

На правах рукописи



Комарова Надежда Романовна

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

Специальность 1.5.4 – Биохимия

1.5.21 – Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор  
**Епринцев Александр Трофимович**

**Официальные оппоненты:**

**Креславский Владимир Данилович** доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, группа экологии и физиологии фототрофных организмов, ведущий научный сотрудник

**Войцеховская Ольга Владимировна** кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, зав. лабораторией экологической физиологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» (ННГУ)

Защита состоится 12 мая 2022г в 15:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.288.02 при Воронежском государственном университете по адресу: 394036, Воронеж, Университетская пл., 1, аудитория 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и сайте ФГБОУ ВПО «ВГУ»: [www.vsu.ru](http://www.vsu.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан « 14 » марта 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук, профессор

Грабович Маргарита Юрьевна

### 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 (Ma Y.C. et al., 2004). При этом регенерируется НАД<sup>+</sup>, 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* (Guiard B., 1985).

Эволюция генных локусов *lox* и возникновение соответствующих ферментов были детерминированы необходимостью адаптации организмов к меняющимся условиям среды, в частности, к увеличению концентрации атмосферного O<sub>2</sub>, 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 и значимость работы.

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 в растениях с разным типом обмена веществ. Предложена гипотетическая схема роли ЛЦО 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-подобной гликолатоксидазы 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). Результаты данной диссертационной работы представлены в 12 публикациях: из них четыре – в печатных изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

#### Объем и структура диссертации.

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.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом исследования в данной работе служили корни и листья гороха (*Pisum sativum* L., сорт Амброзия), проростки сорго (*Sorghum sudanense* J.), выращенные гидропонным способом; а также одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенные фототрофно, из коллекции IPPAS.

Постановка эксперимента по созданию гипоксического воздействия.

Моделирование гипоксии осуществляли путем затопления растений выше корневой шейки, приостановкой барботирования среды.

Определение активности лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы. Активность ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО определяли спектрофотометрически при 340 нм и 324 нм соответственно.

Определение изоферментного состава ферментов. Для определения изоферментного состава ферментов использовали электрофорез в полиакриламидном геле. Специфическое проявление ЛДГ и ЛЦО-подобной ГО осуществляли тетразолиевым методом.

Очистка ферментов. Очистка ферментов выполнялась по четырехстадийной схеме.

Определение молекулярной массы субъединиц ферментов. Определение молекулярной массы субъединиц проводилось методом денатурирующего электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

Выделение 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).

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

Бисульфитное секвенирование ПЦР-продукта. Бисульфитное секвенирование проводили в ЗАО «Евроген» (Россия).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Статистическую обработку осуществляли с использованием критерия Стьюдента в программе Excel 2010 (Лакин, 1990). Опыты проводили в 3-5 биологических повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Динамика активности лактатдегидрогеназы в корнях и листьях гороха, сорго, в микроводоросли хлорелле

В результате анализа показателей активности лактатдегидрогеназы у растений, было установлено, что во время воздействия гипоксии повышается активность исследуемого фермента и в листьях и корнях. Активация фермента в листьях гороха происходит спустя 12 ч, а максимальная величина этого показателя наблюдалась через 48, при этом активность фермента возрастала в 9 раз по сравнению с контрольной группой растений (рис. а). Стремительно нарастает его уровень в корнях, показывая небольшой рост уже через 3 часа, а спустя 24 ч этот показатель достигает своего максимума, возрастая в 12 раз по сравнению с контролем (рис. 1 б).

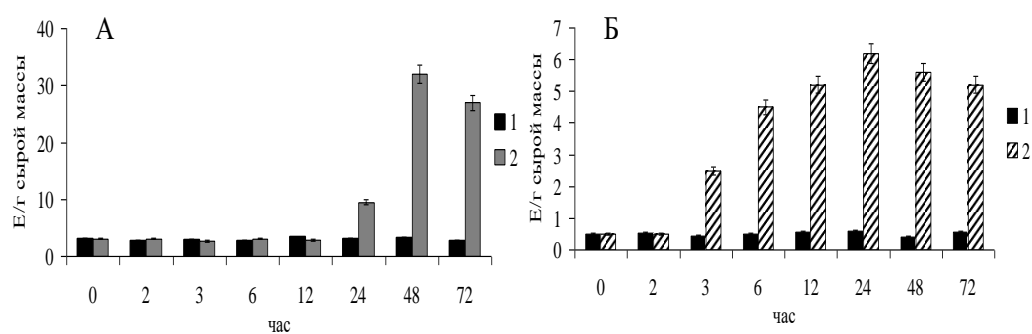


Рис. 1. Динамика активности ЛДГ гороха А) в листьях и Б) в корнях: 1) в контрольной группе растений, находящихся в стандартных условиях, и 2) в экспериментальной группе растений, находящихся под воздействием гипоксии

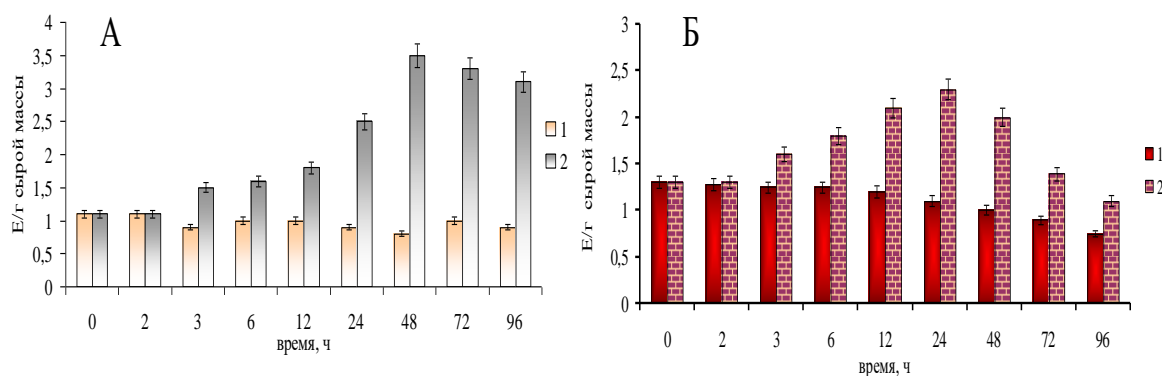


Рис. 2. Динамика активности ЛДГ сорго А) в листьях и Б) в корнях: 1) в контрольной группе растений, находящихся в стандартных условиях, и 2) в экспериментальной группе растений, находящихся под воздействием гипоксии

В ходе исследования воздействия гипоксии на микроводоросль хлореллу было установлено, что активность лактатдегидрогеназы возрастала в 2 раза на 14 сутки

инкубации в микроаэробных условиях, по сравнению с контрольными образцами.

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 (Соорег R.U. et al., 2002). А у растений с  $C_3$ -типом фотосинтеза во время стресса, вызванного дефицитом кислорода, преобладающим является молочнокислое брожение (Войцеховская С.А. с соавт., 2015).

### Изменения активности фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у растений при смене гипоксических условий

В корнях растений гороха, инкубированных в условиях недостатка кислорода, в момент возобновления аэрации, индуцируется активность ЛЦО-подобной гликолатоксидазы (рис. 3 б). 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. 3 а).

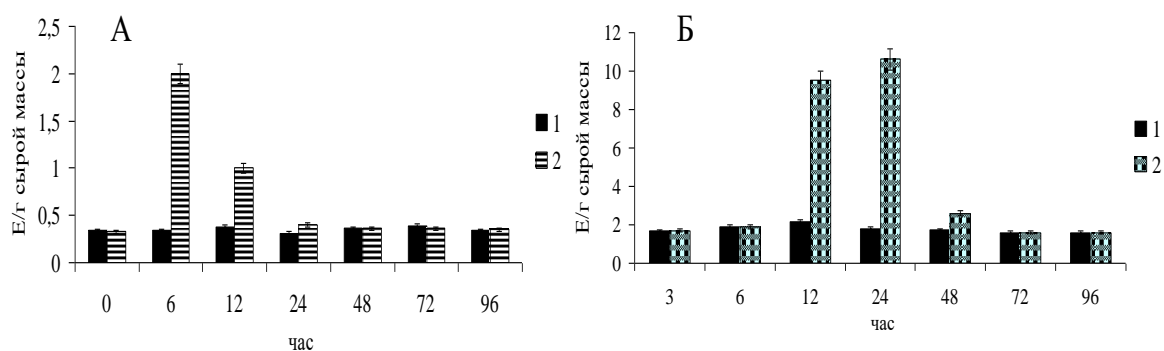


Рис. 3. Динамика активности ЛЦО-подобной гликолатоксидазы гороха А) в листьях и Б) в корнях: 1) при гипоксии и 2) в момент возобновления аэрации

Повышение активности фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы было установлено уже через 6 часов после перехода растений сорго 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. 4 а). 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 4 раза (рис. 4 б). Через 12 часов нормоксии активность ЛЦО-подобной гликолатоксидазы поднялась более чем в 20 раз по сравнению с контролем. Интересно, что высокий уровень активности сохранялся, слегка снижаясь к четвертым суткам.

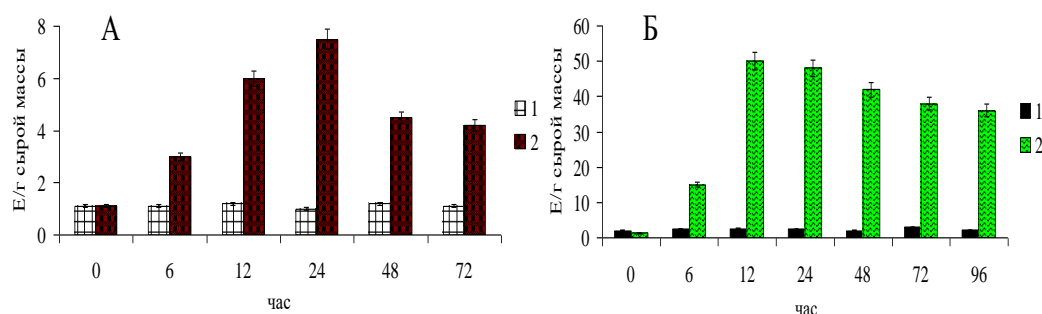


Рис. 4. Динамика активности ЛЦО-подобной ГО сорго А) в листьях и Б) корнях 1) выдержанных в гипоксических условиях (контроль), и 2) во время возобновления нормоксических условий (эксперимент)

#### Получение в гомогенном состоянии исследуемых ферментов

Для определения физико-химических и регуляторных свойств ферментов был проведен ряд многостадийных очисток.

Были получены высокоочищенные препараты лактатдегидрогеназы из листьев и корней гороха, хлореллы. Также использование многостадийной схемы очистки позволило получить препараты ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из листьев и корней гороха, листьев сорго и хлореллы (табл.1).

Таблица 1.  
(n=3; p<0,05)

Сравнительная характеристика показателей очистки

Препарат			Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
<i>Pisum sativum</i> L.	ЛДГ	листья	42	101	26.8
		корни	81	43	2.5
	ЛЦО-подобная ГО	листья	144	95	11.5
		корни	36.6	65	18
<i>Sorghum Sudanense</i> J.	ЛЦО-подобная ГО	листья	274	143	13.8
<i>Chlorella vulgaris</i>	ЛДГ	-	15.75	78	21
	ЛЦО-подобная ГО	-	2.86	71	8

## Электрофоретические исследования очищенных препаратов

Электрофорез в ПААГ показал для всех очищенных ферментов наличие одной полосы при универсальном и специфическом окрашивании. Так для ЛДГ из листьев и корней гороха величины  $R_f$  составили 0,38 и 0,41 соответственно (рис. 5 а, б).

Для исследуемого фермента ЛЦО-подобной гликолатоксидазы как из корней, так и из листьев гороха с помощью универсального окрашивания нитратом серебра был выявлен один белковый компонент с  $R_f = 0,63$  (рис. 1 в, г).

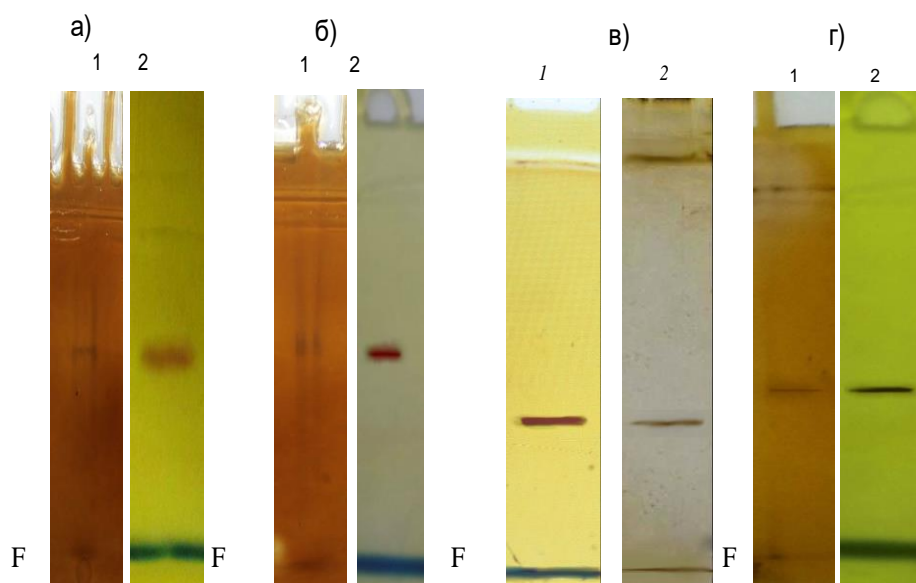


Рис. 5. Электрофорез в ПААГ очищенной ЛДГ: а) из корней гороха, б) из листьев гороха; ЛЦО-подобной ГО, в) из корней гороха, г) из листьев гороха (гели окрашены: 1- нитратом серебра, 2 – специфическим тетразолиевым синим; F – бромфеноловый синий)

### Кинетические и физико-химические свойства ЛДГ, ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в растениях

#### Кинетические свойства

Были изучены каталитические характеристики очищенного препарата ЛДГ из гороха. 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. 6). В ходе работы были получены экспериментальные данные, показывающие высокое сродство ЛДГ листьев и корней гороха к НАДН, а именно их значения составляли 71 и 63 мкМ соответственно, что подтверждает возможность эффективно реокислять гликолитический НАДН.

Полученные результаты величин  $K_m$  ЛДГ для субстратов обратной реакции показали меньшее сродство к лактату и коферменту  $\text{НАД}^+$  по сравнению с пируватом и НАДН. Значение  $K_m$  фермента по лактату составило 3,6 мМ, по  $\text{НАД}^+$

– 1,2 мМ для ЛДГ из листьев и 33 мМ по лактату, по НАД<sup>+</sup> – 5,1 мМ для ЛДГ из корней (Рис. 2).

Значение константы Михаэлиса, определенной по лактату, для ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из корней гороха оказалась равной 360 мкМ, а по гликолату 181 мкМ.

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.

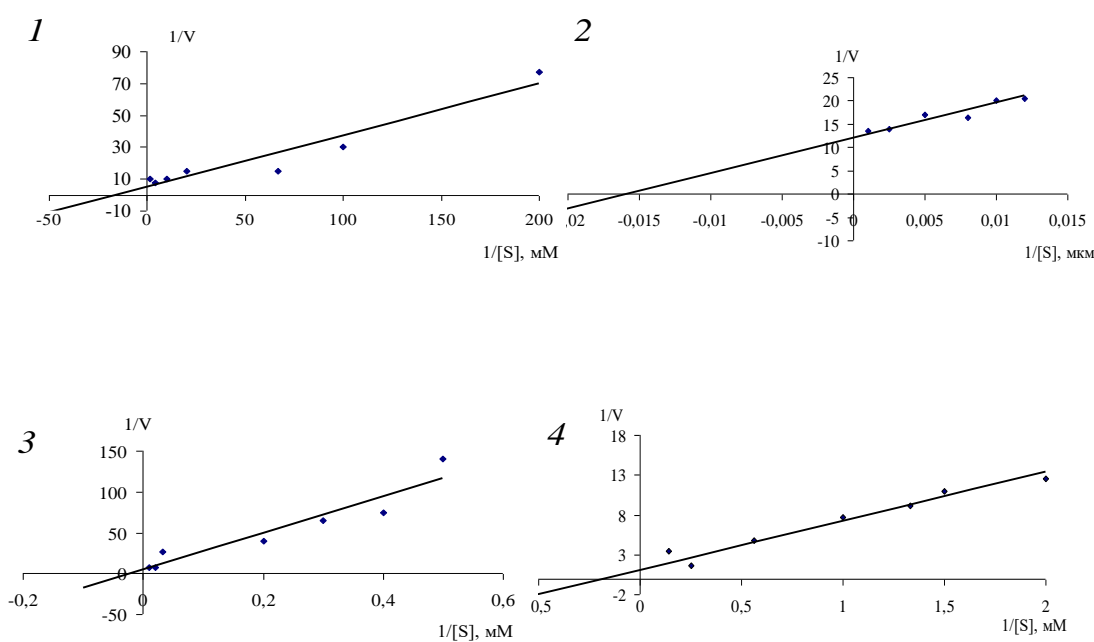


Рис. 6. Определение значений  $K_m$  ЛДГ из корней гороха (1 – пируват, 2 – НАДН, 3 – лактат, 4 – НАД<sup>+</sup>).

### Физико-химические свойства

#### Измерение молекулярной массы субъединиц и нативных молекул препаратов энзимов

Электрофорез в ПААГ с добавлением додецилсульфата натрия позволил определить, что изучаемые ферменты состоят из одинаковых субъединиц и имеют тетрамерное строение с одинаковыми субъединицами. Величина молекулярной массы нативных молекул энзимов была определена методом гель-фильтрации на колонке G-200. Показано, что молекулярная масса ЛДГ порядка 150 кДа, а молекулярная масса ЛЦО-подобной гликолатоксидазы варьирует от 168 до 180 кДа (табл. 2).

Таблица 2.

Препарат			Молекулярная масса, кДа		Количество субъединиц
			Нативной молекулы	Субъединицы	
<i>Pisum sativum</i> L.	ЛДГ	листья	148±4,4	37,1±1,1	4
		корни	151±4,5	37,7±1,1	4
	ЛЦО-подобная ГО	листья	180±2,7	45,0±1,8	4
		корни	180±2,7	45,0±1,8	4
<i>Sorghum Sudanense</i> J.	ЛЦО-подобная ГО	листья	168,0±2,5	42,0±1,3	4

### Подбор 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](http://www.genebee.msu.su/service/malignreduced.html)). 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 7.

```

XP_020218095.1  MHKSGSSSALGPGGLDLTQAFFKSI MNAAPPSPTRKHNKISVVGAGNVGMAIAQTILTQD 60
XP_003549909.1  MHKSASGSLGPGGLDLTQAFFRPI TNAAPPSPTRKHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD 60
XP_014506104.1  MHKSASGSLGPGGLDLTQAFFKPI ANAAPSPTRKHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD 60
XP_017420849.1  MHKSASGSLGPGGLDLTQAFFKPI TNAAPPSPTRKHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD 60
XP_003608731.1  MHKSASGSLGPGGLDLTQAFFKPI SNAAPPSPTRKHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD 60
XP_004516830.1  MHKSASGSLGPGGLDLTQVFFKSI SNAAPPSPTRKHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD 60
XP_015961820.1  MHKSASGSLGPGGLDLTQAFFRPI TNAAPPSPTRKHNKISVIGAGNVGMAIAQTILTQD 60
*****

XP_020218095.1  LTDELALVDIAIPEKLRGEMLDLQHAAAFPRTKIHASTDYAVTAGSDLCIVTAGARQING 120
XP_003549909.1  LTDELVLVDITNDKLRGEMLDLQHAAAFPRTKIHSSADSSVTAGSDLCIVTAGARQIVG 120
XP_014506104.1  LTDELVLVDITNADKLRGEMLDLQHAAAFPRTKIHSSDSSVTAGSDLCIVTAGARQIPG 120
XP_017420849.1  LTDELVLVDITNADKLRGEMLDLQHAAAFPRTKIHASTDSSITAGSDLCIVTAGARQIAG 120
XP_003608731.1  LTDELIVVDNKPDKLRGEMLDLQHAAAFPRVKINSSVEYSVTAGSDLCIVTAGARQIGG 120
XP_004516830.1  LTDELIVVDNKPDKLRGEMLDLQHAAAFPRVKINSSVEYSVTAGSDLCIVTAGARQIAG 120
XP_015961820.1  LTDELVLIDNKDQKLRGEMLDLQHAAAFPRTKIYASVDYAVTAGSDLCIITAGARQIAG 120
*****

```

XP_020218095.1	ESRLNLLQRNVTLFQKIIIPPLVGHSPDITILLIVSNPVDVLSYVAVKLSGFFSNRVIGSGT	180
XP_003549909.1	ESRLNLLQRNLSLFRAIIPPLVRYSPDITILLIVSNPVDILTYVAVKLSGFFSNRVIGSGT	180
XP_014506104.1	ESRLNLLHRNLSLFRAIIPPLVRHSPDITILLIVSNPVDILTYVAVKLSGFFSNRVIGSGT	180
XP_017420849.1	ESRLNLLQRNLSLFRAIIPPLVSHSPDITILLIVSNPVDILTYVAVKLSGFFSNRVIGSGT	180
XP_003608731.1	ESRLNLLQRNLSLFRAIIPPLARYSPETVLLIVSNPVDVLTYYIAWKLSGFFSNRVIGSGT	180
XP_004516830.1	ESRLNLLQRNLSLFRAIIPPLARYSPHTVLLIVSNPVDVLTYYIAWKLSGFFSNRVIGSGT	180
XP_015961820.1	ESRLNLLQRNLSLFRAIIPPLARYSPQTVLLIVSNPVDVLTYYIAWKLSGFFSNRVIGSGT	180
	*****:::***: *:* * . :**.* * :*****:*. :*****:*****	
XP_020218095.1	NLDSRRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSVALWSSISVGGVPVLSFLEKQEIAYE	240
XP_003549909.1	NLDSRRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSVALWSSISVGGVPVLSFLESQHIQIYE	240
XP_014506104.1	NLDSRRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSVALWSSISVGGVPVLSFLDKQIPIYE	240
XP_017420849.1	NLDSRRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSVALWSSISVGGVPVLSFLDKQIPIYE	240
XP_003608731.1	NLDSRRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSVALWSSISVGGVPVLSFLEKQEIAYE	240
XP_004516830.1	NLDSRRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSVALWSSISVGGVPVLSFLEKQEIAYE	240
XP_015961820.1	NLDSRRFRFLIADHLDVNAQDVQAFIVGEHGDSVALWSSISVGGVPVLSFLEKQEIAYE	240
	***** *****:***** *****:*****:*. :*****:*. * *	
XP_020218095.1	REMLEKIHKEVIQGAIVEISLKGYSVAIGSVANLARSILRNQRRVHPVSLAKGFYGI	300
XP_003549909.1	KETLENIHKSVIDGAYEVIRLKGYSVAIGSVANLARSIFRDQRKIHPVSLAKGFYGI	300
XP_014506104.1	KETLENIHKSVIDGAYEVIRLKGYSVAIGSVANLARSILRDQRKIHPVSLAKGFYGI	300
XP_017420849.1	KETLENIHKSVIDGAYEVIRLKGYSVAIGSVANLARSILRDQRKIHPVSLAKGFYGI	300
XP_003608731.1	KETLENIHKSVIDGAYEVIRLKGYSVAIGSVANLARSIFRDQRKIHPVSLAKGFYGI	300
XP_004516830.1	KETLENIHKSVIDGAYEVIRLKGYSVAIGSVANLARSIFRDQRKIHPVSLAKGFYGI	300
XP_015961820.1	KETLENIHKSVIDGAYEVIRLKGYSVAIGSVANLARSIFRDQRKIHPVSLAKGFYGI	300
	*: *:* ** * : :***** *****:*****:*****:*****:*****	
XP_020218095.1	DGGEVFLSLFAQLGRGGVLTGVTNVHLTEEESQRLRDSANTILEVQNLAI	350
XP_003549909.1	DG-EVFLSLPALVGRGGVLTGVTNVHLNEETQRLKDSAKTIEHVQTLGI	349
XP_014506104.1	DG-EVFLSLFAQLGRGGVLTGVTNVHLNEETQRLVDSAKTILEVQTLGI	349
XP_017420849.1	DG-EVFLSLFAQLGRGGVLTGVTNVHLNEETQRLVDSAKTILDMQTLGI	349
XP_003608731.1	GDVEVFLSLFAQLGRGGVLTGVTNVHMKKEEQRLRDSAKTILEVQTLGI	350
XP_004516830.1	GDVEVFLSLFAQLGRGGVLTGVTNVHMKKEEQRLRDSAKTILEVQTLGL	350
XP_015961820.1	GN-EVFLSLFAQLGRGGVLTGVTNVHLNEELQRLRDSAKTILEVQTLGL	349
	.. ***** :*****. :*****. * * * * * : * * * * *	

Рис. 7. Выравнивание аминокислотных последовательностей Ldh представителей семейства Бобовые. Желтым выделены участки, подходящие для подбора вырожденных праймеров

### Количественные показатели транскриптов генов исследуемых ферментов

Был секвенирован участок гена *ldh* гороха. Для секвенирования использовались два прямых и три обратных праймера. 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. 8 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. 8 а).

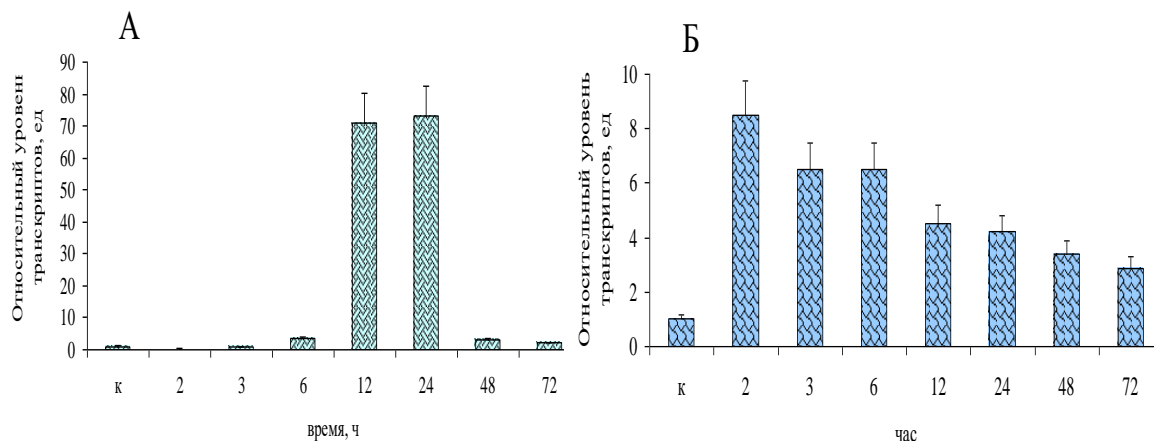


Рис. 8. Относительный уровень транскриптов гена *ldh* в листьях (А) и корнях (Б) гороха, инкубированного в гипоксических условиях

Для фермента лактатдегидрогеназы из листьев и из корней сорго характерно увеличение транскрипции их генов в гипоксических условиях (рис. 9), что может быть связано с участием ЛДГ в интенсифицирующемся при этих условиях гликолизе. Стоит также отметить, что несмотря на общую динамику, разница в изменении экспрессии значительна. Так, уровень относительных транскриптов в листьях сорго возрастает в 8.4 раза по сравнению с контролем, а в корнях – в 7,7 раз. При этом экспрессия в корнях нарастала стремительнее, и уже через 6 ч была выше в три раза по сравнению с контролем. В то же время, в листьях сорго спустя 6 ч с момента инкубации уровень относительных транскриптов возростал лишь в 1,8 раз. Тем не менее, в листьях сорго рост экспрессии наблюдался на протяжении 24 ч, и далее к 96 ч инкубации несколько шел на спад. Хотя в корнях понижение уровня транскриптов наблюдалось уже после 24 ч гипоксического воздействия.

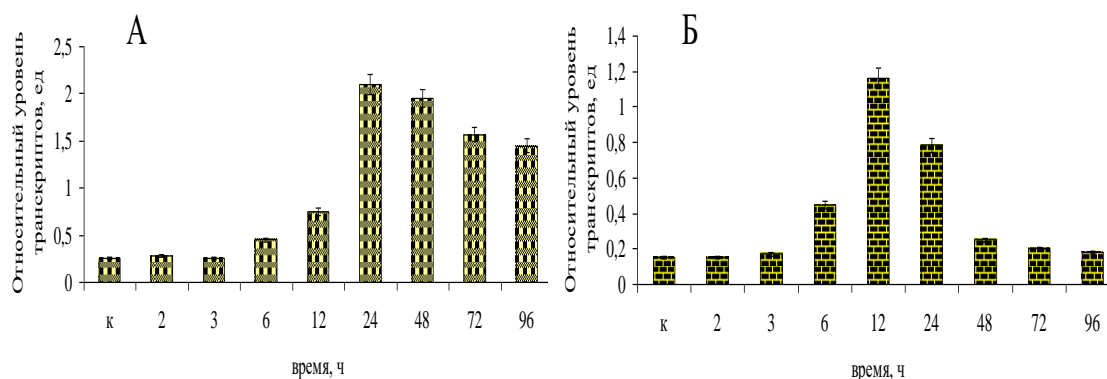


Рис. 9. Относительный уровень транскриптов гена *ldh* в листьях (А) и корнях (Б) сорго, инкубированного в гипоксических условиях

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. 10).

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 после прохождения 24 часов 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.

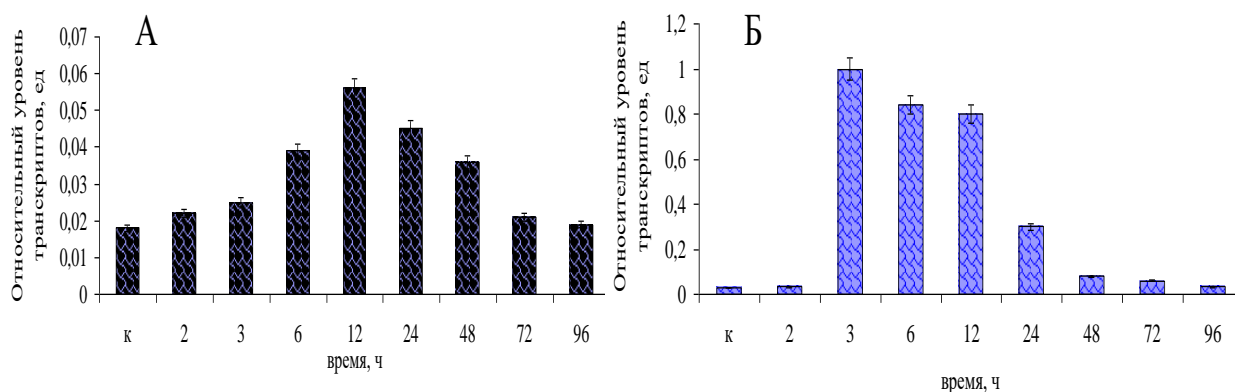


Рис. 10. Относительный уровень транскриптов гена *glo* в листьях (А) и корнях (Б) гороха, после возобновления аэрации

Влияние перехода от гипоксических условий к нормоксическим оказывает четкое действие на активность ЛЦО-подобной изоформы гликолатоксидазы в листьях и корнях растений сорго (рис. 11). 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.

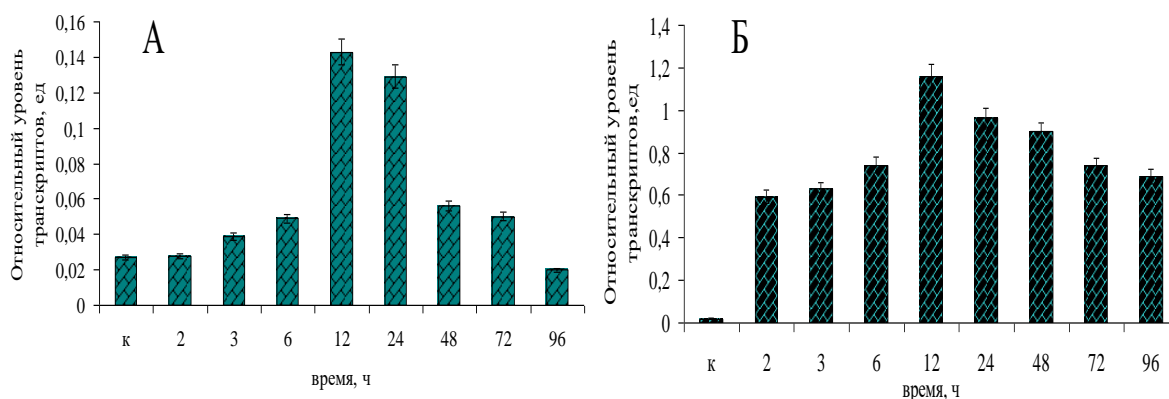


Рис. 11. Относительный уровень транскриптов гена *glo* в листьях (А) и корнях (Б) сорго, после возобновления аэрации

## 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 (Jain V. et al., 2010). Известно, что скорость работы цикла трикарбоновых кислот снижается и происходит интенсификация роли гликолиза. Немаловажно, что при затоплении аналогичные процессы происходят и в листьях растений, ввиду механического закрытия устьиц (Jain V. et al., 2010). При гипоксии у растений с  $C_3$  типом фотосинтеза быстро активируется работа фермента лактатдегидрогеназы (Войцеховская С.А с соавт., 2015). В нашей работе показано, что фермент способен восстанавливать малейшие порции пирувата, обладая высоким сродством к этому интермедиату. Этот процесс связан с реокислением гликолитического НАДН, что 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 (Engqvist M.K. et al., 2015). 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 выше, в сравнении с функционированием его же у растений гороха. В работе Энгвиста с соотр. (Engqvist M.K. et al., 2015) была продемонстрирована роль ЛЦО-подобной гликолатоксидазы у растений *Arabidopsis th.*: фермент способствовал поддержанию низких уровней L-лактата (после его образования) при переходе к нормальным условиям по содержанию кислорода (Engqvist M.K. et al., 2015).

Для того чтобы изучить физико-химические и каталитические свойства исследуемых ферментов были разработаны эффективные схемы очисток, включающие 4-5 стадий. Были получены электрофоретически гомогенные препараты с высокими показателями удельной активности, степени очистки и выхода. На данном этапе работы представляют интерес полученные нами показатели сродства очищенной ЛЦО-подобной гликолатоксидазы из исследуемых объектов к L-лактату. В работе авторов (Engqvist M.K.M et al., 2015) 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. ЛЦО-подобная изоформа гликолатоксидазы арабидопсиса имеет высокие показатели аффинности 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 (Engqvist M.K. et al., 2015).

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 (Tegoni M. et al, 1998), также у проростков риса – молекулярная масса целого фермента составила 160 кДа, с молекулярной массой субъединиц 38 и 39 кДа (Shwarte S., Bauwe H., 2007).

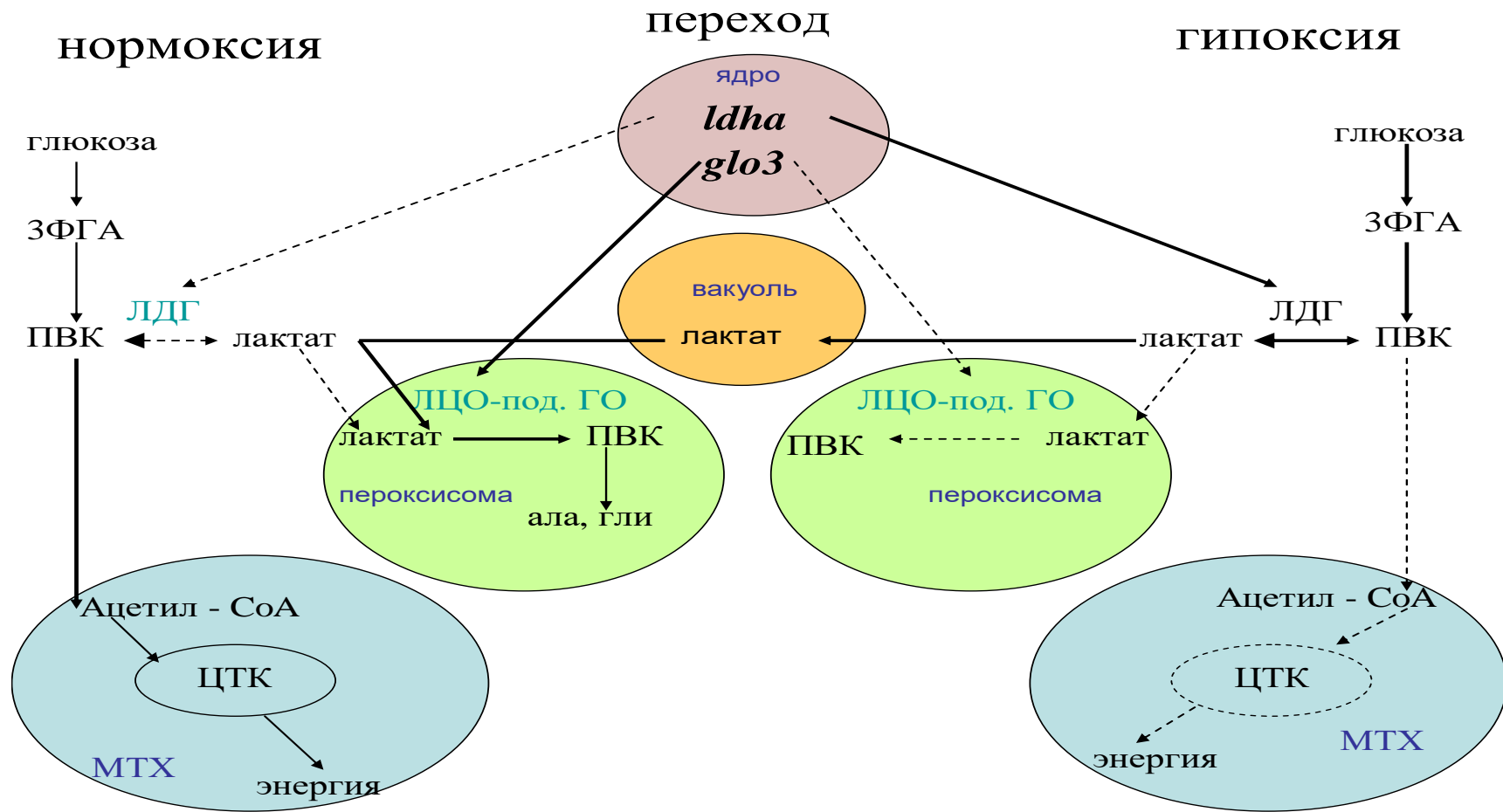
В ходе работы по изучению молекулярных аспектов функционирования фермента лактатдегидрогеназы, были проанализированы базы данных NCBI и KEGG, проведено выравнивание аминокислотных последовательностей семейства Fabaceae, подобраны вырожденные праймеры. Был секвенирован участок гена *ldh* гороха. С помощью специфических праймеров определено изменение уровня мРНК гена *ldh* в ответ на гипоксию в корнях и листьях гороха. Так, уровень экспрессии *ldh* 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 (Engqvist M.K. et al., 2015).

Результатом проведенной работы явилось получение данных о возможной трансформации группы ферментов оксидаз в процессе перехода от анаэробного фотосинтеза к аэробному 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. 11. 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 НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Епринцев А.Т. Применение ионнообменной 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., **Комарова Н.Р.**, Фалалеева М.И., Ковалёва Е.В., Миткевич А.В. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2019. – Т.19. №1. С. 916-923
2. Епринцев А.Т., **Комарова Н.Р.**, Фалалеева М.И.. Физико-химические и регуляторные свойства лактатдегидрогеназы из листьев гороха (*Pisum sativum* L.) в условиях дефицита кислорода / Прикладная биохимия и микробиология // – 2019. – №55 (2). С. 159-164
3. Епринцев А. Т.. Выделение и очистка лактатдегидрогеназы из корней гороха (*Pisum sativum* L.) при гипоксии и исследование ее регуляторных свойств / Епринцев А. Т., **Комарова Н. Р.**, Фалалеева М. И., Белоглазова А.А. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т.55. №5. С. 544-548
4. Фалалеева М.И. Особенности функционирования дегидрогеназ лактата и малата в хлорелле в разных условиях / Фалалеева М.И., **Комарова Н.Р.**, Миткевич А.В., Ковалёва Е.В., Епринцев А.Т. // Вестник ВГУ: серия биология, химия, фармация. – 2019. – №2. С. 48-53
5. Епринцев А.Т. Особенности функционирования ферментов молочно-кислого и спиртового брожения в листьях сорго и гороха в условиях дефицита кислорода / Епринцев А.Т., **Комарова Н.Р.**, Фалалеева М.И., Ларченков В.М. // Известия РАН. Сер. биол. – 2018. – №5. С. 469-476
6. **Комарова Н.Р.** Функционирование лактатдегидрогеназной ферментативной системы в листьях и корнях гороха (*Pisum sativum* L.) при гипоксии / Комарова Н.Р., Белоглазова А.А., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // IX Съезд ОФР, (Казань, 18-24 сентября 2019 г.): тезисы докладов. – 2019. С. 222
7. **Комарова Н.Р.** Роль лактатдегидрогеназы и ЛЦО-подобной гликолатоксидазы в адаптивной реакции клеточного метаболизма в растениях при затоплении их корневой системы / Комарова Н.Р., Сорокина Т.В., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // Сборник материалов (в двух частях) Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 10-15 июля 2018). – 2018. – С. 423-426
8. **Комарова Н.Р.** Динамика активности ключевых ферментов метаболизма

пирувата в листьях гороха и сорго. / Комарова Н.Р., Морозова Ю.А., Сорокина Т.В., Брыкина Д.Е., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрег.сб.науч. работ. – 2017. – Вып. 19. С.120-128

9. **Комарова Н.Р.** Очистка гликолатоксидазы, подобной L-лактат цитохром-с оксидоредуктазе дрожжей, из корней гороха (*Pisum sativum* L.), экспонированных в гипоксических условиях / Комарова Н.Р., Сорокина Т.В., Фалалеева М.И., Епринцев А.Т. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрег.сб.науч.работ. – 2018. – Вып. 20. С. 121-127

10. **Комарова Н.Р.**, Ларченков В.М., Сорокина Т.В. Активация L-лактат:цитохром с-оксидоредуктазы и лактатдегидрогеназы в растениях гороха *Pisum sativum* L., помещенных в условия гипоксии путем затопления / Годичное собрание ОФР (Крым,18-24 сентября 2017года) // Материалы конференции "Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты". – 2017. – С. 198

11. Ларченков В.М. Очистка L-лактат: цитохром с-оксидоредуктазы из проростков гороха *Pisum sativum* / Ларченков В.М., **Комарова Н.Р.**, Ковалёва Е.В., Миткевич А.В. // «Биология – наука XXI века»: 21-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (17 - 21 апреля 2017 г., Пущино). Сборник тезисов. – 2017. С. 136

12. Ларченков В.М. Активность лактатдегидрогеназы у галоалкалофильной бактерии *Rhodovulum steppense* штамм а-20s при различных типах питания / Ларченков В.М., Ахмед А.Х., **Комарова Н.Р.**, Колесникова Н.В., Сорокина Т.В. // «Биология – наука XXI века»: 19-я международная Пущинская школа-конференция молодых учёных (Пущино, 20-24 апреля 2015 года). Сборник тезисов. – 2015. С. 137

№ 1-4 опубликованы в журналах, входящих в перечень списка ВАК.