Husic D.W. The oxidative photosynthetic carbon cycle or C2 cycle. / Husic D.W., Husic H.D., Tolbert N.E. // *CRC Crit Rev Plant Sci.* – 1987. – V. 5. P. 45–100

105. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus* / Cooper R.U. [et al.] // *Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2002. – Vol. 279, № 1–2. P. 1–20.

106. Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 / Omata T. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1999. – V. 96. P. 13571–13576.

107. Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria / Price G.D. [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – V. 101. P. 18228–18233

108. Igamberdiev A.U. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. Igamberdiev A.U., Lea P.J. // *Phytochemistry.* – 2002. – V. 60. P. 651–674

109. Imhoff, J. F. Systematics of anoxygenic phototrophic bacteria. In *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*. Edited by R. Hell, C. Dahl, D. Knaff & Th. Leustek. / New York: Springer. – 2008 – . V. 1. P. 269–287.

110. Imhoff, J. F. The anoxygenic phototrophic purple bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by Brenner D. Y., Krieg N. R., Staley J. T., Garrity G. M. / New York: Springer. – 2001 – 2nd edn. V. 1. P. 621–627.

111. Inactivation of *ccmO* in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 results in a mutant requiring high levels of CO₂ / Marco E. [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 1994. – V. 60. № 3. P. 1018-1020.

112. Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice / Xu H. [et al.] // *Journal of Experimental Botan.* . – 2009. – V. 60. P. 1799-1809.

113. In vivo Hypoxia and a Fungal Alcohol Dehydrogenase Influence the Pathogenesis of Invasive Pulmonary Aspergillosis / Grahl N. [et al.] // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7, № 7. e1002145.

114. Involvement of Tyr24 and Trp108 in substrate binding and substrate specificity of glycolate oxidase. / Stenberg K., [et al.] // Eur J Biochem. 1995. – 1995. – Vol. 228, № 2. P. 408–416.

115. Iwamoto K. Purification and characterization of glycolate oxidase from the brown alga *Spatogossium pacificum* (Phaeophyta) / K. Iwamoto K. Suzuki, T. Ikawa // Journal of phycology. – 1996. – P. 790–798

116. Jacq C. Cytochrome b2 from bakers' yeast (L-lactate dehydrogenase): a double-headed enzyme. / Jacq C., Lederer F. // Eur J Biochem. – 1974. – Vol. 41, № 2. P. 311–320.

117. Jervis L. Affinity purification and subunit structure of soya bean lactate dehydrogenase / Jervis L., Robertson E. R., Schmidt C. N. G. // Phytochemistry. – 1981. Vol. 20, № 9. P. 2117–212.

118. Johnson MP. Photosynthesis / Johnson MP. // Essays Biochem. – 2016. – Vol. 60, № 3. P. 255–273.

119. Kahn S.E. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes / Kahn S.E, Hull R.L., Utzschneider K.M. // Nature. – 2006. – Vol. 444. P. 840–846.

120. Kaplan A. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms / Kaplan A., Reinhold L. // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. – 1999. – V. 50. P. 539–570.

121. Kay H.H. Hypoxia and lactate production in trophoblast cells / Kay H.H., Zhu S., Tsoi S. // Placenta. – 2007. – Vol. 28, № 8–9. P. 854–860.

122. Kelly G.J. Inhibition of spinach-leaf phosphofructokinase by 2-phosphoglycollate. / Kelly G.J., Latzko E. // FEBS Lett. – 1976. – V. 68. – P. 55–58

123. Kennedy R.A. Anaerobic metabolism in plants. / R. A. Kennedy, M. E. Rumpho, T. C. Fox // Plant Physiology. – 1992. – V. 100. P. 1–6,

124. Kern R. Evolution of enzymes involved in the photorespiratory 2-phosphoglycolate cycle from cyanobacteria via algae toward plants. / Kern R., Bauwe H., Hagemann M. // *Photosynth Res.* – 2011. – V. 109. № 1-3. P. 103-14.

125. Keyhani J. *EXPRESSION OF L-LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES DURING ROOT DEVELOPMENT IN CROCUS SATIVUS L. CORM* / Keyhani, J., Keyhani, E., Sattarahmady, N.. // *Acta Horticulturae.* – 2004. – V. 650. P. 109–117. doi:10.17660/actahortic.2004.650.11.

126. Kohashi M. Non-thermal effects of a ceramics radiation on reversibility of lactate dehydrogenase reaction / Kasuya Y., Watanabe T. // *Biosci., Biotechnol. Biochem.* – 1996. – V. 60, № 2. – P. 284–287.

127. Kompantseva E.I. *Rhodovulum steppense* sp. nov., an obligately haloalkaliphilic purple nonsulfur bacterium widespread in saline soda lakes of Central Asia / Kompantseva E.I., Komova A. V., Kostrikina N. A. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2010. – V.60, № 5.

128. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway--a report of the Tumour Angiogenesis Research Group. / Koukourakis M. [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2006. – Vol. 24, № 26. – P. 4301–4308

129. Lactate dehydrogenase from the extreme thermophile *Thermotoga maritima*. / Wrba A. [et al.] // *Eur J Biochem.* – 1990. – Vol. 188, № 1. P. 195-201.

130. Lactate dehydrogenase gene variability among predominant lactate utilizing ruminal bacteria. / Fecskeová L. // *Folia Microbiol.* – 2010. – Vol. 55, № 4. – P. 315-318. doi: 10.1007/s12223-010-0048-z.

131. Lactate metabolism in potato tubers deficient in lactate dehydrogenase activity. / L.J. Sweetlove [et al.] // *Plant Cell Environment.* – 2000. – V. 23. P. 873–881.

132. Lederer F. Flavins and flavoproteins. / Lederer F., Mathews F. S. // Edmondson, D. E., McCormick, D. B., eds. *Walter de Gruyter, Berlin, New York.* – 1987. P. 133-142

133. Leegood R.C. The regulation and control of photorespiration. / Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, Häusler RE. // *J Exp Bot.* – 1995. – V. 46. – P. 1397–1414.

134. Lindqvist Y. The active site of spinach glycolate oxidase. / Lindqvist Y., Brändén C.I. // *J Biol Chem.* – 1989. – Vol. 264, № 6. – P. 3624–3628
135. Long-term response toward inorganic carbon limitation in wild type and glycolate turnover mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 / Eisenhut M. [et al.] // *Plant Physiol.* – 2007. – 144. P. 1946–1959.
136. Major Role of NAD-Dependent Lactate Dehydrogenases in the Production of L-Lactic Acid with High Optical Purity by the Thermophile *Bacillus coagulans*. / Wang L. [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2014. – Vol. 80, № 23. – P. 7134-7141.
137. Making sense of low oxygen sensing. / J. Bailey-Serres [et al.] // *Trends in Plant Science.* – 2012. – V. 17. P. 129–138.
138. Markert C.L. Lactate dehydrogenase. Biochemistry and function of lactate dehydrogenase / Markert C.L. // *Cell Biochem Funct.* – 1984. – Vol. 2, № 3. P. 131–134.
139. Martin W.F. A physiological perspective on the origin and evolution of photosynthesis / Martin W.F., Bryant D.A., Beatty T.J. // *FEMS Microbiol Rev.* – 2018. – Vol. 42, № 2. P. 205–231.
140. Ma Y.C. Analysis of the mechanism of muscle lactate production in sport / Ma Y.C., Gao S.S., Zhang Z.F. // *J. Shengyang Inst. Phys. Edu.* – 2004. – Vol. 23. P. 312–314.
141. Mayr U. Subunit composition and substrate binding region of potato L-lactate dehydrogenase / Mayr U., Hensel R., Kandler O. // *Phytochemistry* – 1982. – V. 21. № 3. P. 627-631
142. Mechanistic and Structural Studies of H373Q Flavocytochrome b₂: Effects of Mutating the Active Site Base / Tsai C.L. [et al.] // *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 46, № 26. P. 7844–7851.
143. Metabolic and evolutionary responses of *Clostridium thermocellum* to genetic interventions aimed at improving ethanol production. / Holwerda E.K. [et al.] // *Biotechnol Biofuels.* – 2020. – doi: 10.1186/s13068-020-01680-5.
144. Miziorko H.M. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. / Miziorko H.M., Lorimer G.H. // *Annu Rev Biochem.* – 1983. – V. 82. – P. 507–535.

145. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation / Yang ZK // *Biotechnol Biofuels*. – 2013. – V. 6. № 1. – P. 1–67.

146. Monitoring cytosolic pH of carboxysome-deficient cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 using fluorescence analysis. / Berry S. [et al.] // *Plant Biol*. – 2005. – V. 7. P. 342–347.

147. MORTON R.K. KINETIC INVESTIGATIONS OF YEAST L-LACTATE DEHYDROGENASE (CYTOCHROME B₂). THE DEHYDROGENATION OF L-LACTATE IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF FERRICYANIDE AS ELECTRON ACCEPTOR. / MORTON R.K., STURTEVANT J.M. // *J Biol Chem*. – 1964. – V. 239. P. 1614–1624.

148. Mowat C.G. Flavocytochrome b₂ / Mowat C.G., Chapman S.K. // *Subcell Biochem*. – 2000. – V. 35. P. 279-295.

149. Mulcahy P. Purification and substrate kinetics of plant lactate dehydrogenase / Mulcahy P., O'Carra P. // *Phytochemistry*. – 1997. – Vol. 45, № 5. – P. 889–896.

150. NAD-Independent L-Lactate Dehydrogenase Required for L-Lactate Utilization in *Pseudomonas stutzeri* A1501 / Gao C. [et al.] // *J Bacteriol*. – 2015. – V. 197, № 13. – P. 2239–2247.

151. Narsai R. How unique is the low oxygen response? An analysis of the anaerobic response during germination and comparison with abiotic stress in rice and *Arabidopsis* / Narsai R., Whelan J. // *Front Plant Sci*. – 2013. – V. 4. – P. 349–363. doi: 10.3389 / fpls.2013.00349

152. Norman E.G. Purification and characterization of phosphoglycolate phosphatase from the cyanobacterium *Coccochloris penicostis*. / Norman E.G., Colman B. // *Plant Physiol*. – 1991. – V. 95. P. 693–698.

153. O'Donnell M. Distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in potato (*Solanum tuberosum*) and other plants. / O'Donnell M., Mulcahy P., O'Carra P. // *Biochem Soc Trans*. – 1990. – V. 18, №2. – P. 271–272.

154. Ogren W.L. Photorespiration—Pathways, regulation, and modification. / Ogren W.L // *Ann Rev Plant Physiol*. – 1984. – V. 35 P. 415–442

155. Ogren W.L. Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybean photorespiration. / Ogren WL, Bowes G. // Nat New Biol. — 1971. — V. 230. P. 159–160.
156. Olson J.M. Photosynthesis in the Archean era / Olson J.M. // Drugs . — Adiss Int. 2006. — V. 88, № 2. — P. 109—117.
157. On the metabolic interactions of (photo)respiration. / Obata T. [et al.] // J Exp Bot 67: 3003–3014 –2016. — V. 67, № 10. — P. 3003—3014.
158. Overexpression of Glycolate Oxidase Confers Improved Photosynthesis under High Light and High Temperature in Rice / Cui L. [et al.] // Front Plant Sci. — 2016. — V. 7. — P. 1165-1177.
159. Passarella S. L-Lactate Transport and Metabolism in Mitochondria of Hep G2 Cells—The Cori Cycle Revisited / Passarella S., Schurr A. // Front Oncol. — 2018. — V. 8. № 120. — P. 1-4
160. Paul J.S. Photorespiration in diatoms III. Glycolate:cytochrome c reductase in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* / Paul J.S., Volcani B.E. // Plant Sci Lett. — 1975. — V. 5. — P. 281–285
161. Paul J.S. Photorespiration in diatoms III. Mitochondrial glycolate dehydrogenase in *Cylindrotheca fusiformis* and *Nitzschia alba* / Paul J.S., Sullivan C.W., Volcani B.E. // Arch Biochem Biophys. — 1975. — V. 169. — P. 152–159
162. Pennati A. Stabilization of an intermediate in the oxidative half-reaction of human liver glycolate oxidase. / Pennati A., Gadda G. // Biochemistry. —2011. — V. 50, № 1. — P. 1—3.
163. Perspectives for a better understanding of the metabolic integration of photorespiration within a complex plant primary metabolism network. / Hodges M. [et al.] // J Exp Bot. —2016. — V. 67, № 10. — P. 3015—3026.
164. Perspectives on plant photorespiratory metabolism. / Fernie A.R. [et al.] // Plant Biol (Stuttg). — 2013 — V. 15. № 4. — P. 748-753
165. *Phaeodactylum tricornutum* photorespiration takes part in glycerol metabolism and is important for nitrogen-limited response / Huang A. [et al.] // Biotechnol Biofuels. — 2015 — V. 8. № 73. — P. 1-16

166. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism / Bauwe H. [et al.] // *Curr Opin Plant Biol.* – 2012. – V. 15. P. 269–275.

167. Photorespiration: Metabolic pathways and their role in stress protection. / Wingler A. [et al.] // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2000. – V. 355. № 1402. – P. 1517-1529

168. Photorespiratory glycolate oxidase is essential for the survival of the red alga *Cyanidioschyzon merolae* under ambient CO₂ conditions. / Rademacher N. [et al.] // *J Exp Bot.* – 2016. – V. 67. № 10. – P. 3165-3175.

169. Photorespiratory metabolism. Genes, mutants, Energetics, and Redox signaling / Foyer C.H. [et al.] // *Annu Rev Plant Biol.* – 2009. – V. 60, № 13. – P. 455–484.

170. Photosynthetic Regulation Under Salt Stress and Salt-Tolerance Mechanism of Sweet Sorghum / Yang Z. [et al.] // *Front Plant Sci.* – 2020. – V. 10, № 1722. – P. 1–12.

171. Pineda J.R. Ligand binding and protein dynamics in lactate dehydrogenase / Pineda J.R., Callender R., Schwartz S.D. // *Biophys J.* 2007. – Vol. 93, № 5. – P. 1474-83.

172. Plant and animal glycolate oxidases have a common eukaryotic ancestor and convergently duplicated to evolve long-chain 2-hydroxy acid oxidases. / Esser C [et al.] // *Mol Biol Evol.* – 2014 – V. 31. № 5. – P. 1089-1101

173. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. / B. Ricard [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 1994. – Vol. 32. P. 1–10.

174. Probing the active site of flavocytochrome b₂ by site-directed mutagenesis / Reid G.A. [et al.] // *Eur J Biochem.* – 1998. – V. 178, № 2. – P. 329–333.

175. Protein measurement with Folin phenol reagent / Lowry O.H. [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193, №1. – P. 265–275.

176. Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms / Reumann S. [et al.] // *The Plant Cell.* – 2007. – V. 19. P. 3170-3193

177. Poyer E. A comparison of potato and vertebrate lactate dehydrogenases / Poyer E., Davies D.D. // *Biochem J.* – 1980. – V. 191. № 2. – P. 341–348.

178. Purification and characterization of human liver glycolate oxidase. Molecular weight, subunit, and kinetic properties / Schwam H [et al.] // *Biochemistry*. – 1979. — V. 18, № 13. — P. 2828—2833.

179. Raven J.A. The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis / Raven J.A., Cockell C.S., De La Rocha C.L. // *Philos Trans R Soc London Ser B*. – 2008. – V. 363. P. 2641–2650.

180. Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. / J. Gibbs [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2000 – Vol. 51. P. 758–796

181. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration / Zabalza A. [et al.] // *Plant Physiol*. – 2009. – Vol. 149. – P. 1860–1871.

182. Regulation of the CYB2 gene expression: transcriptional co-ordination by the Hap1p, Hap2/3/4/5p and Adr1p transcription factors. Ramil E. [et al.] // *Mol Microbiol*. – 2000. – V. 37, №1. – P. 1116–1132.

183. Reumann S. Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C₂ cycle have become filled--others remain. / Reumann S., Weber A.P.M. // *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – Vol. 1763. – P. 1496–1510.

184. Richardson K.E. Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase. / Richardson K.E., Tolbert N.E. // *J Biol Chem*. – 1961. – V. 236. – P. 1280–1284

185. Rivoyal J. Lactate dehydrogenase in *Oryza sativa* L. seedlings and roots: Identification and partial characterization. / Rivoyal J., Ricard B., Pradet A. // *Plant Physiology*. – 1991. – Vol. 95. P. 682–686.

186. Rivoyal J. Metabolic Control of Anaerobic Glycolysis (Overexpression of Lactate Dehydrogenase in Transgenic Tomato Roots Supports the Davies-Roberts Hypothesis and Points to a Critical Role for Lactate Secretion / Rivoyal J., Hanson A.D. // *Plant Physiol*. – 1994. – V. 106, №3. – P. 1179–1185.

187. Role of tyrosine 129 in the active site of spinach glycolate oxidase. / Macheroux P. [et al.] // *J. Biochem*. – 1993. – V. 213. P. 1047-1054.

188. Roth J. P. Catalysis of electron transfer during activation of O₂ by the flavoprotein glucose oxidase / Roth J. P., Klinman J. P. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. V. 100. № 1. P. 62–67
189. Rouvière-Fourmy N. Role of Tyrosine 143 in Lactate dehydrogenation by flavocytochrom b₂ – primary kinetic isotope effect studies with a phenylalanine mutant. / Rouvière-Fourmy, N., Capeillère-Blandin C., Lederer F. // Biochemistry. – 1994. V. 33. P. 798-806.
190. Sachs M.M. Plant anaerobic stress. I. Metabolic adaptation to oxygen deficiency / Sachs M.M., Vartapetian B.B. // Plant Stress. – 2007. – Vol. 1, № 2. P. 123–135.
191. Sandalova T. Crystal structure of apo-glycolate oxidase. / Sandalova T., Lindqvist Y. // FEBS Lett. – 1993. – Vol. 327, № 3. P. 361–365.
192. Schwarte S. Identification of the photorespiratory 2-phosphoglycolate phosphatase, PGLP1, in Arabidopsis. / Schwarte S., Bauwe H. // Plant Physiol. – 2007. – V. 144. P. 1580–1586.
193. Sensitivity and Antioxidant Response of *Chlorella sp. MM3* to Used Engine Oil and Its Water Accommodated Fraction / Ramadass. K. [et al.] // Bulletin of Environ. Contam. and Toxicology, V. 97, № 1. P. 71–77.
194. Somerville C.R. An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. / Somerville C.R. // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 125. P. 20–24.
195. Somerville C.R. Phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of Arabidopsis. / Somerville C.R., Ogren W.L. // Nature. – 1979.— V. 280. P. 833–836.
196. Soybean L-(+)-lactate dehydrogenases: purification, characterization, and resolution of subunit structure / Tihanyi K. [et al.] // Arch Biochem Biophys. – 1989. – V. 84, №2. – P. 626–632.
197. Spinach glycolate oxidase and yeast flavocytochrome b₂ are structurally homologous and evolutionarily related enzymes with distinctly different function and flavin mononucleotide binding. / Lindqvist Y. [et al.] // J Biol Chem. – 1991. – V. 266, № 5. – P. 3198–3207.

198. Structural characterization of the apo form and NADH binary complex of human lactate dehydrogenase / Dempster S. [et al.] // *Biol Crystallogr.* – 2014. – Vol. 70, № 5. – P. 1484–1490.

199. Structure of human glycolate oxidase in complex with the inhibitor 4-carboxy-5-[(4-chlorophenyl)sulfanyl]-1,2,3-thiadiazole / Bourhis J.M. [et al.] // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* – 2009. – Vol. 65, № 12. – P. 1246–1253.

200. Suppression of glycolate oxidase causes glyoxylate accumulation that inhibits photosynthesis through deactivating Rubisco in rice / Lu Y. [et al.] // *Physiologia Plantarum.* - 2013. - V. 150. P. 463-476.

201. Su Q. Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the importance of electrostatic stabilization in superoxide formation / Su Q., Klinman J.P. // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38, № 26. – P. 8572–8581

202. Suzuki K. A photorespiratory mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. / Suzuki K, Marek LF, Spalding MH. // *Plant Physiol.* – 1990. – Vol. 93, № 1. – P. 231–237.

203. Temperature-jump and potentiometric studies on recombinant wild type and Y143F and Y254F mutants of *Saccharomyces cerevisiae* flavocytochrome b₂: role of the driving force in intramolecular electron transfer kinetics / Tegoni M. [et al.] // *Biochemistry* – 1998. – V. 37, № 37. – P. 12761–12767.

204. Timm S. The variety of photorespiratory phenotypes - employing the current status for future research directions on photorespiration. / Timm S., Bauwe H. // *Plant Biol (Stuttg).* – 2013. – V. 15, № 4. – P. 737–747.

205. The activity of alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the sera of patients with brain cancer / Jelski W. [et al.] // *[Neurochem Res.* – 2014. – Vol. 39, № 12. P. 2313–2318.

206. The catalytic role of tyrosine 254 in flavocytochrome b₂ (L-lactate dehydrogenase from baker's yeast). Comparison between the Y254F and Y254L mutant proteins / Gondry M. [et al.] // *Eur J Biochem.* – 2001. – V. 268, № 18. – P. 4918–4927.

207. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism / Badger M.R [et al.] // J Exp Bot. – 2006. – 57. P. 249–265.

208. The genome of *Ricinus communis* encodes a single glycolate oxidase with different functions in photosynthetic and heterotrophic organs / Jessica Schmitz [et al.] // Planta. – 2020. – V. 252.

209. The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. / Eisenhut M. [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA – 2008. – V. 105, № 44. – P. 17199–17204.

210. The photorespiratory metabolite 2-phosphoglycolate regulates photosynthesis and starch accumulation in Arabidopsis. / Flügel F. [et al.] // Plant Cell. – 2017. – V. 29. P. 2537–2551.

211. The plant-like C₂ glycolate cycle and the bacterial-like glycerate pathway cooperate in phosphoglycolate metabolism in cyanobacteria. / Eisenhut M. [et al.] // Plant Physiol. – 2006. – V. 142. P. 333–342

212. The regulatory interplay between photorespiration and photosynthesis. / Timm S. [et al.] // J Exp Bot. – 2016. – V. 67, № 44. – P. 2923–2929.

213. The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. / Igamberdiev A.U. [et al.] // Physiologia Plantarum. – 2001. – V. 111, № 4. – P. 427–438

214. The structure of phototrophic communities of soda lakes of the southeastern Transbaikal region / Kompantseva E. I. [et al.] // Microbiology – 2007. – V. 76. P. 211–219.

215. The value of mutants unable to carry out photorespiration. / Blackwell R.D. [et al.] // Photosynth Res. – 1988. – V. 16. P. 155–176.

216. Thyroid profile and LDH Isoenzymes as prognostic biomarkers for diabetic and/or obese subjects Turki Y. [et al.] // Afr Health Sci. – 2018. – Vol. 18, № 3. P. 697–706.

217. Tolbert N.E. Microbodies peroxisomes and glyoxysomes. / Tolbert N.E. // Annu Rev Plant Physiol. – 1971. – V. 22. – P. 45–74.

218. Tolbert N.E. The C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle. / Tolbert N.E. // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* — 1997. — V. 48. P.1-25.

219. Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentrations in the roots of *Arabidopsis* plants / van Dongen J.T. [et al.] // *Ann Bot.* — 2009. — Vol. 103. — P. 269–280.

220. Tsoi S.C. The Nucleotide and Deduced Amino-Acid Sequences of a cDNA Encoding Lactate Dehydrogenase from *Caenorhabditis elegans*: The Evolutionary Relationships of Lactate Dehydrogenases from Mammals, Birds, Amphibian, Fish, Nematode, Plants, Bacteria, Mycoplasma, and Plasmodium. / Tsoi S.C., Li S.S. // *Biochem Biophys Res Commun.* — 1994. — Vol. 205, № 1. — P. 558-564.

221. Two D-2-hydroxyacid dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with catalytic capacities to participate in the last reactions of the methylglyoxal and β -oxidation pathways / Engqvist M. [et al.] // *Biol. Chem.* 2009. V. 284 № 37. P. 25026–25037

222. Utter M.F. Formation of oxaloacetate from pyruvate and carbon dioxide / Utter M.F., Keech D.B. // *J Biol Chem.* — 1960. — Vol. 235, № 5. P. 17–18.

223. Wang H.L. Alterations in global patterns of gene expression in *Synechocystis sp.* PCC 6803 in response to inorganic carbon limitation and the inactivation of *ndhR*, a LysR family regulator. / Wang H.L., Postier B.L, Burnap R.L. // *J Biol Chem.* — 2004. — V. 279. P. 5739–5751.

224. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. Zhou M [et al.] // *Mol Cancer.* — 2010. — Vol. 9, № 33. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-33>

225. Wilhelm C. From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. / Wilhelm C., Jakob T. // *Appl Microbiol Biotechnol.* — 2011. — V. 92. № 5. P. 909-19.

226. Williams H.E. Disorders of oxalate metabolism. / Williams H.E., Smith L.H. Jr. // *Am J Med.* — 1968. — V. 45, № 5. P. 715–735.

227. Winkler U. Compartmentation of Peroxisomal Enzymes in the Diatom *Fragilaria*. Winkler U., Stabenau H. /In Stabenau H (ed) *Phylogenetic Changes in*

Peroxisomes of Algae — Phylogeny of Plant Peroxisomes // University Press, Oldenburg. – 1992. – P. 130-139

228. Winkler U. Isolation and characterization of peroxisomes from diatoms / Winkler U., Stabenau H. // *Planta* – 1995. – Vol. 195. – P. 403-407

229. Yak lactate dehydrogenase A4: purification, properties, and cDNA cloning. Zheng Y. [et al.] // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2008. – V. 72, №9. – P. 2448–2451.

230. Yamaguchi K. Reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation / Yamaguchi K., Nishimura M. // *Plant and Cell Physiology.* – 2000. – V. 41. P. 1397-1406

231. Xia J.-H. Improved cytoplasmic pH regulation, increased lactate efflux, and reduced cytoplasmic lactate levels are biochemical traits expressed in root tips of whole maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment / Xia J.-H., Roberts J.K.M. // *Plant Physiology.* – 1994. – Vol. 105, № 2. – P. 651–657.

232. Zelitch I. Organic acids and respiration in photosynthetic tissues. / Zelitch I. // *Annu Rev Plant Physiology.* – 1964. – V. 15. P. 121–142.

233. Zhao W.X. RbrA, a cyanobacterial rubrerythrin, functions as a FNR-dependent peroxidase in heterocysts in protection of nitrogenase from damage by hydrogen peroxide in *Anabaena* sp. PCC 7120. / Zhao W.X., Ye Z., Zhao J.D. // *Mol Microbiol.* – 2007. – V. 66. № 5. P. 1219-30.

234. Zhou Z. Multi-energy metabolic mechanisms of the fungus *Fusarium oxysporum* in low oxygen environments / Zhou Z., Takaya N., Shoun H. // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2010. – Vol. 74, № 12. P. 2431–2437.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1.

Этапы очистки ЛДГ из листьев гороха *Pisum sativum* L., в условиях гипоксии

(n=3, p≤0,05)

Стадия очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	21,0	87,5	211,7±6,4	0,41±0,01	1,0	100
Фракционирование сульфатом аммония (35-65%)	5,0	85,9	56,1	1,54	3,7	98,2
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2,5	72,5	29,6	2,45	5,9	82,9
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацеле	3,0	28,1	2,16	13,0	31,5	32,1
Гель-хроматография на сефадексе G-200	2,5	23,4	0,56	41,9	101,3	26,8

Таблица 2.

Этапы очистки ЛДГ из корней гороха *Pisum sativum* L., в условиях гипоксии

(n=3, p≤0,05)

Стадия очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	35,0	304,5	164,2	1,9	1,0	100
Фракционирование сульфатом аммония (60-80%)	6,0	91,35	20,2	4,5	1,0	30
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2,0	60,9	7,3	8,4	4,6	20
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1,0	8,41	0,3	26,1	14,1	2,8
Гель-хроматография на сефадексе G-200	0,5	7,5	0,09	80,5	43,4	2,5

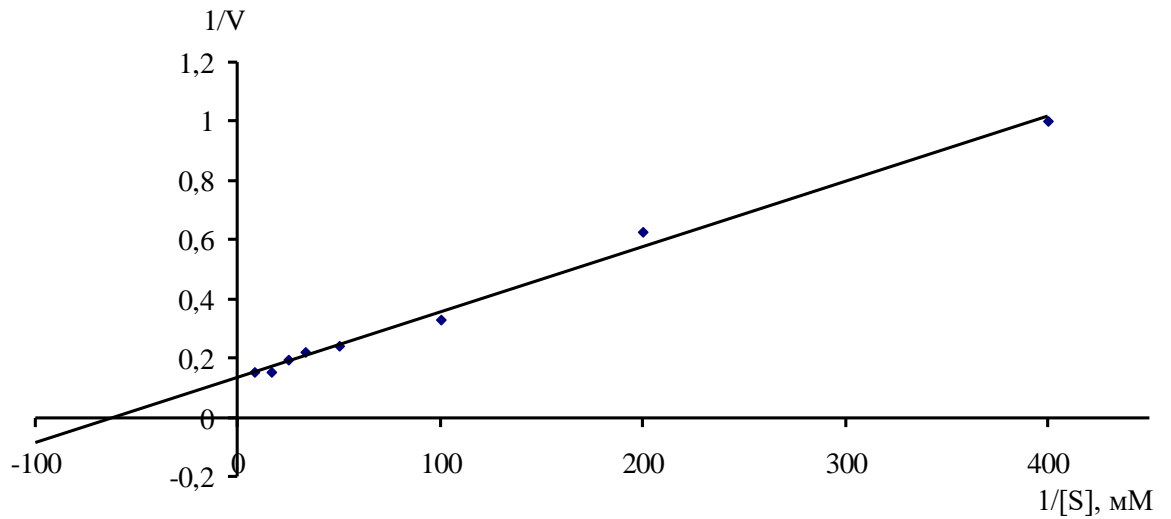


Рис. 23. Определение значений K_M по пирувату для ЛДГ из листьев *Pisum sativum* L.

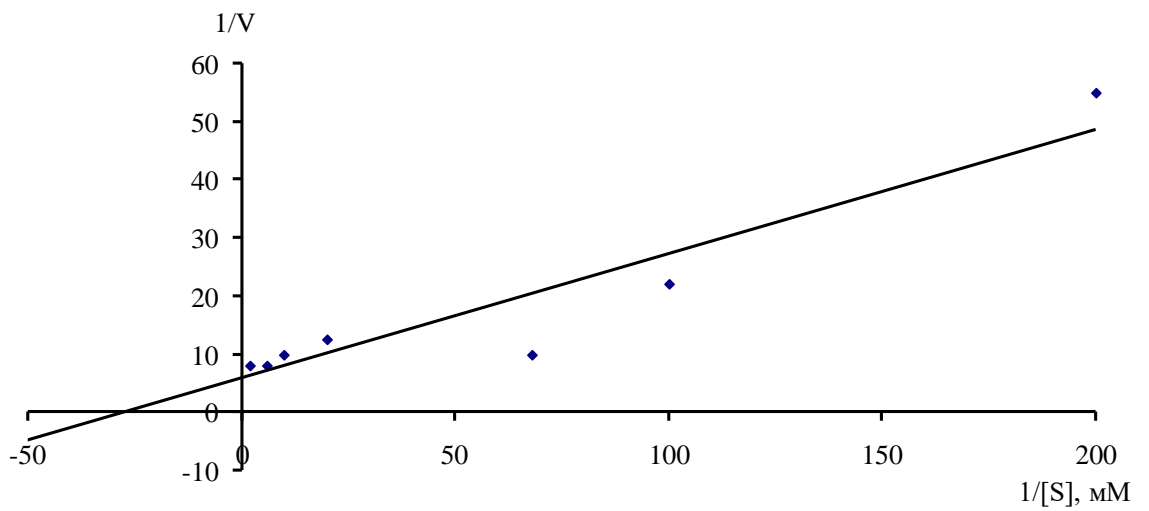


Рис. 24. Определение значений K_M по пирувату для ЛДГ из корней *Pisum sativum* L.

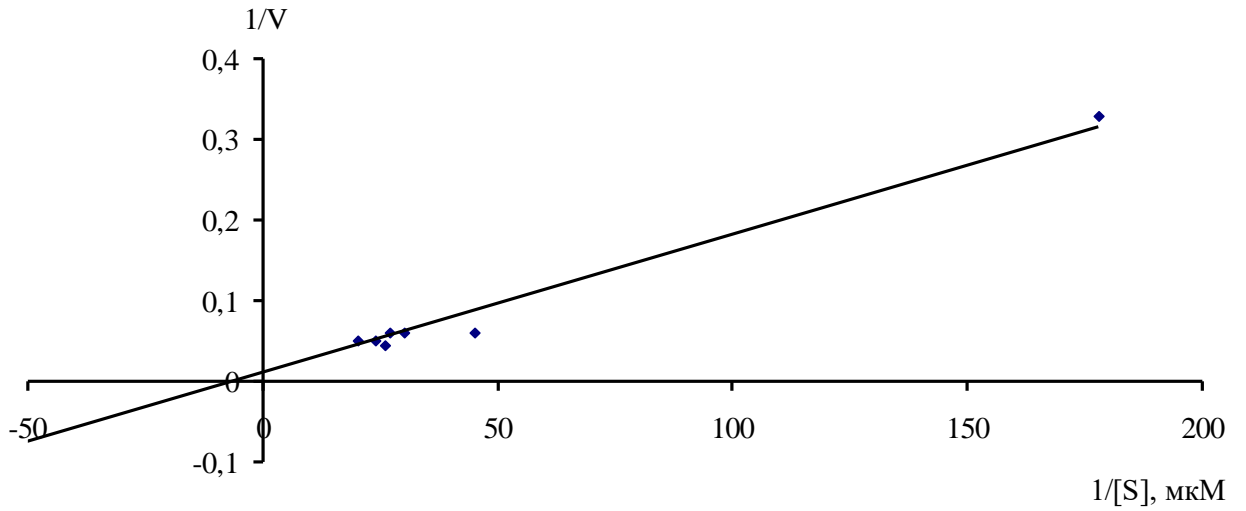


Рис. 25. Определение значений K_M по НАДН для ЛДГ из листьев *Pisum sativum* L.

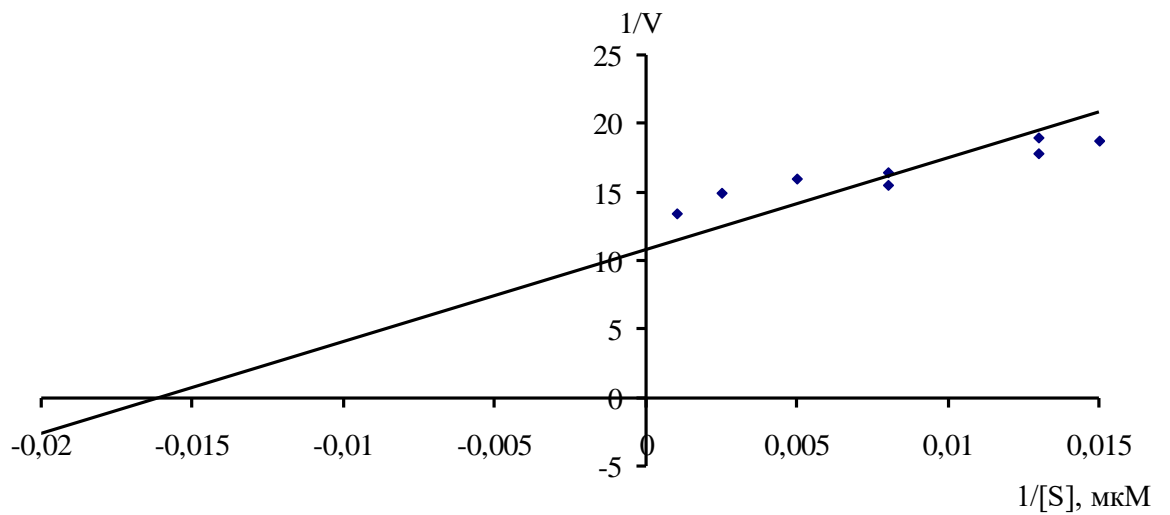


Рис. 26. Определение значений K_M по НАДН для ЛДГ из корней *Pisum sativum* L.

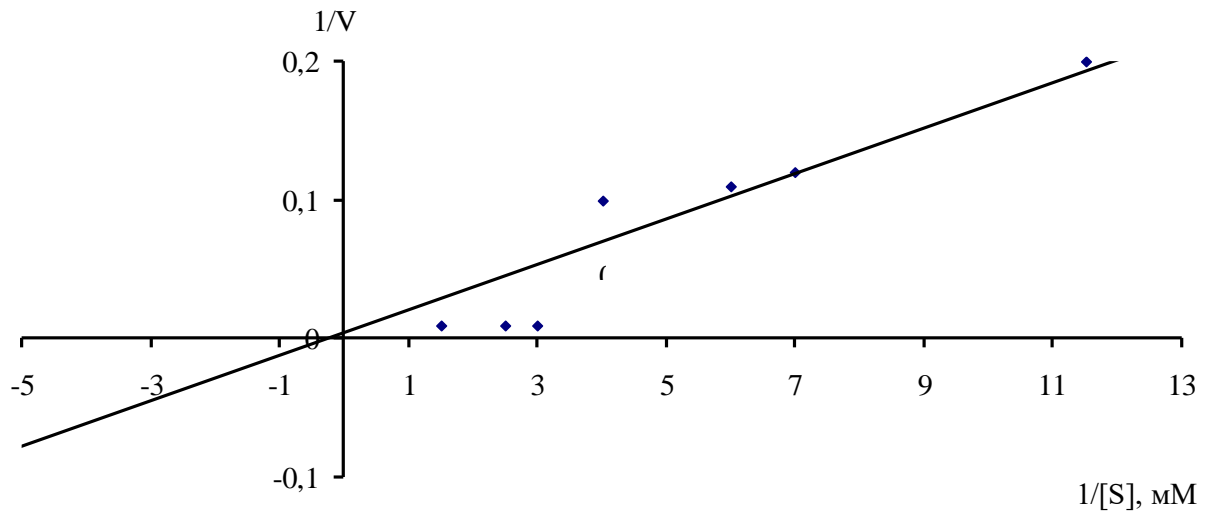


Рис. 27. Определение значений K_M по лактату для ЛДГ из листьев *Pisum sativum* L., подверженных кислородному голоданию на протяжении 48 часов

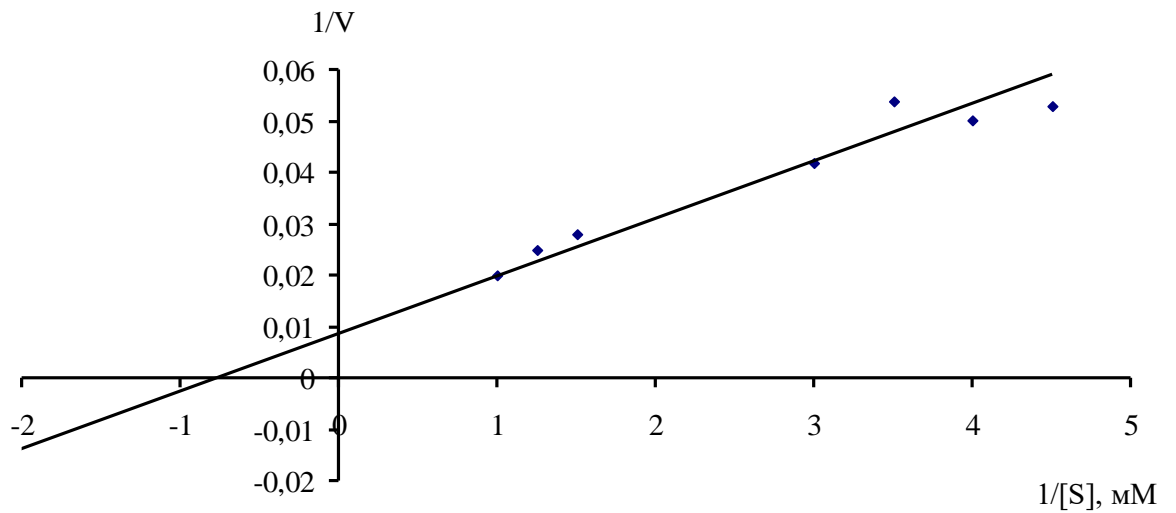


Рис. 28. Определение значений K_M по НАД⁺ для ЛДГ из листьев гороха *Pisum sativum* L., подверженных кислородному голоданию на протяжении 48 часов

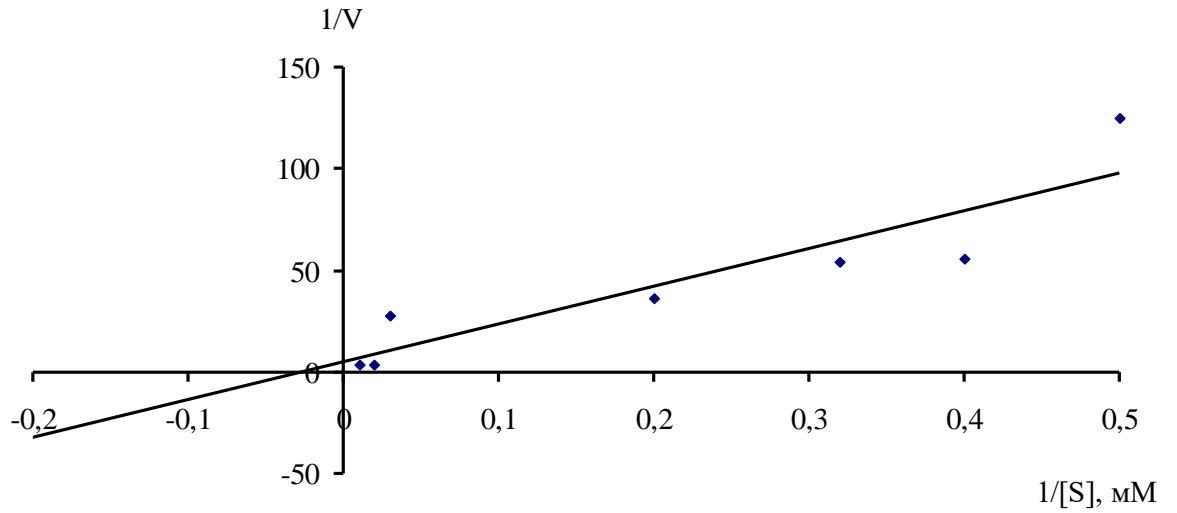


Рис. 29. Определение значений K_M по лактату для ЛДГ из корней *Pisum sativum* L.

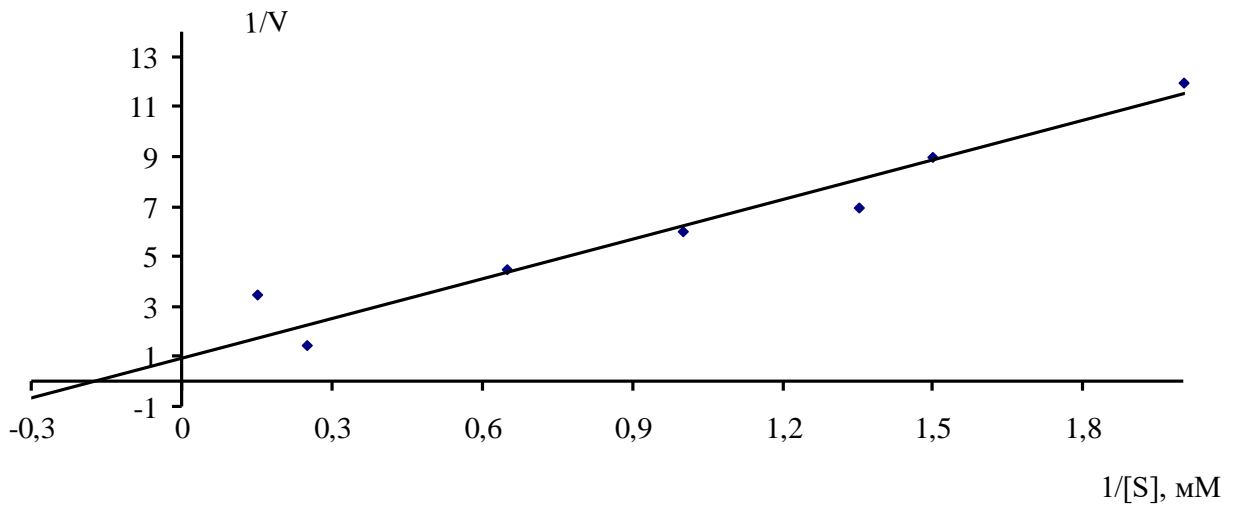


Рис. 30. Определение значений K_M по НАД⁺ для ЛДГ из корней гороха *Pisum sativum* L.

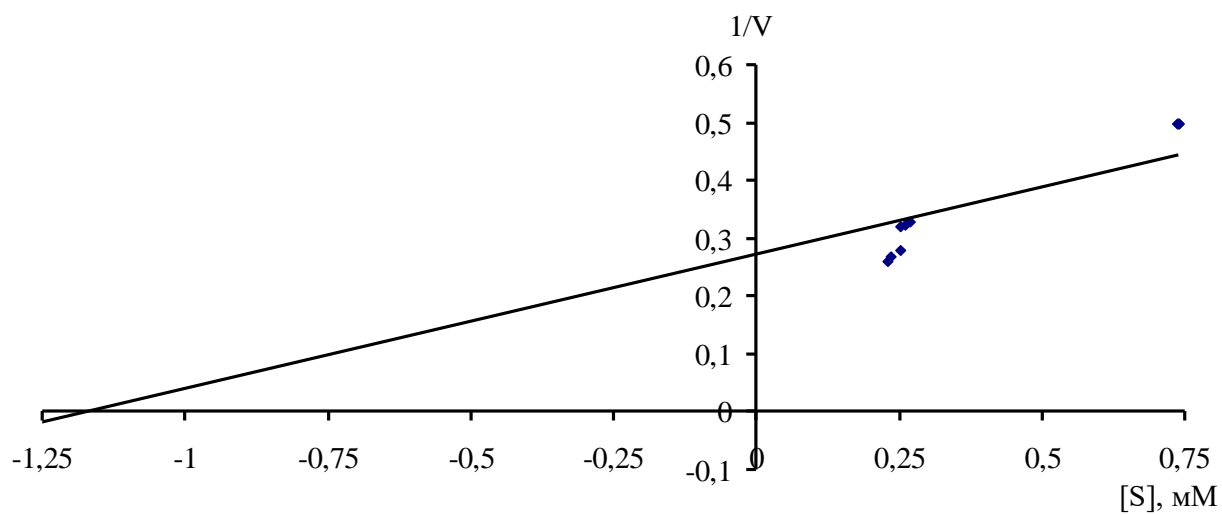


Рис. 31. Определение значения константы ингибирования для ЛДГ из листьев *Pisum sativum* L.

Таблица 7.

Этапы очистки ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, экстрагированной из корней *Pisum sativum* в момент возобновления их аэрации

(n=3, p≤0,05)

Стадия очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	6	4,3	7,7	0,6	1,0	100
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	5,6	3,4	1,8	1,9	3,3	78
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацеле	2,5	2,5	0,5	5,2	9,3	58
Гель-хроматография на сефадексе G-200	1,0	0,8	0,02	36,6	65,0	18

Таблица 8.

Этапы очистки ЛЦО-подобной гликолатоксидазы, экстрагированной из листьев *Pisum sativum* L. в момент возобновления их аэрации

(n=3, p≤0,05)

Стадия очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	18,0	137,32	90,72	1,51	1,0	100
Осаждение сульфатом аммония (30%-65%)	3,4	111,73	10,47	10,67	7,05	81,37
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	1,7	57,86	3,29	17,57	11,63	42,23
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацеле	1,2	32,39	0,62	51,81	34,32	23,59
Гель-хроматография на сефадексе G-200	0,9	15,84	0,11	143,59	95,09	11,53

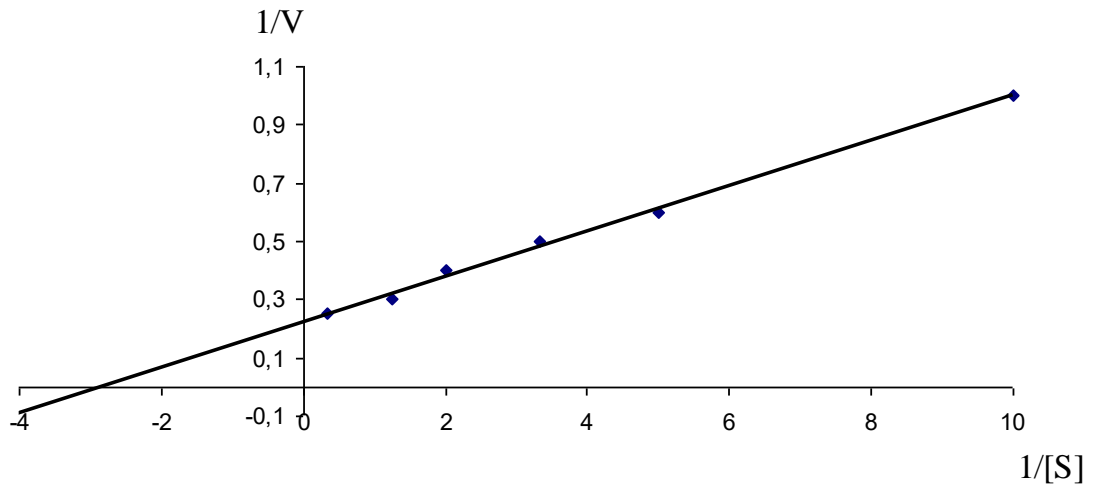


Рис. 43. Определение значений K_m ЛЦО-подобной ГО по лактату из корней *Pisum sativum* L.

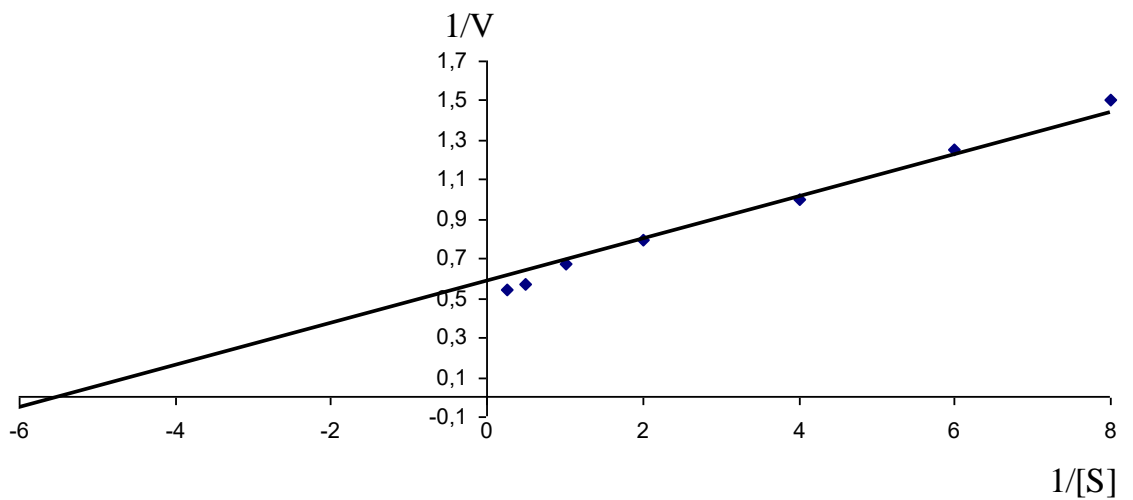


Рис. 44. Определение значений K_m ЛЦО-подобной ГО по гликолату из корней *Pisum sativum* L.

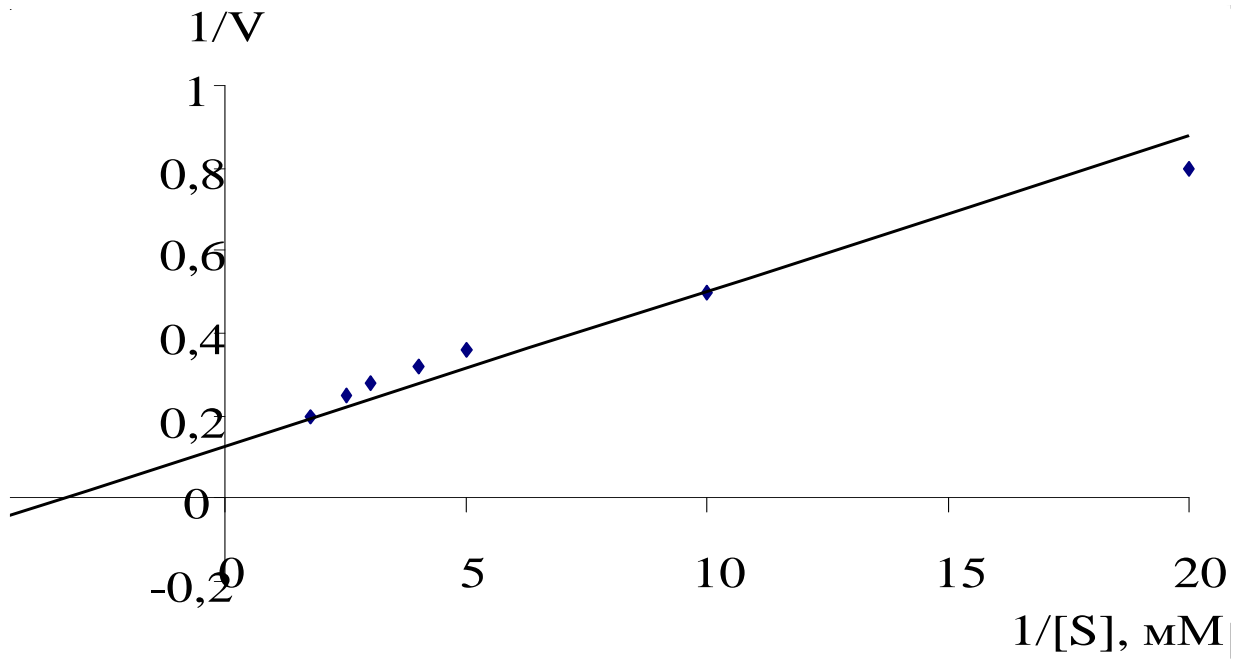


Рис. 45. Определение значений K_M ЛЦО-подобной ГО по лактату из листьев *Pisum sativum* L.

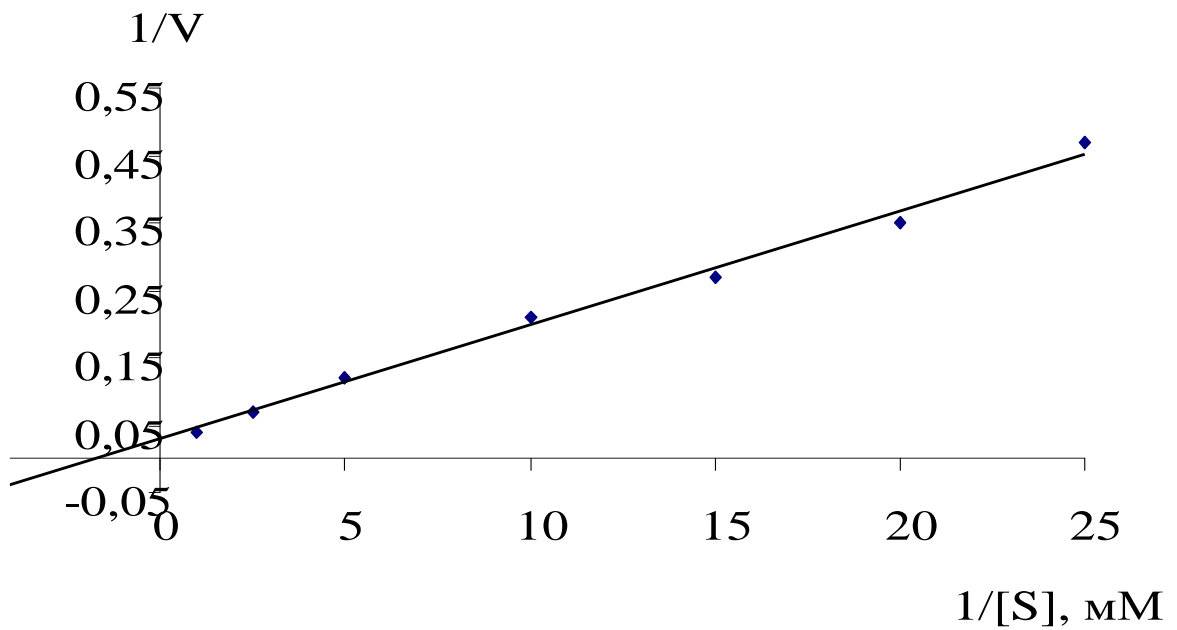


Рис. 46. Определение значений K_M ЛЦО-подобной ГО по гликолату из листьев *Pisum sativum* L.

Очистка ЛЦО-подобной ГО из листьев сорго *Sorghum sudanense* L., в момент возобновления их аэрации

n=3, p≤0,05

Стадии очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	25,0	278,7	146,3	1,9	1,0	100
Осаждение сульфатом аммония (35%-65%)	4,0	204,2	20,0	10,2	5,4	73,2
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2,3	175,0	5,7	30,6	16,0	62,8
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацеле	1,5	135,0	2,5	53,2	27,9	48,6
Гель-хроматография на сефадексе G-200	1,0	38,5	0,14	274,2	143,9	13,8

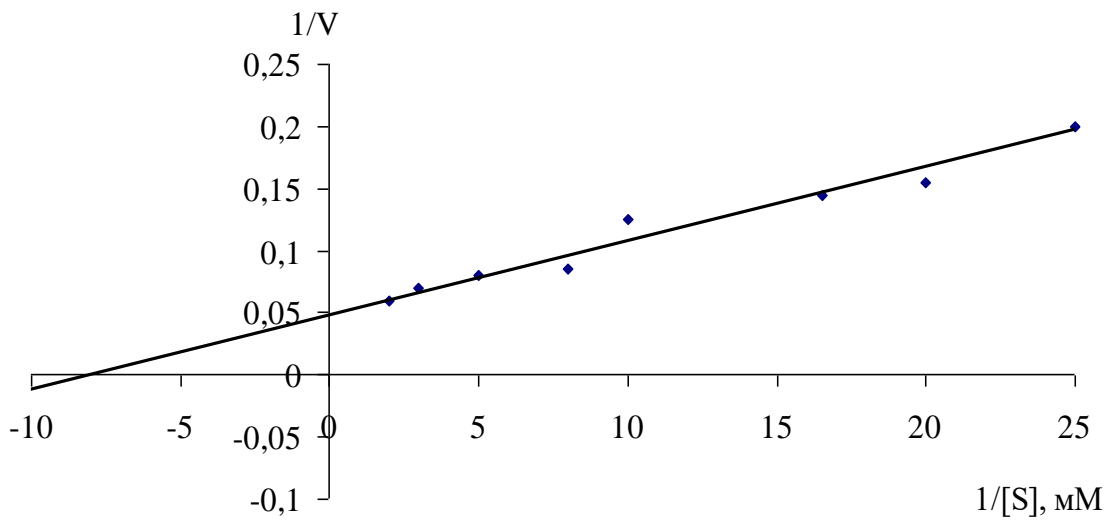


Рис. 58. Определение значений K_M ЛЦО-подобной ГО по лактату из листьев *Sorghum sudanense* J.

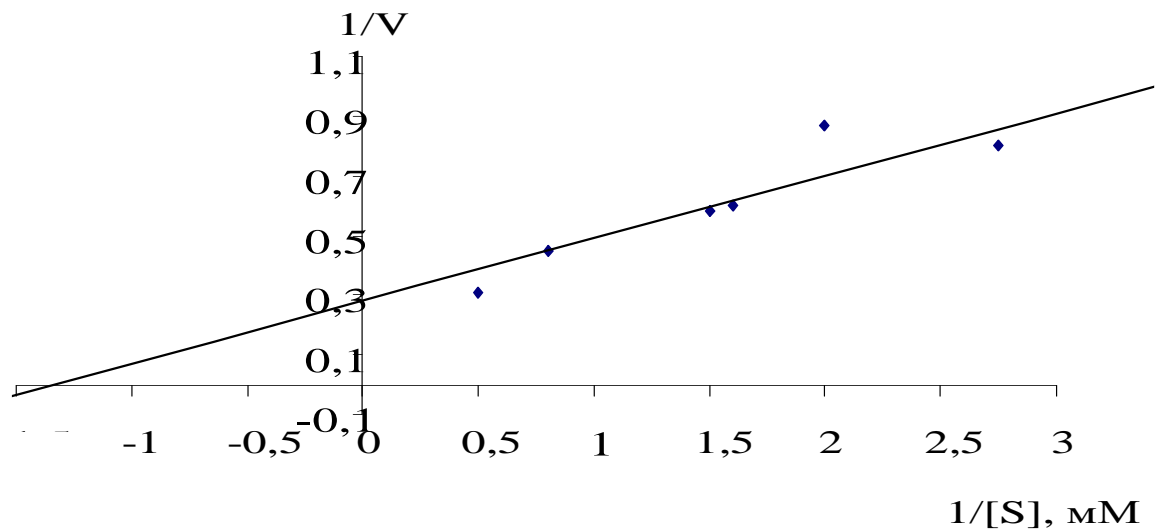


Рис. 59. Определение значений K_M ЛЦО-подобной ГО по гликолату из листьев *Sorghum sudanense* J.

Этапы очистки ЛДГ из водоросли *Chlorella vulgaris*

n=3, p≤0,05

Стадия очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	4,0	4,37	21,76	0,2	1,0	100
Фракционирование сульфатом аммония (30-65%)	2,0	1,58	0,62	2,54	12,64	36
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2,0	1,51	0,58	2,59	12,93	35
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацеле	2,0	0,91	0,03	15,75	78,46	21

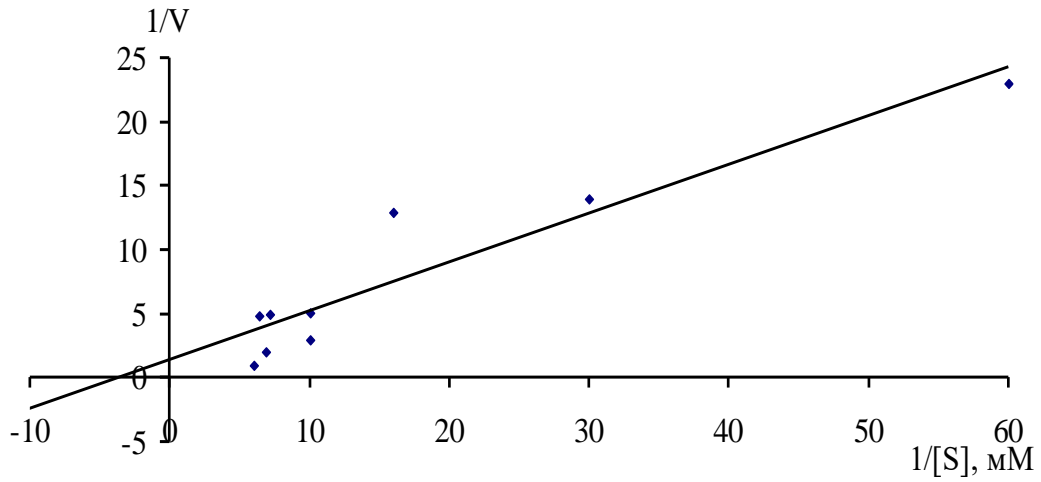


Рис. 64. Определение значений K_M по пирувату для ЛДГ из *Chlorella vulgaris*

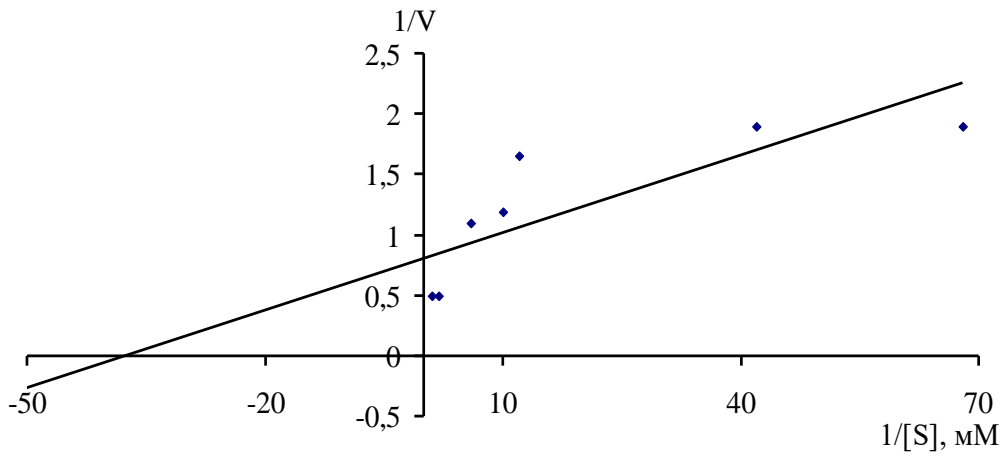


Рис. 65. Определение значений K_M по NADH для ЛДГ из *Chlorella vulgaris*

Очистка гликолатоксидазы из водоросли *Chlorella vulgaris*

(n = 3, p ≤ 0,05)

Стадия очистки	Общий объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг	Степень очистки	Выход, %
Супернатант	4,0	27,78	1,2	0,04	1,0	100
Фракционирование сульфатом аммония (30-55%)	3,0	0,7	0,42	0,62	15,5	34
Гель-фильтрация через сефадекс G-25	2,0	0,28	0,25	0,90	22,5	21
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефацеле	1,6	0,03	0,096	2,86	71,5	8

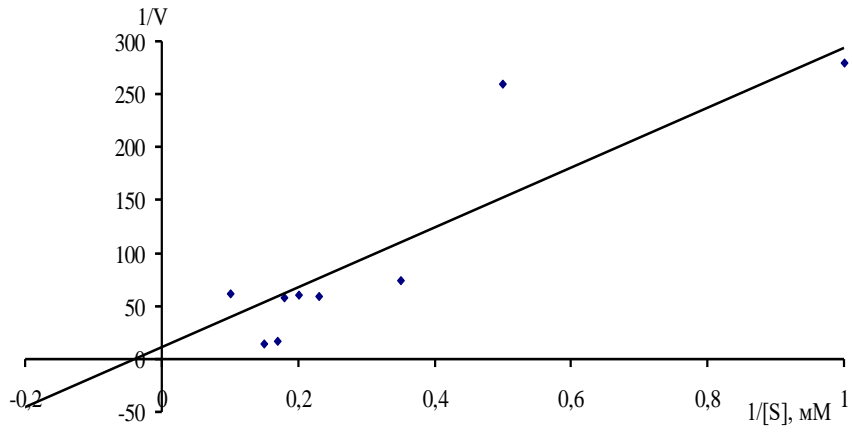


Рис.70. Определение значения K_M по гликолату для гликолатоксидазы из *Chlorella vulgaris*

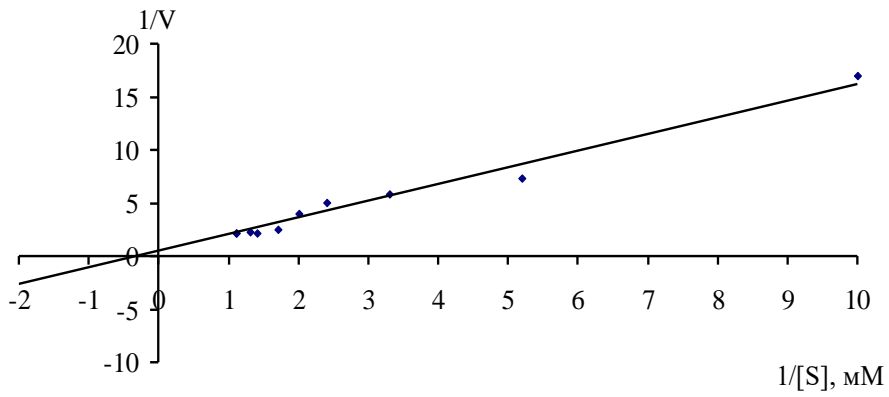


Рис. 71. Определение значения K_M по лактату для гликолатоксидазы из *Chlorella vulgaris*