

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

На правах рукописи

Анохина Галина Борисовна

АНАЛИЗ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ НА
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА 2-ОКСОГЛУТАРАТА
В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ

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

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	7
ВВЕДЕНИЕ.....	9
Глава I . ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Общая характеристика ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ .	16
1.1.1 Структурно-функциональные особенности 2ОГДК	16
1.1.1.1 Структурно-функциональные особенности функционирования 2- оксоглутаратдегидрогеназы	19
1.1.1.2. Структура дигидролипоамидсукцинилтрансферазы и ее роль в клетке	20
1.1.1.3 Структурно- функциональные особенности липоамиддегидрогеназы	21
1.1.1.4. Биохимические аспекты функционирования 2ОГДК.....	22
1.1.1.5. Молекулярно-генетические особенности функционирования 2ОГДК	24
1.1.2. Структурно-функциональная характеристика ГДГ	28
1.1.2.1. Кинетические свойства ГДГ	28
1.1.2.2. Молекулярно-генетические аспекты функционирования ГДГ	32
1.1.3. Структурно-функциональная характеристика ОД	33
1.2. Роль 2ОГ в адаптивной реакции клеточного метаболизма к действию различных стрессовых факторов	36
1.2.1. Влияние стрессоров различной природы на метаболизм растений	40
1.2.1.1. Влияние солевого стресса на метаболизм растений.....	42
1.2.1.2. Влияние светового режима на метаболизм растений.....	51
1.2.1.3. Влияние низких концентраций кислорода на метаболизм растительной клетки	56
Глава II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	62
2.1 ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ.....	62
2.2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	62
2.2.1. Объекты исследования	62
2.2.2 Методы исследования.....	63
2.2.2.1 Постановка эксперимента по индукции солевого стресса.....	63
2.2.2.2 Постановка эксперимента по влиянию света различных длин волн ...	63

2.2.2.3	Постановка эксперимента по действию гипоксии.....	64
2.2.2.4	Обработка рутением красным и ЭГТА	64
2.2.2.5.	Выделение энзимов.....	64
2.2.2.5.1.	Изоплотностное центрифугирование.....	64
2.2.2.5.2	Выделение митохондрий.....	65
2.2.2.6.	Определение активности энзимов	66
2.2.2.6.1.	Определение активности 2ОГДК	66
2.2.2.6.2.	Определение активности ГДГ	66
2.2.2.6.3.	Определение активности ОД	67
2.2.2.7.	Схема очистки ГДГ	67
2.2.2.8.	Определение концентрации белка.....	68
2.2.2.9.	Электрофоретическое исследование белков	68
2.2.2.9.1.	Неденатурирующий электрофорез в ПААГ	68
2.2.2.9.2.	Денатурирующий электрофорез в ПААГ	68
2.2.2.9.3.	Окрашивание белков на гомогенность	69
2.2.2.9.4.	Специфическое проявление белков	69
2.2.2.9.4.1.	Специфическое проявление 2ОГДГ	69
2.2.2.9.4.2.	Специфическое проявление ГДГ	69
2.2.2.10.	Определение молекулярной массы нативного белка	69
2.2.2.11.	Исследование кинетических характеристик регуляции активности ферментов.....	70
2.2.2.13.	Количественный анализ пролина	70
2.2.2.14.	Выделение ДНК.....	70
2.2.2.15.	Конверсия ДНК бисульфитом натрия.....	71
2.2.2.16.	Выделение РНК	71
2.2.2.17.	Электрофорез в агарозном геле	71
2.2.2.18.	Реакция обратной транскрипции.....	72
2.2.2.19.	Полимеразная цепная реакция.....	72
2.2.2.20.	Анализ промоторной области генов на наличие CpG-островков	72
2.2.2.21.	Проведение метил-специфичной ПЦР.....	73
2.2.2. 22.	Бисульфитное секвенирование	73

2.2.2.23. Статистическая обработка данных.....	74
Глава II. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	75
1. Влияние солевого стресса на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ	75
1. 1. Изменение содержание пролина при действии солевого стресса.....	75
1.2. Влияние солевого стресса на функционирование 2ОГДК	76
1.2.1. Субклеточная локализация 2ОГДК	76
1.2.2. Изоферментный состав 2ОГДК	77
1.2.3 Изменение активности 2ОГДК	77
1.2.4.Изменение экспрессионной активности генов ферментов 2ОГДК	79
1. 2. 2. 4. 1. Изменение экспрессии генов 2ОГДГ	79
1. 2. 2.4.1.1. Анализ промоторов генов 2ОГДГ на наличие CpG-островков	81
1. 2. 2.4.1.2. Динамика изменения степени метилирования отдельных CpG- динуклеотидов в составе промоторов	83
1. 2.2.4.2. Изменение экспрессии генов ДЛСТ	84
1. 2.2.4.3. Изменение экспрессии генов ДЛД.....	85
1. 3. Влияние солевого стресса на функционирование ГДГ	87
1.3.1. Субклеточная локализация ГДГ	87
1.3.2. Очистка ГДГ	88
1.3.3. Определение рН- оптимума работы полученных препаратов ГДГ	91
1.3.4. Определение сродства полученных препаратов ГДГ к субстратам	92
1.3.5. Влияние солевого стресса на каталитическую активность ГДГ	93
1.3.6. Изоферментный состав ГДГ в условиях солевого стресса	94
1.3.7. Изменение экспрессионной активности генов ГДГ в условиях действия солевого стресса	95
1.4. Влияние солевого стресса на функционирование ССАДГ	98
1.4.1. Изменение экспрессионной активностью генов ССАДГ.....	98
1.5. Влияние солевого стресса на функционирование ОД.....	100
1. 5. 1. Субклеточная локализация ОД.....	101
1.5.2. Изменение активности ОД в листьях кукурузы в условиях действия солевого стресса	101

1.5.3. Влияние солевого стресса на экспрессию генов ОД	102
1.6. Изменения метаболизма 2ОГ в условиях солевого стресса.....	106
Влияние света различного спектрального состава на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ	107
2.1. Влияние света различного спектрального состава на функционирование 2ОГДК	107
2.1.1. Влияние света различного спектрального состава на активность 2ОГДК	107
2.1.1. Влияние света различной длины волны на экспрессию 2ОГДГ	109
2.1.1.1. Влияние различной длины волны на экспрессию генов 2ОГДГ в листьях кукурузы	109
2.1.1.2. Влияние света различной длины волны на экспрессию генов 2ОГДГ <i>A. thaliana</i>	110
2.1.2. Изменение степени метилирования CpG- динуклеотидов в составе промоторов генов	113
2.2. Влияние света различного спектрального состава на функционирование ГДГ	115
2.2.1. Влияние света различного спектрального состава на активность ГДГ	115
2.2.2. Влияние света различного спектрального состава на изоферментный состав ГДГ	118
2.2.3. Влияние света различного спектрального состава на транскрипцию генов ГДГ	118
2.2.4. Влияние света различного спектрального состава на функционирование ГДГ при обработке рутением красным и ЭГТА	120
2.3. Влияние света различной длины волны на функционирование ССАДГ	124
2.3.1. Влияние света различной длины волны на транскрипцию генов ССАДГ	124
2.4. Влияние света различной длины волны на функционирование ОД.....	126
2.4.1. Влияние света различной длины волны на каталитическую активность ОД	126
2.4.2. Влияние светового спектра на транскрипцию генов ОД	127

2.5. Изменения метаболизма 2ОГ при облучении светом различного спектрального состава	128
3. Влияние гипоксии на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ	129
3.1. Влияние гипоксии на функционирование 2ОГДК	129
3.1.1. Влияние гипоксии на активность 2ОГДК	129
3.1.2. Влияние гипоксии на транскрипцию генов 2ОГДГ	130
3.2. Влияние гипоксии на функционирование ГДГ	132
3.2.1. Влияние гипоксии на активность ГДГ	132
3.2.2. Влияние гипоксии на экспрессию генов ГДГ	133
3.3. Влияние гипоксии на функционирование ССАДГ	136
3.3.1. Влияние гипоксии на экспрессию генов ССАДГ	137
3.4. Влияние гипоксии на функционирование ОД	139
3.4.1. Влияние гипоксии на активность ОД	139
3.4.2. Влияние гипоксии на экспрессию генов ОД	139
3.5. Изменения метаболизма 2ОГ в условиях дефицита кислорода	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
ВЫВОДЫ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	147

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-ОГ – 2-оксоглутарат;

R_f – электрофоретическая подвижность белка;

АБК – абсцизовая кислота;

АДФ – аденозиндифосфат;

АРБЦ – аминокислоты с разветвленными боковыми цепями;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АФК – активные формы кислорода;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

БФС – бромфеноловый синий;

ГАД – глутаматкарбоксилаза;

ГАМК – γ -Аминомасляная кислота;

ГАМК-Т - ГАМК-трансаминаза;

ГМК – γ -гидроксимасляная кислота;

ГОГАТ – глутамин-2-оксоглутаратаминотрансфераза;

ГС – глутаматсинтаза;

ГТФ – гуанозинтрифосфат;

ДКС – дальний красный свет;

ДТТ – дитиотреитол;

КС – красный свет;

мРНК – матричная РНК;

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленный);

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный);

НСТ- нитросиний тетразолий;

ОЦ – оксидцитрат, гидроксидцитрат;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПВП- Поливинилпирролидон;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СДС – додецилсульфат натрия;

СС – синий свет;

ССА – сукциниловый семиальдегид или полуальдегид янтарной кислоты;

ТДФ – тиаминдифосфат;

ТРИС - трис(гидроксиметил)аминометан;

ФАД – флавинадениннуклеотид;

ФМС – феназинметасульфат;

ЦТАБ - цетилтриметиламмония бромид;

ЦТК –цикл трикарбоновых кислот;

ЭГТА- этиленгуанинтетраацетат;

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;

ЭТЦ – электрон транспортная цепь;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время биологические науки большое внимание уделяют исследованиям адаптивных процессов в клетках как животных, так и растений. Изменения условий среды, в которых обитает тот или иной организм, выход за границы оптимальных значений показателей приводит к ответу на различных уровнях организации живого: начиная от ответа на уровне генома и заканчивая изменением численности популяции. Стоит отметить, что абиотические стрессовые факторы всегда вызывали интерес среди исследователей, так как они являются естественными и, как правило, регулярными стрессорами, воздействиям которых подвергаются, в том числе, и растительные организмы. В виду особенностей образа жизни, растения наиболее сильно подвержены влиянию абиотических стрессов: невозможность смены места обитания при засолении, затоплении, засухе и т.п. привела к появлению действенных, четко скоординированных и узко-регулируемых механизмов адаптации к изменяющимся условиям среды.

Метаболические пути обеспечивают клетку энергией и субстратами для осуществления различных биохимических процессов. Регуляция работы ферментов ключевых метаболических путей способствует быстрому клеточному ответу на любое внешнее воздействие, в том числе и на действие стрессовых факторов.

Процесс дыхания представляет собой совокупность четырёх взаимозависимых и взаимодополняющих друг друга метаболических процессов: гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, электрон-транспортная цепь митохондрий и собственно фосфорилирование, осуществляемое за счет процессов окисления внутри митохондриальной мембраны[186]. Синтез энергии в виде АТФ непосредственно связан с митохондриями, также как и синтез многих других соединений, таких как кофакторы, витамины, аминокислоты, а также различные метаболиты, осуществляющие важную роль в росте и развитии клетки, а также обеспечивающие передачу

различных сигналов как в клетку, так и в ядро[29, 135]. Метаболизм митохондрий обеспечивает клетку энергией и сопряжен с процессами дыхания, ассимиляции азота, окислительно-восстановительным балансом, а у растений еще и с фотосинтезом[135]. Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) -центральное звено дыхательного метаболизма, скорость которого лимитирует 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (2ОГДК). Таким образом происходит регуляция потока всего 2-оксоглутарата (2ОГ) [28; 29; 30]. 2ОГ- важнейший интермедиат, который используется для синтеза первичной аминокислоты – глутамата, в результате чего происходит перенос аминогрупп и ассимиляция NH_3 . Из всех соединений, поставляющих углеродные скелеты для биосинтеза аминокислот, 2-оксоглутаровая кислота играет главную роль, так как является наиболее реакционно-способным промежуточным акцептором NH_2 -групп [92, 153]. Предполагается, что 2-ОГ играет роль регулятора цитозольной пируваткиназы и фосфоенолпируваткарбоксилазы, а также митохондриальной цитратсинтазы и альтернативной оксидазы [87]. Ранее были высказаны предположения о том, что 2-ОГ играет роль сигнального метаболита у растений [38]. Шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) - особый обходной путь ЦТК, в некотором смысле, резервный[161], который активируется в тех случаях, когда клетке необходим дополнительный приток энергии[104]. Этот метаболический путь, осуществляется посредством функционирования трёх энзимов, первый из которых – глутаматдекарбоксилаза (ГАД, КФ 4.1.1.15), катализирует преобразование глутамата в γ -аминомасляную кислоту с поглощением протона и высвобождением CO_2 . Впоследствии, ГАМК трансаминируется ферментом ГАМК-трансаминазой (ГАМК-Т, КФ 2.6.1.19) в сукциниловый семиальдегид (ССА), который затем преобразуется в сукцинат под действием сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы (ССАДГ; КФ 1.2.1.24) [176]. Сукцинат поступает в цикл трикарбоновых кислот[161]. По сути, ГАМК- шунт это маленькая страховка клетки на случай непредвиденных обстоятельств. Именно его наличие в клетке говорит о том, насколько скоординирована и

функционально организована клеточная регуляция и сигнализация на случай изменения внешних условий[176]

Связь между ЦТК и ГАМК-шунтом осуществляется посредством функционирования глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.3), которая обеспечивает либо синтез 2ОГ из глутамата, либо его аминирование[113].

Известно, что в некоторых растениях, таких, например, как *Hibiscus* и *Garcinia*, накапливается оксцитрат (ОЦ), роль которого в растительной клетке до сих пор практически не изучена. Оставался неясным вопрос, с какой целью в растительных клетках происходит его накопление. Ранее была показана возможность метаболизации ОЦ до 2ОГ с помощью оксцитратдегидратазы декарбоксилирующей (ОД, КФ 4.2.1.9)[170; 6]. Однако данный фермент в основном изучался с точки зрения катализа реакции биосинтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями [148]. Более того, роль ОЦ, как источника 2ОГ для поддержания некоторых биохимических процессов, не установлена.

Несмотря на достаточно большой объем информации о механизмах адаптации клеточного метаболизма к стрессовым факторам, всё еще остается неясной роль 2ОГ и ферментов, участвующих в его метаболизации, в этом процессе. Также до конца не изучены изменения в катаболических и анаболических путях клеточного метаболизма. В связи с тем, что 2ОГ-ключевой интермедиат и метаболизма углерода, и метаболизма азота, целесообразным представляется исследовать особенности функционирования 2ОГДК, ГДГ, ОД, принимающих участие в метаболизме 2-оксоглутаровой кислоты в стрессовых условиях [32].

Цель и задачи. Целью работы являлось изучение физиолого-биохимических аспектов ферментативной регуляции метаболизма 2-оксоглутарата в листьях некоторых растений С3 и С4 типа в условиях солевого стресса, гипоксии, а также при облучении светом различного

спектрального состава. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить субклеточную локализацию энзимов, метаболизирующих 2-оксоглутаровую кислоту, а также изменения их изоферментного состава в стрессовых условиях;
2. Получить высокоочищенные препараты ГДГ из СЗ (*Triticum aestivum* L.) и С4 (*Zea mays* L.) растений и провести сравнительный анализ некоторых кинетических характеристик полученных белков;
3. Исследовать биохимические и физиологические аспекты функционирования 2ОГДК, ГДГ, ОД в растениях (*Zea mays* L., *Beta vulgaris* L., *Arabidopsis thaliana* L.) *in vivo* в условиях действия солевого стресса, гипоксии и при облучении светом различного спектрального состава;
4. Выявить роль процесса метилирования CpG-динуклеотидов промотора в регуляции транскрипции генов, кодирующих 2ОГДГ, ГДГ, ОД в условиях действия различных стрессовых факторов.

Научная новизна и значимость работы. Проведенное исследование динамики активности 2ОГДК и ГДГ в стрессовых условиях позволило выявить изменения в клеточном метаболизме заключающиеся в индукции «стрессового пути». Показано, что регуляция функционирования энзимов осуществляется генетически. Впервые исследовано влияние различных стрессовых факторов на активность ОД по реакции образования 2ОГ. Получение высокоочищенных препаратов изоферментов ГДГ из листьев кукурузы и пшеницы, дало возможность выявить отличия в их кинетических характеристиках. Обнаружено участие фитохромной и криптохромной систем в трансдукции светового сигнала к генам исследуемых белков. Выявлена важная роль Ca^{2+} как мессенджера фитохромного сигнала к генам семейства *GDH*. Анализ паттерна экспрессии генов *DHAD1* и *DHAD2* позволил определить роль каждой изоформы ОД: ген *DHAD1* кодирует полипептид, катализирующий протекание реакции окисления ОЦ до 2ОГ, в то время как

изофермент, кодируемый геном *DHAD2*, участвует в биосинтезе аминокислот с разветвленными боковыми цепями. Анализ нуклеотидной последовательности промоторов генов *OGDH1*, *OGDH3*, *GDH1*, *GDH2*, *DHAD1*, *DHAD2* выявил в составе некоторых из них CpG-островки. Впервые установлено, что функционирование 2ОГДК и ГДГ в условиях засоления и гипоксического стресса регулируется на эпигенетическом уровне через изменение метильного статуса CG-динуклеотидов генов *OGDH1*, *OGDH3*, *GDH1*, *GDH2*. Выявленное увеличение транскрипции гена *DHAD2* при солевом стрессе также сопряжено со снижением степени метилирования CG-динуклеотидов. Экспрессия гена *DHAD1* ОД регулируется путем метилирования/деметиления CpG-нуклеотидов его промотора при изменении освещенности листьев кукурузы и при гипоксии.

Практическая значимость. Результаты исследования могут иметь значение в области фундаментальной науки, для понимания процессов регуляции клеточного метаболизма при адаптации растительного организма к внешним факторам.

Выявленный характер регуляции работы ферментов может быть использован при создании генно-модифицированных линий растений, обладающих повышенной продуктивностью, урожайностью, и устойчивых к действию различных стрессоров.

Адаптированная методика выделения и очистки ГДГ может служить для получения высокоочищенных и гомогенных препаратов из растений, кроме того, для проведения вестерн-блоттинга при создании поликлональных и моноклональных антител, а также в качестве вспомогательного фермента в биохимических реакциях.

Разработанные праймеры для МС-ПЦР и бисульфитного секвенирования могут быть использованы при исследовании эпигенетических аспектов регуляции энзимов.

Модифицированная методика выделения ОД и определения её активности могут применяться в научных исследованиях в качестве метода определения

активности изофермента дегидратазы дигидроксикислот, который в хлоропластах обеспечивает превращение оксидитрата в 2-оксоглутарат.

Данные, представленные в диссертационной работе, будут использоваться в образовательном процессе при чтении курсов лекций по биохимии, физиологии растений, спецкурсов, спецпрактикумов.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлена хлоропластная локализация изоферментов ОД. Показано значение изоферментов ОД в протекании реакции синтеза 2ОГ за счёт экспрессии гена *DHAD1* и его метаболизации для образования аминокислот с разветвленными боковыми цепями за счёт синтеза полипептида, кодируемого геном *DHAD2*.
2. Изменения в функционировании 2ОГДК, ГДГ и ОД в различных условиях обусловлены дифференцировкой экспрессии их генов, при этом ключевую роль в перераспределении потока 2ОГ играет ГДГ. Солевой стресс и гипоксия вызывают индукцию пути «стрессового ответа». Регуляция в этом случае осуществляется на биохимическом, генетическом и эпигенетическом уровнях.
3. Гипоксия ингибирует активность 2ОГДК и активирует функционирование ГДГ. Регуляция активности исследуемых ферментов при дефиците кислорода обусловлена изменением экспрессии их генов (*OGDH1*, *OGDH3*, *GDH1*, *GDH2*, *DHAD1*, *DHAD2*).
4. Белый свет ингибирует функционирование 2ОГДК и ГДГ, разнонаправленно воздействуя на активность изоферментов ОД. Трансдукция светового сигнала осуществляется с участием фитохрома А, криптохромов.
5. Метилирование CpG-динуклеотидов в составе промотора играет ключевую роль в регуляции транскрипции генов, кодирующих 2ОГДК, ГДГ и ОД при адаптации растительной клетки к действию стрессовых факторов.

Апробация работы. Результаты прошли апробацию на общероссийских и международных конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2019, 2021); 9-й

Съезд общества физиологов растений России, (Казань, 18-24 сентября 2019г.); Годичное собрание Общества физиологов растений России: Всероссийская научная конференция с международным участием и школой молодых ученых (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.); Межрегиональных конференциях, посвященных памяти А.А. Землянухина «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021); ежегодных Научных сессиях отчетных конференций студентов (2017) и преподавателей и сотрудников (2020) ВГУ.

Публикации. Основные результаты работы изложены в 18 публикациях, из них 8 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 6 из них индексируются в Web of Science и Scopus.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материалы изложены на 169 страницах основного текста, диссертация включает в себя 74 рисунка, 14 таблиц и 203 источника литературы.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ

1.1.1 Структурно-функциональные особенности 2ОГДК

Клетки растений уникальны тем, что они содержат четыре вида комплексов дегидрогеназ α -кетокислот: пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК, КФ 1.2.1.104), 2-оксоглутарат дегидрогеназный комплекс (2ОГДК, КФ 1.2.1.105) и комплекс дегидрогеназ α -кетокислот с разветвленной цепью (КФ 1.2.1.25). Все комплексы включают несколько копий трех компонентов: 2-оксоглутаратдегидрогеназы (или 2-оксоглутаратдекарбоксилазы), дигидролипоилацилтрансферазы и дигидролипоилдегидрогеназы [138].

2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (2-ОГДК, КФ 1.2.4.2), являясь участником цикла трикарбоновых кислот, осуществляет окисление 2-оксоглутарата (2-ОГ) в сукцинил-КоА одновременно восстанавливая НАД⁺ до НАДН (Рис. 1) [146]. 2-ОГДК играет важную роль в метаболизме растений, катализируя, во-первых, лимитирующий этап митохондриального дыхания, а во-вторых, является ключевым участником в углерод-азотных взаимодействиях [146, 136].

2ОГДК представляет собой мультиферментный комплекс, состоящий из трех каталитически-активных компонентов, которые нередко в зарубежной литературе называют субъединицами, что в некотором смысле, все же не совсем верно. Первый компонент, обозначаемый обычно как E1 – 2-оксоглутаратдегидрогеназа (2ОГДГ, К.Ф. 1.2.4.2.); второй компонент - дигидролипоилсукцинилтрансфераза (ДЛСТ, К.Ф. 2.3.1.61), и третий фермент - участник 2ОГДК - E3, дигидролипоилдегидрогеназа (ДЛД, К.Ф. 1.8.1.4.) [135, 136].

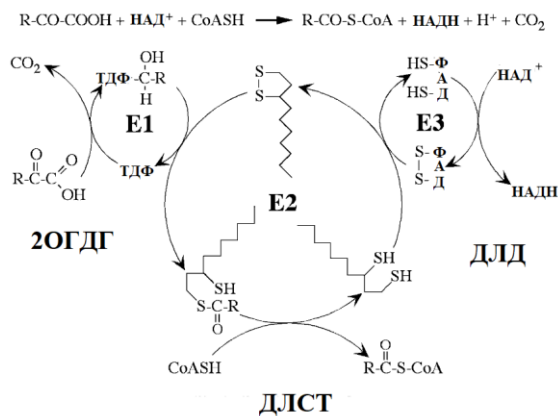


Рис. 1 Общая схема реакции 2ОГДК

Помимо этого, для нормального катализа необходим тиаминдифосфат, Mg^{2+} , липоевая кислота и кофакторы ФАД⁺[43]. Компоненты 2ОГДГ и ДЛД регулируются соответствующими субстратами и эффекторами, включая кооперативные взаимодействия активных сайтов.

2ОГДК, выделенный из митохондрий цветной капусты, активируется 1 мМ АМФ [136, 192]. Связывание АМФ с 2ОГДГ снижает величину константы Михаэлиса по 2-оксоглутарату, тем самым увеличивая сродство фермента к субстрату, а следовательно максимальную скорость реакции [136, 56]. Реакция, катализируемая 2ОГДК, также может регулироваться активностью мтхПДК и цитратсинтазы посредством конкуренции за митохондриальный пул Co-SH [60]. Как и все комплексы дегидрогеназ-кетокислот, 2ОГДК является субстрат-специфическим. Скорость восстановления НАДН за счет работы 2ОГДК в клубнях картофеля с использованием в качестве субстрата пирувата и изовалериата составляет менее 2% от скорости с 2-оксоглутаратом [135, 136]. Структура 2ОГДК млекопитающих имеет молекулярную массу примерно 2 МДа. Гомодимеры 2ОГДГ и ДЛД расположены вокруг 24-мерного ядра ДЛСТ [106]. 2ОГДК из картофеля имеет коэффициент седиментации (S) 25 ± 2 , что соответствует молекулярной массе примерно 1.7 МДа. Согласно данным, полученным методом гель-хроматографии, 2ОГДК значительно меньше, чем мтхПДК [135, 136]. Несмотря на то, что 2ОГДК является наименее изученным из всех

растительных комплексов, сходство молекулярной массы 2ОГДК млекопитающих и растений предполагает сохранение 24-мерной структуры ДЛСТ.

2-ОГДК имеет строго упорядоченное и компактное строение. В пределах структуры комплекса, весьма фиксированной, протекают все химические превращения субстратов. Многочисленные полипептидные цепочки белков закреплены плотно и определенным образом. Следует отметить, что промежуточные продукты, образующиеся в ходе множеств каталитических реакций, в среду не выделяются [162].

Дигидролипоамидсукцинилтрансфераза выполняет каталитическую и структурные функции. Что касается флавопротеиновых компонентов обоих комплексов, то они являются взаимозаменяемыми. Выделенная из пируватдегидрогеназного комплекса липоилдегидрогеназа способна включаться в 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс при реконструкции, и при этом каталитические свойства не нарушаются. Возможна и обратная ситуация. Отмечается, что в качестве субстрата для 2-ОГДК пируват подходит плохо, однако, связанный с комплексом ФАД он восстанавливается полностью. Имеются предположения, что 2-ОГДК может иметь пируватдегидрогеназу (ПДГ) и 2 оксоглутаратдегидрогеназу (2-ОГДГ) в качестве E1 компонента [118]. Расположенные на противоположных сторонах два центра связывания обеспечивают локализацию 2оксоглутаратдегидрогеназного комплекса на внутренней мембране митохондрий. Существует мнение, что метаболон цикла трикарбоновых кислот взаимодействует с мультиферментными комплексами электрон-транспортной цепи [103, 125, 172].

1.1.1.1 Структурно-функциональные особенности функционирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы

Первый компонент 2ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназа (2-ОГДГ, К.Ф. 1.2.4.2), принадлежащая семейству дегидрогеназ, представляет собой гомодимер, катализирующий превращение 2-оксоглутарата в сукцинат семиальдегид. В качестве кофактора в реакции участвует тиаминдифосфат (ТДФ). 2-ОГДГ является холоферментом, а соответственно для его функционирования необходимы ионы магния. Белок, кодируемый геном *oGDH*, локализован в митохондриальном матриксе. Субъединицы гомодимера соединены между собой кислотными остатками, что увеличивает основные свойства димера [202].

Как ранее уже упоминалось, 2ОГДГ является тиамин-зависимым энзимом. В кристаллической структуре 2ОГДГ *E. coli* обнаруживается характерная складка, которая связывает тиаминдифосфат, и которая сходна с $\alpha\beta_2$ гетеротетрамерными 2ОГДГ других мультиферментных комплексов 2-оксокислот, за исключением того, что в 2ОГДГ субъединицы α и β слиты в один полипептид (Рис. 2А). Расширенный сегмент, который связывает α -подобные и β -подобные домены, образует карман, занимаемый АМФ, который распознается специфически. Для 2ОГДГ также характерны N-концевые удлинения центральной складки, которые могут опосредовать взаимодействия с другими компонентами 2ОГДК. Карман активного сайта содержит группу из трех остатков гистидина и одного серина, которые, по видимому, придают субстратную специфичность и способность принимать оксалоацетат из ЦТК. Оксалоацетат подавляет активность 2ОГДГ при физиологических концентрациях, что, по предположениям Франк (Frank, 2007) с соавторами, обеспечивает скоординированную работу ЦТК [76].

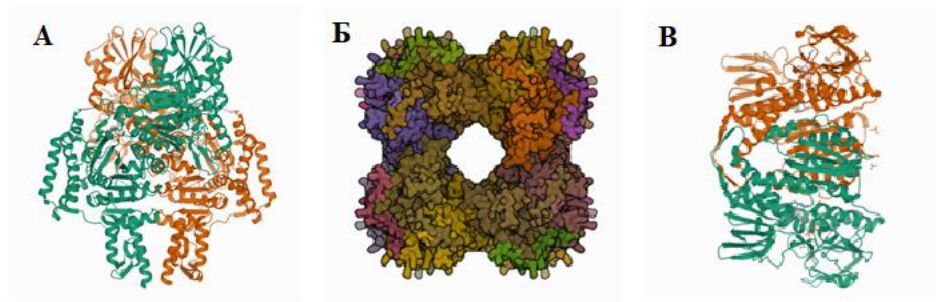


Рис.2 А- Кристаллическая структура 2ОГДГ *Escherichia coli* K-12 [76];
 Б- Кристаллическая структура ДЛСТ *Escherichia coli* K-12 [26];
 В- Кристаллическая структура дигидролипоамиддегидрогеназы из *Thermus thermophilus* HB8 [101].

1.1.1.2. Структура дигидролипоамидсукцинилтрансферазы и ее роль в клетке

Дигидролипоамидсукцинилтрансфераза (ДЛСТ, К.Ф. 2.3.1.61) - фермент семейства трансфераз, специализирующихся на переносе групп, не являющихся аминокислотными; представляющий собой Гомо24мер, то есть состоит из 24 гомологичных субъединиц с 432-точечной групповой симметрией (Рис.2Б). Молекулярная масса одной субъединицы ДЛСТ *Escherichia coli* составляет 26.11 кДа [26]. Катализирует реакция превращение сукцинилаСo-А с образованием Сo-А и фермента N6-(S-сукцинилдигидролипоил) лизин. Дигидролипоамидсукцинилтрансфераза выполняет каталитическую и структурные функции.

Недавнее исследование показало, что ДЛСТ 2ОГДК у *Arabidopsis thaliana* проявляет свойства сукцинат -связывающего белка [118]. Второй компонент 2-ОГДК принимает участие в ЦТК, а также в деградации лизина. Каталитический домен второго компонента 2-ОГДК катализирует перенос сукцинильной группы из S-сукцинилдигидролипоильного фрагмента в кофермент-А[118]. Имеются сведения об участии ДЛСТ в эпигенетической регуляции работы генома за счет обеспечения процесса сукцинилирования в

ядре за счет связывания с лизин-ацетилтрансферазой 2А (КАТ2А) из промоторных областей генов [191].

1.1.1.3 Структурно- функциональные особенности липоамиддегидрогеназы

Липоамиддегидрогеназа (ДЛД, К.Ф. 1.8.1.4.) – фермент, обеспечивающий окисление дигидролипоамида до липоамида. ДЛД является митохондриальным ферментом, играющим важную роль в энергетическом метаболизме эукариот. Фермент представляет собой флавопротеин, который содержит реакционно способный дисульфидный мостик, а также ФАД – кофактор[101;173]. Именно они непосредственно участвуют в катализе. Структурно ДЛД представляет собой сильно связанный между собой гомодимер (Рис. 2В).

Мультиферментная структура 2ОГДК важна для регуляции как физиологических, так и побочных реакций. С 24 копиями второго компонента комплекса - ДЛСТ, образующими ядро 2ОГДК, к которым прикреплены множественные копии периферических компонентов Е1 и Е3 [40], 2ОГДК можно рассматривать как клеточный микрокомпартмент липоевой кислоты. В этом микрокомпартменте не только значительно ускоряется и регулируется общая реакция [43], но также можно строго контролировать ряд побочных реакций многоступенчатого катализа [31]. В частности, стабильность тиольного радикала, обеспечиваемая взаимодействиями липоильных остатков, способствует эффективной регуляции активности 2ОГДК по образованию АФК в соответствии с вышеупомянутой инактивацией 2ОГДГ[18], позволяя 2ОГДК реагировать на интегральный сигнал метаболического состояния клеток, кодируемый соотношением его субстратов и продуктов[31]. Как акцептор тиольных радикалов[31], тиоредоксин предотвращает инактивацию 2ОГДГ, облегчая производство сукцинил-КоА в условиях, при которых комплекс обычно

инактивирован, то есть при низком уровне НАД⁺ или при высоком соотношении НАДН / НАД⁺. Биологическое значение этой регуляции подтверждается независимыми наблюдениями, что наиболее эффективная регуляция митохондриального 2ОГДК обеспечивается узнаваемым митохондриальным тиоредоксином, а ДЛСТ связывает тиоредоксин [40]. Однако, защищая 2ОГДГ от инактивации тиольными радикалами, тиоредоксин увеличивает продукцию АФК с помощью 2ОГДК [43].

Подавление 2ОГДГ у *Solanum lycopersicum* значительно снижает активность 2ОГДК [29, 30]. Вместе эти результаты показывают, что модификации в различных компонентах 2ОГДК могут влиять на активность всего мультиферментного комплекса [118].

1.1.1.4. Биохимические аспекты функционирования 2ОГДК

2ОГДГ, который катализирует начальную, субстрат-специфичную и необратимую стадию общей реакции окисления 2ОГ до сукцинил-СоА, имеет самую низкую каталитическую активность («число оборотов») среди компонентов и, как таковой, ограничивает скорость всего процесса [118]. Было показано, что в процессе, катализируемом 2ОГДГ, реакция является самой медленной [43]. «Ограничивающая скорость» роль 2ОГДГ, очевидно, ответственна за тот факт, что именно на этот компонент влияет большинство регуляторов всего процесса [43] и экспрессия которого часто увеличивается в ответ на нарушения работы 2ОГДК. Помимо этого исследуемый мультиферментный комплекс также катализирует несколько побочных реакций, потенциально имеющих биологическое значение [143]: активность 2ОГДК по продуцированию АФК, когда соотношение субстратов и / или продуктов 2ОГДК способствует избыточному образованию промежуточного дигидролипата, 2ОГДК катализирует окисление последнего молекулярным

кислородом с образованием супероксид-анион-радикала и тиольного радикала комплексно-связанного липоата [118].

Весь комплекс является предметом аллостерической регуляции первого компонента с помощью продукта ДЛД – НАДН. Кроме того, повышенные соотношения НАДН/НАД⁺ и сукцинил-СоА/СоА ингибируют 2-ОГДК, тогда как Са²⁺ и АМФ, а в растительных организмах ГТФ, аллостерически активируют Е1 при субнасыщающих концентрациях 2-ОГ за счет увеличения сродства 2ОГДГ к ее субстрату [178;43]. Ингибирование 2-ОГДК в клубнях картофеля (*Solanum tuberosum*) с помощью специфических ингибиторов приводит к нарушениям как дыхания, так и углеродно-азотных взаимодействий [31].

Ранее уже упоминалось, что 2ОГДК регулируется с помощью различных механизмов, в том числе и аллостерически в ответ на воздействие вторичных мессенджеров и метаболических индикаторов, таких как Са²⁺, АТФ / АДФ(АМФ), тиоловые / дисульфидные группы, НАДН / НАД, ацил-СоА / СоА [43]. Эти механизмы включают белковые медиаторы, такие как рецепторы, связанные с G-белками, участвующими в стимуляции синтеза инозитолфосфата [42; 76] или индуцируемый гипоксией фактор пролилгидроксилазы [46, 130]. Более того, клеточная рецепция соотношения 2ОГ / глутамат, по крайней мере, у нефотосинтезирующих видов, вовлечена в ретроградную передачу сигналов митохондрией ядру, что приводит к адаптации при митохондриальных нарушениях [42]. 2ОГ также сигнализирует о дефиците азота [86, 47, 48] при связывании либо с фактором транскрипции NTсА в цианобактериях [47], либо с фосфорилируемым белком РII (продукт *glnVgene*), обнаруженным у бактерий и растений [86,47]. Наконец, ОГ действует как репрессор чувствительных к катаболизму генов в *E. coli*, частично за счет снижения синтеза цАМФ [58].

Химическое ингибирование 2-ОГДК показало, что этот мультиферментный комплекс играет важную роль в ассимиляции нитратов, а также в метаболизме аминокислот[31]. Более того, антисмысловое

ингибирование 2-ОГДК в томатах (*Solanum lycopersicum*) привело к изменениям в развитии растений, которые были связаны с уменьшением общего количества аминокислот и нитратных пулов[30]. Более того, было замечено, что подавление 2ОГДГ увеличивает поток через ГАМК-шунт, компенсируя снижение продукции сукцината через ЦТК[30]. Суммируя вышеизложенные данные, можно сделать вывод, что реакция, катализируемая 2-ОГДК, представляет собой точку метаболического разветвления, соединяющую ЦТК с ассимиляцией азота, в которой 2ОГ либо превращается 2ОГДК в сукцинил СоА и НАДН, либо обеспечивает углеродные скелеты для ассимиляции азота с помощью работы глутаматдегидрогеназы [86, 136, 54].

Исследования последних десятилетий показали, что эволюционно консервативная реакция деградации 2ОГ необходима для метаболической адаптации. В частности, регуляция функционирования 2ОГДК в стрессовых условиях может иметь важное значение при ответе на механическое повреждение у растений. Таким образом, помимо своей роли в производстве энергии, поток через 2ОГДК значительно влияет на ассимиляцию азота и метаболизм аминокислот, тогда как побочные реакции 2ОГДК, такие как производство АФК и реакция карболигазы, имеют биологические функции в передаче сигналов и использовании глиоксилата [43].

1.1.1.5. Молекулярно-генетические особенности функционирования 2ОГДК

Невероятно важным для исследований механизмов регуляции активности 2ОГДК является изучение как на уровне белковых молекул ферментов, так и изучение воздействия на скорость работы комплекса различных метаболитов. Однако, не менее важным является исследование регуляции работы 2ОГДК посредством действия на генетический аппарат. В виду того, что 2-оксоглутаратдегидрогеназная ферментная система

катализирует образование сукцинил-кофермента А за счёт функционирования трёх ферментных компонентов, транскрипция которых осуществляется с трёх разных генов, необходимо исследовать роль каждого гена в адаптивном механизме растительной клетки при действии различных стрессовых факторов.

В настоящее время, весьма мало работ, посвященных изучению регуляции генов 2ОГДК, что связано с малой изученностью данного комплекса. Следует отметить, что большая часть работ посвящена изучению регуляции 2ОДГК в животных клетках, меньшая часть – изучению бактериального 2ОГДК.

Окислительное декарбоксилирование 2-оксоглутарата, осуществляемое комплексом, относится к «высокопоточной основе» метаболизма [23]. Было показано, что гены компонентов комплекса важны для раннего эмбрионального развития у животных [24, 199]. Решающая роль 2ОГДК заключается в том, что у людей редко встречаются мутации его компонентов. Даже частичное нарушение мутировавшего 2ОГДК у человека приводит к неврологическим симптомам и ранней смерти [43]. С другой стороны, возрастные нейродегенеративные заболевания также связаны со снижением активности 2ОГДК. Таким образом, точка метаболического ветвления ОГ, которая либо необратимо разрушается под действием 2ОГДК, либо обеспечивает углеродный скелет для ассимиляции азота, явно имеет системное значение [43;42].

Наличие полной геномной последовательности модельного цветкового растения *A. thaliana* предоставило уникальную возможность для анализа семейств генов. Фрагментарная информация, доступная для других растений, согласуется с тем же относительно простым паттерном: каждая субъединица кодируется от одного до трех членов семейства генов. В геноме *Arabidopsis thaliana* в настоящее время аннотировано два гена: *OGDH1* (AT3G55410) и *OGDH2* (AT5G65750). Филогенетический анализ, основанный на аминокислотных последовательностях 2-OGDH из *Arabidopsis*, выявил ее

тесную связь с гомологами из однодольных и других видов двудольных. Аминокислотная последовательность E1-OGDH1 *Arabidopsis* (NP_191101) выявила 98% идентичность с *Brassica napus* (CDY62385), 86% идентичность с *Nicotiana sylvestris* (XP_009798399) и *S. tuberosum* (XP_006365716). Аминокислотная последовательность E1-OGDH2 *Arabidopsis* (NP_201376) выявила 87% идентичность с *B. napus* (CDY62385), 86% идентичность с *N. sylvestris* (XP_009798399) и 85% идентичность с *S. tuberosum* (XP_006365716). Аминокислотные последовательности E1-OGDH1 и E1-OGDH2 демонстрируют значительно более низкую идентичность (75% и 74% соответственно) с аминокислотной последовательностью *Physcomitrella patens* (XP_001753674) [53]. Хотя в геноме *Arabidopsis thaliana* два гена кодируют первый компонент 2-ОГДК, но физиологические роли каждой изоформы остаются неизвестными. В своём исследовании Кондори -Апфата с соавт. (Condori-Apfata, 2019) выделили линии мутантных растений, нокаутных по инсерции Т-ДНК *Arabidopsis* для каждого из генов, кодирующих первый компонент 2ОГДК[54]. У всех мутантов наблюдалось значительное снижение скорости дыхания и ассимиляции CO₂. Кроме того, мутантные линии показали пониженные уровни хлорофиллов и нитратов, повышенные уровни сахарозы, малата и фумарата и незначительные изменения в уровнях общего белка и крахмала в листьях. Несмотря на сходные метаболические фенотипы для двух изоформ 2ОГДГ, снижение экспрессии каждого гена привело к различным ответам с точки зрения роста растений и производства семян, что указывает на разные роли каждой изоформы. В совокупности результаты исследования продемонстрировали важность E1 субъединицы 2-ОГДГ как в автотрофных, так и в гетеротрофных тканях: по предположениям авторов исследования две изоформы E1 не являются функционально избыточными с точки зрения роста растений у *A. thaliana* [53, 54].

Ранее сообщалось о наличии трёх генов, кодирующих 2ОГДГ в геноме кукурузы *Zea mays* L., однако недавние исследования показали, что 2-

оксоглутаратдегидрогеназу кодируют четыре гена. Ген *OGDH1*, расположенный на 2 хромосоме (LOC100383579, Gene ID: 100383579) имеет в своём составе 10 экзонов. Ген, ранее известный как *OGDH2* (LOC103639200) в настоящий момент показан как псевдоген, а ген *OGDH3* (LOC100383847) по последним сообщениям кодирует полипептид 2-оксоглутаратдегидрогеназы и локализуется в 10 хромосоме, включая в себя 9 экзонов. Ген *OGDH4* (LOC103640827), который ранее был аннотирован как ген, кодирующий 2-оксоглутаратдегидрогеназоподобный белок также локализован в 10 хромосоме и несет в своем составе 5 экзонов, по предварительным данным всё –таки кодирует 2ОГДГ. Имеются данные, что полипептид, кодируемый геном LOC100383412, локализованным в 6 хромосоме принадлежит к семейству генов *OGDH*, однако, эти данные пока не подтверждены (дата обращения 09.06.2021). В геноме *Beta vulgaris* 2-оксоглутаратдегидрогеназа кодируется одним геном *OGDH* (BVRB_9g217610, LOC104904371), локализованным в 9 хромосоме. Ген включает в свой состав 9 экзонов.

У кукурузы для дигидролипоамидсукцинилтрансферазы в настоящее время обнаружена два гена: ген *DLST1*, расположенный на 10 хромосоме (LOC100280624, Gene ID: 100280624), включает в себя 14 экзонов; ген *DLST2*, локализованный на 2 хромосоме (LOC100284269, Gene ID: 100284269), также имеет 14 экзонов в своём составе. Дигидролипоамидсукцинилтрансфераза в геноме свеклы аннотирован как ген *DLST* (BVRB_009840), включающий в свой состав 15 экзонов, однако, хромосомная локализация его пока не установлена.

Для кукурузы обнаружены гены, кодирующие и третий компонент 2-ОГДК – липоамиддегидрогеназу: ген *DLD1*, расположенный на 3 хромосоме (LOC103650140, Gene ID: 103650140) содержит в своём составе всего 2 экзона; ген *DLD2* (Gene ID: 100501719) локализован на 8 хромосоме и включает также 2 экзона. Известно, что полипептиды, кодируемые этими двумя генами между собой достаточно гомологичны (97%). Относительно

недавно появилась информация о наличии третьего гена, кодирующего ДЛД в геноме кукурузы - *DLD3* (LOC100381818) расположенного в 8 хромосоме , который включает в себя 15 экзонов (дата обращения 9.06.2021)

1.1.2. Структурно-функциональная характеристика ГДГ

1.1.2.1. Кинетические свойства ГДГ

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, L-глутамат: NAD(P)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.3) энзим класса оксидоредуктаз, катализирующий обратимую реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до L-глутамата. Реакция идёт в 2 этапа. В качестве первого этапа выступает ферментативное дегидрирование глутамата с образованием α -иминоглутарата, после чего – неферментативное гидролитическое отщепление аминогруппы в виде аммиака, в результате чего образуется 2-оксоглутарат[75].

Согласно коферментной специфичности, существуют три основных типа ГДГ: НАД-зависимая (КФ 1.4.1.2), НАДФ-зависимая (КФ 1.4.1.4) и та, которая может использовать два кофермента сразу (КФ 1.4.1.3) (двойные кофермент-специфические ГДГ). ГДГ, которые используют НАД [156; 73] или НАДФ[145], обнаружены в различных комбинациях у растений, грибов и микроорганизмов, тогда как ГДГ позвоночных способны использовать как НАД, так и НАДФ с сопоставимой эффективностью, которая зависит от направления реакции[65]. Точнее, НАДФН служит субстратом в реакции восстановительного аминирования 2ОГ, в то время как НАД + используется в реакции дезаминирования[82].

Большинство глутаматдегидрогеназ, которые были обнаружены до сих пор – олигомерные ферменты, но они различаются по числу мономеров, из которых они состоят. Преимущественно ГДГ имеют гексамерную структуру, но также были обнаружены тетрамерные и даже димерные формы. Наиболее распространенной структурой для них является два тримера субъединиц, уложенные непосредственно друг над другом[150].

Бактериальные ГДГ являются гомогексамерами, в то время как эукариотические ферменты эволюционировали в два семейства, которые различаются олигомерной структурой. ГДГ позвоночных образуют гомогексамеры, ГДГ растений существуют как гомо- или гетерогексамеры, состоящие из субъединиц ~ 45-50 кДа, тогда как тетрамеры субъединиц ~ 115 кДа были обнаружены у грибов. Гексамерные ГДГ структурно похожи и имеют два домена. Домен I участвует в связывании субстрата, а домен II связывает кофермент. Активный центр формируется в глубокой бороздке между двумя доменами[33]. ГДГ животных обладают третьим доменом, называемым антенной, который отсутствует в других типах ГДГ[147]. Антенный домен может связывать широкий спектр небольших молекул и таким образом может аллостерически регулировать активность энзима[82].

Глутаматдегидрогеназа, как уже упоминалось, является олигомером и может состоять из субъединиц различного типа: α , β , γ [156]. Известно, что преобладание α -субъединиц в структуре обеспечивает более высокое сродство к глутамату, в то время как наличие β -субъединиц повышает сродство к 2-оксоглутарату [156]. *In vivo* отдельные субъединицы связываются в различных соотношениях с образованием гомо- и гетерогексамеров ~ 270 кДа. Гексамеры, состоящие из субъединиц α и β , присутствуют в корнях, стеблях и листьях, тогда как субъединица γ собирается с α - и β -субъединицами только в корнях [156, 182, 74, 73, 127].

Изоформы ГДГ арабидопсиса обладают разными функциональными свойствами. Например, Марчи (Marchi et al., 2014) показали, что белок, кодируемый геном AtGDH3 (γ - субъединица) менее термостабилен, чем белки, кодируемые генами AtGDH1 (α -субъединица) и AtGDH2 (β – субъединица), и что карбоксильный конец участвует в стабилизации олигомерной структуры фермента[128]. Также было установлено, что белок AtGDH2, но не AtGDH1 или AtGDH3, имеет область, подобную мотиву петли EF-hand, которая может участвовать в связывании кальция. Соответственно, активность этой изоформы стимулировалась ионами Ca^{2+} . К

настоящему времени несколько структур бактериальных, археобактериальных, позвоночных и грибковых ГДГ были депонированы в Protein Data Bank (PDB). Однако ферментам растительного происхождения уделялось гораздо меньше внимания[82].

Активаторами реакций обычно служат двухвалентные ионы металлов. Исходя из литературных данных, в большинстве организмов в качестве активатора выступает кальций. Также реакция может регулироваться нуклеотидами, связывающимися с ферментом в аллостерическом центре, такими как АДФ и АМФ. В редких случаях активаторами могут выступать такие аминокислоты как аспартат, аспарагин, цистеин и лейцин [55; 80, 90]. Все перечисленные выше соединения в больших концентрациях могут являться также ингибиторами глутаматдегидрогеназной активности [61]. Значения оптимума рН для прямой и обратной реакции в различных организмах могут быть неодинаковыми. Так для ГДГ, выделенной из *Arabidopsis thaliana*, оптимум рН для прямой реакции аминирования 2-оксоглутарата составляет 8.3, в то время как для реакции дезаминирования глутамата составляет 9.2[25].

ГДГ растений является гетерогенным ферментом, и степень гетерогенности зависит от вида растений и места локализации [129]. Количество изоферментов может варьироваться в тканях растений в процессе развития и при различных условиях окружающей среды. Чаще всего идентифицируется в растениях арабидопсиса 7 изоформ с НАД(Ф)-зависимой регуляцией и также 7 изоформ в листьях винограда [44, 120]. Стоун с соавт. (Stone et al.,1979) выделил из клубеньков люпина НАД-зависимую глутаматдегидрогеназу, обнаружив четыре изоформы энзима[177]. В 2017 году Флоренская с соавторами опубликовали результаты исследования изоферментного состава глутаматдегидрогеназы в корнях сои, в которых продемонстрировали существование двух изоформ ГДГ: низкомолекулярной (молекулярная масса около 48 кДа) и

высокомолекулярной (молекулярная масса составляет около 196 кДа) [20]. Тот факт, что изоформы ГДГ являются ткане-специфичными, может быть обусловлен клеточной дифференцировкой, субклеточной локализацией и физиологической функцией.

Из-за больших различий в азотном обмене между азотом, ассимилирующимся корнями, и азотом, ассимилирующимся тканями, было высказано предположение, что разные изоформы ГДГ могут быть вовлечены в анаболические процессы, тогда как другие могут действовать преимущественно катаболически [139].

По имеющимся данным внутри клеток растений фермент локализован в митохондриях и хлоропластах, а у бактерий и архей может встречаться цитоплазматическая форма [139]. Глутаматдегидрогеназа распространена во всех органах и тканях растений, при этом, встречаются различные изоформы фермента. Растения имеют отдельные изоферменты ГДГ, которые являются либо НАД-, либо НАДФ-специфическими. НАД-специфические ГДГ локализованы в митохондриях, тогда как НАДФ-специфические формы энзима существуют в хлоропластах, где их биологическая функция полностью не изучена [82, 73].

Также экспрессия генов глутаматдегидрогеназы имеет органоспецифический характер. Например, продукт гена *GDH-3* арабидопсиса обнаруживается только в листьях, в то время как мРНК гена *GDH2* имеет наиболее активно транскрибируется в корнях [20].

Физиологическая роль ГДГ у растений и микроорганизмов включает ассимиляцию азота, катаболизм глутамата, а также осмотический баланс и устойчивость к высоким температурам. Также данный фермент является промежуточным звеном между циклом лимонной кислоты и ГАМК-шунтом. Экспериментально было доказано, что 2-оксоглутарат, полученный в ходе реакции дезаминирования глутамата, катализируемой ГДГ, может быть введен в ЦТК и использован для энергизации клетки [163]. По предположениям Гарник Е. Ю. с соавторами (2013) ГДГ в клетке растений

играет роль «страховки» на случай углеводного голодания. Снижение уровня глюкозы в клетки приводит к дерепрессии генов ГДГ [1].

В течение долгого времени физиологическая роль ГДГ была неясной из-за неопределенности в отношении направления его реакции *in vivo* [163; 156, 137]. Первоначально ГДГ считался наиболее важным ферментом, участвующим в ассимиляции аммиака до открытия цикла ГС-ГОГАТ. В настоящее время цикл ГС-ГОГАТ признан основным путем ассимиляции аммиака в органические молекулы в растениях [113]. Это открытие изменило представление о роли глутаматдегидрогеназы в растениях. Более поздние исследования предоставляют доказательства того, что вклад ГДГ в прямую ассимиляцию NH^{4+} незначителен (5%) по сравнению с вкладом, катализируемым циклом ГС-ГОГАТ (95%) [113]. Однако ГДГ обеспечивает альтернативный путь включения аммиака в органические соединения только во время определенных экологических стимулов, когда требуется ремобилизация питательных веществ [175]. Основная роль ГДГ заключается в подпитке цикла трикарбоновых кислот 2ОГ, когда углерод становится ограничивающим фактором [73]. Таким образом - вместе с ГОГАТ – глутаматдегидрогеназа контролирует гомеостаз глутамата [109]. По этой причине энзим играет важную роль в точке разветвления путей ассимиляции углерода и азота [82].

1.1.2.2. Молекулярно-генетические аспекты функционирования ГДГ

В геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено 3 гена: *GDH1* и *GDH2*, локализованные в 5 хромосоме и *GDH3*, находящийся в 3 хромосоме. Ген *GDH1* (Gene ID: 831935) кодирует α -субъединицу (43 кДа) глутаматдегидрогеназы с предположительно митохондриально-транзитным полипептидом и НАД(Н)- и α -кетоглутарат-связывающими доменами. Митохондриальная локализация подтверждена субклеточным фракционированием. Данный белок сочетается в нескольких соотношениях с

продуктом гена *GDH2* в виде семи изоферментов и может быть вовлечен в ассимиляцию аммиака в условиях избытка неорганического азота. Энзим найден исключительно в митохондриях клеток стебля и листьев (Gene ID: 830635). По предположению Гарник Е. Ю. с соавторами (2013), экспрессия гена *GDH2* глутаматдегидрогеназы *A. Thaliana* регулируется посредством циркадных ритмов за счёт участия сахарозависимых и хлоропластно-ядерных регуляторных путей[1].

Ген *GDH3* (Gene ID: 821072) кодирует фермент глутаматдегидрогеназного семейства. Его экспрессия увеличивается в ответ на действие цитокининов, что может играть роль в контроле метаболизма азота при развитии листьев. В геноме *Homo sapiens* обнаружено 2 гена ГДГ: *GLUD1* (Gene ID: 2746) и *GLUD2* (Gene ID: 2747).

В геноме *Zea mays* L. глутаматдегидрогеназа кодируется двумя генами, каждый из которых содержит информацию о разных типах субъединиц ГДГ: α и β [114]. Сакакибара с соавторами (Sakakibara et al., 1995) изолировали полноразмерную кДНК *GDH1* (LOC542220), кодирующую β –субъединицу ГДГ. Данный ген в геноме кукурузы имеет локализацию в первой хромосоме. Анализ структуры нуклеотидной последовательности позволил установить, что открытая рамка считывания кодирует 411 аминокислотный остаток. Данный транскрипт в меньшей степени распространен в листьях, чем в корнях [167]. Ген *GDH2* (LOC100193614) локализован в 10 хромосоме и кодирует α -субъединицу ГДГ кукурузы.

1.1.3. Структурно-функциональная характеристика ОД

Оксицитрат (гидроксицитрат) был впервые обнаружен в соке сахарной свеклы, где он присутствует в низкой концентрации. Позднее он был найден в больших количествах у ряда видов *Hibiscus* и в плодах *Garcinia cambogia* (до 30% от сухого веса)[170]. Гидроксицитрат имеет два асимметричных центра и может существовать в виде четырех стереоизомеров, однако только

два из них были обнаружены в растениях. Первый изомер, (+) алло-гидроксицитрат, был обнаружен в гибискусе, а второй, (-) гидроксицитрат, был выделен из плодов гарцинии[170]. Щипарев и Солдатенков (1972) показали, что (+) алло-гидроксицитрат легко метаболизируется не только в гибискусе, но также в кукурузе, *Phaseolus* и других растениях[21]. В растительных организмах ОЦ способен метаболизироваться в 2ОГ с помощью фермента оксидатдегидратазы декарбоксилирующей (ОД, дегидратаза дигидроксикислот, гидроксицитрат дегидратаза декарбоксилирующая, КФ 4.2.1.9.), наличие которой впервые было показано Землянухиным[6]. Метаболизм гидроксицитрата до недавнего времени практически не изучался. ОЦ способен регулировать углеводный и липидный обмен, что было показано на животных объектах[98].

Дегидратаза дигидроксикислот фермент класса лиаз, который участвует в превращении 2,3-дигидрокси-3-метилбутаноат в 3-метил-2-оксобутаноат, дегидратацию 2,3-дигидрокси-3-метилвалерата в 2-кето-3-метилвалерат, являясь участником биосинтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями (остатками), такими как лейцин, валин и изолейцин, что несомненно делает этот фермент необычайно интересным объектом для изучения. Также, известно, что ОД принимает участие в биосинтезе пантотената, приводя к образованию кофермента А [122]. Ко всему прочему данный фермент выполняет взаимопревращение гидроксицитрата в 2-оксоглутарат [148, 6].

Фермент, взаимопревращающий гидроксицитрат и 2-оксоглутарат в бактериях *Micrococcus*, имеет молекулярную массу 112 кДа, значение константы Михаэлиса составляет 0.35 мМ и оптимум рН 7.7–8.3 [6]. Такой фермент был продемонстрирован также Землянухиным с соавт. (1995) на проростках *Hibiscus cannabinus*, но очистка не была достигнута из-за его нестабильности[6]. Этот фермент может быть важен для развития гаметофитов и устойчивости к солевому стрессу у *Arabidopsis* [198]. Флинт и Эмпаж (Flint and Emptage, 1988) и Пиррунг (Pirrung et al., 1989)

охарактеризовали этот фермент в листьях шпината и показали, что он содержит кластер [2Fe-2S], который имеет некоторое сходство с аконитазой [72, 151]. Изоцитратдегидрогеназа (в основном НАДФ-зависимая) проявляет некоторую активность с изомером гидроксицитрата из гарцинии, но не из гибискуса [152], образуя 4-гидрокси-2-оксоглутарат. (-) Гидроксицитрат является сильным ингибитором АТФ-цитратлиазы, который может иметь важное значение для подавления биосинтеза липидов [98]. Таким образом, ОЦ может являться метаболитом, который являясь предшественником 2ОГ, запасается в клетках растений на тот случай, если клетке срочно будет требоваться субстрат для энергетического метаболизма.

Известно, что ОД *A.thaliana* как правило является мономером, однако, возможно образование гомодимерной формы энзима. Согласно литературным данным, в связи с выполняемыми в клетке функциями фермент локализован в хлоропластах, однако, данных о проведении исследований субклеточной локализации ОД нами обнаружено не было. Интересно отметить, что у этиолированных проростках кенафа (*Hibiscus cannabinus* L.) гидроксицитрат не был обнаружен, в то время как в зеленых листьях, как уже было упомянуто он обнаруживается в достаточном количестве [170].

Дигидроксикислот дегидратаза катализирует ключевой этап пути биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью, который существует у многих организмов, включая бактерии, грибы и растения. У *Arabidopsis thaliana* ОД кодируется одним геном (AT3G23940), но его биологическая функция в контроле развития растений остается не охарактеризованной. Основываясь на высоком сходстве последовательностей с ортологами у других организмов, ген, кодирующий ОД у *Arabidopsis*, был отнесен к AT3G23940 в базе данных метаболических путей растений (www.PlantCyc.org) и в обзорах Яндера и Йоши (Jander and Joshi, 2009), и Биндера (Binder, 2010) [100, 34]. Гены ОД однодольных и двудольных образуют две отдельные клады, указывая на то, что хотя последовательности

фундаментально консервативны, гены энзима претерпевают последующее расхождение, сопровождаемое эволюцией этих групп. Также стоит отметить, что ОД, по-видимому, встречается в виде гена – единственной копии у большого числа видов растений[198]. У арабидопсиса Ген AtDHAD содержит 14 экзонов и 13 интронов и кодирует предполагаемый белок из 608 аминокислот.

В геноме кукурузы в настоящий момент аннотированы два гена – *DHAD1* и *DHAD2*, кодирующие хлоропластную форму ОД. Ген *DHAD1* (LOC100273676, Gene ID: 100273676) локализован в 1 хромосоме и включает в свой состав 14 экзонов. Полипептид, состоящий из 591 азотистого основания и имеющий молекулярную массу 63.3 Да, локализован в хлоропластах, имеет в активном центре 4 железо-серных кластера.

Ген *DHAD2* (LOC100384514, Gene ID: 100384514), кодирующий также хлоропластную форму ОД локализован в 4 хромосоме и включает в свой состав 15 экзонов. Полипептид, кодируемый данным геном, также имеет 4 железо-серных кластера.

1.2. Роль 2ОГ в адаптивной реакции клеточного метаболизма к действию различных стрессовых факторов

Чтобы справиться с действием внешних стрессовых факторов организмы выработали множество систем передачи сигналов, чтобы определять стратегию поведения в зависимости от имеющихся ресурсов и генерировать соответствующий метаболический ответ. Два основных элемента метаболического обмена - это углерод и азот. Идеальный сигнальный метаболит для координации регуляции азот-углеродного метаболизма должен находиться на пересечении этих двух метаболических путей[28]. Давно признано, что промежуточный продукт цикла трикарбоновой кислоты 2-оксоглутарат теоретически может выполнять

такую регулирующую роль, поскольку 2-ОГ является основным поставщиком углеродных скелетов в реакциях ассимиляции азота [52]. Экспериментальные данные подтверждают вывод о том, что внутриклеточные уровни 2-оксоглутарата колеблются в зависимости от наличия азота и углерода[28]. В последние годы, информация о метаболических путях, которые, регулируются уровнем 2-оксоглутарата, значительно расширила представления об адаптивных процессах, протекающих в клетках живых организмов. Следует отметить, что 2-ОГ является прямым регулятором нескольких ферментов таких как цитозольная пируваткиназа(ПК, КФ 2.7.1.40) и ФЕП-карбоксилаза (КФ 4.1.1.31), митохондриальная цитратсинтаза (ЦС, КФ 2.3.3.1) и альтернативная оксидаза (АО), которые связаны с потоком сахаров и/или органических кислот, а также с окислительно-восстановительным контролем между цитозолем и митохондриями[87]. Помимо этого, имеются предположения о том, что 2-ОГ играет роль сигнального метаболита в растениях[38]. Эта роль, однако, в значительной степени основана на аналогии с той важной ролью, которую он играет в соединении с пластидным белком РII у растений[184]. Имеющиеся на сегодняшний день сообщения предполагают, что хотя РII может регулировать небольшое количество ферментных систем в растениях, включая N-ацетил-глутаматкиназу [87] и пластидную ацетил-СоА карбоксилазу его роль вряд ли будет столь же важной для растений, как и в нерастительных системах. Предельно ясно, что продукция 2-ОГ в митохондриях или цитозоле является важным фактором, определяющим активности некоторых ферментов пластид [184]. Сигнальные свойства 2-оксоглутарата подчеркиваются тем фактом, что этот метаболит регулирует синтез хорошо зарекомендовавшей себя основной сигнальной молекулы, циклического АМФ (цАМФ), в *Escherichia coli* [91].

Экспериментальные данные, полученные Хуэрго и Диксоном (Huergo, Dixon, 2015) подтвердили, что 2-ОГ действует как главный регуляторный метаболит[91]. В то время, когда клетка использует глюкозу, жирные

кислоты или некоторые аминокислоты в качестве источника углерода в аэробных условиях, эти молекулы окисляются до ацетил-кофермента А, который поступает в ЦТК. Ацетильная группа ацетил-КоА окисляется до двух молекул CO_2 , и энергия, полученная в результате этих реакций, сохраняется либо в восстановленных переносчиках электронов, либо в АТФ. ЦТК также выполняет важные анаболические функции. Так, например, 2ОГ и оксалоацетат действуют как предшественники для синтеза аминокислот и нуклеотидов. Также примечательно, что у некоторых прокариот действуют альтернативные ЦТК. Эти альтернативные пути могут возникать у организмов, которые ранее считались имеющими неполные циклы лимонной кислоты из-за отсутствия 2-оксоглутаратдегидрогеназы или 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса[91].

Основными внутриклеточными донорами азота для синтеза различных азотсодержащих соединений посредством реакций трансаминирования и трансамидирования обычно являются глутамин и глутамат. Синтез глутамина происходит через глутаминсинтетазу (ГС, КФ 6.3.1.2). ГС катализирует АТФ-зависимое превращение глутамата в глутамин путем включения аммиака.

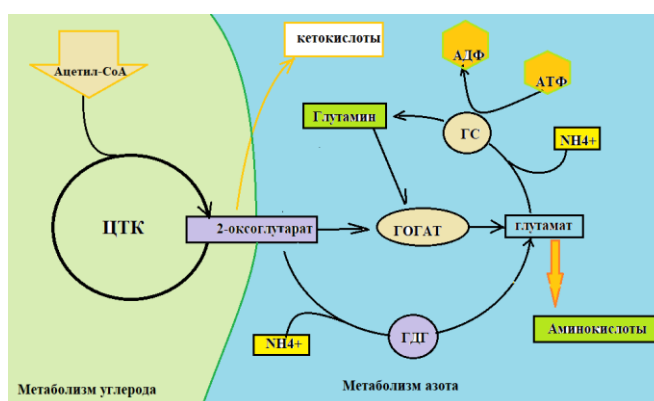


Рис. 3 Общая схема углеродного и азотного метаболизма

Синтез глутамата из аммония может происходить двумя различными путями: через объединение глутамина, продуцируемого ГС, с 2-ОГ посредством действия фермента глутаматсинтазы (Глутамин-2-оксоглутаратаминотрансфераза, ГОГАТ, КФ 1.4.1.13), что приводит к

производству двух молекул глутамата ; и через реакцию восстановительного аминирования 2-ОГ в результате работы глутаматдегидрогеназы, в результате которой образуется лишь одна молекула глутамата. ГС и ГОГАТ функционируют в цитозоле и хлоропластах, в то время как ГДГ – путь который используется в митохондриях[82]. До выделения Леа и Мифлином (Lea и Mifflin, 1974) в 1974 году ГОГАТ из листьев растений, ГДГ считался основным путем усвоения аммиака растениями[112]. Однако дальнейшие биохимические, молекулярные и генетические исследования показали, что ферменты ГС и ГОГАТ действуют как основной путь усвоения аммиака растениями [134]. Кроме того еще в далеком 1989 году было показано что, в условиях фотодыхания ген, кодирующий изофермент хлоропластной формы ГС, индуцировался в 4 раза [63]. Роль ГДГ-пути волновала множество ученых умов: на протяжении последних сорока лет ведутся исследования данного вопроса[193, 82] Согласно множеству имеющихся литературных данных ГДГ играет дополнительную роль по отношению к пути ГС/ГОГАТ в реассимиляции избыточного аммиака, высвобождаемого в стрессовых условиях или на определенных стадиях развития [182, 82]. Образовавшийся в результате работы ГДГ глутамат в дальнейшем может или идти на синтез других аминокислот, или же выступать в качестве субстрата для ГАМК-шунта – основного метаболического пути в условиях стресса [45]. В молодых и старых листьях табака глутамат синтезируется за счёт комбинированного действия ГС и глутаминсинтазы, в то время как ГДГ отвечает преимущественно за дезаминирование глутамата[75].

В метаболический путь γ - аминomásляной кислоты - ГАМК-шунт растений, названный так потому, что он обеспечивает «обход» двух реакций ЦТК, обычно включают три ферментные реакции[144]. γ - аминomásляная кислота (ГАМК) в основном синтезируется путем декарбоксилирования глутамата, катализируемого глутаматдекарбоксилазой (ГАД, КФ 4.1.1.15), в зависимости от пиридоксальфосфата. Впоследствии ГАМК транспортируется в митохондрии, где она катаболизируется ГАМК-трансаминазой (ГАМК-Т,

КФ 2.6.1.19) до янтарного полуальдегида (семиальдегид янтарной кислоты, сукциниловый семиальдегид, ССА). ССА может быть окислен митохондриальной янтарной полуальдегиддегидрогеназой (сукциниловый семиальдегиддегидрогеназой, ССАДГ, КФ 1.2.1.16) с образованием сукцината или восстановлен до γ -гидроксibuтирата (ГБ) цитозольной γ -гидроксibuтиратдегидрогеназой (ГБДГ, КФ 1.1.1.61) [161]. Сукцинат, образовавшийся в результате работы ССАДГ входит в цикл лимонной кислоты, в качестве субстрата для сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.5.1), тем самым, замыкая цикл.

Известно, что 2-оксоглутарат может образовываться не только в результате работы ЦТК за счет работы изоцитратдегидрогеназы (ИДГ, КФ 1.1.1.41), но также возможно и за счёт работы некоторых других ферментов. Растительные организмы, помимо цитрата могут накапливать и гидроксичитрат (оксицитрат, ОЦ) [170]. Гидроксичитрат был впервые обнаружен в соке сахарной свеклы [119], где он присутствует в низкой концентрации. К сожалению, роль оксичитрата практически не изучена, данных, посвященных исследованиям метаболизма ОЦ, ничтожно мало. Однако, имеются данные о том, что оксичитрат под действием фермента – оксичитратдегидратаза (декарбоксилирующая) – окисляется до 2-оксоглутарата, который в свою очередь может поступать как в ЦТК, так и на путь ГС-ГОГАТ[6, 119].

1.2.1. Влияние стрессоров различной природы на метаболизм растений

В последние десятилетия очень большое внимание уделяется действию внешних факторов на живые организмы. Любое воздействие на организм со стороны внешней среды вызывает в нем ответную реакцию. Внешние факторы, в этом случае, могут быть самыми разными: физические, химические, механические. В 1936 году выдающийся канадский физиолог Г. Селье (Selye, 1936) для описания воздействия неблагоприятных факторов на

организм предложил термин «стресс» [169]. Генкель, исследуя растения, выделил понятие «фитостресс»[2] - комплекс метаболических перестроек, возникающий в растительном организме в ответ на неблагоприятное внешнее воздействие. Нередко термин «стресс» используют в качестве обозначения целого комплекса неспецифических и специфических изменений организма. Помимо этого, часто, под термином «стресс» подразумевают и совокупность реакций организма, которые возникают в результате действия различных факторов.

Высшие растения, как и любые другие живые существа, за тысячелетия эволюции выработали различные механизмы адаптации к действиям неблагоприятных факторов среды. Способность к саморегуляции позволила растительным организмам активно реагировать на действие стрессовых факторов за счёт оптимизации процессов, протекающих в клетках. В качестве самых распространённых факторов, вызывающих неблагоприятное воздействие на растительный организм, выделяют: температуру (действие температур, выходящих за границы оптимума роста); избыток воды; избыток солей в почве; гипоксия; нарушение светового режима и т.д.

В результате появления резистентности в ответ на действие какого-либо фактора возможна выработка к нему устойчивости. Возможна также ситуация, при которой устойчивость увеличится не только к воздействию одного фактора, но и к некоторым другим одновременно, что говорит о неспецифическом характере адаптивных реакций. В случае, когда воздействие достаточно продолжительно по времени, проявляются специфические механизмы устойчивости. При кратковременном действии наблюдаются неспецифические адаптивные механизмы. У растений стресс представляет собой единую ответную реакцию организма на воздействие, имеющее повреждающий характер, и обеспечивает выживание организма путём активации всех защитных систем организма[96].

1.2.1.1. Влияние солевого стресса на метаболизм растений

Абиотическая среда имеет решающее значение для правильного роста растений, а абиотические стрессы могут негативно повлиять на способность растения развиваться в данной среде. Засоление является одним из основных факторов, ограничивающих урожайность и распространение растений в окружающей среде. Засоленные почвы покрывают около 3,1 процента поверхности земли, а на орошаемых землях это число достигает 19,5 процента[117]. Более 45 миллионов гектаров орошаемых земель засолены выше нормы, что составляет 20% от общей площади земель, и 1,5 миллиона гектаров земель ежегодно выводятся из эксплуатации из-за высокой концентрации солей[85]. Повышенный уровень солей отрицательно влияет на вегетативный рост, прорастание семян, а также на физиологические процессы – фотосинтез, дыхание, транспирацию, мембранную проницаемость, метаболическую и ферментативную активность. Нарушение клеточного гомеостаза, вызванное засолением, приводит к изменению гормонального статуса, а также индуцирует образование активных форм кислорода, что при сильном и/или длительном стрессе является губительным для растения [85, 97].

Засоление почвы наносит большой вред растениям и ограничивает их рост и продуктивность. Однако миллионы лет эволюции не прошли даром и растения адаптировались к изменениям окружающей среды и разработали свой механизм, позволяющий справляться с различными видами стресса.

Токсическое действие солевого стресса включает несколько аспектов. Поглощение чрезмерного количества Na^+ и Cl^- нарушает многие внутриклеточные метаболические процессы.

Солевой стресс обычно вызывает раннюю (осмотическая) и позднюю (ионная) фазы стресса. Первый этап относится к быстрому возникновению осмотического стресса в течение нескольких минут из-за быстрого снижения

внутриклеточного водного потенциала, а второй - к ионному и окислительному стрессу, а также к дисбалансу питательных веществ в результате накопления Na^+ и Cl^- с течением времени. «Симптомы» поздней фазы стресса можно наблюдать в течение нескольких дней [165, 158].

Высокая концентрация соли в почве вызывает осмотический стресс, который ограничивает поглощение воды из почвы [158]. Высокая концентрация Na^+ препятствует усвоению питательных элементов. Между тем, ионная токсичность и осмотический стресс также вызывают дисбаланс в метаболизме и окислительный стресс [158]. В целом токсическое действие солевого стресса включает гибель растения или по крайней мере снижение продуктивности. Практически все растения при солевом стрессе демонстрируют задержку роста. Однако уровень снижения темпов роста и критическая концентрация соли у разных растений сильно различаются. Солевой стресс влияет почти на все аспекты биологических процессов, включая рост растений, фотосинтез, синтез белка и метаболизм белка и фосфолипидов. Как уже было указано выше, солевой стресс влияет на фотосинтез растений как при краткосрочном, так и при длительном воздействии. Кратковременный эффект наступает в течение от нескольких часов до одного-двух дней при воздействии солевого стресса [165, 158]. Ассимиляция углерода в этот период полностью прекращается. Долговременный эффект наступает через несколько дней, после воздействия высоких концентраций солей [158]. Из-за накопления соли в листе снижается и ассимиляция углерода. Концентрация солей играет большую роль: в экспериментах с *Alhagi* низкие концентрации солей (50 мМ) вызывали индукцию фотосинтеза, в то время как увеличение концентрации до пороговых значений оптимума (200 мМ) приводило к падению скорости ассимиляции диоксида углерода до 60%. Согласно экспериментальным данным, полученным Паридом с соавт. (Parida, 2004), скорость ассимиляции углекислого газа у *Bidens parviflora* увеличивалась при солевом стрессе при низкой концентрации хлорида натрия, и снижалась при солевом стрессе

высокой концентрации [149]. Известно, что повышение концентрации Na^+ и Cl^- в *U. fasciata* вызывает накопление пролина, который, в свою очередь, снижает активность пролиндегидрогеназы (ПДГ) и концентрацию растворимого Ca^{2+} [117].

Как уже упоминалось, солевой стресс оказывает действие на весь растительный организм, в том числе и на молекулярно-генетическом уровне. Связано это, прежде всего, с тем, что клетка имеет ряд специфических сигналов, которые обеспечивают клеточный ответ на действие стрессового фактора. Передача сигнала о наступлении солевого стресса включает: сигнализацию путей ионного и осмотического гомеостаза, в которой задействована сложная сеть сигнального взаимодействия, основанная на передаче сигналов с помощью Ca^{2+} , путей детоксикации (контроля и восстановления повреждений) и путей регуляции роста. Известно, что Ca^{2+} / кальмодулин-центрированная система передачи Ca^{2+} играет решающую роль в ответе и адаптации растений к солевому стрессу [158].

Ионный гомеостаз контролируется за счет функционирования, так называемого SOS-пути, где кальций-чувствительный комплекс протеинкиназы SOS3-SOS2 контролирует экспрессию и активность переносчиков ионов, таких как SOS1 [203]. Осмотический стресс активирует несколько протеинкиназ, включая митоген-активируемые киназы, которые могут опосредовать осмотический гомеостаз и / или реакции детоксикации. Ряд фосфолипидных систем активируется под действием осмотического стресса, генерируя разнообразный набор молекул-мессенджеров, некоторые из которых могут функционировать раньше чем протеинкиназы, активируемые осмотическим стрессом. Биосинтез абсцизовой кислоты (АБК) регулируется осмотическим стрессом на нескольких этапах. Как АБК-зависимая, так и АБК-независимая передача сигналов осмотического стресса сначала модифицируют конститутивно экспрессируемые факторы транскрипции, что приводит к экспрессии транскрипционных активаторов

раннего ответа, которые затем активируют гены эффекторов стрессоустойчивости, расположенные «ниже по течению»[203]

Известно, что растения способны адаптироваться к солевому стрессу за счет синтеза таких осмолитов как пролин и растворимые сахара и амины. Осмопротекторная активность этих соединений хорошо изучена на высших растениях [142; 140; 64]. Помимо снижения цитозольного осмотического потенциала, пролин также важен для стабилизации белковых структур, улавливания свободных радикалов и поддержания внутриклеточного ионного гомеостаза[64]. В настоящее время известно, что биосинтез пролина осуществляется по глутаматному и по орнитиновому пути[64].

Частичный дефицит пролина у мутантов с нарушением его биосинтеза (например *p5cs1*), приводит к тому, что растения становятся сверхчувствительными к солевому стрессу [188]. Однако в некоторых исследованиях было признано, что пролин не единственная аминокислота, повышенно вырабатываемая при осмотическом стрессе. Известно, что уровни некоторых других аминокислот, а именно аминокислот с короткими разветвленными боковыми цепями (АРБЦ), могут возрастать до показателей, сопоставимых с пролином, а иногда и выше [198]. Это говорит о том, что биосинтез АРБЦ также может принимать участие в механизмах устойчивости растений к стрессу, но прямых доказательств, подтверждающих эту гипотезу, получено не было. В экспериментах на нокдаун-мутантах по гену *dhad*, который в геноме *Arabidopsis* кодирует ОД, уровни всех трех типов АРБЦ в корнях были снижены, что приводило к более короткому фенотипу корня. Что еще более интересно, нокдаун-мутанты проявляли более высокую чувствительность к солевому стрессу, что свидетельствует о том, что гомеостаз АРБЦ играет роль в устойчивости растений к солевому стрессу. Стоит отметить, что такая гиперчувствительность, была довольно специфична для солевого стресса, поскольку параллельный анализ реакции на осмотический стресс и стресс тяжелыми металлами показал противоположный результат. По предположениям авторов исследования это

связано с обоими аспектами фундаментальных функций АРБЦ, в которых они служат либо в качестве субстратов для индуцированного стрессом биосинтеза белка, либо в качестве сигнальных молекул для регуляции экспрессии чувствительных к стрессу генов[198].

Следует отметить, что в условиях действия стрессовых факторов биосинтез пролина осуществляется по глутаматному пути[64]. Наряду с пролином происходит накопление аргинина и орнитина, которые также являются производными глутамата[49]. В исследованиях Че-Отман (Che-Othman, 2020) показал увеличение содержания лизина (в 80 раз), метионина и аспарагина (в 15-20 раз). Эти аминокислоты могут поступать из множества источников, включая процессы деградации белка и синтез *de novo* посредством ассимиляции N в C-скелет, полученный в результате гликолиза и ЦТК[49]. Их накопление также согласуется со снижением утилизации оксалоацетата ЦТК из-за ингибирования ПДК.

Дефицит воды является одним из основных последствий солевого стресса у растений[70]. Имеются сообщения о том, что экзогенный пролин увеличивает содержание воды в растениях при солевом стрессе, и это может способствовать разбавлению соли и, как следствие, улучшению роста растений[200]. Аквапорины - это группа переносчиков, которые способствуют поглощению воды растениями из почвы. При солевом стрессе существует положительная корреляция между экспрессией генов аквапоринов и солеустойчивостью *Eutrema salsugineum* [157].

Сахара, в особенности глюкоза и сахароза, играют решающую роль в метаболизме растений. Это связано с тем, что они не только поставляют углерод и энергию, но также участвуют в сигнальном пути, инициируя повышающую регуляцию связанных с защитой генов и понижающую регуляцию экспрессии фотосинтетических генов [140]. У многих растений общее содержание углеводов увеличивается после обработки NaCl, в основном из-за повышенного стресса при засолении, накопление сахарозы и глюкозы обеспечивает активную осмотическую регулировку, тем самым

облегчая адаптацию за счет транслокации и компартиментации натрия, а также влияя на обмен белков и производство совместимых растворенных веществ [140]. Существуют убедительные доказательства того, что глюкоза и фруктоза играют роль в адаптивном механизме растений к солевому стрессу [140]. Высокие концентрации хлорида натрия также могут влиять на метаболизм растений, препятствуя этапам ассимиляции азота, тем самым снижая уровень азота. Вопреки распространенному мнению, не только семейство бобовых, но и большинство высших растений фиксируют азот, сначала восстанавливая его неорганическую форму (NO_3) до NH_4 , а затем преобразовывая его в органическую форму [83].

Ранее упоминалось о том, что солевой стресс оказывает влияние на ферментативную и метаболическую активность. Исследования, проведенные Наливайски и Складовска (Naliwajski, Skłodowska, 2018) на листьях огурца показали, что активность ГДГ (как по реакции аминирования, так и по реакции дезаминирования), АЛАТ, АСАТ (ЕС 2.6.1.1), НАДФ-ИДГ, изменялась после 24 и 72 часов действия солевого стресса. Активность НАДН-ГДГ, АЛАТ и АСАТ значительно повышалась на протяжении всего времени эксперимента, что, по предположениям авторов исследования, было связано с высокой потребностью в глутамате. Наблюдаемые изменения могут потребоваться для поддержания правильной активности цикла ЦТК [140]. Также, НАДН-ГДГ играет решающую роль в детоксикации аммония, поскольку ГДГ проявляет большую аминирующую активность при более высоких уровнях NH_4^+ [140].

Высокое содержание NaCl индуцирует образование активных форм кислорода, которые, в свою очередь, индуцируют синтез α -субъединицы ГДГ в табаке и виноградной лозе. Скопелитис (Skopelitis, 2006) с соавт. показал, что ингибирование ГС при действии высоких концентраций солей на растения приводило к включению меченного аммиака через ГДГ в $[15\text{N}]$ глутамат и $[15\text{N}]$ пролин [175]. Важную роль глутаматдегидрогеназы в адаптивном ответе растительной клетки к солевому стрессу подтверждают

сообщения Кумара с соавт. (Kumar, 2000) о том, что у солеустойчивых сортов риса (*Oryza sativa*) активность аминирующей ГДГ возрастает при увеличении солевого стресса, в то время как у солечувствительных сортов она снижается [108]. Показано что у растений гороха (*Pisum sativum*), который является устойчивым к аммонийному загрязнению, активность аминирующего ГДГ в корнях очень высока [111].

Наряду с повышающей регуляцией α -ГДГ с помощью NaCl также индуцируются гены изоцитратдегидрогеназы, которые обеспечивают синтез 2-оксоглутарата. Сигнал АФК, генерируемый засолением, индуцирует экспрессию α -субъединицы ГДГ (которая в растениях табака катализирует реакцию аминирования 2-оксоглутарата). Анионные изоформы ГДГ, которые ассимилируют аммиак, действуют как антистрессовые ферменты при детоксикации аммиака и производстве глутамата для синтеза пролина [175].

Известно, что способность к накоплению пролина обуславливает солетолерантность растений [70, 200, 164]. Трансгенные растения табака, продуцирующие пролин на высоком уровне, обладали повышенной устойчивостью к действию NaCl. При этом, синтез пролина в клетках осуществлялся *de novo* по глутамат-синтазному пути. Катаболизм пролина, также как и его образование по орнитиновому пути, в стрессовых условиях ингибировались [164]. Весь пролин в этом случае составлял около 4% от всего пула свободных аминокислот в клетках табака, неустойчивых к действию солей, и около 80% в клетках, толерантных к хлориду натрия [164].

Цикл трикарбоновых кислот, как основной энергетический путь клетки также подвергается существенным изменениям в результате действия солевого стресса. Митохондриальное дыхание и активное функционирование цикла трикарбоновых кислот необходимы во время солевого стресса у растений для обеспечения клеток энергией АТФ для протекания процессов адаптации. Совсем недавно было показано, что пируватдегидрогеназный комплекс и 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс из листьев пшеницы

чувствительны к действию солевого стресса[49]. По сообщениям Че-Отмана (Che-Othman, 2020) солевой стресс инактивирующе действует на активность 2ОГДК и ПДК, что говорит о том, что работа ЦТК в условиях солевого стресса тормозится. Во время воздействия засоления ключевые метаболические ферменты, необходимые для циклической работы ЦТК, физиохимически ингибируются солью. Это ингибирование преодолевается повышенной активностью шунта ГАМК, которая обеспечивает альтернативный источник углерода для митохондрий, минуя чувствительные к соли ферменты, чтобы облегчить увеличение интенсивности дыхания листьев пшеницы[49].

Однако, по сообщениям Джи с соавт. (Ji et al., 2020) активность 2ОГДК и СДГ у проростков тополя (*Populus alba* × *Populus glandulosa*), обработанных различными концентрациями NaCl в течение 30 часов в значительной степени индуцируется NaCl. Видимо различия в характере воздействия солей натрия в экспериментах связаны со временем обработки растений хлоридом натрия, а также с чувствительностью растений к действию солевого стресса[99].

Засоление хлоридом натрия в течение длительного времени вызывает значительное увеличение количества промежуточных продуктов ЦТК: 2-оксоглутарата и сукцината в листьях пшеницы. 2-оксоглутарат в ЦТК образуется в результате окислительного декарбоксилирования изоцитрата с помощью ИДГ, а также может быть получен путем дезаминирования глутамата с помощью глутаматдегидрогеназы[99]. Повышенное содержание 2-оксоглутарата в листьях пшеницы в условиях действия солевого стресса может быть результатом повышенной активности одного или обоих этих ферментов. Отмечено низкое содержание нескольких органических кислот, в первую очередь цитрата и аконитата, что вероятно связано с ингибированием пируватдегидрогеназного комплекса. Более низкое содержание цитратов также наблюдалось у широкого круга растений в условиях солевого стресса,

тогда как снижение содержания аконитата наблюдалось только в листьях пшеницы[99].

Давно известно и не подвергается сомнению тот факт, что при солевом стрессе наблюдается увеличение концентрации ГАМК[160]. Было показано, что различные абиотические, а также биотические стрессовые стимулы вызывают повышение уровня ГАМК в растительной ткани. Например, было замечено, что солевой стресс в листьях сои (*Glycine max*) приводит к быстрому накоплению ГАМК до 25 раз [160]. По результатам исследований Ренолт (Renault et al., 2010) у мутантов по генам *rop2-1*, дефицитных по ГАМК-Т *A. thaliana*, уровень ГАМК увеличивается после обработки NaCl, что доказывает, что его концентрация также может быть результатом скорости его разложения [161]. Увеличение ГАМК при солевом стрессе также может зависеть от обратной активности ГАМК-Т, которая способна катализировать обратную реакцию от полуальдегида янтарной кислоты (ССА) к ГАМК[22];. Накопленная в цитозоле ГАМК затем переносится в митохондрии через митохондриальную пермеазу ГАМК, и преобразуется сначала в ССА с помощью ГАМК-Т, а затем в сукцинат, который входит в ЦТК[99]. Эта последняя стадия сильно влияет на окислительно-восстановительный статус клетки, потому что сукцинат обходит три реакции ЦТК с синтезом НАДН. Активность ГАМК-Т и ССАДГ, вероятно, скоординирована, чтобы предотвратить накопление ССА, и их кодирующие гены (например, *rop2* и *SSADH*) активируются в ситуациях, когда ГАМК увеличивается, например, при умеренном и высоком уровне засоления [161]. Фактически, правильное функционирование шунта ГАМК, по-видимому, необходимо для ограничения увеличения количества активных форм кислорода (АФК). Мутанты ГАМК-Т сверхчувствительны к засолению [161], а мутанты, нокаутные по генам ССАДГ демонстрируют некротическую гибель клеток, вызванную аномальным накоплением АФК, карликовостью и гиперчувствительностью к стрессам окружающей среды. Растения

Arabidopsis thaliana, продуцирующие более низкий конститутивный уровень ГАМК, показали более высокую восприимчивость к стрессу засухи из-за дефекта закрытия устьиц, который можно было исправить, увеличив внутренний уровень ГАМК [133]. В частности, соленость NaCl действует как сильный эффектор, увеличивающий содержание ГАМК[99]

1.2.1.2. Влияние светового режима на метаболизм растений

Способность реагировать и адаптироваться к изменяющимся экологическим стимулам имеет огромное значение для роста и развития растений. Среди этих факторов чрезвычайно важными для растений являются световые сигналы. Люди, в результате развития научно-технического прогресса научились использовать свет в качестве источника энергии. Однако растения научились использовать «энергию солнца» гораздо раньше.

Растения ведут неподвижный, фотоавтотрофный образ жизни. Таким образом, весь их жизненный цикл находится под сильным влиянием постоянно меняющейся световой среды. В процессе фотосинтеза растительный организм напрямую использует световую энергию для вегетативного роста. Помимо этого, свет, может также выступать в качестве старт-сигнала для запуска важных онтогенетических и физиологических процессов растений, таких, например, как эмбриогенез, и адаптивная реакция на стресс. Влияние света связано с регуляцией центральных метаболических процессов, включая дыхание и фотосинтез. Красный и дальний красный свет являются важными сигналами в регуляции роста, развития, размножения растений, циркадных ритмов и адаптивных ответов. Также, свет оказывает влияние на процессы роста и развития растений посредством изменения транскрипционной активности генов, трансляционного контроля и пост-трансляционной модификации белков.

Свет - важный и динамичный экологический сигнал для многих процессов онтогенеза. Процесс фотоморфогенеза широко используется для исследований светочувствительных и сигнальных путей, регулируемых на разных уровнях. Во-первых, деградация белка в ответ на световое воздействие приводит к положительной и отрицательной регуляции работы различных ферментных систем. Во-вторых, светорегулируемое фосфорилирование белка включает в себя активацию как фоторецепторов, так и сигнальных молекул. В-третьих, регуляция трансляции осуществляется в ответ на световой или темновой сигнал [190].

Синий свет также регулирует многие фотоморфогенетические и метаболические реакции растений. Фоторецепторами синего света считаются флавины и каротиноиды. Есть данные о том, что синий свет ингибирует митоз [189].

По имеющимся данным, общая ассимиляция CO_2 на синем свете более активна, и это обусловлено тем, что синий свет активизирует процессы транспорта электронов в реакциях углеродного цикла. Там, где донором электронов служила H_2O , синий свет повышал активность фотовосстановления НАДФ⁺ в 2 раза, если сравнивать активность такой же реакции у растительных организмов на красном свете. Спектр света показывает состав продуктов, которые синтезируются при фотосинтезе: на синем свете преимущественно органические кислоты и аминокислоты, а на более позднем этапе – белки. А на красном свете происходит индукция синтеза растворимых углеводов, а в дальнейшем – крахмала[57]. Показано регулирующее действие синего света на активность ферментов фотосинтетического превращения углерода. Растения, которые были выращены на синем свете, демонстрировали высокую активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, гликолатоксидазы, и др[189]. Изменение активности ферментов цикла трикарбоновых кислот, в том числе 2-ОГДК, связано с синергическим действием синего света на *de novo* синтез полипептидов[189].

Высшие растения обладают несколькими семействами фоторецепторов, которые могут улавливать свет от ультрафиолетового-В света до дальнего красного. Смена освещенности, переход от темноты к свету имеют фундаментальное значение для выживания растений. Смена светового режима влияет на все аспекты роста и развития растений. Световые сигналы воспринимаются фоторецепторами, которые способны различать световые волны различной длины. Фоторецепторы, а именно фитохромы (воспринимают красный и дальний красный свет)[96]. Анализ литературных источников позволил установить, что УФ-А и синий свет воспринимаются фоторецепторами, которые в настоящее время принято делить на три класса: криптохромы, фототропины и члены семейства *Zeitlupe*. Известно, что у *Arabidopsis thaliana*, эти фоторецепторные системы представлены среди криптохромов генами *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*; среди фототропинов генами *phot1* и *phot2*; *ZTL*, *FKF1* и *LKP2* среди членов семейства *Zeitlupe*[102]. Способность воспринимать свет различной длины волны и интенсивности активирует несколько путей передачи сигналов, которые, в свою очередь, регулируют рост, физиологию, морфологию и иммунитет растений [102, 181]. Кроме того, сами фотосинтетические реакции регулируют биохимические механизмы в тканях растений [123]. Об этом свидетельствует тот факт, что у *Arabidopsis thaliana* и некоторых других растений ряд генов транскрипционно индуцируется циркадными ритмами [57]. Сообщается, что циркадные часы тщательно регулируют защитные механизмы растений [96].

Из-за различий в световом спектре, интенсивности, направлении и фотопериоде ряд фоторецепторов, включая фитохром, криптохром и фототропин, эволюционировали, чтобы адаптировать растения к различным условиям освещения [96]. Функциональная специализация в семействах фоторецепторов привела к появлению фоторецепторов, которые способны улавливать свет широкого диапазона интенсивности. Генетические и фотобиологические исследования, проведенные на растениях *A. thaliana*,

показали, что эти световые сенсоры опосредуют многочисленные адаптивные реакции (например, фототропизм и избегание тени) и переходы в развитии (например, прорастание и цветение). Некоторые физиологические реакции специализированы на запуске конкретным фоторецептором, однако, известно, что чаще всего несколько фоторецепторов обеспечивают скоординированный ответ. Имеются данные о том, что у *A. Thaliana* на некоторые внешние стрессоры наблюдаются перекрестные ответы, которые могут быть взаимоисключающими и/или взаимозамещающими (например, между светом и температурой, или светом и патогенами)[102].

Фитохром - важный класс фоторецепторов, которые воспринимают красный и дальний красный свет[77, 116]. На сегодняшний день у *Arabidopsis* идентифицировано пять фитохромов (phyA, phyB, phyC, phyD, phyE), которые, ко всему прочему обладают двумя фото-взаимопревращаемыми формами [185, 105]. Под воздействием красного света конформация фитохромов аллостерически изменяется от неактивной формы, поглощающей красный свет, до активной формы, поглощающей дальний красный свет. Неактивная форма находится в цитозоле, тогда как активная форма находится в ядре [185, 105]. После транслокации в ядро фитохромы в активной форме взаимодействуют с множеством факторов, чтобы регулировать транскрипцию генов-мишеней и опосредовать последующие организованные фотореакции [105]. Транскрипционные факторы, взаимодействующие с фитохромом (PIF), в первую очередь действуют как негативные регуляторы фотоморфогенеза в ответ на световое воздействие. Кроме того, известно, что PIF-ы, также могут регулировать многие другие пути, включая биосинтез антоцианов, термоморфогенез, передачу гуморальных сигналов и реакцию на биотические и абиотические стрессы путем взаимодействия с множеством клеточных молекул [201]. Имеются данные, что у кукурузы (*Zea mays*) гены *ZmPIF1* и *ZmPIF3* могут увеличить устойчивость риса к засухе, вызывая закрытие устьиц [201]. Известно, что у растений, мутантных по гену *pif4* рост гипокотилей нечувствителен к

действию высоких температур (29 °C), что указывает на ключевую роль AtPIF4 в термореактивном росте растений. Таким образом, PIF считается центром интеграции экологических и гормональных сигнальных путей [201].

В растительных организмах при дневном свете работа ЦТК ингибируется, хотя и не полностью, что связано с наличием фотосинтетической системы, которая и берет на себя основную роль в таких условиях, обеспечивая клетку энергией. Индукция ЦТК осуществляется в большей степени в темноте для дополнительного притока энергии в виду отсутствия фотосинтеза, что подтверждается рядом исследований[93]. Так, известно, что для большей части митохондриальных ферментов – участников ЦТК, таких как сукцинатдегидрогеназа (СДГ, К.Ф. 1.3.99.1), малатдегидрогеназа (МДГ, К.Ф. 1.1.1.37), аконитатгидратаза (АГ, КФ 4.2.1.3), цитратсинтаза (ЦС, К.Ф. 2.3.3.1 ранее 4.1.3.7), фумараза (ФГ, К.Ф. 4.2.1.2), установлено повышение активности в темноте и снижение на свету[67,68,69,71]. Эксперименты, проведенные с использованием специфических ингибиторов (сукцинилфосфонат и карбоксиэтиловый эфир являются ингибиторами медленного связывания 2-ОГДК) продемонстрировали ингибирующее действие белого света на функционирование 2ОГДК. Инкубация листовых дисков со специфическими ингибиторами 2ОГДК показала, что они оказывают ожидаемое влияние на активность 2ОГДК *in situ*[30]. Снижение частоты дыхания связано с изменениями в регуляции метаболических и сигнальных путей, что приводит к дисбалансу углеродно-азотного метаболизма и клеточного гомеостаза. Индуцибельное изменение первичного метаболизма было связано с модуляциями экспрессии генов, принадлежащих аминокислотному биосинтезу, дыханию растений и метаболизму сахаров[30, 159]. Окисление 2ОГ 2-оксоглутаратдегидрогеназой сильно влияет на распределение промежуточных продуктов цикла трикарбоновой кислоты и ГАМК- шунта. ЦТК явно работает нециклическим образом при ингибировании 2-ОГДК в течение светового периода [30].

В освещенных листьях интенсивность декарбоксилирования ЦТК снижается на 80%, а реакция декарбоксилирования, осуществляющаяся пируватдегидрогеназой снижает свою интенсивность на 30% по сравнению с темновым дыханием [30]. Возможно, что этой активности недостаточно для производства всего 2ОГ, необходимого для ассимиляции азота. Однако в фотосинтетических тканях активность полного цикла лимонной кислоты, по-видимому, снижена, и нециклический путь, вероятно, более важен в освещенных листьях из-за транспорта органических кислот из митохондрий [179]. В литературных источниках имеются убедительные доказательства того, что работа ЦТК в освещенных листьях важна для обеспечения 2ОГ [87, 30]. Процесс ассимиляции азота влияет на дыхание в течение светового периода[30].

Но не только ЦТК, вместе со всеми его участниками подвергается значительным функциональным изменениям в результате смены светового режима. Известно, что дневной свет высокой интенсивности и УФ-излучение, индуцируют работу ГАМК-шунта, а также накопление ГАМК [99]. Имеются данные, согласно которым активация ГАМК-шунта в освещенных листьях высших растений обуславливается снижением активности или же полной инактивацией 2ОГДК, в связи с чем обходной путь обеспечивает ЦТК сукцинатом за счёт работы ССАДГ[79].

1.2.1.3. Влияние низких концентраций кислорода на метаболизм растительной клетки

Высшие растения часто испытывают недостаток кислорода, в основном связанный с затоплением, заболачиванием и орошением. Примерно 16% плодородных земель во всем мире подвержены заболачиванию почвы [130]. Переувлажнение приводит к снижению уровня кислорода в корневой зоне растений из-за низкой скорости диффузии молекулярного кислорода в воде. Последствия гипоксии, такие как снижение энергетического заряда

клеток, закисление рН цитоплазмы и накопление токсичных конечных продуктов анаэробного дыхания и активных форм кислорода (АФК) во время восстановления, ответственны за наблюдаемое падение темпов роста и урожайности многих важных сельскохозяйственных культур [130].

У растений, подвергшихся гипоксии, происходят резкие метаболические изменения. Защитные механизмы вынуждены справляться с потенциальным повреждением [130]. За время эволюционных преобразований растительный организм выработал множество приспособлений, обеспечивающих защиту от гипоксического и аноксического стрессов. Явление гипоксии оказывает существенную роль на метаболические процессы, протекающие в растительном организме. Митохондрии, как участники клеточного дыхания осуществляют энергетическую поддержку клеточного гомеостаза за счёт аэробного синтеза. В связи с этим, митохондрии в первую очередь подвергаются воздействию гипоксии и аноксии [10, 11, 59]. Следует отметить, что адаптационным изменениям подвержены абсолютно все клеточные процессы, и, в первую очередь, биоэнергетика клетки, так как в большей степени адаптивная перестройка молекулярных, биохимических, морфологических характеристик растительного организма является энергозависимым процессом.

Механизмы биохимических перестроек, обеспечивающих приспособление растительных организмов к недостатку кислорода, весьма многочисленны: торможение распада липидов и полипептидов; синтез белков аноксического ответа и гормонов, переключение метаболических путей на анаэробноз, трансформация дыхательных путей.

Трансформация дыхательных путей возможна тремя разными способами. При аноксии происходит увеличение доли гликолиза в метаболизме растения. Это, в первую очередь, связано с тем, что ЦТК не способен функционировать в бескислородной среде. Окислительное фосфорилирование также не осуществляется. В связи с этим, единственный

способ получить АТФ – гликолиз. При гипоксии происходит возрастание доли пентозофосфатного пути [17]. Механизм переключения на альтернативные пути окисления восстановленных коферментов также является адаптацией клеточного метаболизма, которая трансформируя дыхательные пути обеспечивает приспособление к условиям гипоксии/анноксии[155, 196].

Высшие растения – облигатные аэробы, следовательно, они всегда нуждаются в доступном молекулярном кислороде, что делает их чувствительными к колебаниям газового состава в среде обитания[196]. Эволюционные преобразования многих видов позволили им освоить и заселить анаэробные затопленные, а также гидроморфные почвы [155]. Среди культурных растений рис (*Oryza sativa* L.) является видом, который достаточно хорошо освоил механизмы адаптации к гипоксическим условиям среды, произрастая исключительно в затопленных условиях, хотя и для этого вида аноксический стресс, вызванный полным погружением растений, является непростым испытанием [133].

Кукуруза (*Zea mays* L.) относится к устойчивым к заболачиванию видам растений, которые адаптируются к гипоксии за счет развития аэренхимы в корнях для вентиляции[133]. Кроме того, некоторые виды водно-болотных растений образуют субериновый барьер во внешних клеточных слоях корней, чтобы уменьшить радиальную потерю кислорода от аэренхимы [88, 166].

Как ранее уже упоминалось, ключевую роль в адаптации растений к гипоксии играют процессы гликолиза и ферментации, а также углеводный обмен [155, 78, 166]. Даже при незначительных падениях концентрации O_2 растительные организмы реагируют изменением соотношения АТФ/АДФ [166, 78]. Согласно некоторым литературным данным, при снижении уровня внутриклеточного АТФ на 15-20% наблюдается угнетение ведущих энергозависимых функционально-метаболических процессов. 30%-ное падение уровня АТФ относительно физиологической нормы приводит к

полному угнетению функционально-метаболических процессов, связанных с энергизацией клетки [10, 11]. В условиях гипоксии дыхательная цепь митохондрий участвует в формировании системы ответа организма на дефицит кислорода, таким образом, обеспечивая адаптивную реакцию клеточного метаболизма [10, 11]. Многочисленные исследования Лукьяновой показали, что повышение устойчивости к гипоксии связано с переключением потока электронов с дыхательной цепи митохондрий на активацию сукцинатоксидазного пути субстратного окисления. Это связано с тем, что сукцинатоксидазный путь энергетически более эффективен. В связи с этим, комплекс II ЭТЦ митохондрий участвует в сигнальной системе регуляции клеточно-митохондриального ответа на отсутствие, или же низкое содержание кислорода, как стрессового фактора [115, 10, 11, 166, 78].

Известно, что как гипоксия, так и аноксия быстро деполяризуют плазматическую мембрану (ПМ) высших растений примерно на 50 мВ, предположительно, за счет ингибирования электрогенных H^+ насосов [115].

Электрон-транспортная цепь митохондрий функционирует в аэробных условиях, используя кислород как акцептор электронов, в связи с чем, колебания в концентрации кислорода играют значительную роль в энергизации клетки. В гипоксических условиях цитохромоксидаза (ЦО) в использовании O_2 ограничена, а альтернативная оксидаза (АО) почти полностью ингибируется. Такое различие в работе обусловлено разным сродством к субстрату этих двух терминальных оксидаз [95].

Молекулярно-генетические исследования, проведённые на растениях риса и арабидопсиса, показали снижение транскрипционной активности генов участников цикла трикарбоновых кислот, ПДК, а также генов энзимов аминокислотного метаболизма [141]. Из-за нехватки терминального акцептора электронов - кислорода - дыхательный метаболизм не способен функционировать через цикл трикарбоновых кислот и электрон-транспортную цепь митохондрий, в связи с чем, активируется пируватдекарбоксилаза [95]. Во время гипоксии, когда цепь переноса

электронов не окисляет восстанавливающие эквиваленты, некоторые сегменты ЦТК остаются работоспособными и катализируют реакции в противоположных направлениях. Это служит цели использования высокоэнергетических фосфатов посредством фосфорилирования на уровне матричного субстрата в отсутствие окислительного фосфорилирования.

Экспрессия гена аланинаминотрансферазы, как уже упоминалось, в условиях гипоксии возрастала, и, как следствие, происходило увеличение содержания аланина в клетке растения. Его накопление было объяснено следующим образом: во время затопления пируват вступает в реакцию вместе с глутаматом и под действием АлАт образуется аланин и 2-оксоглутарата. 2-оксоглутарат в дальнейшем может метаболизироваться несколькими путями:

1. Через ЦТК, выступая субстратом для 2ОГДК;
2. Через ГАМК-шунт, выступая субстратом для ГДГ;
3. Выступая субстратом для Fe^{2+} -зависимой 2ОГ-оксигеназы(2ОГО)[35; 141].

Однако, следует отметить, что использование 2ОГ в ЦТК по последним сообщениям маловероятно – исследования проведенные на растениях *Oryza sativa* и *Arabidopsis* показали, что в гипоксических условиях 2ОГДК заметно снижается [141,154].

В литературе имеются данные, согласно которым неожиданная активация потребляющих кислород 2-оксоглутаратоксигеназ (2-ОГО) в условиях гипоксии была подтверждена метаанализом исследований гипоксических микроматриц [141, 154]. В «гипоксическом пути» повышенная активность Fe -зависимой 2-оксоглутаратоксигеназы обусловлена использованием 2-оксоглутарата и аскорбата в присутствии кислорода, таким образом, конкурируя за аскорбат с монодегидроаскорбатредуктазой (МДАР). По некоторым предположениям, 2-ОГ, необходимый для реакции, доставляется опосредованно через шунт

ГАМК, который охватывает цитозоль и митохондрии. Эти ферментативные реакции используются для подачи сукцината и оксалоацетата в ЦТК, минуя инактивированные компоненты цикла, и, таким образом, усиливают / модифицируют ЦТК[94].

При исследовании физиологических реакций *Zostera marina* L. на аноксию в темноте было установлено, что такие условия оказывают отрицательное влияние на интенсивность фотосинтеза и рост *Z. marina*. Гликолиз в этом случае интенсифицирован, а концентрация большинства важных метаболитов значительно увеличена. Кроме того, экспрессия гена 2-оксоглутаратдегидрогеназы, лимитирующей ЦТК, была значительно снижена, что указывает на то, что в условиях аноксии этот цикл ингибируется. В листьях было обнаружено пониженное содержание глутамата и незначительное снижение глутамина – веществ, потребляемых в механизмах шунтирования аланина и функционирования ГАМК-шунта. Исходя из этого, делается вывод, что аноксический стресс вызывает запрограммированный транскриптомный и метаболомный ответ у морских водорослей, что отражает сложную стратегию акклиматизации и адаптации этих растений к сопротивлению аноксическому стрессу[199].

В связи с тем, что ГАМК играет роль компонента E-2-гексенального сигнального пути в ответ на биотические стрессы, не удивляет тот факт, что ГАМК-шунт активируется в ответ на действие гипоксического стресса у сои[27]. Увеличение уровня ГАМК, по некоторым данным, регулирует ЦТК, для обеспечения притока энергии для поддержания энергозатратных реакции адаптации к абиотическим стрессам, в том числе и к гипоксии[195].

Глава II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

Целью работы являлось изучение физиолого-биохимических аспектов ферментативной регуляции метаболизма 2-оксоглутарата в листьях некоторых растений С3 и С4 типа в условиях солевого стресса, гипоксии, а также при облучении светом различного спектрального состава. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить субклеточную локализацию энзимов, метаболизирующих 2-оксоглутаровую кислоту, а также изменения их изоферментного состава в стрессовых условиях;
2. Получить высокоочищенные препараты ГДГ из С3 (*Triticum aestivum* L.) и С4 (*Zea mays* L.) растений и провести сравнительный анализ некоторых кинетических характеристик полученных белков;
3. Исследовать биохимические и физиологические аспекты функционирования 2ОГДК, ГДГ, ОД в растениях (*Zea mays* L., *Beta vulgaris* L., *Arabidopsis thaliana* L.) *in vivo* в условиях действия солевого стресса, гипоксии и при облучении светом различного спектрального состава;
4. Выявить роль процесса метилирования CpG-динуклеотидов промотора в регуляции транскрипции генов, кодирующих 2ОГДК, ГДГ, ОД в условиях действия различных стрессовых факторов.

2.2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1. Объекты исследования

Основным объектом исследований являлись проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76, выращенная гидропонно при десятичасовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м² (климатическая камера “LabTech”, Корея) и температурой окружающей среды 25°C.

Кроме того, в качестве дополнительных объектов использовались проростки сахарной свёклы *Beta vulgaris* L. (СЗ-растение) сорта МС17017 (ФГБНУ «ВНИИ сахарной свёклы и сахара им. Мазумова») и 12-дневные проростки пшеницы *Triticum aestivum* L., сорта Московская-40, выращенные при 16 часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м² (климатическая камера «LabTech», Корея) и температурой окружающей среды 25°C. Также, в работе использовались 24-дневные проростки *Arabidopsis thaliana* L. четырех линий: дикого типа (Col-0) и нокаутных по генам фоторецепторов: фитохрома А (*phyA-201*), фитохрома В (*phyB-1*), криптохрома (*cry-4*) (Институт М. Планка, Гольм, Германия), выращенные при 12-часовом световом дне.

2.2.2 Методы исследования

2.2.2.1 Постановка эксперимента по индукции солевого стресса

Индукция солевого стресса осуществлялась путём помещения растений из опытной группы, с предварительно удаленной корневой системой, в 0.15 М раствор NaCl на двадцать четыре часа. В качестве контрольной группы использовались растения, помещённые на время всего эксперимента в воду. Первые образцы для исследования отбирались ещё до начала инкубации (нулевой образец).

2.2.2.2 Постановка эксперимента по влиянию света различных длин волн

Растения помещали в камеру на 24 часа (вариант «темнота»), после чего облучали красным (640–680 нм), и/или дальним красным (710–750 нм), синим (465–470 нм) светом в течение 15 мин с интенсивностью 4 мкмоль•м⁻²•с⁻¹, используя соответственно светодиоды 640–680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия), 710–750 нм (ЗЛ127А-5-5, Россия) и 465–470 нм (КИПД40М30-С1-7, Россия) для облучения синим светом. Пробы для анализа отбирали через 3 часа после

облучения. Экспозиция растений из группы «свет» осуществлялась в обычных условиях с 12 часовым световым периодом.

2.2.2.3 Постановка эксперимента по действию гипоксии

Растения предварительно помещали в вакуум-эксикаторы на 24 часа без доступа света, после чего в эксикатор с опытной группой растений в течение суток подавался азот из баллона 10150У (ГОСТ 94973, Россия, УЗГПО) со средней скоростью 18 см³/сек. Контрольная группа находилась в среде, куда непрерывно осуществлялся приток кислорода воздуха.

Согласно сертификату соответствия содержание кислорода в баллоне с азотом составляло ≤ 0.5 %. Температура окружающей среды во время эксперимента поддерживалась на уровне 25 °С. Первые образцы для исследования изымались до начала эксперимента.

2.2.2.4 Обработка рутением красным и ЭГТА

Для исследования участия кальция в регуляции работы ГДГ при действии различного светового спектра проростки кукурузы инкубировались в 25 мМ растворе рутения красного в течение 60 минут в темноте для ингибирования кальциевых каналов. Инкубация растений в темноте в 5 мкМ растворе ЭГТА на протяжении 1 часа обеспечивала связывание ионов кальция.

2.2.2.5. Выделение энзимов

2.2.2.5.1. Изоплотностное центрифугирование

Для исследования субклеточной локализации проводили центрифугирование в градиенте плотности сахарозы[13]. Градиент создавался путем последовательного наложения растворов сахарозы в концентрациях: 2.5 М, 2.3 М, 1.8 М, 1.5 М, 1.3 М. Образцы гомогенизировали в среде выделения (1:5), которая содержала 0.1 М Tris-HCl буфер pH 8,0; 0,4 М C₁₂H₂₂O₁₁; 2 мМ KCl; 1 мМ ЭДТА; 3 мМ дитиотреитол.

Далее отфильтровали и центрифугировали 3-4 минуты при 1000 об./мин, отобрали надосадок и центрифугировали еще 3-4 минуты с той же скоростью. Супернатант центрифугировали при 11000 об./мин. Осадок растворили в 10 мл среды выделения и наслаивали на вершину охлажденного до 0°C ступенчатого сахарного градиента, состоящего из следующих ступеней: 2.5 М (2 мл); 2.3 М (5 мл); 1.8 М (6 мл); 1.5 М (5 мл); 1.3 М (5 мл). Разделение органелл достигали путем центрифугирования на центрифуге Beckman (США) при 100 000g 90 минут при 0°C. Полученные фракции отбирали и разбавляли буфером до концентрации сахарозы 0.4-0.5 М, затем центрифугировали 30 мин при 11000 об./мин для осаждения органелл. Полученные осадки разрушали осмотическим шоком (в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7.5).

2.2.2.5.2 Выделение митохондрий

Экстракция фракции митохондрий из проростков кукурузы осуществлялась путем гомогенизации образцов в ледяной среде выделения включающей: 0.15 М калий-фосфатный буфер (pH 7.4), 0.4 М сахароза; 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорид калия, 4 мМ хлорид магния в соотношении 1:10. Гомогенат фильтровали и центрифугировали 3 минуты при 3000 об/мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R. Супернатант центрифугировали 10 минут при 20 000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.4). В суспензию митохондрий, используемую для определения активности 2-ОГДГ, при ресуспендировании осадка дополнительно добавляли 0.2 мМ ТДФ. Все манипуляции проводили при температуре +4°C.

2.2.2.5.3 Выделение хлоропластов

Навеску растительного материала гомогенизировали при +4 °С с ледяным буфером экстракции : 50 мМ Трис-HCl (pH 8), 0.3 М Сахарозы, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и свежеприготовленный 0.2% БСА. Фильтровали

через Mesh 100 (Sigma-Aldrich, США) очищенный гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 7 мин при +4 °С. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 7 мл буфера для выделения и повторяли этап дифференциального центрифугирования. После, супернатант удаляли и собирали осадок хлоропластов[81].

Для экстракции ОД и ГДГ из гомогената растительный материал растирали при +4 °С со средой экстракции: 50 мМ Трис-НСl (рН 8); 1 мМ ЭДТА, 0.05% Тритон X-100, 0.5% ПВП-40. Затем гомогенат фильтровали и осаждали клеточные стенки при 5000 g в течение 3 минут.

2.2.2.6. Определение активности энзимов

2.2.2.6.1. Определение активности 2ОГДК

Активность 2-ОГДК определяли при 25⁰С на спектрофотометре Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) по скорости образования НАДН при 340 нм в реакционной среде, содержащей: 1 мМ 2-оксоглутарат калия, 2 мМ НАД⁺, 0.5 мМ MgCl₂, 0.12 мМ литий-СоА, 0.2 мМ ТДФ, 2.5 мМ цистеин, 1 мМ АМФ, 0.05% Тритон X-100, 0.1 М Трис-НСl буфер (рН 7.5) [31].

2.2.2.6.2. Определение активности ГДГ

Активность ГДГ по реакции аминирования определяли спектрофотометрическим методом при 340 нм в среде, содержащей 13 мМ 2-оксоглутарата, 0.25 мМ НАДН, 1мМ СаCl₂, 50 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1 М Трис-НСl буфер (рН 8.0) [168]; Активность ГДГ по реакции дезаминирования определяли по скорости образования НАДН в реакционной смеси, содержащей следующие компоненты: 0.05 М глутамата натрия, 1 мМ СаCl₂, 3 мМ НАД⁺, 0.1 М Трис-НСl буфер (рН 8.5) по методу Такахаси и

Фурухаши (Takahashi, Furuhashi), с некоторыми модификациями Томоюки (Tomoyuki) [194].

2.2.2.6.3. Определение активности ОД

Активность ОД определяли спектрофотометрически при 340 нм путём регистрации окисленного НАД⁺, образующегося в результате работы ГДГ, которая являясь компонентом среды спектрофотометрирования осуществляет окисление 2-оксоглутарата - продукта реакции, катализируемой ОД, в среде спектрофотометрирования следующего состава: 100 мМ Трис-НСl буфер (рН 8.0), 1 мМ гидроксицитрата калия (Sigma Aldrich, CAS Number [232281-44-6](#), PubChem Substance ID [329758630](#)), 50 мМ NH₄Cl, 0.4 мМ НАДН, 1мМ ДТТ, 0.2 Е ГДГ. Запуск реакции осуществляли путём добавления гидроксицитрата калия. В качестве контроля использовали среду спектрофотометрирования с ферментным препаратом без добавления субстрата.

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при 25 °С при оптимальном значении рН.

2.2.2.7. Схема очистки ГДГ

Очистку глутаматдегидрогеназы проводили в четыре-пять стадий при +4°С. Гомогенизованный со средой экстракции (1:5) растительный материал центрифугировали в течение 3 минут при 5000 об/мин, после чего фракционировали NH₄(SO₄)₂ в две стадии: от 0 до до 35% насыщения раствора и от 35 до 70%. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl буфере (рН 7.8) объемом 2 мл. Удаление солей аммония осуществляли путем гель-фильтрации через сефадекс G-25. Эллюировали 50

мМ Трис-НСl буфером (рН 8.0). Полученный препарат подвергли ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Sephacel (GE Healthcare, Швеция). Десорбцию производили линейным градиентом NaCl от 0.15 до 0.35 М [90]. Затем, очистку препарата проводили путем гель-хроматографии на сефадексе G-200[107].

2.2.2.8. Определение концентрации белка

Белок определяли по методу Лоури [121] и по методу Брэдфорда[39].

2.2.2.9. Электрофоретическое исследование белков

2.2.2.9.1. Неденатурирующий электрофорез в ПААГ

Изоферментный состав определяли путём проведения электрофореза в ПААГ по методу Дэвиса при 2–4 °С. Для исследования изоферментного состава 2ОГДГ, белок концентрировали с помощью крупнопористого концентрирующего 3%- ного полиакриламидного геля. Разделение белков проводили с помощью мелкопористого разделяющего геля (6.5 % полиакриламида). Концентрация верхнего геля при исследовании изоформ ГДГ составляла 4%, а нижнего геля – 7%. Приготовление гелей осуществляли по методике Мауэра [12].

2.2.2.9.2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ

Электрофоретические исследования белков в 7% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия по Лэммли позволило провести определение молекулярной массы отдельных субъединиц ГДГ[110]. Разделяющий гель представлял собой 2.5% раствор акриламида, 10% СДС; 10% аммония персульфата; 0.025% ТЕМЕД; 0.4 М Трис-НСl буфер (рН 8.8). В состав верхнего концентрирующего геля входило 6% акриламида; 10% СДС; 0,025% ТЕМЕД и 10% персульфата аммония, 0.4 М Tris-НСl (рН 6.8).

Препарат смешивали со средой нанесения (62.5 мМ Tris-HCl буфер (pH 6.8), 2% СДС, 10% глицерин, 5% β- меркаптоэтанол и 0.001% БФС) и проводили 10 минутную денатурацию 80 °С. Молекулярную массу субъединиц определяли при помощи белкового маркера Page Ruler (Fermentas, США).

2.2.2.9.3. Окрашивание белков на гомогенность

Универсальное окрашивание белков проводили с помощью AgNO₃ [171].

2.2.2.9.4. Специфическое проявление белков

2.2.2.9.4.1. Специфическое проявление 2ОГДГ

Специфическое проявление 2ОГДГ осуществлялось с помощью модифицированного тетразолиевого метода [180]. Гелевые пластинки инкубировались в темноте в присутствии среды инкубации: 0.1 М Tris HCl (pH 7.5), 0.43 мМ НСТ, 0.05 мг/мл ФМС, 0.5 мМ MgCl₂, 2 мМ НАД⁺, 0.12 мМ CoA-SH, 0.2 мМ ТДФ, 2.5 мМ цистеин, 1 мМ АМФ, 1 мМ 2-оксоглутарата.

2.2.2.9.4.2. Специфическое проявление ГДГ

Специфическое проявление ГДГ осуществляли тетразолиевым методом. Окрашивание проводили путем инкубации геля в темноте в среде, содержащей 1 мМ ФМС; 1.8 мМ нитросинего тетразолия; 2 мМ НАД, 10 мМ глутамата натрия, 0.1 М Tris-HCl буфера (pH 8.0) [180].

2.2.2.10. Определение молекулярной массы нативного белка

Молекулярную массу нативной молекулы очищенной ГДГ определяли путем регистрации объема выхода ($V_{\text{вых}}$) фермента при прохождении его через колонку (1.5*45 см), заполненную Sephadex G-200 (сверхтонкий). Молекулярную массу (M_r) ГДГ рассчитывали по формуле Детермана [3]:

$$\lg M_r = 6.698 - 0.987 * \frac{V_{\text{вых}}}{V_{\text{св}}},$$

где $V_{\text{вых}}$ – объем выхода фермента, мл; $V_{\text{св}}$ – свободный объем колонки, мл, который определяли с использованием голубого декстрана.

2.2.2.11. Исследование кинетических характеристик регуляции активности ферментов

Кинетические свойства ферментов изучали на электрофоретически гомогенных и высокоочищенных препаратах. Определение констант Михаэлиса осуществляли с использованием программ линейной аппроксимации по методу наименьших квадратов[4].

Влияние значений рН на скорость ферментативной реакции полученных молекулярных форм ГДГ определяли путем проведения серии измерений скорости ферментативной реакции при различных значениях рН.

2.2.2.13. Количественный анализ пролина

Пролин экстрагировали троекратно в течение часа раствором 4% толуола при комнатной температуре, после чего экстракт объединяли. Количество пролина определяли путём проведения реакции с нингидрином и регистрации оптической плотности раствора при 520 нм. В качестве контроля использовали чистый толуол [84].

2.2.2.14. Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществлялось путем лизиса растительной ткани в буфере, содержащем: 2% ЦТАБ, 1.4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 0.1 М Трис-HCl (рН 8.0)[15]. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически на приборе Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) в 0.09% растворе при 260 и 320 нм. Расчёт концентрации проводился при помощи онлайн-протокола http://www.molbiol.edu.ru/protocol/10_01.html

2.2.2.15. Конверсия ДНК бисульфитом натрия

Конверсия ДНК проводилась в три этапа с использованием бисульфита натрия в качестве основного модифицирующего агента [89]. На первом этапе, предварительно денатурированная ДНК (инкубация при 55 °С в присутствии 0.3М NaOH) модифицировалась путём добавления 500 мкл смеси 4 М раствора NaHSO₃ и 0.2 М гидрохинона с последующей инкубацией в темноте при 55 °С в течение 4 часов.

На втором этапе происходила очистка модифицированной ДНК от бисульфита натрия с использованием набора DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen, Германия).

Десульфонирование модифицированной ДНК осуществляли путем инкубации с 0.3 М NaOH в течение 20 минут при 37°С. Для осаждения ДНК из раствора добавляли 2 мкл раствора гликогена в концентрации 20 мг/мл, 35 мкл, 10 М ацетата аммония и 3 объема 80% этанола, после чего инкубировали не менее 20 минут при -20° С. Затем, центрифугировали в течении 30 минут при 13 000 об/мин, дважды промывали охлажденным 80% этанолом, высушивали и растворяли в воде, свободной от ДНКаз.

2.2.2.16. Выделение РНК

Суммарная РНК выделялась методом экстракции фенолом и смеси хлороформа и изоамилового спирта с использованием LiCl для очистки от ДНК [50 ; 131].

2.2.2.17. Электрофорез в агарозном геле

Разделение нуклеиновых кислот осуществляли с помощью 1% агарозного геля (Helicon, Россия) с добавлением бромистого этидия (Sigma Aldrich, США). Визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли в 2% агарозном

геле [5]. Для визуализации использовали трансиллюминатор Serva Blue cube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) с длиной волны 312 нм.

2.2.2.18. Реакция обратной транскрипции

В качестве метода получения кДНК использовали выделенную суммарную РНК в реакции обратной транскрипции с использованием набора MMLV-RT Kit (ЗАО «Евроген») в соответствии с протоколом производителя.

2.2.2.19. Полимеразная цепная реакция

Real time – ПЦР проводили на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) с использованием разработанных праймеров (Приложение, табл. 1), применяя SYBR Green I в качестве интеркалирующего красителя. Амплификация осуществлялась по следующим параметрам: предварительная денатурация – 95°C, 5 мин; проведение 35 циклов, включающих стадии: 95°C – 10 сек; $T_{\text{отжига}}$ – 10 сек; 72°C – 10 сек. В завершении проводили 10 минутную финальную элонгацию при 72°C. Количественный контроль матрицы проводили с использованием ген-специфических праймеров к генам домашнего хозяйства (факторы элонгации *Ef-1 α*). В качестве отрицательного контроля использовалась суммарная РНК, без стадии ОТ-ПЦР. Расчёт значений относительного уровня транскриптов исследуемых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [5].

2.2.2.20. Анализ промоторной области генов на наличие CpG-островков

Анализ промоторов исследуемых генов на наличие CpG-островков и подбор праймеров для МС-ПЦР (Приложение, табл. 2-3) осуществляли с помощью онлайн-сервиса MethPrimer.

2.2.2.21. Проведение метил-специфичной ПЦР

Для исследования метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в промоторах исследуемых генов проводили метил-специфичную ПЦР с применением ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва), используя в качестве матрицы ДНК, модифицированную бисульфитом натрия. Амплификацию проводили на приборе Mini AMP Thermal cycler (Thermo Fisher, США) по схеме: предварительная денатурация (10 минут, 95°C), собственно амплификация (35 циклов), финальная элонгация (10 минут, 72°C). В ходе 35 циклов амплификации проводили денатурацию (30 сек, 95°C), амплификацию (30 сек, 52°C), элонгацию (30 сек, 72°C).

Расчет численных значений степени метилирования промоторов исследованных генов осуществлялся на основании результатов электрофореза ампликонов МС-ПЦР. Степень метилирования промоторной области представляет собой суммарное значение результатов метил-специфичной ПЦР исследуемых CpG-динуклеотидов конкретного гена. Для оценки степени метилирования промотора применялись следующие критерии: 0% метилирования - все три исследованных CpG- динуклеотида неметилированные; 25% метилирования - частично метилированы 1 или 2 CpG-динуклеотида или 1 CpG-динуклеотид метилирован полностью; 50% метилирования – полностью метилированы 1 или 2 CpG-динуклеотида или все три исследованных CpG- динуклеотида частично метилированы; 75% метилирования - 1 или 2 CpG- динуклеотида частично метилированы, а остальные - полностью метилированы; 100% метилирования - все три CpG-динуклеотида метилированы.

2.2.2. 22. Бисульфитное секвенирование

Праймеры для амплификации промоторных участков, включающих CpG-островки исследуемых генов на матрице конвертируемой бисульфитом

натрия ДНК конструировали с использованием программы MethPrimer (Приложение, табл. 4). Амплификацию осуществляли по стандартной схеме (п.п. 2.2.2.19.). Очистку фрагментов осуществляли с помощью набора QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Полученные образцы были секвенированы по методу Сэнгера в ЗАО «Евроген» (Москва). Анализ полученных результатов проводили с помощью онлайн-сервиса Quma (<http://quma.cdb.riken.jp>).

2.2.2.23. Статистическая обработка данных

Опыты проводили в 3-4-кратных биологических повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0.

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка.

Результаты на графиках выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. Для множественных сравнений критерий Стьюдента использовался с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) [9, 197].

Глава II. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние солевого стресса на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 20Г

1. 1. Изменение содержание пролина при действии солевого стресса

Известно, что для растительных клеток характерно увеличение синтеза пролина в ответ на действии солевого стресса. Ранее, было показано, что воздействие на растения кукурузы 150 мМ раствором натриевой соли соляной кислоты индуцирует у растений кукурузы солевой стресс, при этом не вызывая солевого шока[174]. Для растений *A. thaliana* пороговой концентрацией для индукции стрессового воздействия, также является 150 мМ NaCl. Увеличение количества хлорида натрия в среде до 225 мМ приводит к гибели растений[51].

В ходе исследования, нами была измерена концентрация пролина в зеленых листьях кукурузы при действии солевого стресса (Приложение, Табл. 5). Показано увеличение уровня искомой аминокислоты в 3.1 раза, начиная с первого часа инкубации растений в растворе хлористого натрия. В дальнейшем, уровень пролина продолжал возрастать, достигая максимума на 24 час солевого воздействия, превышая значения контрольной группы более чем в 4 раза.

Таким образом, полученные данные по изменению содержания пролина в растительных клетках свидетельствуют о том, что инкубация проростков кукурузы в 150 мМ растворе хлорида натрия приводила к возникновению солевого стресса, что соотносится с ранее полученными данными для других растительных объектов[51, 174].

1.2. Влияние солевого стресса на функционирование 2ОГДК

1.2.1. Субклеточная локализация 2ОГДК

Для уточнения информации о субклеточной локализации 2ОГДК было проведено изоплотностное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы. Результаты проведенного исследования (Табл. 1) показывают, что активность 2ОГДК обнаруживается преимущественно в митохондриальной фракции – 98.5 %. Небольшая активность исследуемой ферментной системы присутствовала в цитоплазматической фракции, однако это, вероятно связано с небольшой долей загрязнения цитоплазмы митохондриями.

Таблица 1

Субклеточная локализация 2ОГДК-активности в листьях кукурузы
(n=4, p <0.05)

Фракция органоидов	Общая активность, Е/грамм сырой массы	% активности фермента от общего содержания
Пероксисомы	-	-
Цитоплазма	2.1	1.5
Хлоропласты	-	-
Митохондрии	137.4	98.5

Степень чистоты полученных фракций определяли путем измерения активности маркерных ферментов (цитоплазмы – алкогольдегидрогеназы, митохондрий - сукцинатдегидрогеназы, пероксисом – каталазы). В качестве показателя загрязнения хлоропластной фракцией исследовали содержание хлорофилла (см. Приложение, Табл. 7). Установлено, что уровень перекрестного загрязнения для цитоплазматической фракции не превышает 3.4 %, для хлоропластной и митохондриальной фракций – 6%, для пероксисомальной фракции – 1.1%.

1.2.2. Изоферментный состав 2ОГДК

В рамках работы был исследован изоферментный состав 2ОГДГ в зеленых листьях кукурузы посредством проведения неденатурирующего электрофореза в ПААГ с последующим проявлением фермента тетразолиевым методом. Установлено, что в листьях кукурузы присутствует только одна форма, проявляющая 2ОГДГ-активность, которая на электрофореграмме локализуется белковой полосой, со значением электрофоретической подвижности равной 0.06(Приложение, Рис.1).

1.2.3 Изменение активности 2ОГДК

Проведенное исследование влияния натриевой соли соляной кислоты на функционирование 2ОГДК *in vivo* позволило установить, что солевой стресс оказывает активирующий эффект на ферментативную активность 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса в растительных объектах как с С4, так и с С3 типом метаболизма. В листьях кукурузы показатель общей активности исследуемой системы увеличивается уже спустя час после инкубации в солевом растворе почти в 3 раза по сравнению с контролем (Рис. 4). Максимальные значения отмечены на 2 час инкубации. В последующие часы эксперимента наблюдалось постепенное снижение скорости функционирования исследуемой системы. По истечении двенадцати часов, активность 2-оксоглутаратдегидрогеназного ферментного комплекса соответствовала значениям, характерным для растений, инкубированных в воде на протяжении суток.

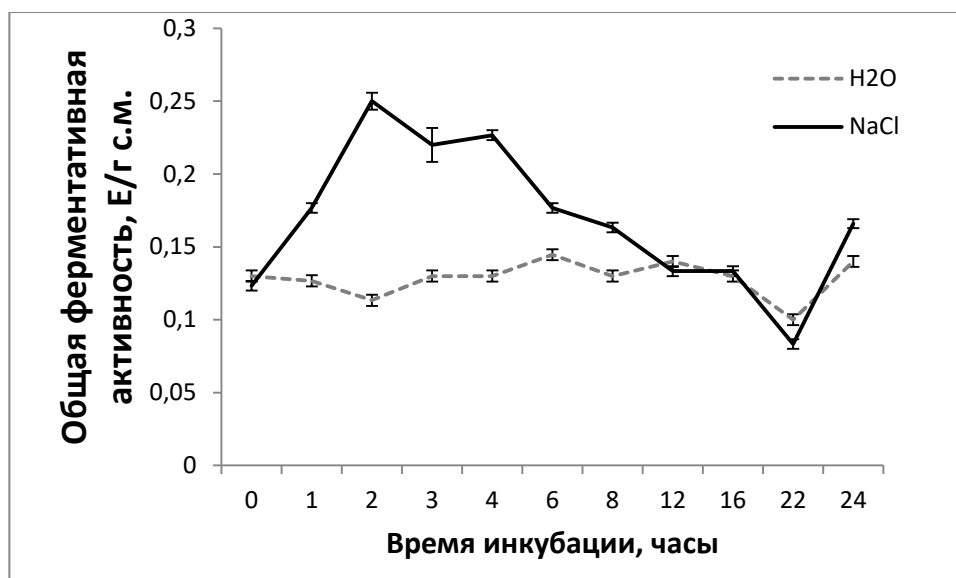


Рис. 4 Общая ферментативная активность 2ОГДК (n=4) при солевом стрессе в листьях кукурузы. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Индукция ЦТК в условиях действия солевого стресса, обусловленная увеличением каталитической активности исследуемого ферментного комплекса в первые часы инкубации, известна как «солевое дыхание»[187]. Именно поэтому длительная инкубация проростков в 150 мМ растворе NaCl приводит к снижению ферментативной активности после пятого часа стрессового воздействия.

Аналогичная картина наблюдалась при действии тех же концентраций хлорида натрия на проростки сахарной свеклы: солевой стресс индуцировал работу 2ОГДК уже с первого часа эксперимента (Приложение, Рис. 2). Увеличение общей ферментативной активности спустя час засоления было почти в 5 раз выше значений, отмеченных для контрольной группы, где колебания активности были незначительны. Максимум общей ферментативной активности 2ОГДК в проростках *Beta vulgaris* отмечается на 2 час инкубации, также как и в листьях кукурузы, что говорит об общем механизме регуляции работы 2ОГДК в условиях засоления.

Высокие значения общей ферментативной активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса в проростках сахарной свёклы были зарегистрированы на протяжении всего эксперимента, в то время как в

листьях *Zea mays* после 12 часов инкубации в растворе NaCl наблюдался существенный спад активности исследуемого метаболита. Различия в длительности индуцирующего эффекта хлорида натрия вероятно обусловлены различной степенью устойчивости растений к солевому стрессу, что, скорее всего, связано с типом метаболизма и анатомо-физиологическими характеристиками растений. Кукуруза считается растением умеренно чувствительным к действию солей, хотя ее солеустойчивость характеризуется внутривидовой изменчивостью[126].

1.2.4.Изменение экспрессионной активности генов ферментов 2ОГДК

В связи с тем, что инкубация растений в 150 мМ растворе хлорида натрия вызывает индукцию 2ОГДК уже с первого часа стрессового воздействия, важно определить механизм регуляции каталитической активности. Поскольку 2ОГДК обеспечивает окисление 2-оксоглутарата путём взаимодействия трёх компонентов, для каждого из которых характерен полиморфизм генов, нами было проведено исследование динамики транскрипционной активности всех генов, кодирующих ферменты 2ОГДК.

1. 2. 2. 4. 1. Изменение экспрессии генов 2ОГДГ

Исследование уровня мРНК генов, кодирующих 2ОГДГ, показало, что солевой стресс стимулирует экспрессию генов 2-оксоглутаратдегидрогеназы в первые часы эксперимента: начиная с первого часа воздействия хлористого натрия отмечается рост уровня транскриптов гена *OGDH1* по сравнению с контрольными образцами (рис. 5). Максимальная концентрация мРНК гена *OGDH1* зарегистрирована на второй час засоления. Дальнейшая инкубация проростков в растворе натриевой соли соляной кислоты приводила к снижению экспрессии исследуемого гена, что в целом коррелировало с результатами динамики ферментативной активности 2ОГДК.

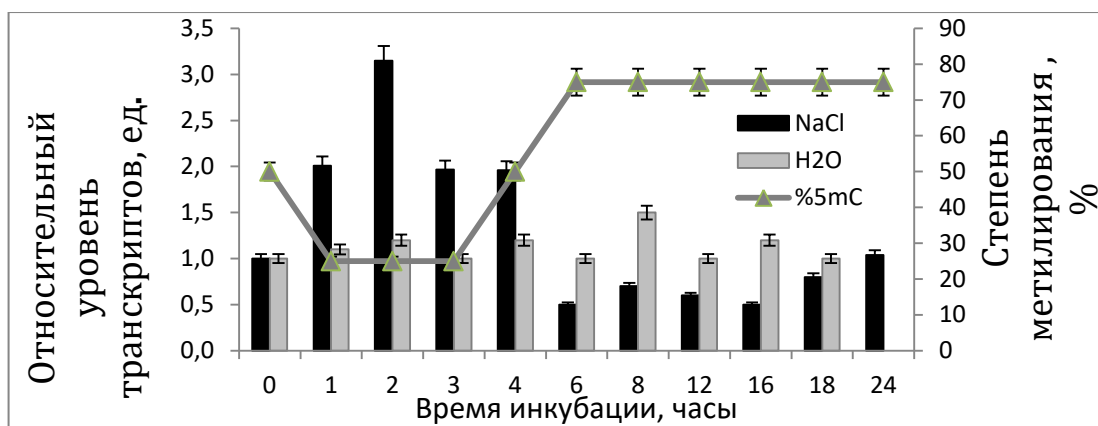


Рис. 6 Динамика экспрессии гена *OGDH1* и метилирования его промотора при действии солевого стресса в листьях кукурузы. NaCl – опытная группа, H₂O- контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

В паттерне экспрессии гена *OGDH1* 2ОГДГ свёклы отмечалась сходная картина (Приложение, рис.4). Увеличение относительного уровня транскриптов исследуемого гена наблюдалось уже с первого часа засоления. В дальнейшем концентрация мРНК гена *OGDH1* продолжала расти, достигая максимума на второй час эксперимента, превышая первоначальные значения более чем в 3 раза. Следует отметить, что величина относительного уровня транскриптов гена 2ОГДГ в проростках сахарной свёклы из контрольной группы практически не изменялась. Шестичасовая инкубация растений в солевом растворе приводила к снижению концентрации мРНК гена *OGDH1*. К концу эксперимента его транскрипционная активность восстанавливалась до уровня контроля. Изменения относительного уровня транскрипта гена *OGDH1* коррелируют с изменением общей ферментативной активности, что говорит о важной роли данного гена в функционировании 2ОГДК в проростках *Beta vulgaris* при стрессовом воздействии, вызванным хлоридом натрия. Снижение уровня мРНК гена 2ОГДГ отмечалось не на 6 час эксперимента, как в листьях кукурузы, а лишь на 12 час. Следует отметить, что в этом случае относительный уровень транскриптов был, несмотря на снижение, все равно выше, чем у растений контрольной группы на протяжении всего эксперимента.

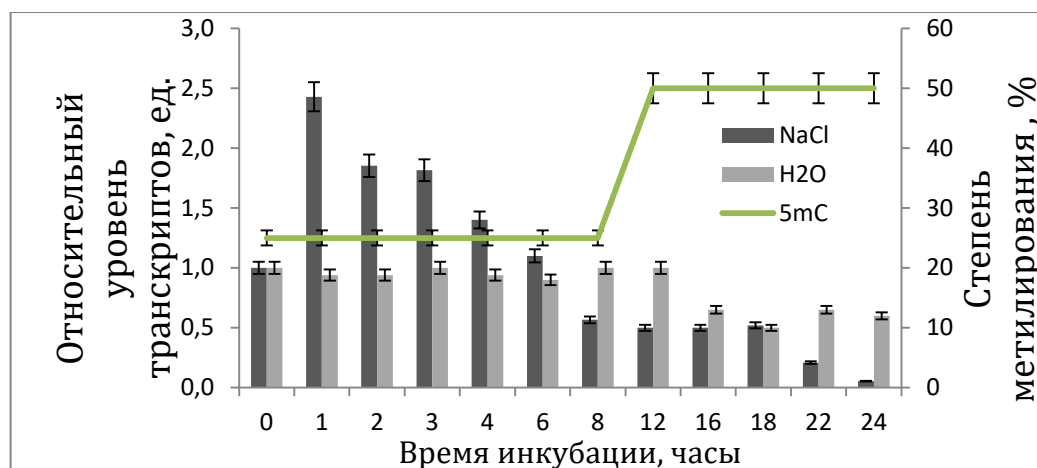


Рис. 6 Динамика экспрессии гена *OGDH3* и метилирования его промотора при действии солевого стресса в листьях кукурузы. NaCl – опытная группа, H₂O- контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

При проведении анализа динамики относительного уровня транскриптов гена *OGDH3* в листьях кукурузы, было установлено индуцирующее действие хлористого натрия на экспрессию данного гена (Рис. 6). Максимальный эффект наступал в первый час стрессового воздействия. Увеличение уровня мРНК гена *OGDH3* в первые часы эксперимента к 6 часу сменяется постепенным спадом транскрипционной активности исследуемого гена. Спустя сутки в листьях кукурузы из опытной группы относительный уровень транскриптов был в 20 раз ниже, чем в листьях, которые не были подвергнуты стрессовому воздействию.

1. 2. 2.4.1.1. Анализ промоторов генов 2ОГДГ на наличие CpG-островков

Известно, что активность ферментных систем может регулироваться на биохимическом, молекулярно-генетическом и эпигенетическом уровнях. Особая роль принадлежит эпигенетическим механизмам регуляции работы генома, что необычайно важно в контексте исследования ферментных систем, которые обеспечивают поддержание гомеостаза и перестройку метаболических потоков при изменении условий среды. Имеются

убедительные доказательства того, что эпигенетическая изменчивость может быть важным механизмом адаптации к разным средам обитания[32]. Более того, имеется множество данных, свидетельствующих об изменении степени метилирования как всего генома, так и его отдельных участков, индуцированных стрессовым воздействием[32].

Транскрипционная активность генов может регулироваться за счет изменения метильного статуса как отдельных CpG – динуклеотидов, так и CpG – динуклеотидов в составе CpG- островка[8]. Проведенный анализ промоторов генов ОГДГ на наличие CpG-островков показал, что в промоторной области гена *OGDH1* нет ни одного CpG-островка(Рис. 7А), в то время как промоторная область *OGDH3* содержит два CpG- островка с размерами 116 п.н. и 591 п.н. (Рис.7Б). Ввиду того, что в промоторной области гена присутствуют CpG-островки, можно предположить возможность регуляции работы данного гена посредством метилирования. Однако, отсутствие CpG- островков не исключает возможности контроля экспрессии гена посредством смены метильного статуса, поскольку у растительных организмов, в отличие от животных, метилирование цитозина возможно не только по сайтам CpG, но также по сайтам CpNpG и CpNpN, где N– A, T или C[8].

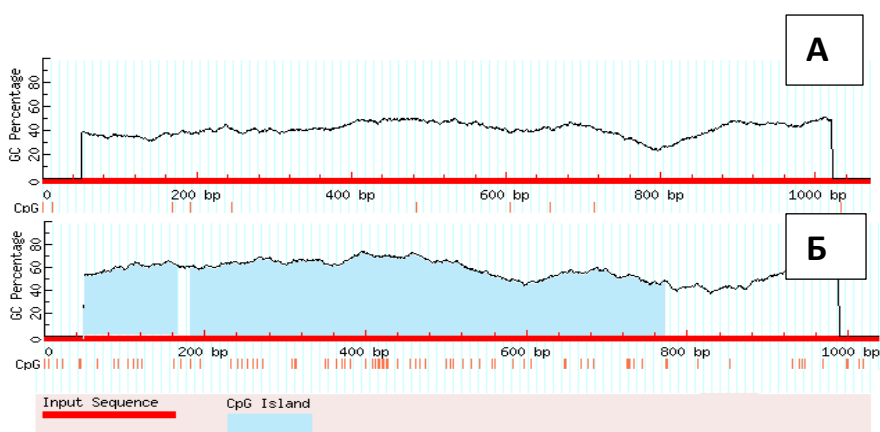


Рис. 7 Результаты анализа промотора гена *OGDH1* (А) и *OGDH3* (Б) 2ОГДГ *Z. mays L.* на наличие CpG-островков. Вертикальными линиями указаны положения CpG-динуклеотидов.

Проведенный анализ промоторной области гена *OGDH1* на наличие сайтов CpNpG и CpNpN позволил установить, что исследуемый участок промотора размером 1000 п.н. содержит около 24.9% CpNpN- сайтов и 11.4% приходится на сайты CpNpG, что свидетельствует о возможности регуляции транскрипции гена за счёт изменения метильного статуса его промотора.

1.2.2.4.1.2. Динамика изменения степени метилирования отдельных CpG- динуклеотидов в составе промоторов

Анализ полученных в ходе МС-ПЦР данных позволил установить, что изменение уровня мРНК гена *OGDH1* кукурузы при воздействии солями хлористого натрия на проростки *in vivo* сопряжено с изменением метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в составе промотора, что обеспечивает, судя по всему, регуляцию работы данного гена. Увеличение транскрипции гена сопровождалось уменьшением количества метилированных цитозинов, в то время как снижение концентрации мРНК гена коррелировало с ростом доли метилированных динуклеотидов (Рис.5).

При этом, показано, что у образцов, полученных из растений кукурузы, инкубированных в воде, степень метилирования составляла 50% на протяжении всего времени эксперимента (Приложение, Рис. 3).

Анализ динамики метилирования гена *OGDH3* и его экспрессии при действии солей натрия соляной кислоты показал, что в первые часы солевого стресса наблюдается индукция функционирования исследуемого гена. При этом, колебаний в степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов не наблюдается - доля метилированных цитозинов на протяжении 4 часов воздействия NaCl составляет 25%(Рис. 6).

Наблюдаемое на 12 час эксперимента снижение транскрипционной активности гена *OGDH3*, судя по всему, связано с возросшим до 50% числом метилированных цитозинов в области промотора. В контрольной группе растений степень метилирования оставалась на постоянном уровне и составляла 25%(Приложение, Рис. 5). Следовательно, можно утверждать, что регуляция работы данного гена осуществляется на эпигенетическом уровне.

Изменения в метильном статусе CpG-динуклеотидов промоторов генов *OGDH1* и *OGDH3*, коррелирующее с трансформацией относительного уровня их транскриптов, свидетельствуют о важной роли метилирования ДНК в регуляции функционирования 2ОГДГ при адаптивном ответе клеточного метаболизма в условиях засоления.

1.2.2.4.2. Изменение экспрессии генов ДЛСТ

Индущирующий эффект солевого стресса был обнаружен также при исследовании динамики экспрессионной активности генов дигидролипоамиддегидрогеназы, являющейся компонентом 2ОГДК. Увеличение концентрации мРНК гена *DLST1* отмечено в первые часы засоления, достигая максимума уже на второй час эксперимента (Рис.8). В последующем, обнаруживалось снижение значений относительного уровня транскриптов, до показателей контрольных образцов.

В проростках *Beta vulgaris* отмечен сходный характер изменения транскрипционной активности гена, кодирующего ДЛСТ (Приложение, Рис. б). Увеличение уровня мРНК наблюдалось с первого часа инкубации проростков сахарной свёклы в растворе NaCl. Максимум значений зарегистрирован на второй час воздействия солевого стресса и превышает показатели контрольной группы почти в 25 раз.

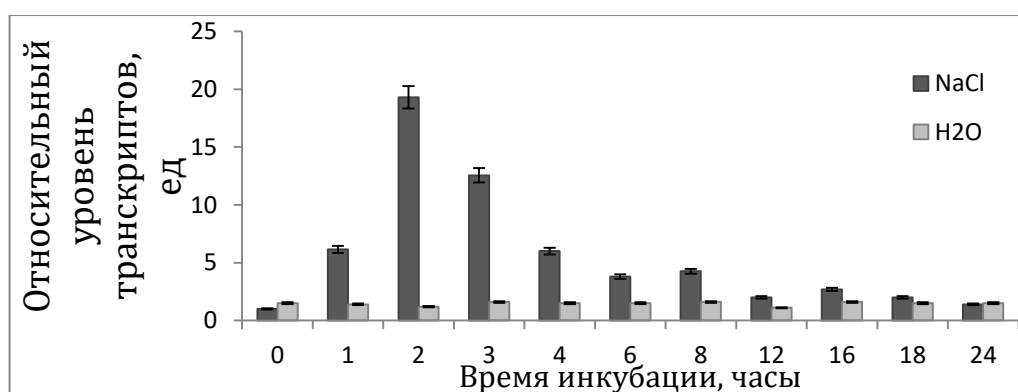


Рис. 8 Динамика относительного уровня транскриптов гена *DLST1* в листьях кукурузы в условиях солевого стресса. NaCl – опытная группа, H2O-контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

В условиях солевого стресса динамика экспрессии гена *DLST2* несколько отличалась: несмотря на неизменную концентрацию мРНК в первые два часа эксперимента, увеличение уровня транскриптов происходило с 3 часа инкубации проростков кукурузы в солевом растворе (Рис.9). Максимум транскрипционной активности был отмечен на 18 час засоления. К 24 часу эксперимента концентрация мРНК была сопоставима со значениями матричной РНК, которые регистрировались в образцах контрольной группы растений. Следует отметить, что изменения в транскрипционной активности гена *DLST2* в контрольных образцах почти отсутствуют.

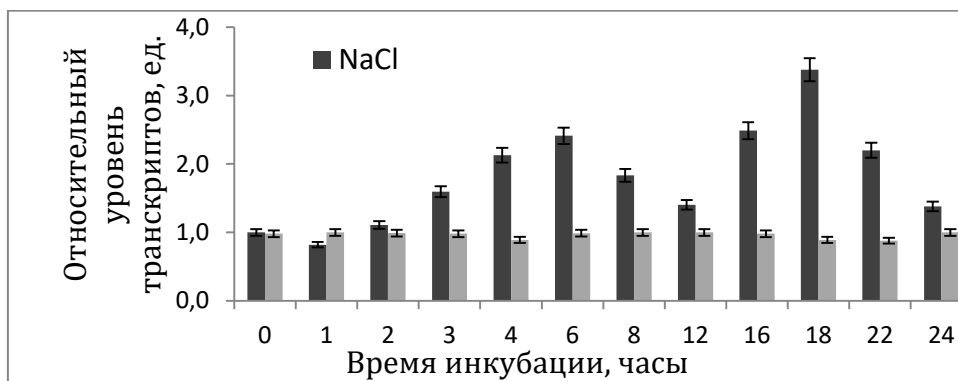


Рис.9. Изменение относительного уровня транскриптов гена *DLST2* при действии солевого стресса в листьях кукурузы. NaCl – опытная группа, H₂O – контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

1.2.2.4.3. Изменение экспрессии генов ДЛД

В рамках настоящей работы исследована динамика функционирования генов, кодирующих ДЛД в листьях кукурузы в условиях действия солевого стресса. Установлена индукция гена *DLD1* с первого часа воздействия хлоридом натрия (Рис.10) с максимумом значений на второй час инкубации проростков в солевом растворе. Аналогичным образом на возникновение солевого стресса реагировал ген *DLD2*. Максимум зарегистрирован в первый час засоления (рис. 11) – в дальнейшем, относительный уровень транскриптов постепенно снижался.

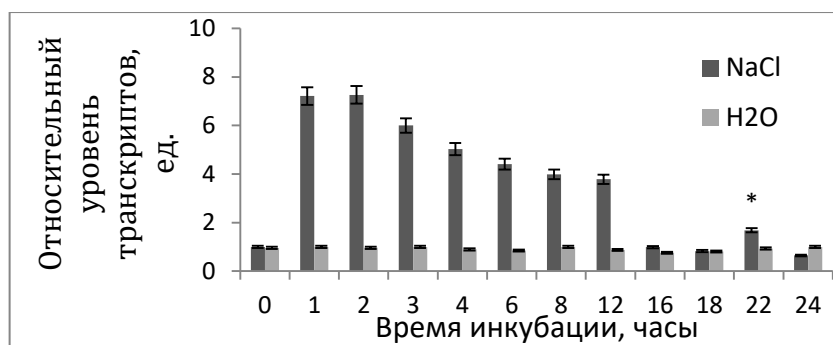


Рис.10 Изменение относительного уровня транскриптов гена *DLD1* при действии солевого стресса в листьях кукурузы. NaCl – опытная группа, H₂O- контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Таким образом, выявлено стимулирующее действие хлорида натрия на экспрессию генов, кодирующих дегидролипоамиддегидрогеназу в первые часы эксперимента.

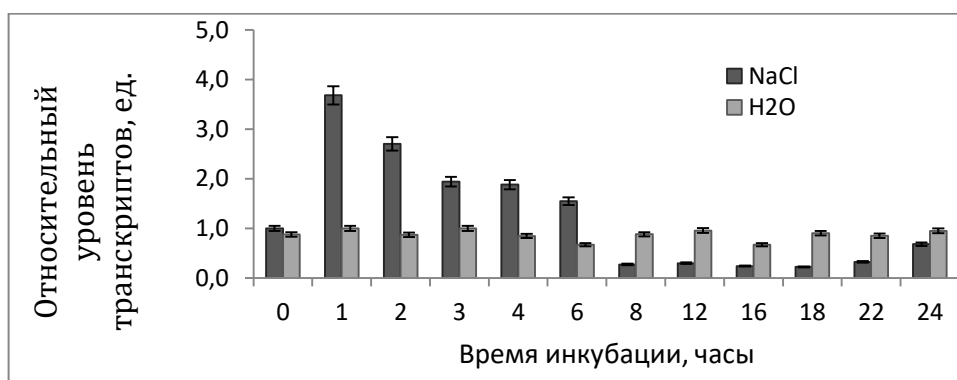


Рис. 11 Относительный уровень транскриптов гена *DLD2* в листьях кукурузы при засолении. NaCl – опытная группа, H₂O- контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Анализ динамики относительного уровня транскриптов генов, которые в геноме кукурузы кодируют полипептиды, формирующие 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, продемонстрировал увеличение экспрессионной активности генов *OGDH1*, *OGDH3*, *DLST1*, *DLST2*, *DLD1*, *DLD2* в первые часы солевого стресса, что указывает на индукцию 2ОГДК и, соответственно, ЦТК.

Таким образом, установлено, что стресс-индуцированные изменения функционирования отдельных ферментов 2-оксоглутаратдегидрогеназного

комплекса в листьях кукурузы *in vivo* при действии 150 мМ NaCl в среде инкубации в первые 6 часов вызваны значительным увеличением экспрессии генов *OGDH1*, *OGDH3* 2ОГДГ, *DLST1*, *DLST2* ДЛСТ и *DLD1*, *DLD2* ДЛД. Модуляции активности 2ОГДК лежат в основе механизма адаптации растительного организма к действию солевого стресса, который заключается в интенсификации функционирования ЦТК для дополнительного притока энергии. Отдельно следует отметить, что транскрипция генов 2-оксoglутаратдегидрогеназы, которая лимитирует скорость всего процесса окисления 2ОГ до сукцинил СоА, регулируется за счёт метилирования/деметиления CpG-динуклеотидов в составе их промоторов.

1. 3. Влияние солевого стресса на функционирование ГДГ

1.3.1. Субклеточная локализация ГДГ

Для определения субклеточной локализации глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы было проведено изоплотностное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, которое позволило исследовать четыре фракции: цитоплазму, хлоропласты, митохондрии и пероксисомы (Приложение, табл. 8).

Из представленных данных видно, что глутаматдегидрогеназная активность локализована в большей степени в митохондриях (86.54%) и в цитозоле (9.53%), что в целом согласуется с имеющимися литературными данными[61]. В хлоропластах обнаруживается порядка 3.92% активности. В пероксисомах активности исследуемого фермента обнаружено не было.

Для определения чистоты полученных фракций был произведен анализ перекрёстного загрязнения (Приложение, табл.9). Полученные результаты показывают, что степень перекрёстного загрязнения для цитоплазматической фракции не превышает 4.5 %, для хлоропластной и митохондриальной фракций – 10%, для пероксисомальной фракции – 1%.

1.3.2. Очистка ГДГ

В процессе исследования была проведена очистка фермента из 10-дневных зеленых листьев кукурузы, а также из проростков пшеницы. Результаты, представлены в таблицах 2-3.

Применение четырехстадийной очистки позволило получить высокоочищенные препараты изоформ ГДГ из листьев кукурузы. Фракционирование сульфатом аммония (до 70% насыщения) и гель-фильтрация на Sephadex G-25 позволили получить ферментную вытяжку с величиной общей активности 313 Е, при этом, значение удельной активности составляло 5.19 Е/мг белка (табл. 2). Проведение ионообменной хроматографии с использованием ДЭАЭ-Sephacel позволило обнаружить 3 пика активности глутаматдегидрогеназы, которые были десорбированы хлористым натрием. ГДГ1 была очищена до удельной активности 195 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 98 раз, выход составлял 8 %. Вторая форма (ГДГ2) получена с удельной активностью 166 Е/мг белка, степенью очистки 83 раза и выходом 32 %. Ферментный препарат ГДГ3 имел удельную активность 122.2 Е/мг белка, степень очистки 61 и выход 21 %.

Таблица 2

Стадии очистки изоформ глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы (n=3, p≤0.05)

Стадия	Объем, мл	Количество белка, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	110.0	241.0	478.0	1.9	100.0	1.0
Фракционирование сульфатом аммония до 70% насыщения	3.0	72.7	313.0	4.3	65.4	2.2
Гель-	6.0	57.5	298.6	5.2	62.0	2.6

фильтрация через Sephadex G-25							
ДЭАЭ- Sephacel	ГДГ1	2.5	0.2	38.6	195.0	8.0	98.0
	ГДГ2	2.5	0.9	156.2	166.0	32.0	83.0
	ГДГ3	2.0	0.8	101.3	122.2	21.0	61.0

Проведение ПААГ-электрофореза с универсальным окрашиванием на белок нитратом серебра позволило установить, что один ферментный препарат (ГДГ-1) был очищен до гомогенного состояния, в то время как два других (ГДГ-2 и ГДГ-3) являлись высокоочищенными, так как присутствовали сопутствующие белки (Рис. 12А).

При помощи тетразолиевого метода проявления была определена принадлежность полученных белковых препаратов к ГДГ (рис.13Б). Значения R_f для трех форм фермента составили следующие величины: для ГДГ1 - 0.26, для ГДГ2 - 0.34 и ГДГ3 - 0.7.

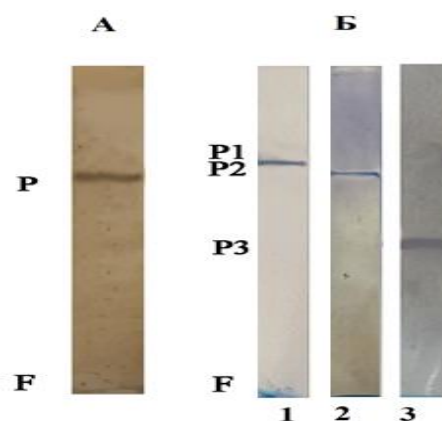
Рис. 12 Электрофореграмма очищенного препарата ГДГ из листьев кукурузы.

А – универсальное проявление ГДГ1 с использованием нитрата серебра.

Р – белковая полоса, F – фронт красителя;

Б – Специфическое проявление ГДГ.

Р1, Р2, Р3 – белковые полосы для препаратов ГДГ1, ГДГ2 и ГДГ3, F – фронт красителя; 1, 2, 3 – электрофореграмма препарата ГДГ1, ГДГ2, ГДГ3.



В результате модифицированной схемы пятистадийной очистки из зеленых проростков пшеницы был выделен и очищен электрофоретически гомогенный препарат ГДГ (табл. 3). Фракционирование сульфатом аммония

(до 70% насыщения) и гель-фильтрация на сефадексе G-25 позволили получить фермент с удельной активностью 16.1 Е/мг белка. При проведении ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Sepharcel глутаматдегидрогеназа десорбировалась хлористым натрием (254 мМ). Полученный ферментный препарат с удельной активностью 163 Е/мг белка в дальнейшем подвергался гель-хроматографии на сефадексе G-200 .

В результате проведенных операций был получен препарат ГДГ с удельной активностью 377 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 319.5 раз и выход 3.7 % .

Проведение электрофореза в ПААГ с универсальным окрашиванием белков нитратом серебра позволило установить, что ГДГ была получена в гомогенном состоянии (рис. 13А). При помощи модифицированного тетразолиевого метода окрашивания была определена принадлежность полученного очищенного белка к глутаматдегидрогеназе (рис. 13Б). Значение R_f для полученного ферментного препарата составляло 0.12. Следует отметить, что относительная электрофоретическая подвижность ГДГ из разных объектов является консервативной величиной. Так, значение R_f для ГДГ из 12-дневных проростков кукурузы равняется 0.13. По мнению некоторых авторов, величина этого показателя обусловлена количеством субъединиц и их соотношением [61, 1, 156].

Таблица 3.
Стадии очистки глутаматдегидрогеназы из проростков пшеницы
(n=3, p≤0.05)

Стадия	Объем, мл	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	10	148	175.2	1.18	100.0	1.0
Фракционирование сульфатом аммония, 70% насыщения	7.5	31.3	90.3	2.88	51.5	2.4

Гель-фильтрация через сефадекс G-25	4.0	1.21	19.5	16.1	11.1	13.64
ДЭАЭ- Sephacel	2.0	0.1	16.3	163	9.3	138.1
Гель-фильтрация через сефадекс G-200	2.0	0.017	6.55	377	3.7	319.5

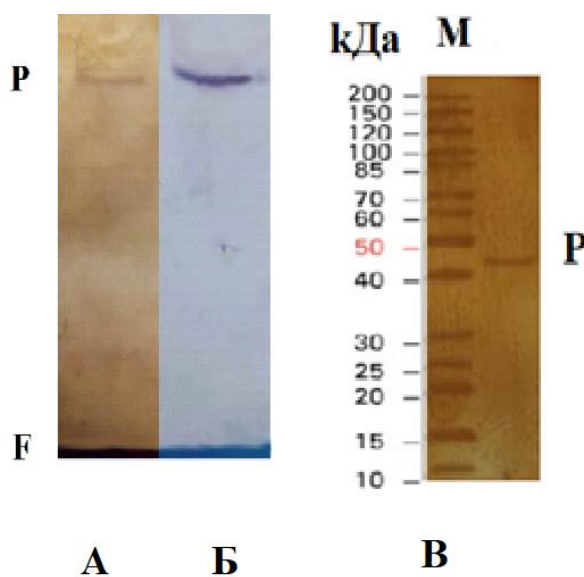
Был проведен электрофорез полученного препарата в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия. Очищенный фермент имеет массу нативного белка порядка 176 кДа, проведение SDS-электрофореза с последующим окрашиванием нитратом серебра показало, что масса отдельных субъединиц составила порядка 44 кДа (Рис.13В).

Рис.13 Электрофореграмма очищенного препарата ГДГ из проростков пшеницы. **Р**

А – окрашивание ГДГ с использованием AgNO_3 ;

Б – специфическое проявление ГДГ;

В – электрофореграмма препарата ГДГ при проведении SDS-электрофореза. Окрашивание белка проводили с использованием AgNO_3 . **М** - маркер, **Р** - белковая полоса, **Ф** - фронт красителя.



1.3.3. Определение pH- оптимума работы полученных препаратов ГДГ

Для полученных изоферментов глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы и проростков пшеницы были измерены оптимумы pH (Приложение. Рис. 7-9). Для энзима очищенного из листьев кукурузы

оптимум работы по реакции аминирования оставляет :ГДГ 1 – 7.5, ГДГ2 – 7.0 и ГДГ3 – 8.5(Приложение, Рис.7).

Анализ результатов динамики активности полученного препарата глутаматдегидрогеназы выделенной из пшеницы при изменении концентрации ионов водорода, показал, что оптимальное значение рН для протекания реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до глутамата составляет 8.5 (Приложение, Рис.8.). Интересно отметить, что для данного препарата оптимум работы рН по реакции дезаминирования также составляет 8.5(Приложение, Рис.9). Имеются данные, согласно которым величина рН-оптимума для ГДГ из листьев сои 8.0. В случае осуществления реакции дезаминирования рН-оптимум составлял для ГДГ из кукурузы 9.0 [61, 183,156].

1.3.4. Определение сродства полученных препаратов ГДГ к субстратам

В рамках исследования было проведен анализ сродства полученных ферментных препаратов к субстратам, который показал, что все три полученных из листьев кукурузы ферментных препарата ГДГ имеют отличное друг от друга значение K_m к 2-оксоглутарату (табл.4; Приложение, Рис. 10). Данные различия могут характеризовать различия в скорости протекания ферментативной реакции катализируемой изоформами ГДГ.

Таблица 4

Сравнительная таблица значений констант Михаэлиса и оптимальных значений рН полученных для препаратов кукурузы (n=3, p<0.05)

Изоформа ГДГ	рН оптимум	K_m по 2-ОГ, мМ
ГДГ1	7.5	0.34±0.01
ГДГ2	7.0	0.60±0.01

ГДГЗ	8.5	0.22±0.01
------	-----	-----------

Полученный ферментный препарат глутаматдегидрогеназы из проростков пшеницы имел различные значения K_m : для 2-оксоглутарата $K_m = 2.75$ мМ (Приложение, Рис. 11А), а для глутамата – 14.9 мМ (Приложение, Рис. 11Б, Таблица 10).

Известно, что α -субъединицы обеспечивают каталитическое действие фермента в реакции дезаминирования, а β -субъединицы – по направлению аминирования кетокислоты. Сравнивая полученные результаты с ГДГ из кукурузы установлено более высокое сродство к 2-оксоглутарату, что может быть связано со структурой молекулы белка, а также с особенностями метаболизма C_3 и C_4 растений. Полученный ферментный препарат содержит доминирующее количество β -субъединиц.

1.3.5. Влияние солевого стресса на каталитическую активность ГДГ

В результате проведенных исследований по влиянию хлорида натрия на функционирование глутаматдегидрогеназы в проростках кукурузы *in vivo* было установлено, что засоление оказывает индуцирующее действие на общую активность исследуемого фермента по реакции аминирования (Рис. 14).

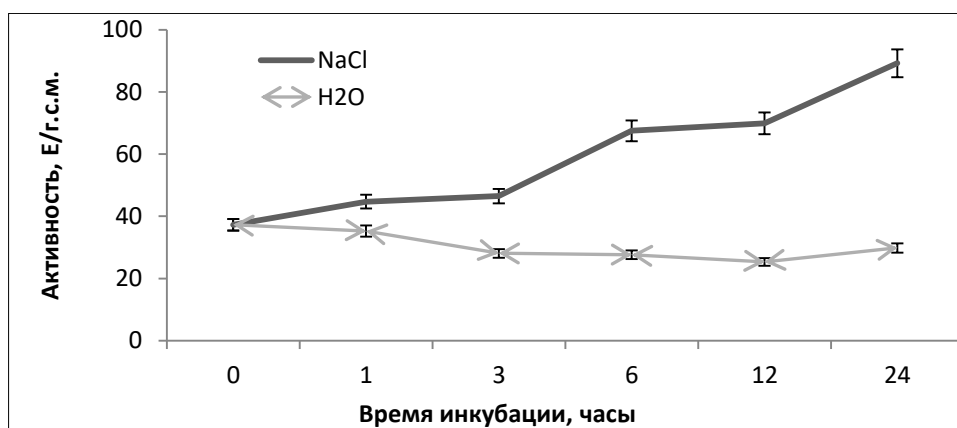


Рис.14 Изменение общей ферментативной активности ГДГ в листьях кукурузы в условиях солевого стресса по реакции аминирования. NaCl –

опытная группа, H₂O- контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Увеличение ГДГ-активности почти в 1.5 раза зафиксировано уже спустя час инкубации в растворе хлористого натрия в сравнении с контрольной группой растений, где соответствующие значения оставались на постоянном уровне. На 24 час инкубации показатель общей ферментативной активности ГДГ достигает своего максимума (в 3 раза выше контроля) (рис.15).

1.3.6. Изоферментный состав ГДГ в условиях солевого стресса

Установлено, что повышение общей ферментативной активности ГДГ сопровождалось появлением дополнительной изоформы глутаматдегидрогеназы, что подтверждалось проведённым электрофоретическим исследованием. Выявлено наличие 2 изоформ глутаматдегидрогеназы с различными величинами электрофоретической подвижности $R_f=0,13$ и 0.17 (рис. 15). До начала эксперимента, а также у растений из контрольной группы растений, наблюдалась лишь одна форма ГДГ со значением электрофоретической подвижности равным 0.17 , однако начиная уже с первого часа инкубации в солевом растворе отмечалось появление второй изоформы со значением $R_f = 0.13$.

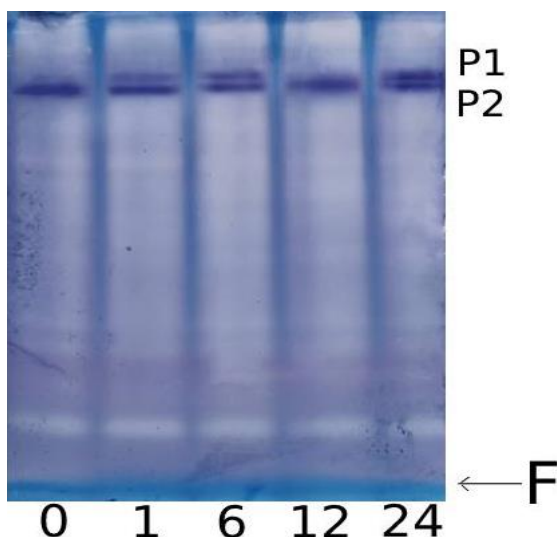


Рис.15 Электрофореграмма ГДГ из листьев кукурузы в ПААГ при действии солевого стресса. 0,1,6,12,24 – время инкубации в растворе NaCl; P1,P2 – белковые полосы; F – фронт красителя.

1.3.7. Изменение экспрессионной активности генов ГДГ в условиях действия солевого стресса

Индукция ГДГ –активности при действии солевого стресса обусловлена, как было установлено, изменением в функционировании генов *GDH1* и *GDH2* (Рис. 16). Относительный уровень транскриптов гена *GDH1* несмотря на первоначальное ингибирование в первые 5 часов эксперимента, увеличивается на 6 час солевого стресса (Рис. 16А). Низкий уровень экспрессии этого гена в первые часы засоления компенсируется работой гена *GDH2*, транскрипционная активность которого повышается уже спустя час инкубации в растворе NaCl (Рис. 16Б). Судя по всему, появление дополнительной изоформы ($R_f = 0.13$) в первые часы воздействия хлоридом натрия на проростки индуцируется экспрессией гена *GDH2* (Рис. 16Б), обеспечивающего синтез α -субъединицы ГДГ, катализирующего образование 2ОГ. Начиная с 6 часа, активируется ген *GDH1* (Рис.16А), синтезирующий β -субъединицу ГДГ, что способствует протеканию реакции в сторону образования глутамата, идущего на синтез пролина

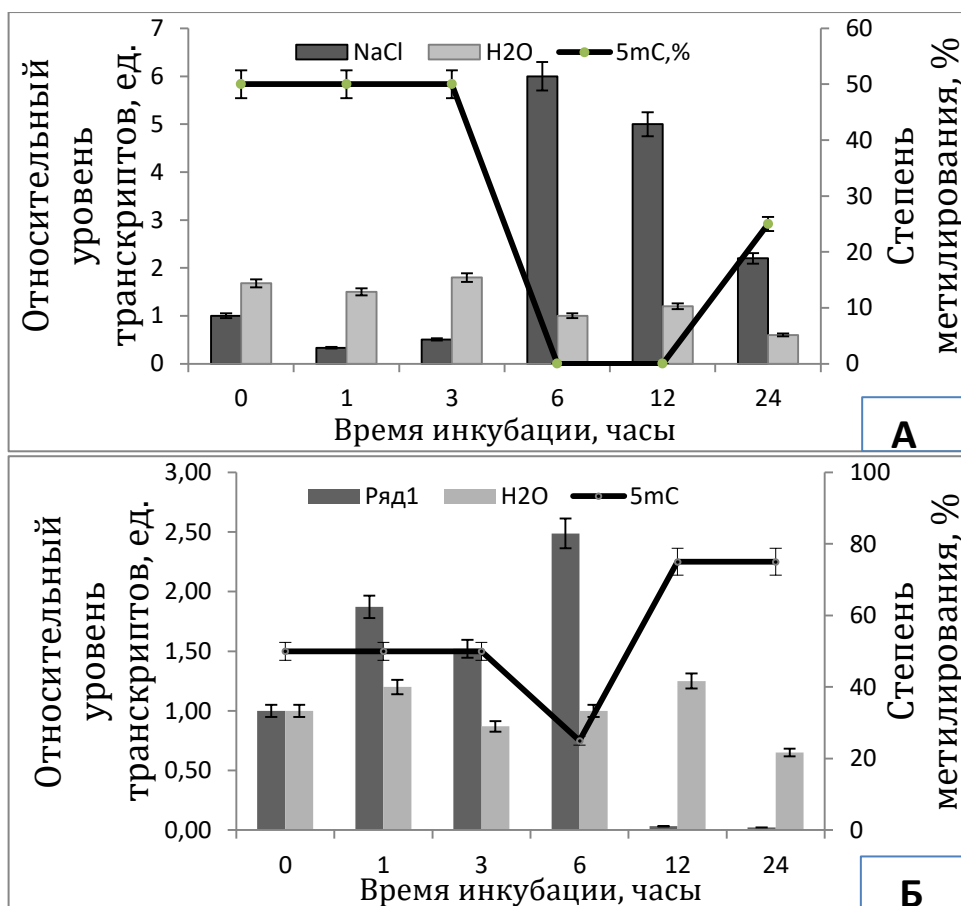


Рис. 16. Относительный уровень транскриптов генов *GDH1*(А) и *GDH2* (Б) в листьях кукурузы при действии солевого стресса. NaCl – опытная группа, H2O- контрольная группа. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Предварительный анализ промоторов генов семейства *GDH* на наличие CpG-островков показал, что промотор гена *GDH1* не содержит ни одного CpG-островка, в то время как в составе промоторной области гена *GDH2* обнаружено два островка размеров 404 и 383 п.н.. (Приложение, Рис. 12). Исследование промоторной области гена *GDH1* на наличие CpNpG и CpNpN сайтов позволило выявить, что в структуре участка промотора размером 1000 п.н. содержится около 24.9% CpNpN- сайтов и порядка 13.8% приходится на сайты CpNpG.

Исследование изменения степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в составе промотора гена *GDH1* позволило установить, что рост концентрации мРНК на 6 час стрессового воздействия связан с полным

деметилованием исследуемых динуклеотидов, которые до начала эксперимента и в первые 3 часа эксперимента были метилированы на 50%(Рис. 16А). Следовательно, изменение функционирования гена *GDH1* в условиях солевого стресса сопряжено с трансформацией метильного статуса, указывая на эпигенетический механизм регуляции его транскрипции.

Также, установлено, что увеличение концентрации мРНК гена *GDH2* на 6 час солевого стресса сопровождается снижением доли метилированных цитозинов (с 50 до 25%) в составе его промотора, а дальнейшая инактивация гена, вероятно, обусловлена ростом степени метилирования до 75%(Рис. 16Б)

Таким образом, установлено, что инкубация проростков кукурузы в растворе хлористого натрия индуцирует функционирование ГДГ. При этом, в регуляции ферментативной активности ГДГ в листьях кукурузы при действии солевого стресса принимают участие оба гена: *GDH1* и *GDH2*. Появление в первые часы эксперимента дополнительной изоформы связано с образованием формы ГДГ, состоящей из α -субъединиц, преобладание которых в структуре полипептида обеспечивают протекание ферментативной реакции в сторону образования 2ОГ, что способствует поддержанию ЦТК и всего энергетического метаболизма. Длительное воздействие NaCl на проростки кукурузы (6 часов, и более) индуцирует транскрипцию мРНК гена *GDH1*, в результате чего синтезируются β -субъединицы энзима, приводя к тому, что 2ОГ из ЦТК подвергается аминированию, тем самым превращаясь в глутамат, который в дальнейшем может на синтез пролина и ГАМК. Полученные нами данные согласуются с литературной информацией о том, что в условиях солевого стресса увеличивается уровень пролина, предшественником, которого, как известно выступает глутамат[7]. Кроме того, показано, что регуляция работы генов *GDH1* и *GDH2* глутаматдегидрогеназы в условиях солевого стресса осуществляется за счёт изменения метильного статуса CpG-динуклеотидов в составе их промоторов.

1.4. Влияние солевого стресса на функционирование ССАДГ

Активность ГАМК-шунта в растениях быстро увеличивается в ответ на различные биотические и абиотические стрессы. Благодаря способности ССАДГ восстанавливать НАД⁺ и образовывать сукцинат в условиях, когда ЦТК ингибирован и наблюдается увеличение АФК, скорость накопления пероксида водорода снижается [36]. С другой стороны, шунт необходим растению для нормального роста и способности противостоять стрессу в связи с необходимостью поддержания определенного уровня других метаболитов. Накопление ГАМК, вызванное биотическими стрессорами или абиотическими (гипоксия, засоление, холод, обезвоживание) могут вызывать накопление АФК и дальнейшую гибель клетки [104, 176].

Янтарный полуальдегиддегидрогеназа участвует в финальной стадии разложения ингибирующего нейромедиатора гамма-аминомасляной кислоты в матриксе митохондрий. Продукция ГАМК в растениях значительно усиливается в ответ на различные биотические и абиотические стрессы [37, 104, 176]. Недавние исследования показывают, что он играет важную роль в первичном метаболизме растений, но другие функции этого метаболита остаются неизвестными [124].

Нарушение функции ГАМК-шунта путем нарушения экспрессии или структуры гена ССАДГ *Arabidopsis* вызывает повышенное накопление активных форм кислорода и гибель клеток в ответ на световой и тепловой стресс. Накопление ССА, ГМК или обоих интермедиатов, продуцируемых «ниже» стадии трансаминирования ГАМК-Т, токсично для растений, что приводит к высоким уровням АФК и нарушению развития [124].

1.4.1. Изменение экспрессионной активности генов ССАДГ

В геноме кукурузы сукциниловый семиальдегид дегидрогеназа кодируется двумя генами, расположенными в разных хромосомах. Ген

SSADH1 (LOC100284047) локализован в 4 хромосоме и несет в своем составе 23 экзона, кодируя митохондриальную форму фермента. Ген *SSADH2* (LOC100280779) локализован в 5 хромосоме и включает 20 экзонов. Нуклеотидные последовательности идентичны между собой на 83.68%. В геноме *A. thaliana* в настоящее время аннотирован лишь один ген *SSADH* (ALDH5F1, AT1G79440), также как и в геноме *Oryza sativa* (LOC9267109).

В ходе проведенного исследования по влиянию раствора хлористого натрия на изменение относительного уровня транскриптов генов, кодирующих ССАДГ в геноме кукурузы, было установлено, что засоление вызывает дифференциальные изменения в работе обоих генов (Рис 17).

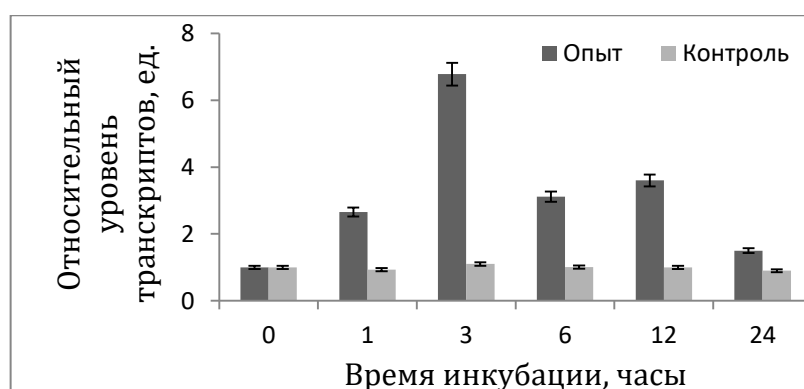


Рис. 17 Изменение относительного уровня транскриптов гена *SSADH1* в листьях кукурузы при действии солевого стресса. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Уже в первые часы эксперимента транскрипционная активность гена *SSADH1* увеличивается более чем в 2.6 раз, достигая максимального значения к 3 часу инкубации, превышая контрольные значения почти в 7 раз. В дальнейшем, уровень мРНК исследуемого гена снижался. К 24 часу эксперимента значения относительного уровня транскриптов в опытной группе лишь в 1.5 раза превышают контроль.

Кардинально отличное действие солевой стресс оказывает на транскрипцию гена *SSADH2* (Рис. 18). Уже с первого часа эксперимента заметно инактивирующее действие хлорида натрия на экспрессию

исследуемого гена, которое сохраняется в течении всего времени инкубации. При этом, значения относительного уровня транскриптов у опытной группы растений более чем в 4.5 раз меньше, чем у контрольной.

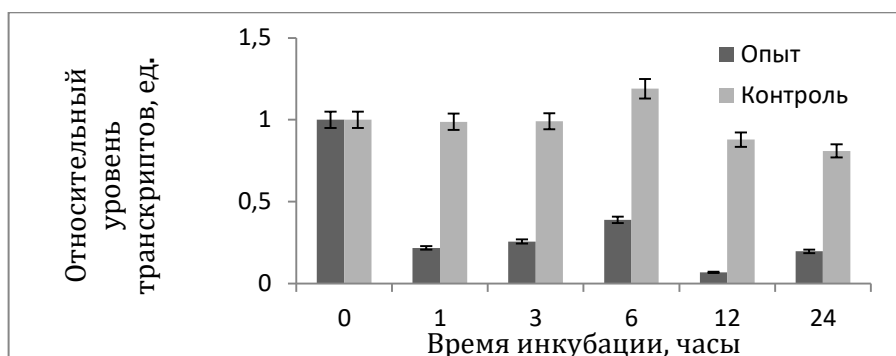


Рис. 18 Изменение относительного уровня транскриптов гена *SSADH2* в листьях кукурузы при действии солевого стресса. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Таким образом, показано, что солевой стресс активирует работу ССАДГ на уровне генома за счёт активации транскрипции гена *SSADH1*. Ген *SSADH2* в этих условиях инактивируется.

1.5. Влияние солевого стресса на функционирование ОД

ОД – фермент который, главным образом участвуя в метаболизме аминокислот, катализирует превращение оксидитрата в 2ОГ, тем самым, являясь поставщиком 2ОГ. К сожалению, достоверных данных о том, куда в дальнейшем поставляется 2ОГ, полученный из ОЦ в настоящее время обнаружено не было. При этом, следует отметить, что имеются литературные свидетельства того, что транскрипция генов ОД увеличивается в ответ на действие солевого стресса[198], что делает данный фермент интересной мишенью для исследований адаптивной реакции клеточного метаболизма при действии солевого стресса.

1. 5. 1. Субклеточная локализация ОД

В связи с тем, что данный фермент практически не исследован, в том числе не установлен характер распределения ферментативной активности внутри клетки, был проведен анализ субклеточной локализации оксидантдигидратазы декарбоксилирующей, результаты которого представлены в табл. 5. Установлено, что основная часть ОД-активности сосредоточена в хлоропластах (91.7%), в то время как в цитоплазме обнаруживается порядка 8.3%.

Таблица 5
Субклеточная локализация активности ОД в листьях кукурузы
(n=3, p≤0.05)

Фракция органоидов	Общая активность, Е/грамм сырой массы	% активности фермента от общего содержания
Пероксисомы	-	-
Цитоплазма	0.37	8.3
Хлоропласты	8.27	91.7
Митохондрии	-	-

1.5.2. Изменение активности ОД в листьях кукурузы в условиях действия солевого стресса

В результате проведенного исследования было показано, что воздействие на проростки кукурузы 150 мМ раствором хлористого натрия более трёх часов вызывает увеличение общей ферментативной активности ОД (Рис.19).

В первые часы засоления обнаруживалось первичное ингибирование ферментативной активности фермента (снижением активности почти в 2.5). Дальнейшая инкубация растений в растворе NaCl способствовала восстановлению и даже росту показателей активности ОД, достигая

максимума к 6 часу. Инактивация энзима к 24 часу эксперимента может быть связана с повреждающим действием хлорида натрия на полипептид [14].

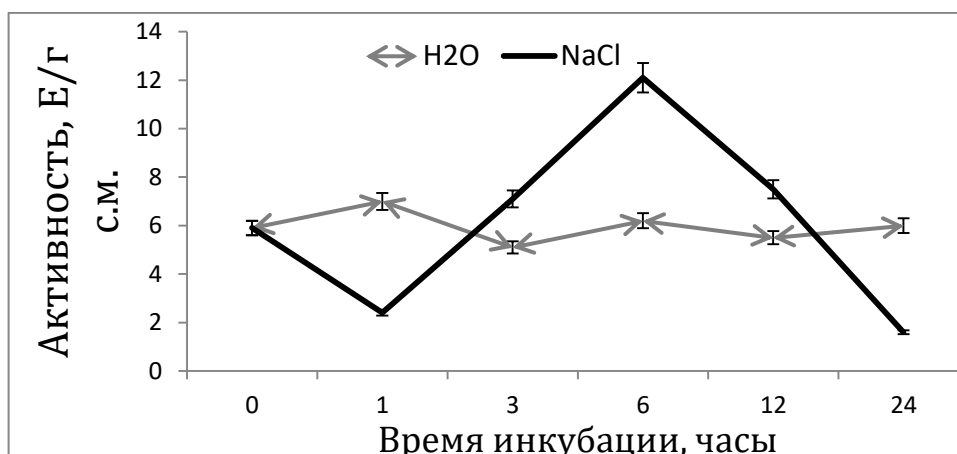


Рис.19 Изменение общей ферментативной активности ОД в листьях кукурузы при действии солевого стресса. Серая линия - контрольная группа, черная линия – группа, инкубированная в растворе NaCl. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

1.5.3. Влияние солевого стресса на экспрессию генов ОД

В геноме кукурузы ОД представлен двумя генами, однако их роль в функционировании энзима установлена не до конца. С помощью программы Blast проведен анализ гомологии обоих полипептидов. Установлено, что степень гомологии составляет 97.8%. Исследование относительного уровня транскриптов генов *DHAD1* и *DHAD2* показало, что солевой стресс по-разному действует на экспрессию этих генов.

Засоление вызывает снижение уровня транскриптов гена *DHAD1* с уже 1 часа эксперимента, однако, в последующие часы происходило восстановление концентрации его мРНК до значений сопоставимых с контролем. Однако, воздействие хлоридом натрия на проростки более 12 часов, по-видимому, приводит к смене стратегии адаптации, в результате чего, по истечению 24 часов ген *DHAD1* инактивируется (Рис. 20). Динамика изменения экспрессионной активности данного гена в полной мере

коррелировала с изменением общей ферментативной активности ОД по реакции дегидратации оксидитрата.

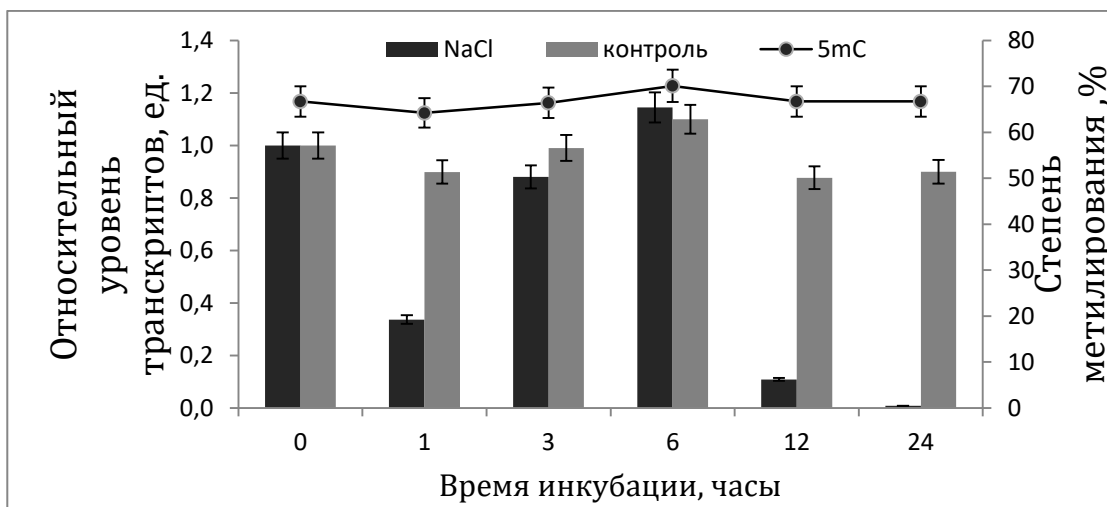


Рис.20 Изменение относительного уровня транскриптов гена *DHAD1* в листьях кукурузы при действии солевого стресса. Серые столбцы- контроль, черные столбцы- NaCl. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Индукция гена *DHAD2*, вызванная солевым стрессом, наблюдалась с первого часа эксперимента (Рис. 21). При этом, увеличение концентрации мРНК *DHAD2*, было максимальным на 3 час эксперимента и превышало более чем в 5 раз значения контрольной группы растений. Несмотря на последующее снижение уровня транскриптов активность гена *DHAD2* была повышена и спустя сутки засоления.

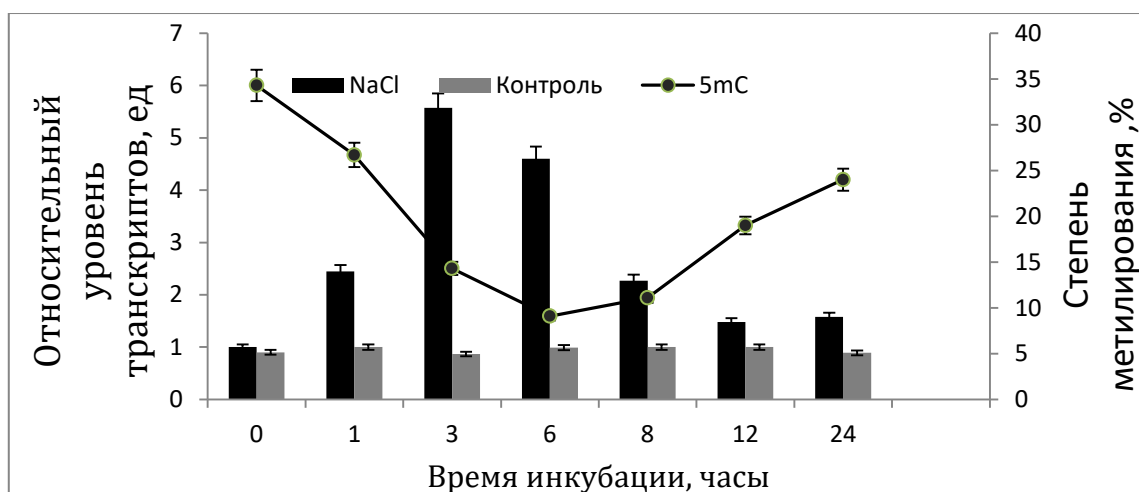


Рис.21 Влияние солевого стресса на динамику относительного уровня транскриптов гена *DHAD2* в листьях кукурузы. Серые столбцы- контроль,

черные столбцы- NaCl. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

В связи с тем, что некоторые ферменты подвержены эпигенетической регуляции[66], интересным представляется выяснить роль метильного статуса в регуляции работы ОД при действии 150 мМ раствора хлорида натрия.

Анализ нуклеотидной последовательности гена *DHAD1* на наличие CpG-островков позволил обнаружить в составе промотора два CpG-островка, размером 323 и 143 п.н. в районе – 50 -327 и – 801 – 943 от стартового кодона(Рис.22А); ген *DHAD2* в области -777 – 943 от стартового кодона имеет один CpG-островок (167 п.н.) (Рис.22Б).

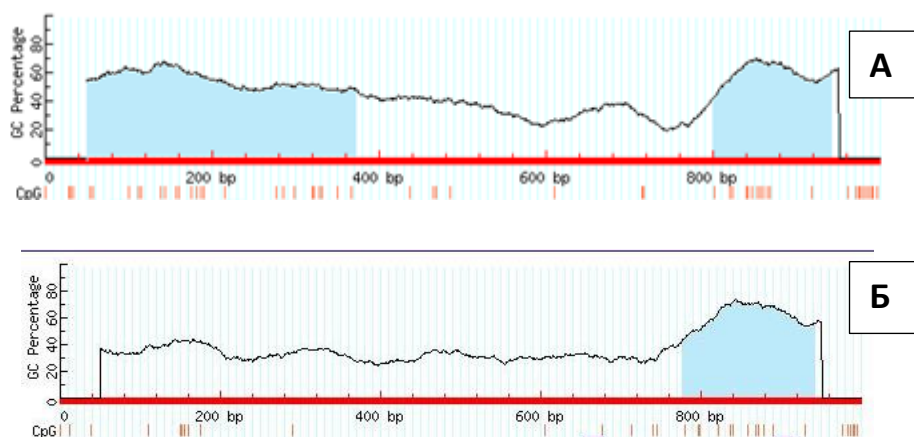


Рис. 22 Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора генов *DHAD1*(А) и *DHAD2*(Б) *Z. mays L.*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов

Наличие в промоторной области обоих генов CpG-островков может свидетельствовать о эпигенетической регуляции работы генов путем изменения их метильного статуса. Для проверки этой теории было проведено бисульфитное секвенирование ампликонов, полученных в ходе ПЦР с использованием праймеров подобранных к промоторным участкам генов *DHAD1* и *DHAD2* с учетом модификации ДНК бисульфитом натрия.

Анализ данных, полученных в ходе бисульфитного секвенирования, показал, что солевой стресс оказывает разнородное влияние на метильный статус генов семейства *DHAD*. В начале эксперимента CG-динуклеотиды в

составе промотора гена *DHAD1* были метилированы на 66.7 % (Рис.20). В дальнейшем, и в опытной, и в контрольной группах изменения метильного статуса практически не происходило (изменения в пределах колебаний) и степень метилирования не превышала 70.1%.

Динамика степени метилирования CG-динуклеотидов в составе промотора гена *DHAD2* существенным образом менялась на протяжении всего времени эксперимента (Рис.21). До начала эксперимента метилированно было 34.3% всех CG-динуклеотидов, а уже после первого часа эксперимента их количество снизилось до 26.7%, достигая 9.1% к 6 часу эксперимента. В последующие часы воздействия хлористым натрием на проростки кукурузы, степень метилирования начала возрастать, достигая максимума к 24 часу эксперимента. Изменения в транскрипционной активности гена *DHAD2* коррелируют обратно-пропорционально степени метилирования его промотора. Увеличение относительного уровня транскриптов в первые часы инкубации растений в солевом растворе сопровождалось снижением доли метилированных цитозинов, и наоборот, увеличение метильного статуса CG-динуклеотидов в составе CpG-островка, вероятно, обуславливало снижение экспрессии гена к концу эксперимента.

Таким образом, показано, что солевой стресс, несмотря на первичное ингибирование, стимулирует каталитическую активность ОД, вызывая разнородные изменения в транскрипционной активности генов *DHAD1* и *DHAD2*. Индукция данных генов осуществляется в разной степени, что говорит о ключевой роли генетического аппарата в адаптивной реакции растительного организма к засолению, и поддержании осмотического гомеостаза клетки. Изменения транскрипционной активности гена *DHAD1* коррелируют с изменениями общей ферментативной активности ОД, что говорит о вероятной роли данного гена в синтезе полипептида ответственного за поставку 2ОГ, как субстрата для синтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями, или же как субстрата для синтеза первичной аминокислоты – глутамата. В то же время ген *DHAD2*, вероятно,

принимает участие в синтезе аминокислот с короткими боковыми цепями. Изменения в степени метилирования CpG-динуклеотидов в промоторной области генов *DHAD2* при солевом стрессе коррелировали со значениями относительного уровня транскриптов соответствующих генов.

Полученные данные согласуются с имеющейся в литературе информацией о том, что солевой стресс вызывает увеличение уровня не только пролина, но и некоторых других аминокислот, в частности аминокислот с разветвленными боковыми цепями, одним из трех ферментов синтеза которых является ОД[198].

1.6. Изменения метаболизма 2ОГ в условиях солевого стресса

Инкубация проростков кукурузы в водном растворе хлорида натрия в первые шесть часов (1 этап воздействия) приводит к интенсификации ЦТК за счёт увеличения активности 2ОГДК. При этом, скорость функционирования данного метаболита регулируется на биохимическом, генетическом и эпигенетическом уровнях. Дополнительный приток 2ОГ, поступающий в ЦТК за счёт дезаминирующей активности ГДГ, также приводит к интенсификации образования сукцинил-СоА за счёт трёхстадийного катализа 2ОГДК. Изменения в активности 2ОГДК сопряжены с колебаниями степени метилирования промоторов генов *OGDH1*, *OGDH3*, что в свою очередь приводит к изменению паттернов их экспрессии, а также экспрессии других генов комплекса - *DLST1*, *DLST2* ДЛСТ и *DLD1*, *DLD2* ДЛД. В хлоропластах накопленный ОЦ дегидратируется до 2ОГ, который в дальнейшем может поступать как на образование глутамата, так и на синтез аминокислот с разветвленными боковыми цепями. Во втором случае, этот процесс будет обеспечиваться за счёт индукции гена *DHAD2*, регуляция функционирования которого в этих условиях осуществляется на уровне эпигенома. Стресс-индуцируемые изменения в функционировании изоферментов ОД вероятно связаны с потребностью в 2ОГ для биосинтеза аминокислот с

разветвленными боковыми цепями, которые, судя по всему играют существенную роль в адаптивной реакции клеточного метаболизма к действию солевого стресса. Инкубация проростков кукурузы в 150 мМ растворе хлорида натрия более 6 часов (2 этап) индуцирует в митохондриях переключение потока 2ОГ через ГДГ на ГАМК шунт. Такое перераспределение ключевого метаболита ЦТК связано с тем, что 2ОГДК функционирует не в полной мере и его активность значительно снижена, что связано, в том числе, и с увеличением доли метилированных цитозинов в составе промоторов генов *OGDH1* и *OGDH3*. Изменение в экспрессии генов глутаматдегидрогеназы обеспечивает «переключение» потока 2ОГ от ЦТК на аминокислотный синтез. Следует отметить, что глутаматдегидрогеназная активность как на первом, так и на втором этапе стрессового воздействия регулируется за счёт дифференциальной экспрессии генов *GDH1* и *GDH2*. При этом, процессы метилирования/деметилирования CpG-динуклеотидов в составе их промоторов играют ключевую роль в регуляции активности глутаматдегидрогеназы. В хлоропластах в это время происходит кратковременное восстановление ОЦ-метаболизирующей активности ОД за счёт изменения экспрессии гена *DHAD1*, которое в дальнейшем сменяется практически его полной инактивацией.

Влияние света различного спектрального состава на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ

2.1. Влияние света различного спектрального состава на функционирование 2ОГДК

2.1.1. Влияние света различного спектрального состава на активность 2ОГДК

Проведенный анализ влияния светового режима на функционирование 2ОГДК кукурузы позволил установить ингибирующее действие белого света на активность 2-ОГДК – значения общей ферментативной активности составили 1.2 Е /г с. м., в то время как для растений экспонированных в

темноте соответствующие значения были выше в 3.4 раза и составляли 5.4 Е/г с. м. (рис. 23). Инсоляция проростков *Zea mays* светом с длиной волны 660 нм приводила к снижению значений в 2 раза, по сравнению со значениями, зарегистрированными у растений, находившихся в условиях отсутствия света. Облучение дальним красным светом, а также последовательное воздействие на проростки красным и дальним красным светом не приводило к каким-либо изменениям в работе 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса. Показано, что синий свет также ингибирует 2-ОГДК- активность в 1.3 раза по сравнению с группой растений, экспозиция которых осуществлялась в течении всего времени эксперимента в темноте.

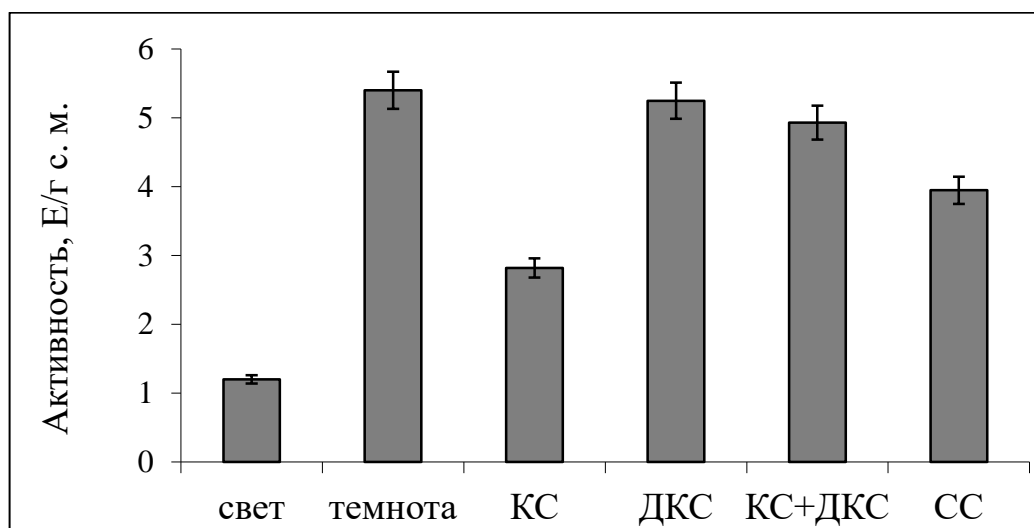


Рис.23 Анализ общей активности 2ОГДК в листьях *Zea mays* L. при облучении светом различного спектрального состава. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, экспонированные в темноте; КС – растения, облученные красным спектром; ДКС – растения, облученные дальним красным светом; КС+ДКС – растения, последовательно облученные КС и ДКС; СС - растения, облученные синим светом

Полученные результаты свидетельствуют о фитохром-зависимом механизме регуляции активности 2ОГДК. При этом, активная форма фитохрома проявляет ингибирующее действие по отношению к исследуемому ферментному комплексу.

2.1.1. Влияние света разной длины волны на экспрессию 2ОГДГ

2.1.1.1. Влияние различной длины волны на экспрессию генов 2ОГДГ в листьях кукурузы

Установленный характер функционирования 2ОГДГ при смене светового режима обусловлен модуляцией в экспрессии генов *OGDH1* и *OGDH3* в проростках *Zea mays* L.: уровень мРНК обоих генов на свету заметно ниже, чем в темноте (рис.24). Экспрессия генов *OGDH1* и *OGDH3* у растений, подвергшихся воздействию красного спектрального излучения осуществлялась в 4 раза менее интенсивно, чем у растений экспонированных в отсутствии какого-либо источника света, что указывает на то, что в регуляции работы генов 2ОГДГ принимает участие система фитохромов. В результате экспозиции растений в течении 15 минут при свете с $\lambda = 730$ нм изменения концентрации мРНК генов *OGDH1* и *OGDH3* относительно растений, находившихся в темноте, не наблюдалось. Также, смена спектрального состава света с красного на дальний красный способствовала переходу фитохрома в активную форму. При этом, значения относительного уровня транскриптов генов 2ОГДГ были сходны с данной величиной у «темновой» группы. Инсоляция синим светом приводила к подавлению экспрессии *OGDH1*, однако уровень транскриптов гена *OGDH3* при этом не изменялся в сравнении с показателем, отмеченным для растений, находившихся в условиях отсутствия света.

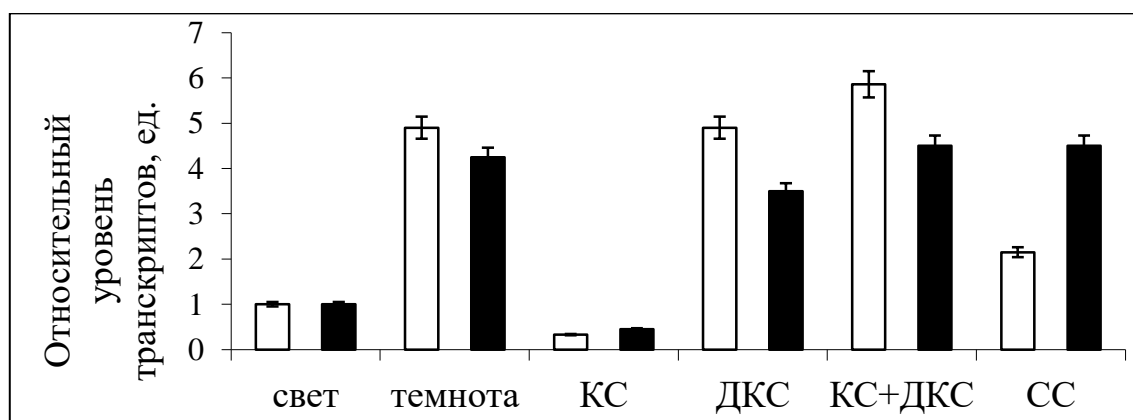


Рис.24 Влияние света различного спектрального состава на относительный уровень транскриптов *OGDH1* (белые столбцы) и *OGDH3* (черные столбцы) в листьях *Zea mays* L.

В литературе имеются данные об аналогичном эффекте белого и красного света на функционирование некоторых других энзимов цикла лимонной кислоты: сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы, аконитатгидратазы, что указывает на ключевую роль ЦТК в энергизации клеток в условиях отсутствия света [67, 68,69].

2.1.1.2. Влияние света различной длины волны на экспрессию генов 2ОГДГ *A. thaliana*

Гены *OGDH1* и *OGDH2*, кодирующие 2-оксоглутаратдегидрогеназу в геноме *A. Thaliana* в ответ на изменение спектрального состава света демонстрируют сходный с генами *OGDH1* и *OGDH3 Zea mays* паттерн экспрессии. Относительный уровень транскриптов генов *OGDH1* и *OGDH2* в растениях *A. thaliana* в темноте был в 2–4 раза выше, чем на свету (рис.25). Облучение проростков *Arabidopsis* красным светом способствовало снижению исследуемого показателя в 3.11 и 2 раза, соответственно, для генов *OGDH1* и *OGDH2*. Экспозиция растений в условиях инсоляции дальним красным светом, а также, при последовательном пятнадцатиминутном облучении красным и дальним красным светом, приводили к увеличению экспрессии гена *OGDH1* в 2.3 и 2 раза, соответственно. Уровень мРНК гена *OGDH2* в этих условиях изменялся незначительно. Облучение растений светом с длиной волны 465 нм способствовало падению уровня транскриптов генов *OGDH1*, относительно значений «темновой» группы.

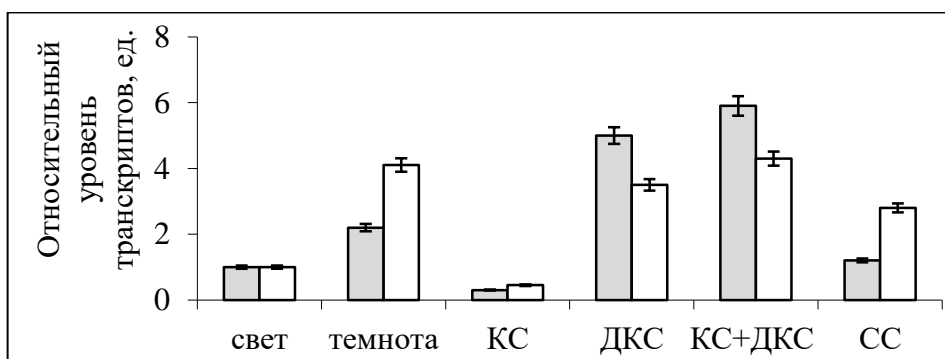


Рис.25 Влияние света различного спектрального состава на относительный уровень транскриптов генов *OGDH1* (серые столбцы), *OGDH2* (белые столбцы) 2ОГДГ в листьях *A. thaliana* дикого типа

Для выяснения роли отдельных фоторецепторов в процессах световой регуляции транскрипции генов 2ОГДГ были проведены исследования зависимости содержания их мРНК от света различного спектрального состава в нокаут - мутантах *Arabidopsis thaliana*, по генам *phyA*, *phyB*, *cry-4*.

Относительный уровень транскриптов генов *OGDH1* и *OGDH2* в линии *A. thaliana* дефицитной по гену *phyA* в отсутствие света увеличивался в 1.4 и 1.7 раз, соответственно, по сравнению с растениями, экспозиция которых осуществлялась в стандартных условиях освещения (Рис.26). Следует отметить, что облучение растений светом с различной длиной волны приводило к незначительному падению транскрипционной активности гена *OGDH2*, хотя значения относительного уровня транскриптов были все равно несколько выше, чем в группе «свет». Такой характер действия красного света на экспрессию данного гена в нокадаун –мутантах по гену фитохрома А может указывать на участие фитохрома В, в трансдукции светового сигнала.

Для оценки участия фитохрома В в регуляции работы 2ОГДК в условиях различного светового режима был проанализирован относительный уровень транскриптов генов *OGDH1* и *OGDH2* мутантных линий *A. thaliana*, нокаутных по гену фитохрома В. Растения, экспонировавшиеся в темноте демонстрировали индукцию генов 2ОГДГ (рис. 27).

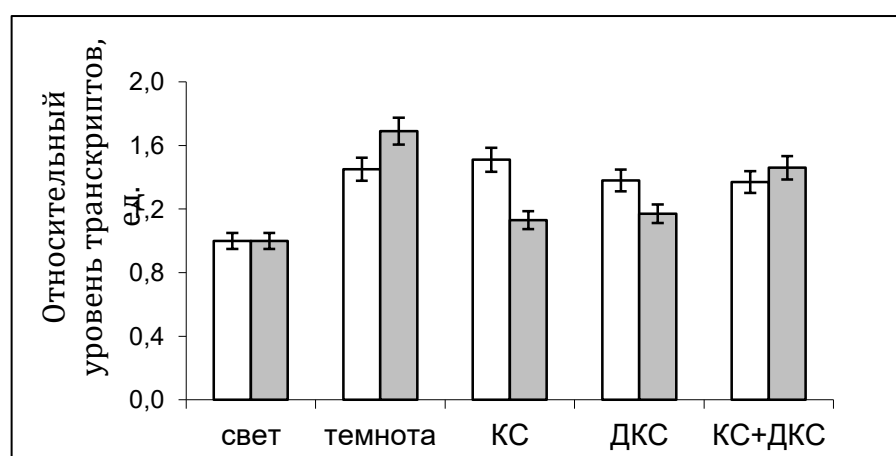


Рис.26 Влияние светового спектра на относительный уровень транскриптов гена *OGDH1* (белый), *OGDH2* (серый) в мутантах *A. thaliana*, нокаутных по гену *phyA*, в условиях различного освещения

Экспрессия генов *OGDH1* и *OGDH2* в растениях *A. thaliana* выросла почти в 2 раза в сравнении с уровнем транскриптов, отмеченным у растений, находившихся на свету. КС ингибировал транскрипцию генов *OGDH1* и *OGDH2* в мутантных о гену *phyB* растений арабидопсиса – снижение значений в 20 и 7.7 раз, соответственно.

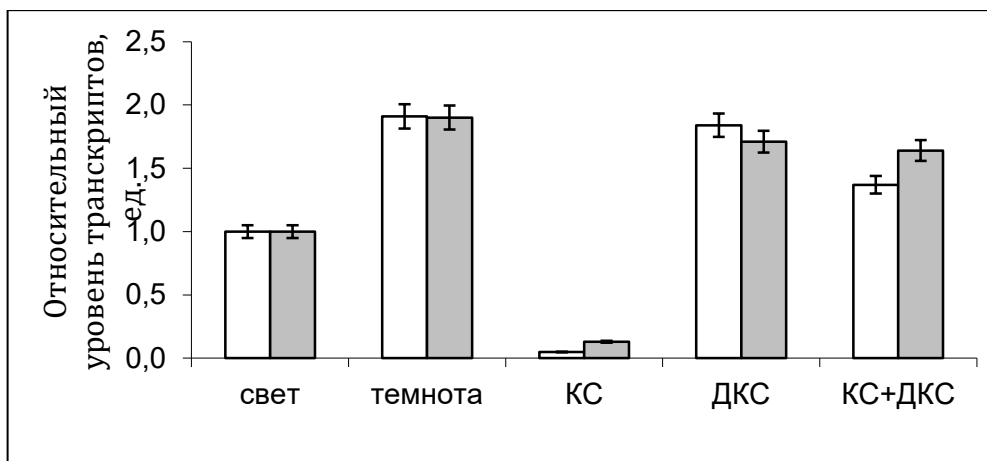


Рис.27 Относительный уровень транскриптов гена *OGDH1* (белый), *OGDH2* (серый) в нокаут-мутантах *A. thaliana* по гену *phyB*, при облучении светом различного спектрального состава

Снижение уровня мРНК генов *OGDH1* и *OGDH2* в 26 и 62 раза, соответственно, при облучении растений *Arabidopsis*, дефицитных по гену *cry-4* синим светом позволило установить криптохром-зависимый характер работы исследуемых генов(рис.28).

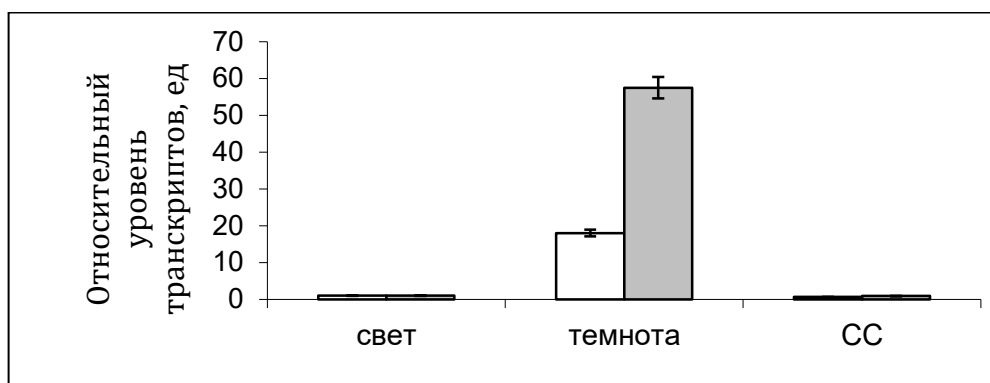


Рис. 28 Относительный уровень транскриптов генов *OGDH1* (белые столбцы) и *OGDH2* (серые столбцы) 2-ОГДГ в нокаут- мутантах *A. Thaliana* по гену *cry-4*, при облучении светом разного спектра

Исследование влияния света различного спектрального состава с применением нокаутных растений арабидопсиса по генам фитохрома А и В и криптохрома позволило установить роль каждого из них в световой регуляции 2ОГДК. Показано, что отсутствие фитохрома А в растениях *A.thaliana* значительно сказывается на механизме регуляции гена *OGDH1*. При облучении растений КС и ДКС не происходит достоверных изменений в уровне его транскрипции, что указывает на фитохром А-зависимую регуляцию. Для гена *OGDH2* характерна, вероятно, регуляция при участии и фитохрома А, и фитохрома В, поскольку для обоих мутантов выявлено изменение содержания мРНК данного гена при облучении растений красным и дальним красным светом в различных сочетаниях. Следовательно, фитохром-зависимый механизм является основным способом световой регуляции 2ОГДК, осуществляемый как фитохромом А, так и фитохромом В.

Кроме того, установлен криптохром-зависимый механизм регуляции работы генов 2ОГДГ в проростках *A. thaliana*. Инсоляция растений светом с длиной волны 465 нм вызывала изменения в экспрессии генов *OGDH1* и *OGDH2*. Эксперименты, проведенные на линиях арабидопсиса, мутантных по гену *Cry-4* не выявили участия полипептида, кодируемого с этого гена в передаче светового сигнала к генам 2ОГДГ.

2.1.2. Изменение степени метилирования CpG- динуклеотидов в составе промоторов генов

Результаты анализа метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в промоторной области гена *OGDH1* в проростках кукурузы при облучении светом разных длин волн позволили сопоставить изменения в статусе метилирования промотора с транскрипционной активностью данного гена. Степень метилированных цитозинов хотя и колебалась от 50 до 75%, однако, эти изменения не коррелировали с модуляциями уровня транскриптов данного гена (рис. 29). Результаты МС-ПЦР позволили установить, что метильный статус отдельных CpG-динуклеотидов в составе промоторной

области гена *OGDH*-оставался на уровне 25% при действии света различного спектра(Рис. 30).

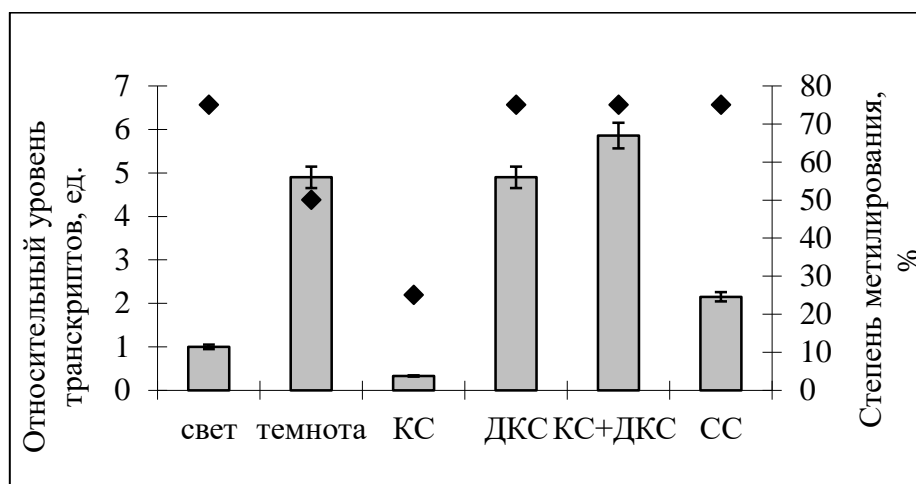


Рис.29 Динамика транскрипции гена *OGDH1* и метилирования его промотора при облучении растений светом разных длин волн

Установлено, что снижение ферментативной активности 2ОГДК под действием красного света относительно темнового контроля обусловлено, вероятно, участием фитохромной системы в регуляции функционирования данного энзима.

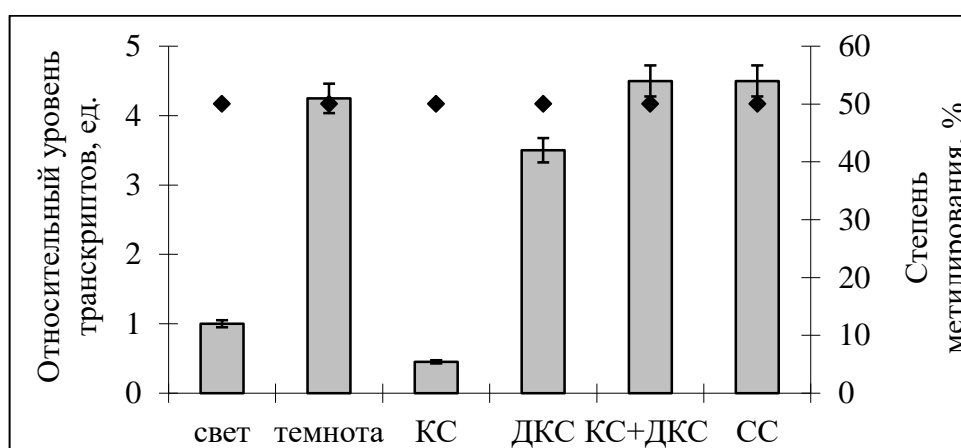


Рис.30 Динамика транскрипции гена *OGDH3* и метилирования его промотора при облучении растений светом разной длины волны

Красный свет приводит к падению активности 2-ОГДГ более чем в 4 раза, если проводить сравнение с группой растений экспонировавшихся в темноте. Снижение активности исследуемого энзима при облучении растений светом с длиной волны 465 нм, вероятно, обусловлено опосредованным влиянием на 2-оксоглутаратдегидрогеназу через

криптохромную систему. Арайо с соавт. ранее сообщали об угнетении работы 2-оксоглутаратдегидрогеназного ферментного комплекса на свету, которое связано с тем, что 2ОГ в листьях, в этом случае, выступает в качестве субстрата для глутаматдегидрогеназы и в листьях используется для синтеза глутамата [29, 30]. Увеличение аланина, ГАМК и глутамата, наблюдаемое в этих условиях подтверждает вывод о том, что на свету 2ОГДК тормозится и, видимо, начинает работать нециклически [30]. В работе показано, что в трансдукции светового сигнала, обеспечивающего контроль генов 2ОГДГ принимают участие системы фитохрома А и В, а также система криптохромов.

Результаты исследования указывают на пассивную роль эпигенетического механизма в регуляции функционирования 2-оксоглутаратдегидрогеназного ферментного комплекса, поскольку изменения в экспрессии генов, кодирующих 2ОГДГ в растениях в различных условиях светового режима, не связаны с колебаниями метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в области промоторов генов *OGDH1* и *OGDH3*.

2.2. Влияние света различного спектрального состава на функционирование ГДГ

В связи с тем, что глутаматдегидрогеназа в клетке имеет различную локализацию, нами была исследована общая (суммарная) активность глутаматдегидрогеназы по реакции аминирования, являющейся суммой активностей всех трёх субклеточных фракций. Исследование фракции хлоропластов не проводилось, так как в них функционирует глутамин-синтетазный путь [113].

2.2.1. Влияние света различного спектрального состава на активность ГДГ

В результате проведенных исследований по влиянию различного светового режима на функционирование глутаматдегидрогеназы было

установлено, что в листьях кукурузы, находившихся на свету, общая активность ГДГ по реакции аминированию составила 8.11 Е/г.с.м., в то время как в темноте наблюдалось ее увеличение в 2.4 раза выше (19.2 Е/г.с.м.) (рис. 31). После облучения растений красным светом с длиной волны 660 нм ГДГ-активность снижалась в несколько раз относительно аналогичных значений у растений, находящихся в темноте. Однако облучение листьев кукурузы ДКС и КС+ДКС не приводило к изменениям в работе ферментной системы – активность ГДГ была близка к значениям, характерным для группы «темнота».

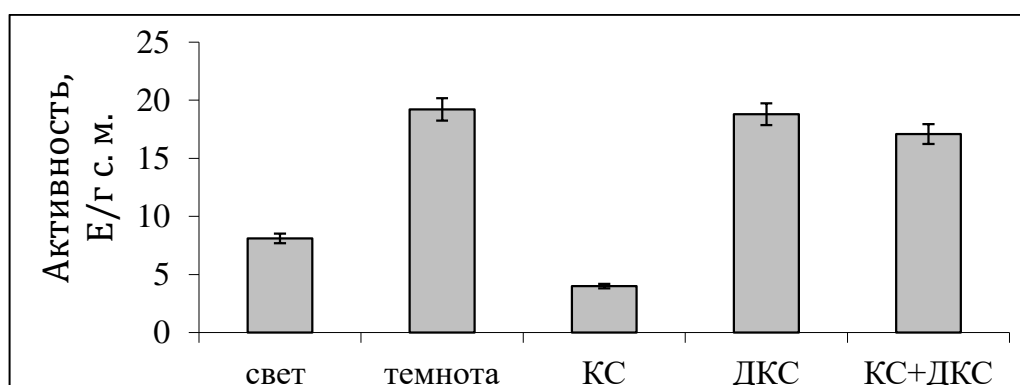


Рис.31 Суммарная активность ГДГ в листьях кукурузы в условиях различного светового режима

Для исследования влияния светового режима на активность митохондриальной формы глутаматдегидрогеназы было проведено выделение митохондриальной фракции из зеленых листьев кукурузы методом дифференциального центрифугирования. Расчет степени перекрестного загрязнения осуществлялся на основе анализа активности маркерного фермента цитоплазмы - алкогольдегидрогеназы. Установлено, что данная величина в наших исследованиях для фракции митохондрий составляла 8.7%. При анализе результатов по определению скорости функционирования ГДГ учитывалась степень перекрёстного загрязнения.

Анализ изменения активности митохондриальной глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях разного освещения продемонстрировал сходную картину: низкие значения общей

ферментативной активности в растениях находившихся в обычных световых условиях (группа «свет») и в листьях кукурузы, подвергнутых действию красного света, по сравнению с растениями, находившимися в темноте на протяжении всего времени эксперимента (Рис. 32). Активность ГДГ в листьях, экспонированных на свету, составила 4.8 Е/г.с.м., что почти в два раза ниже, чем у растений, находившихся в темноте. При облучении проростков кукурузы красным светом скорость функционирования ГДГ в листьях была близкой к значениям «световой» группы растений. Однако, иная картина характерна для растений инсолированных в течении 15 минут ДКС и последовательно КС и ДКС. При облучении ДКС и последовательном облучении красным и дальним красным светом общая ферментативная активность была в 1.9 раз выше, чем на свету.

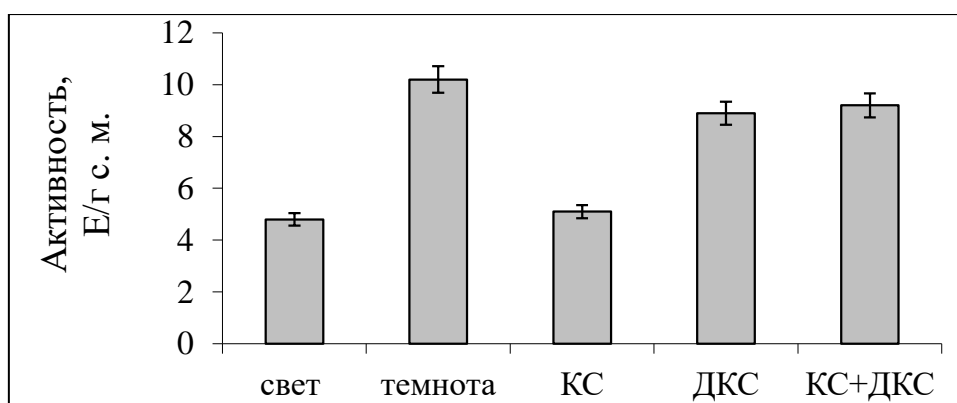


Рис.32 Активность глутаматдегидрогеназы в митохондриальной фракции из листьев кукурузы в условиях различного светового режима

Полученные данные свидетельствуют о том, что действующим фактором в передаче сигнала выступает фитохромная система, осуществляющая рецепцию светового потока в области длин волн 660 и 730нм. Угнетение функционирования ГДГ наблюдается в присутствии в клетке активной формы фитохрома, что связано с облучением кукурузы светом с длиной волны 660 нм. Следует отметить, что воздействие на растения дальнего красного света с длиной волны 730 нм приводит к активации ГДГ- активности.

2.2.2. Влияние света различного спектрального состава на изоферментный состав ГДГ

Исследование изоферментного состава ГДГ при облучении светом различного спектра показало, что высокие значения ферментативной активности ГДГ, зарегистрированные в растениях, находившихся в темноте на протяжении всего эксперимента связаны с наличием двух форм фермента со значениями электрофоретической подвижности 0.13 и 0.17 (Рис. 33). Инсоляция растений на белом свете, также как и экспозиция в течении 15 минут при действии красного света приводили к снижению активности энзима – обнаруживалась одна форма ГДГ со значением $R_f = 0.17$. Последовательное облучение растений кукурузы КС и ДКС приводило к снятию ингибирующего эффекта КС, и появлению изоформы ГДГ с 0.13.

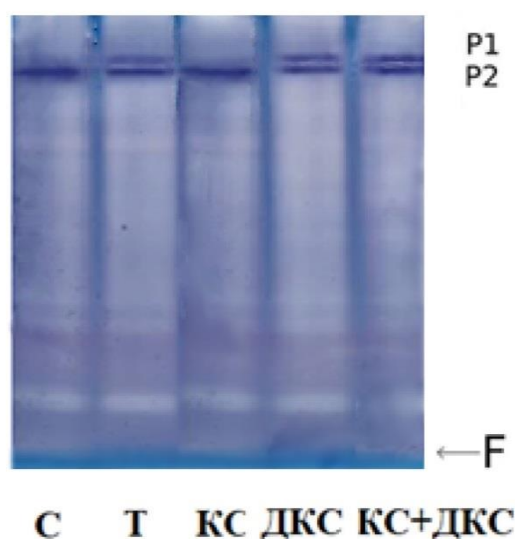


Рис.33 Электрофореграмма глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы в ПААГ в условиях действия света, различного спектрального состава. P1,P2 – белковые полосы; F – фронт красителя.

2.2.3. Влияние света различного спектрального состава на транскрипцию генов ГДГ

Для определения молекулярных механизмов регуляции функционирования ГДГ при облучении растений светом различного спектрального состава, был проведен анализ транскрипционной активности генов *GDH1* и *GDH2* (Рис. 34). В растениях, экспонированных на свету,

содержание мРНК обоих генов ниже такового показателя в сравнении с растениями из группы «темнота»: концентрация транскриптов гена *GDH1* в растениях в темноте была в 3.25 раза выше, чем на свету. При этом, значения относительного уровня транскриптов гена *GDH2* в темноте были выше, чем на свету в 1.38 раз. Сходные результаты были продемонстрированы для группы растений, облученных красным светом. Облучение растений красным светом индуцировало снижение концентрации мРНК гена *GDH1* в 1.77 раза и в 1.36 уровень транскриптов гена *GDH2* по сравнению с аналогичными показателями у растений, экспонируемых в темноте. Следует отметить, что значения относительного уровня транскриптов гена *GDH1* в клетках растений после их облучения светом 730 нм и последовательным облучением 660 и 730 нм были в 3.8 и 3.3 раза больше, чем на свету, соответственно.

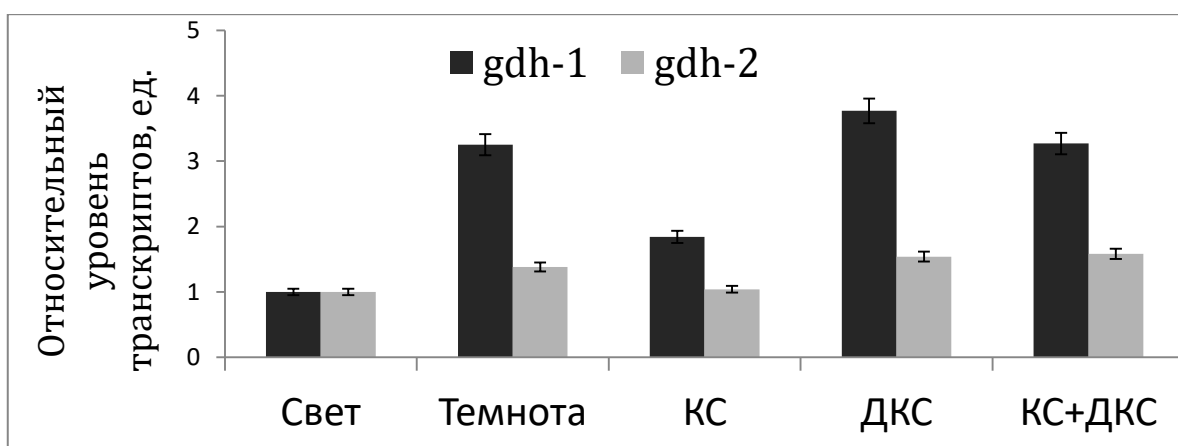


Рис.34 Относительный уровень экспрессии гена *GDH1* и *GDH2* в листьях кукурузы при облучении светом различной длины волны

Величины транскриптов гена *GDH2* после облучения растений ДКС и последовательном облучении КС и ДКС оставались выше значений, отмеченных для варианта «свет».

Анализ метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в составе промоторов генов *GDH1* и *GDH2* глутаматедгидрогеназы кукурузы при инсоляции растений светом различной длины волны показал, что при переходе растений в темновые условия степень метилирования гена *GDH2*

изменяется, однако нельзя в полной мере утверждать, что метилирование в данном случае является регулирующим экспрессию фактором (Приложение, Рис.13-14). На графиках видно, что увеличение экспрессии гена *GDH1* в темноте не сопровождалось какими-либо изменениями доли метилированных цитозинов в составе его промотора (степень метилирования 50%)(Приложение, Рис.13). Облучение растений КС, ДКС и последовательное облучение КС и ДКС также не вызывало никаких изменений в метильном статусе исследуемых CpG-динуклеотидов. При исследовании CpG-динуклеотидов в составе CpG-островка промотора гена *GDH2* было обнаружено, что инсоляция растений на свету вызывает увеличение степени метилирования цитозинов до 50% которое коррелирует со снижением концентрации мРНК исследуемого гена (Приложение, Рис.14). Следует отметить, что облучение проростков кукурузы КС не приводило к смене метильного статуса, также как и последовательное облучение КС и ДКС, в то время как инсоляция растений в течении 15 минут ДКС способствовала увеличению степени метилирования до 75% , что , однако, не коррелировало с результатами анализа экспрессии гена *GDH2*.

Результаты исследования метильного статуса промоторов генов ГДГ свидетельствуют о фитохром-зависимом механизме регуляции их экспрессии, которая проявляется при освещении растений КС и ДКС, специфически акцептируемыми фитохромной системой. Активация фитохрома путем облучения растений красным светом индуцировало изменение содержания мРНК, проявляющееся в уменьшении величины анализируемого показателя.

2.2.4. Влияние света различного спектрального состава на функционирование ГДГ при обработке рутением красным и ЭГТА

Фитохромы имеют несколько вариантов контроля активности ферментов, как через непосредственное взаимодействие, так и через опосредованное

влияние на генетический материал - изменение экспрессии генетического аппарата клетки с участием различных мессенджеров [19].

Известно, что механизм регуляции экспрессии гена *sdh 1-2* сукцинатдегидрогеназы при смене светового режима может осуществляться через изменение активности факторов транскрипции вторичным мессенджером (Ca^{2+} , цГМФ) [69].

Для определения влияния свободных катионов кальция на передачу светового сигнала применяли комплексон ЭГТА, который, являясь хелатирующим агентом, имеет высокое сродство к кальцию, и рутению красный, блокирующий кальциевые каналы ядерной мембраны. Применение рутения красного и ЭГТА приводило к связыванию кальция, что сопровождалось снятием ингибирующего эффекта действия красного света (Рис. 35).

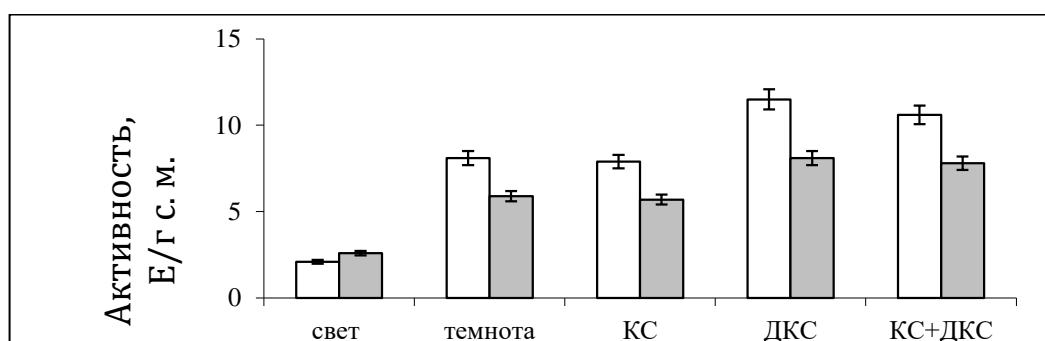


Рис. 35 Активность митохондриальной ГДГ в листьях кукурузы в условиях различного светового режима в присутствии ЭГТА (белые столбцы) и рутения красного (серые столбцы)

Облучение красным светом не вызывало падения общей ферментативной активности, что полностью коррелировало с результатами, полученными в ходе исследования относительного уровня транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* (Рис. 36-37). Применение комплексона ЭГТА снижало ингибирующий эффект красного света на экспрессию исследуемых генов. Воздействие дальнего красного, а также сочетанного действия красного и дальнего красного света не вызывало изменения скорости транскрипции исследуемого гена в листьях исследуемых растений относительно темнового варианта. Кроме того, инкубация растений кукурузы, обработанных

рутением красным в темноте, приводила к увеличению содержания транскриптов генов ГДГ. В присутствии рутения не происходит изменение скорости функционирования митохондриальной ГДГ в листьях кукурузы при облучении растений красным, дальним красным светом и последовательным действием КС и ДКС, относительно контроля – варианта «темнота».

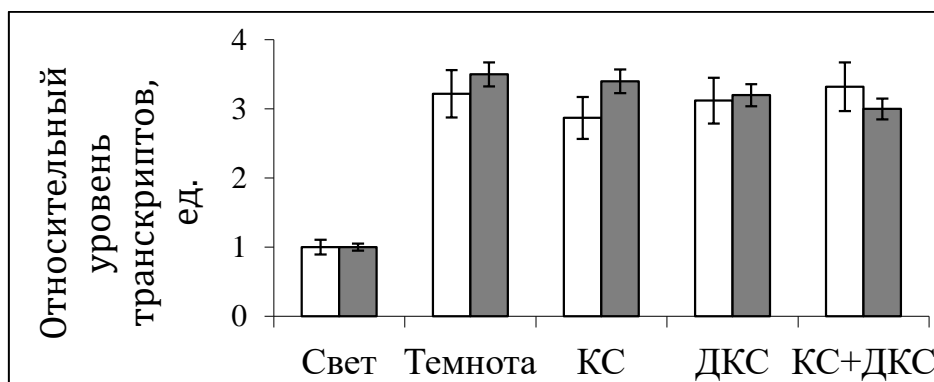


Рис.36 Относительный уровень транскриптов гена *GDH1* в листьях кукурузы в присутствии комплекса ЭГТА (белые столбцы) и ингибитора кальциевых каналов рутения красного (серые столбцы) при облучении светом различного спектрального состава

Таким образом, полученные результаты исследования экспрессионной активности генов *GDH1* и *GDH2* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима в присутствии ЭГТА и рутения красного, позволили установить роль кальций-зависимой регуляции данных генов. Анализ полученных в этой работе данных свидетельствует о сложном влиянии светового режима на функционирование ГДГ в листьях кукурузы.

Красный свет вызывал резкое снижение ГДГ- активности, но при облучении листьев дальним красным светом и в темноте индуцировалось увеличение интенсивности работы данной ферментной системы. Известно, что АТФ в высоких концентрациях является ингибитором работы ГДГ (в сторону образования 2-оксоглутарата) и дыхательного метаболизма митохондрии[61].

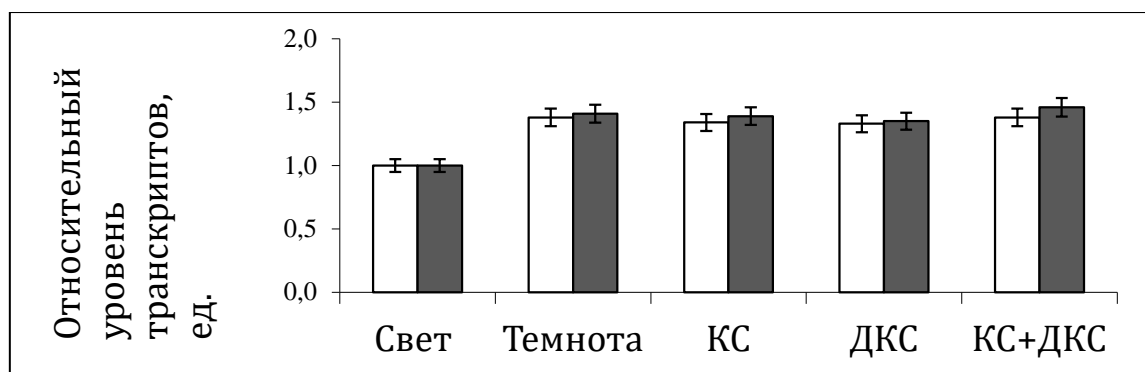


Рис.37 Относительный уровень транскриптов гена *GDH2* в листьях кукурузы в присутствии комплексона ЭГТА (белые столбцы) и ингибитора кальциевых каналов рутения красного (серые столбцы)

Подобный эффект тормозящего действия света на активность ферментов связывается с трансформацией клеточного метаболизма, обусловленного фотосинтетическим процессом образования АТФ, то есть на свету роль цикла Кребса в биоэнергетике клетки резко снижается [68,71]. Интересно отметить, что ГДГ активирована своей деятельностью в темноте и при облучении дальним красным светом, что обусловлено интенсификацией функционирования цикла трикарбоновых кислот. При этом, глутаматдегидрогеназа в листьях в темновых условиях катализирует в большей степени реакцию аминирования, что подтверждается рядом независимых исследований [74, 73, 182]. Важным вопросом интерпретации полученных данных является механизм трансдукции фитохромного сигнала в растительной клетке. Полученные данные с использованием специфического ингибитора кальциевых каналов - рутения красного и ЭГТА, связывающей свободные ионы кальция, позволили получить данные, подтверждающие, что концентрационные трансформации Ca^{2+} обеспечивают передачу сигнала в ядро клетки.

Содержание Ca^{2+} в ядрах листьев на свету значительно ниже, чем в темноте. В отсутствие света в клетках функционирует окислительный метаболизм, обеспечивающий энергией клетку. Это способствует активации митохондриального метаболизма, в том числе и ЦТК[69].

Увеличение экспрессионной активности гена *GDH1* в темноте значительно выше, чем гена *GDH2*. Как известно, ген *GDH1* кодирует β -субъединицу глутаматдегидрогеназы. По имеющимся данным, преобладание в структуре фермента β -субъединиц приводит к смещению равновесия в работе фермента в сторону реакции аминирования 2-оксоглутарата – образования глутамата[156]. Вероятно, существенное увеличение транскрипционной активности гена *GDH1* в темноте связано с поставкой глутамата для синтеза аминокислот. Увеличение транскрипционной активности генов ГДГ может свидетельствовать об увеличении доли этого фермента в анализируемых условиях, необходимой для поддержания нормального метаболизма митохондрий в отсутствии фотосинтеза.

2.3. Влияние света различной длины волны на функционирование ССАДГ

В связи с тем, что в темноте ЦТК интенсифицируется, основной поток 2ОГ направлен на 2ОГДК. Однако, интересным представляется установить каким образом функционирует участок ЦТК- ГДГ-ГАМК-шунт в условиях действия света различных длин волн. ССАДГ, как участник ГАМК-шунта, обеспечивающий его связь с ЦТК, играет значительную роль в этом взаимодействии.

2.3.1. Влияние света различной длины волны на транскрипцию генов ССАДГ

Исследовав изменения относительного уровня транскриптов гена *SSADH1* при действии света различного спектрального состава, удалось установить, что полипептид, кодируемый данным геном активен в большей мере на свету – экспрессионная активность исследуемого гена в 6.7 раз выше на свету чем в темноте (Рис. 38). Растения, облученные КС демонстрировали увеличение концентрации мРНК гена *SSADH1* в 14.7 раза больше, чем у

растений, которые находились в темноте, что указывает на ведущую роль фитохромной системы в его регуляции. У образцов, подвергнутых действию ДКС, а также облученных последовательно КС и ДКС значения относительного уровня транскриптов были в 5.8 и 2.1 раза, соответственно ниже, чем у растений экспонировавшихся всё время эксперимента на свету.

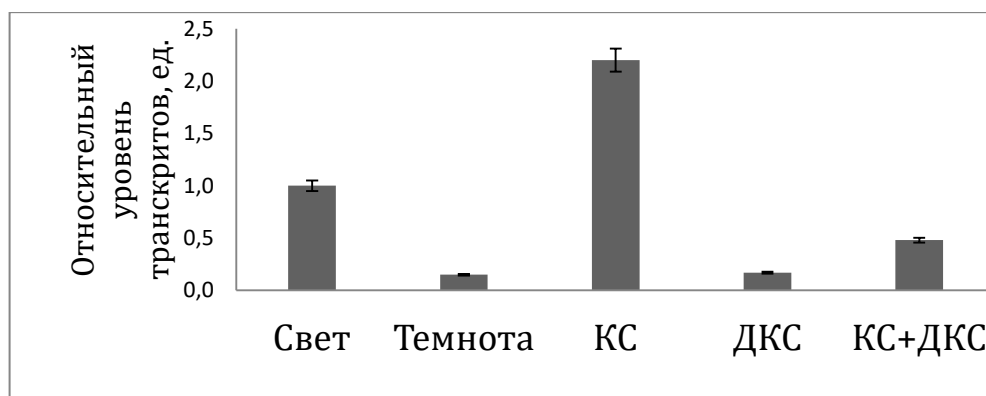


Рис. 38 Относительный уровень транскриптов гена *SSADH1* в листьях кукурузы при облучении светом различного спектрального состава

Установлен светозависимый характер регуляции работы гена *SSADH2*, экспрессия которого также ингибируется в темноте (концентрация мРНК в темноте в 4.8 раза ниже, чем на свету) (Рис. 39).

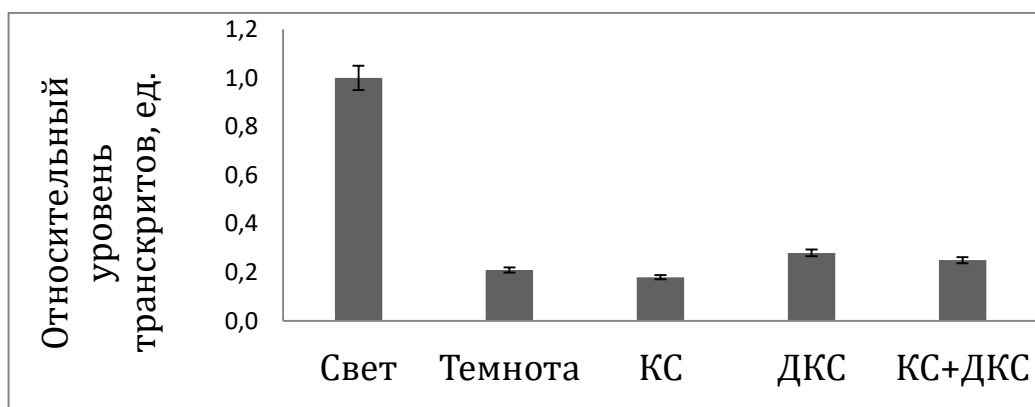


Рис. 39 Относительный уровень транскриптов гена *SSADH2* в листьях кукурузы при облучении светом различного спектрального состава

Интересно отметить, что облучение растений КС не приводило к активации данного гена, впрочем, также как и облучение ДКС и последовательное облучение КС и ДКС – относительный уровень транскриптов оставался значительно ниже, чем у растений из группы «свет».

Таким образом, установлено, что ССАДГ является светозависимым энзимом и функционирует преимущественно днем, что обусловлено, вероятно, необходимостью поддерживать ЦТК на свету, когда его активность снижена в виду функционирования фотосинтетической системы, которая в данный период является основным источником энергии для клетки.

2.4. Влияние света различной длины волны на функционирование ОД

2.4.1. Влияние света различной длины волны на каталитическую активность ОД

В ходе проведенного исследования по влиянию света различных длин волн на активность ОД был установлен ингибирующий характер воздействия красного света на активность фермента по реакции образования 2ОГ – значения общей ферментативной активности в 10 раз ниже, чем в темноте (Рис.40). Облучение растений находящихся в темноте красным светом (КС) приводит к снижению общей ферментативной активности в два раза, в то время как облучение растений дальним красным светом (ДКС) увеличивает значения общей ферментативной активности в 1.5 раза.

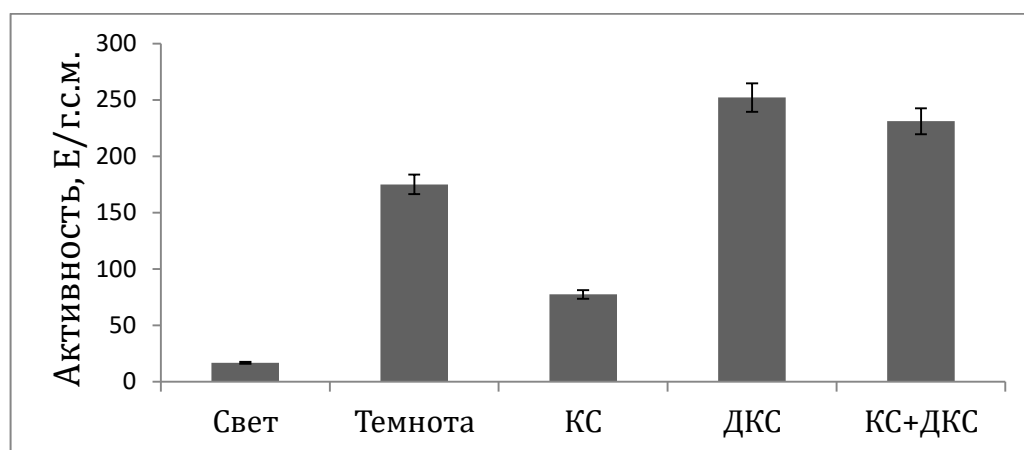


Рис. 40 Влияние света различных длин волн на общую ферментативную активность ОД в листьях кукурузы *in vivo*

Установленные эффекты красного-дальнего красного света на функционирование ОД указывают на фитохром-зависимую регуляцию работы данного энзима.

2.4.2. Влияние светового спектра на транскрипцию генов ОД

Исследования транскрипционной активности генов *DHAD1* и *DHAD2* показали, что облучение светом различных длин волн приводит к изменениям относительного уровня транскриптов обоих генов (Рис. 41- 42).

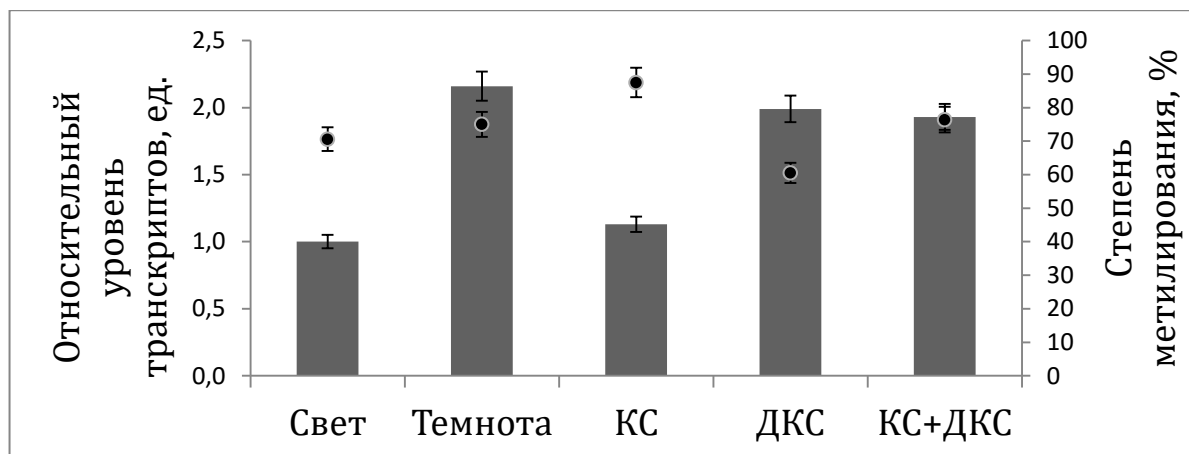


Рис. 41 Относительный уровень транскриптов гена *DHAD1* в листьях кукурузы при их облучении светом разной длины волны

Паттерн экспрессии *DHAD1* коррелировал с характером общей ферментативной активности: относительный уровень транскриптов исследуемого гена в темноте и при экспозиции растений в условиях освещения ДКС значительно выше, чем на свету и при действии КС (Рис. 41).

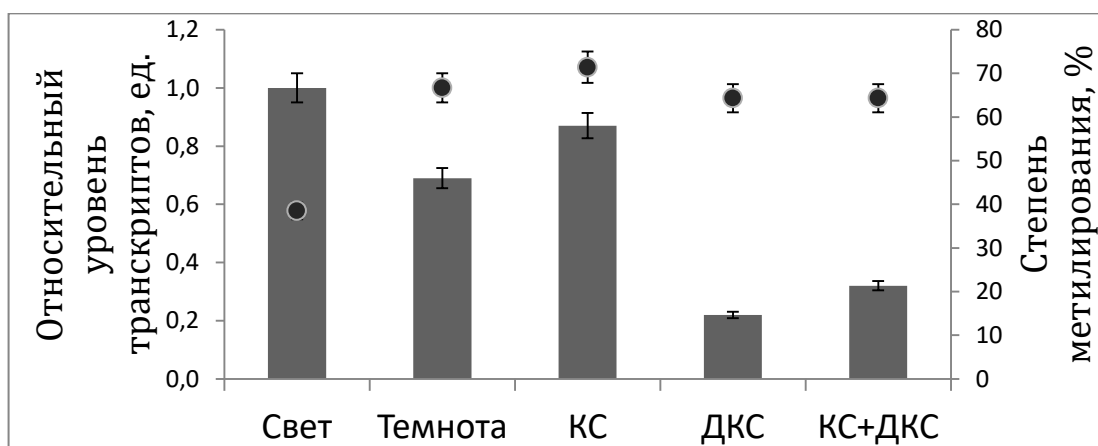


Рис. 42 Относительный уровень транскриптов гена *DHAD2* в листьях кукурузы при их облучении светом разной длины волны

Изменения транскрипционной активности гена *DHAD1* соответствовали увеличению степени метилирования промотора данного

гена при облучении красным светом, если сравнивать с соответствующими показателями, полученными у растений, экспонировавшихся при действии ДКС, хотя, изменений в метильном статусе промотора при инкубации растений на свету и в темноте не наблюдалось.

Экспрессия *DHAD2*, наоборот, была выше на свету в 1.5 и в 1.1 раза выше при облучении красным светом, чем в темноте, в то время как облучение дальним красным светом еще больше снижало экспрессию *DHAD2* (Рис.42). Корреляции в изменении относительного уровня транскриптов и степени метилирования промотора исследуемого гена обнаружено не было: процент метилированных цитозинон колебался от 38.5% до 71.4%.

2.5. Изменения метаболизма 2ОГ при облучении светом различного спектрального состава

На основе полученных данных разработана гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов метаболизма 2-оксоглутарата в листьях кукурузы при смене светового режима, из которой видна фитохром-А опосредованная регуляция функционирования 2ОГДГ, ГДГ, ОД (Приложение, Рис.20). Облучение растений светом приводит к концентрационным трансформациям ионов кальция, а также к конформационным изменениям в структуре фитохрома А, в результате чего его активная форма перемещается в ядро, где опосредованно через систему транскрипционных факторов[105, 201] происходит регуляция (снижение) транскрипции генов 2ОГДГ, ГДГ. Для гена *OGDH1* показан криптохром-зависимый механизм регуляции его функционирования. Глутаматдегидрогеназа активирует свою деятельность в темноте и при облучении дальним красным светом, что обусловлено интенсификацией функционирования цикла трикарбоновых кислот за счёт поставки 2ОГ. Показано, что на свету активирует свою деятельность ССАДГ за счёт индукции гена *SSADH1*. В хлоропластах, свет индуцирует функционирование

изофермента ОД, обеспечивающего синтез аминокислот с разветвленными боковыми цепями, за счёт использования 2ОГ, метаболизм которого осуществляет энзим, кодируемый геном *DHAD1* в темновую фазу. Установленные эффекты красного-дальнего красного света на функционирование ОД указывают на фитохром-зависимый механизм трансдукции светового сигнала. При этом, отмечено, что регуляция данного гена осуществляется за счёт трансформации метильного статуса промотора.

3. Влияние гипоксии на функционирование ферментов, участвующих в метаболизме 2ОГ

3.1. Влияние гипоксии на функционирование 2ОГДК

3.1.1. Влияние гипоксии на активность 2ОГДК

Снижение концентрации кислорода в газовой среде в первые часы воздействия на растения *in vivo* вызывает угнетение каталитической активности 2ОГДК, что связано с тем, что недостаток кислорода в первую очередь вызывает инактивацию ЭТЦ митохондрий в виду отсутствия терминального акцептора электронов, в роли которого выступает кислород (Рис. 43). Общая ферментативная активность исследуемого метаболита оставалась ниже контрольных значений на протяжении всего времени эксперимента. Контрольная группа не демонстрировала значительных изменений общей ферментативной активности (изменения в пределах колебаний). Как известно, снижение кислорода в среде приводит к ингибированию работы ЭТЦ митохондрий, что связано с тем, что основной донор электронов отсутствует [115, 10, 11, 166, 78]. Помимо этого, увеличивается концентрация АФК, что способствует повреждению мембран клетки, за счет нарушения двойного слоя липидов, а также самих белковых молекул[130]. Таким образом, полученные нами результаты динамики активности 2ОГДК в условиях гипоксии согласуются с имеющимися в литературе данными о подавлении работы 2ОГДК и всего ЦТК[37].

Снижение активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса может быть связано с «переключением» потока 2ОГ на ГАМК-шунт – основной «стрессовый» путь растительных организмов через глутаматдегидрогеназу, которая осуществляет его аминирование до глутамата [37].

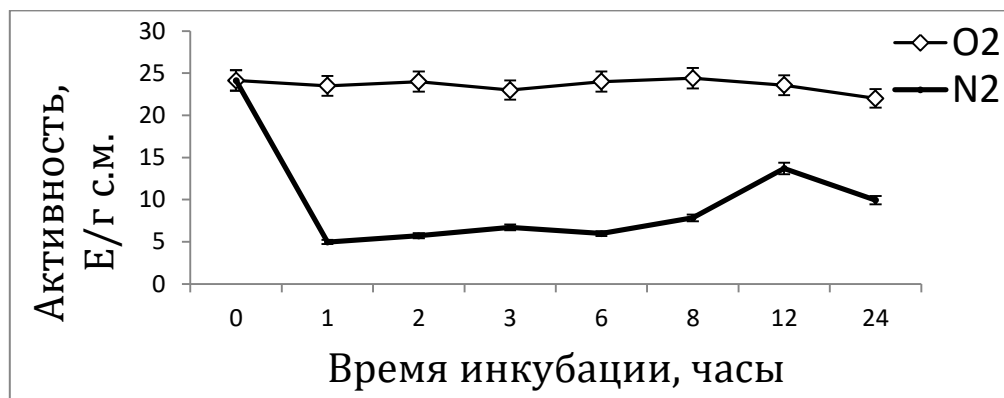


Рис. 43 Динамика ферментативной активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях гипоксии. O₂- контрольная группа растений; N₂- опытная группа растений. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

3.1.2. Влияние гипоксии на транскрипцию генов 2ОГДГ

В результате проведенного исследования по влиянию дефицита кислорода на экспрессию генов *OGDH1* и *OGDH3* показано, что гипоксия вызывает значительные изменения в метильном статусе исследуемых CG-динуклеотидах этих генов, что приводит к их инактивации.

Показано, что снижение уровня транскриптов гена *OGDH1* сопровождалось постепенным увеличением степени метилирования отдельных CG-динуклеотидов с 25% до 75% (Рис.44). В контрольной группе растений доля метилированных цитозиной составляла 25% в течение всего времени гипоксического воздействия (Приложение, Рис. 15).

Анализ метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов в составе промотора гена *OGDH3* позволил выявить увеличение доли метилированных цитозинов с 50% до 75%, коррелирующее со снижением значений относительного уровня транскриптов данного гена (Рис. 45).

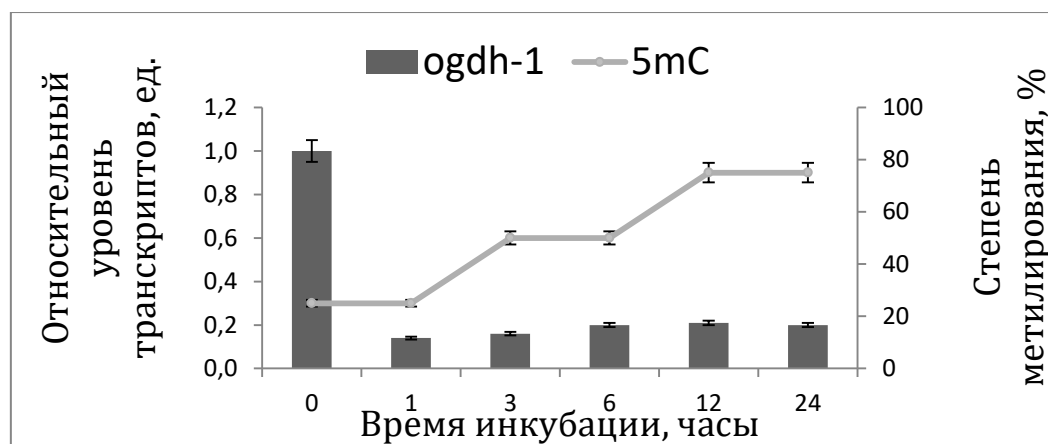


Рис.44 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *OGDH1* и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в проростках кукурузы при дефиците кислорода. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

В контрольной группе растений на протяжении всего эксперимента, находящейся в нормоксических условиях, изменения степени метилирования CG-динуклеотидов не наблюдалось (50% всех исследованных цитозинон были метилированы)(Приложение, Рис. 16).

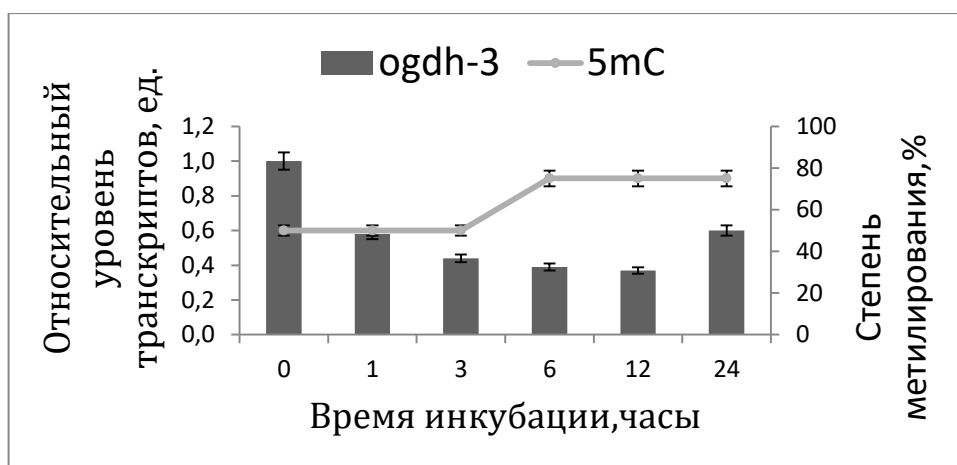


Рис. 45 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *OGDH3* и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в проростках кукурузы при гипоксии. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Таким образом, изменение активности 2-ОГДГ в листьях кукурузы в гипоксических условиях обусловлено модуляциями экспрессии генетического аппарата клетки. Колебания содержания транскриптов генов *OGDH1* и *OGDH3* сопряжены с изменением метильного статуса CG-

динуклеотидов в их промоторах. Следовательно, регуляция функционирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы в условиях низких концентраций кислорода осуществляется на эпигенетическом уровне посредством изменения метильного статуса промоторов их генов.

Полученные результаты согласуются с имеющейся в литературе информацией о том, что 2ОГДК, будучи важной точкой пересечения нескольких метаболических путей, осуществляет контроль всего энергетического метаболизма клетки, в том числе и за счет переключения потока электронов на ГАМК-шунт[43]. Вероятно, снижение концентрации кислорода в среде, приводящее к увеличению уровня АФК и снижению концентрации АТФ в клетке, за счет того, что ЭТЦ растительной клетки практически перестает функционировать, запускает механизм гипоксического ответа [43,196, 95].

3.2. Влияние гипоксии на функционирование ГДГ

3.2.1. Влияние гипоксии на активность ГДГ

В связи с тем, что активность 2ОГДК в условиях низких концентраций кислорода ингибируется, наиболее вероятно переключение потока электронов на другой путь, для того, чтобы или компенсировать или же нивелировать негативное влияние стрессора. Исследование влияния гипоксии на ферментативную активность ГДГ позволило установить активацию данной ферментной системы по реакции аминирования (Рис. 46). В первые часы эксперимента в листьях кукурузы наблюдалась существенно активности ГДГ по реакции аминирования более чем в 1.5 раза. Максимум активности был зафиксирован на 12 ч инкубации. Спустя сутки эксперимента значения общей ферментативной активности ГДГ снижались до уровня контрольной группы.

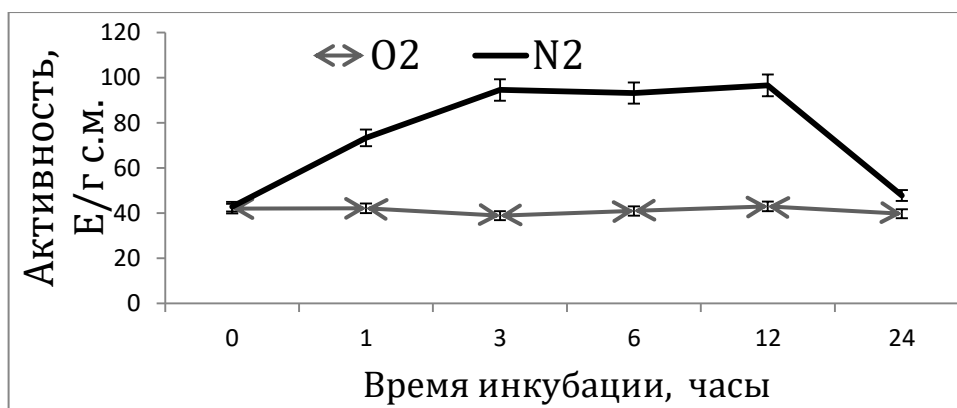


Рис. 46 Изменение общей ферментативной активности ГДГ (по реакции аминирования) в проростках кукурузы при гипоксии. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Увеличение активности ГДГ может быть связано с переключением потока 2ОГ из ЦТК на образование глутамата, который в дальнейшем может быть использован клеткой непосредственно для аминокислотного синтеза, так и в качестве субстрата для некоторых метаболических путей, в том числе и для ГАМК-шунта.

3.2.2. Влияние гипоксии на экспрессию генов ГДГ

Для установления механизма, регулирующего активность ГДГ в данных условиях было проведено исследование транскрипционной активности генов, которые в геноме кукурузы кодируют α и β -субъединицы глутаматдегидрогеназы.

Было установлено, что транскрипция гена *GDH1* при инкубации растений в среде с низким содержанием кислорода первоначально снижается в два раза, что, однако, к третьему часу сменяется его активацией (Рис. 47).

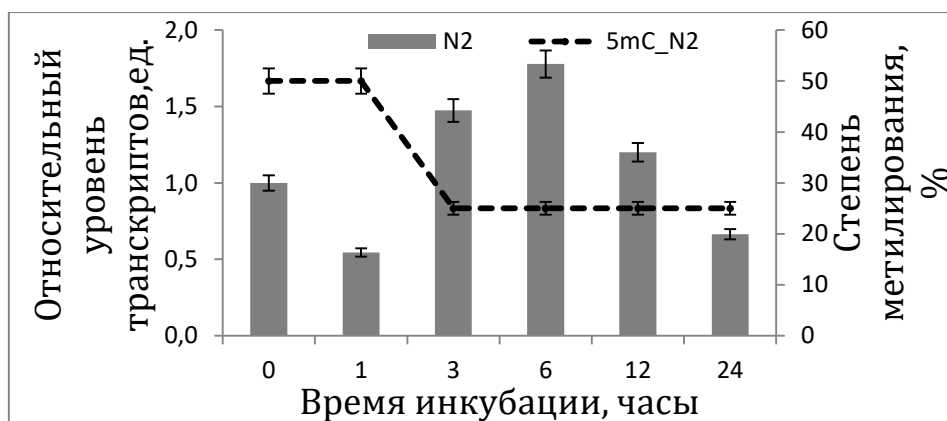


Рис.47 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH1* от степени метилирования (5mC_N2) его промотора в проростках кукурузы в условиях дефицита кислорода. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

К 6 часу эксперимента относительный уровень транскриптов *GDH1* достигает своего максимума. В последующие часы концентрация мРНК данного гена постепенно снижается. Следует отметить, что в контрольной группе растений относительный уровень транскриптов гена *GDH1* практически не изменялся (изменения в пределах колебаний) на протяжении всего времени эксперимента.

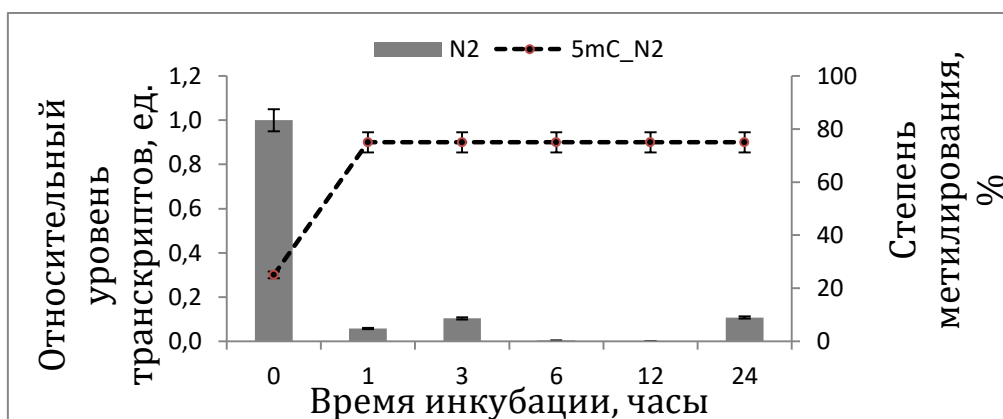


Рис. 48 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH2* от степени метилирования (5mC_N2) его промотора в проростках кукурузы в условиях дефицита кислорода. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Проведенное исследование динамики относительного уровня транскриптов гена, кодирующего α -субъединицу ГДГ – *GDH2* показало, что уже в первые часы эксперимента ген инактивируется (Рис. 48) - на 6 час

эксперимента зарегистрировано минимальное значение уровня мРНК данного гена, что в некоторой степени коррелирует с максимумом транскрипционной активности гена *GDH1*.

На протяжении всего времени эксперимента относительный уровень транскриптов гена, кодирующего α -субъединицу ГДГ остается на достаточно низком уровне, более чем в 9 раз ниже уровня значений, демонстрируемых в контрольной группе растений

Полученные в результате проведенной МС-ПЦР данные позволили выявить корреляцию между динамикой транскрипционной активности генов семейства *GDH* и модуляциями в метильном статусе исследуемых CpG-динуклеотидов.

Установлено, что инкубация растений кукурузы в среде с низким содержанием кислорода приводит к снижению количества метилированных цитозинов в промоторе гена *GDH1*, что сопровождается увеличением его транскрипционной активности – до начала эксперимента 50% всех исследованных CpG-динуклеотидов обладали метильной группой, однако, по истечению третьего часа гипоксического воздействия 25% исследуемых цитозинов находились уже в деметилированном состоянии (Рис. 47). У растений, находившихся в нормоксических условиях степень метилирования составляла 50% на протяжении всего эксперимента (Приложение, Рис 17.).

Инактивация гена *GDH2* с первого часа нахождения в условиях дефицита кислорода была обусловлена метилированием CpG-динуклеотидов в составе его промотора до 75% (Рис.48). Увеличение доли метилированных цитозинов у контрольной группы растений не наблюдалось - степень метилирования промотора в условиях нормоксии составляла 25% (Приложение, Рис.18).

Таким образом, разнонаправленные модуляции в метильном статусе исследуемых CpG-динуклеотидов промоторов генов *GDH1* и *GDH2* в условиях действия гипоксического стресса, сопряженные с изменением их

транскрипционной активности указывают на существенную роль эпигенетического механизма в регуляции работы глутаматдегидрогеназной активности.

В условиях дефицита кислорода активность ГДГ – фермента, обеспечивающего не только синтез глутамата, а также связь ЦТК и ГАМК-шунта, индуцируется уже с первых часов инкубации растений в гипоксических условиях, что обусловлено активацией гена *GDH1*, который в геноме кукурузы кодирует β -субъединицу энзима. Наличие в структуре полипептида ГДГ β -субъединиц приводит к смещению равновесия в сторону образования глутамата, который, вероятно, в дальнейшем может идти на ГАМК-шунт. Это предположение подтверждает тот факт, что при гипоксии транскрипция гена *GDH2*, который несет в себе информацию об α -субъединице, практически полностью инактивируется, что согласуется с данными, полученными в исследовании функционирования 2ОГДК.

Показано, что при понижении концентрации кислорода в среде в листьях кукурузы происходят существенные изменения в метильном статусе CpG-динуклеотидов, входящих в состав промоторов генов субъединиц глутаматдегидрогеназы. Деметилирование CpG-динуклеотидов промотора гена *GDH1* приводило к росту его транскрипционной активности, в то же время, в увеличение доли цитозинон, связанных с CH₃-группой, приводило к инактивации гена *GDH2*. Характер распределения динамики относительного уровня транскриптов генов, кодирующих α и β -субъединицы глутаматдегидрогеназы указывает на эпигенетический характер регуляции функционирования данного энзима в гипоксических условиях, что лишь очередной раз подтверждает ключевую роль данного фермента в процессах адаптации клеточного метаболизма к изменяющимся условиям среды

3.3. Влияние гипоксии на функционирование ССАДГ

В виду того, что активность ГДГ по реакции аминирования увеличивается в гипоксических условиях, а также, как уже было сказано,

потому, что в условиях действия некоторых стрессоров активируется ГАМК-шунт, нами представляется необходимым исследовать транскрипционную активность генов одного из участников ГАМК-шунта - ССАДГ, который располагается на важном этапе этого стрессового пути[144].

3.3.1. Влияние гипоксии на экспрессию генов ССАДГ

Гипоксический стресс вызывает увеличение транскрипционной активности гена *SSADH1* уже на первый час эксперимента более чем в 3 раза (Рис.49). Полученные результаты не только подтверждают активацию ГАМК-шунта в листьях кукурузы в ответ на снижение концентрации кислорода в составе газовой среды, но также и указывает на то, что при гипоксии запускается обходной путь ЦТК, что в первые часы обеспечивает дополнительный приток энергии, за счёт осуществляя поставки сукцината для СДГ.

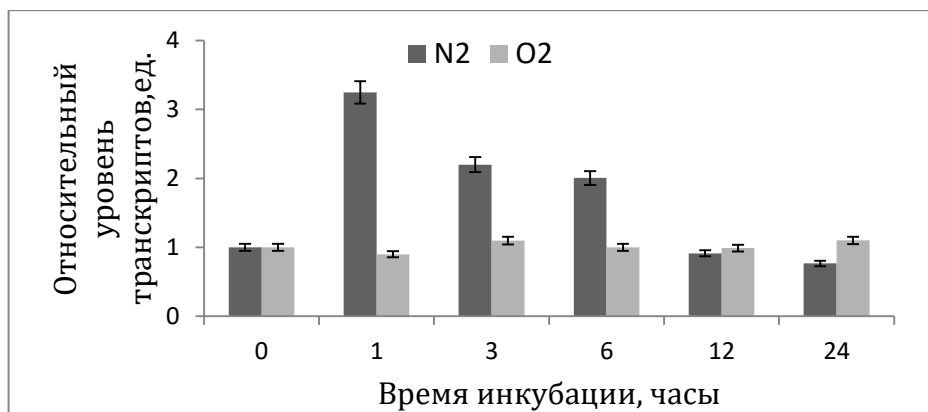


Рис. 49 Изменения относительного уровня транскриптов гена *SSADH1* в листьях кукурузы в гипоксических условиях. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Начиная с 3 часа инкубации относительный уровень транскриптов исследуемого гена постепенно снижается, достигая уровня незначительно превышающего контрольные значения. К 24 часу экспрессионная активность гена *SSADH1* снижается до значений, характерных для контрольной группы растений, у которых соответствующие показатели оставались на постоянном уровне на протяжении всего времени

гипоксического воздействия. Инкубация растений в среде, с низким содержанием кислорода приводило к постепенной инаktivации гена *SSADH2* (Рис. 50). К концу эксперимента относительный уровень транскриптов исследуемого гена снизился в 5.5 раз. Таким образом, установлено, что в условиях гипоксического стресса активизируется ГАМК-шунт, что подтверждают полученные данные по динамике транскрипционной активности гена *SSADH1*, относительный уровень транскриптов которого в условиях действия низких концентраций кислорода увеличивается в первые часы воздействия.

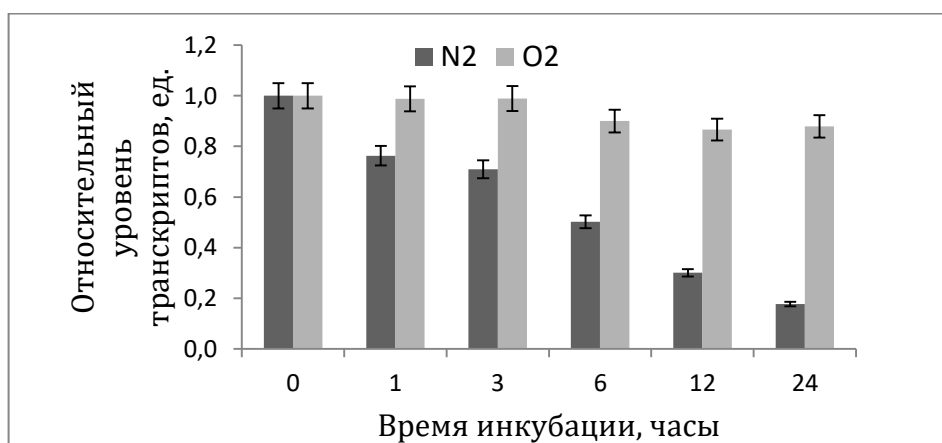


Рис.50 Динамика относительного уровня транскриптов гена *SSADH2* в проростках кукурузы при действии гипоксии. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

ССА в митохондриальном матриксе превращается либо в сукцинат под действием ССАДГ который поступает в ЦТК, либо же в γ -гидроксимасляную кислоту (ГМК) с помощью фермента гидроксibuтиратдегидрогеназы (ГБДГ, КФ 1.1.1.61)[41]. Следовательно, дальнейшее снижение экспрессионной активности гена обусловлено, вероятно, инаktivацией СДГ и активацией ГБДГ (ГБДГ, КФ 1.1.1.61), которая превращает ССА в ГМК, что в некоторой степени согласуется с данными, согласно которым у некоторых растений при гипоксии наблюдается накопление сукцината в клетке [95].

3.4. Влияние гипоксии на функционирование ОД

3.4.1. Влияние гипоксии на активность ОД

Исследовано влияние гипоксии на функционирование ОД. Установлено, что низкие концентрации кислорода вызывают первичное ингибирование ферментативной активности, которое на третий час нахождения в условиях дефицита кислорода сменяется активацией (Рис.51). Отмечено, что максимум общей ферментативной активности ОД в листьях кукурузы отмечался на 6 час инкубации и превышает контрольные значения более чем в 6.5 раз.

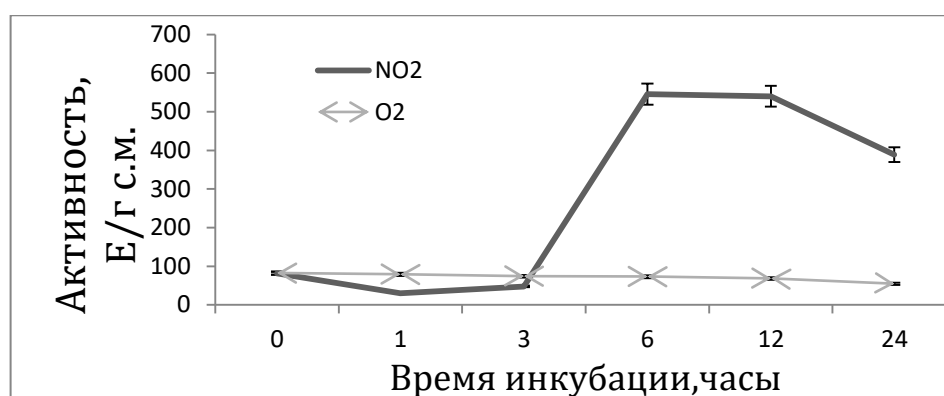


Рис.51 Изменения общей ферментативной активности ОД в гипоксических условиях в листьях кукурузы. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

3.4.2. Влияние гипоксии на экспрессию генов ОД

Исследование экспрессионной активности генов *DHAD1* и *DHAD2*, кодирующих ОД при действии гипоксии показало, что снижение концентрации кислорода в газовой среде стимулирует увеличение активности обоих генов в листьях кукурузы.

Установлено, что экспрессия гена *DHAD1* в первые часы инкубации растений в гипоксической среде практически не вызывает изменений транскрипционной активности гена, однако к шестому часу эксперимента относительный уровень транскриптов выше контроля в 2.2 раза, а к 12 часу достигает максимума, превышая первоначальное значение (точка «ноль») почти в 10 раз (Рис. 52).

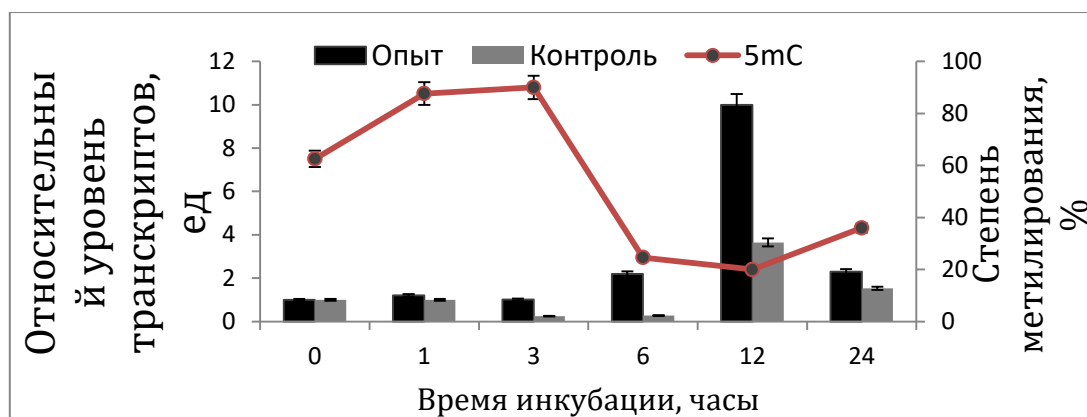


Рис.52 Изменения относительного уровня транскриптов гена *DHAD1* кукурузы в условиях дефицита кислорода. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

К 24 часу эксперимента концентрация мРНК снизилась, однако всё равно была выше значений, зарегистрированных в контрольной группе растений, где соответствующие показатели оставались на постоянном уровне. На рис. 53 видно, что гипоксия также стимулирует работу гена *DHAD2*, однако, увеличение относительного уровня транскриптов не так велико (максимум на 1 час инкубации, увеличении более чем в 2 раза).

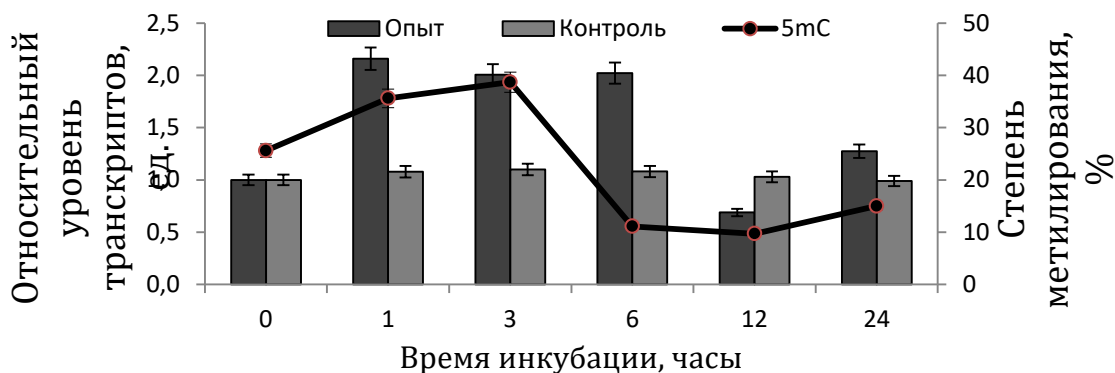


Рис.53 Динамика относительного уровня транскриптов гена *DHAD2* кукурузы в условиях действия гипоксии. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

На 12 час эксперимента в опытной группе наблюдался спад концентрации мРНК исследуемого гена. Изменения относительного уровня транскриптов гена *DHAD2* в контрольной группе растений оставались на постоянном уровне.

Таким образом, мы можем говорить о том, что ведущую роль в регуляции работы ОД в гипоксических условиях в листьях кукурузы берет на себя ген *DHAD1*, что указывает на то, что вероятно данный ген кодирует изофермент ОД, обеспечивающий синтез 2ОГ. Результаты проведенного бисульфитного секвенирования показали, что гипоксия вызывает изменения в метильном статусе промоторов генов *DHAD1* и *DHAD2*. Сравнительный анализ динамики относительного уровня транскриптов гена *DHAD1* показал, что увеличение количества мРНК на 12 час инкубации сопровождалось снижением степени метилирования промотора с 90% до 20% (рис.52). Дальнейшее снижение транскрипционной активности гена соответствовало увеличению доли метилированных цитозинов в составе промотора до 36%.

Трансформация метильного статуса гена *DHAD2* в условиях дефицита кислорода наблюдалась на протяжении 24 часов (Рис. 53). У растений, отобранных перед началом эксперимента, степень метилирования промотора гена *DHAD2* составляла 25.6%, увеличившись сначала до 35.6%, а затем и до 38.7% на 3 час инкубации растений в среде с низким содержанием кислорода. В дальнейшем, к 12 часу эксперимента, количество метилированных цитозинов снизилось до 9.7%. Однако, стоит отметить, что в изменениях в степени метилирования промотора гена *DHAD2* не наблюдалось значимых корреляций с динамикой относительного уровня транскриптов данного гена.

Таким образом, показано, что регуляция активности гена *DHAD1* в условиях гипоксии осуществляется на эпигенетическом уровне и обусловлена изменением степени метилирования CG-динуклеотидов в составе его промотора, в то время как изменения в метильном статусе промотора гена *DHAD2* носят случайный характер, не связанный с регуляцией транскрипции данного гена при гипоксии.

3.5. Изменения метаболизма 2ОГ в условиях дефицита кислорода

На основе полученных данных была разработана гипотетическая схема регуляции метаболизма 2ОГ в гипоксических условиях из которой видно, что при гипоксии происходит ингибирование реакции окисления 2ОГ, связанное с инактивацией 2-ОГДГ в листьях кукурузы, что обусловлено состоянием генетического аппарата клетки (Приложение, рис. 19). Снижение содержания транскриптов генов *OGDH1* и *OGDH3* сопряжено с увеличением доли метилированных CG-динуклеотидов в составе их промоторов. Вероятно, снижение концентрации кислорода в среде, приводящее к увеличению уровня АФК и снижению концентрации АТФ в клетке, за счет того, что ЭТЦ растительной клетки практически перестает функционировать, запускает механизм гипоксического ответа, который обеспечивает ингибирование 2ОГДК в условиях дефицита кислорода. 2ОГ, не способный метаболизироваться до сукцинил –CoA в данных условиях, направляется по обходному пути - показано, что уже начиная с первого часа эксперимента активность ГДГ существенно увеличивается. 2ОГ превращается в глутамат за счёт транскрипции гена *GDH1*, в то время как ген *GDH2* инактивируется, «перекрывая» поток 2ОГ в сторону ЦТК. Образующийся глутамат поступает, вероятно, на ГАМК-шунт в виде ГАМК, что подтверждается активацией гена *ssdh-1*[144]. При гипоксии ОД вероятно принимает участие в интенсификации вспомогательных путей метаболизма органических кислот в условиях, когда ЦТК ингибирован. Повышение активности ОД в этих условиях в основном связано с экспрессией гена *DHAD1*, которая обеспечивается снижением метилирования его промотора. Увеличение *DHAD2*, наблюдаемое только в первые часы и не связанное с деметилированием, повышение активности ОД, может дополнительно подтвердить предположение, о том, что этот ген не участвует в метаболизме гидроксидрата и связан с образованием аминокислот с разветвленными

боковыми цепями. По-видимому, ОД является ферментом, который играет существенную роль в адаптации растений к изменяющимся условиям среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование по влиянию различных стрессовых факторов на ферментативную регуляцию метаболизма 2-оксоглутарата позволило установить функционально-значимую роль 2ОГДК, ГДГ и ОД в перестройке клеточного метаболизма растений к изменяющимся условиям окружающей среды.

Солевой стресс у кукурузы сопровождается кратковременным увеличением интенсивности функционирования ЦТК[187]. Изменения функционирования 2ОГДК, ГДГ и ОД при засолении регулируются путем интенсификации экспрессии их генов. Показано, что в условиях солевого стресса в регуляции процесса окисления 2ОГ до сукцинил-СоА принимают участие все три компонента 2ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназа, дигидролипоамидсукцинилтрансфераза и дигидролипоамиддегидрогеназа. При этом изменение доли метилированных цитозинов в составе промоторов генов *OGDH1* и *OGDH3* 2-оксоглутаратдегидрогеназы обеспечивает контроль их экспрессии и, как следствие, протекания всей реакции. Снижающаяся после длительного солевого воздействия активность 2ОГДК компенсируется, вероятно, включением обходного пути (ГАМК-шунта), в котором функционирует глутаматдегидрогеназа. Основная роль энзима заключается в поддержке функционирования ЦТК поставкой 2ОГ [175; 73]. Было показано, что в первые 6 часов эксперимента экспрессируется ген *GDH2*, обеспечивающий синтез 2-оксоглутаровой кислоты. Начиная с шестого часа инкубации растений в растворе NaCl, активируется *GDH1*, что меняет направление реакции в сторону образования глутамата, идущего на синтез пролина (концентрация которого, как показано, увеличивается), а

также на образование ГАМК, служащей субстратом для ГАМК-шунта [37, 161, 45]. Данное предположение подтверждается полученными результатами увеличения транскрипционной активности гена *SSADH1* ССАДГ в ответ на действие солевого стресса. Оксицитратдегидратаза, локализованная в хлоропластах, краткосрочно активируется при засолении, что связано с изменением экспрессии её генов. Стоит отметить, что модуляции экспрессии *DHAD2* показывают обратную зависимость от метильного статуса промотора, указывая на то, что функционирование данного изофермента регулируется процессами метилирования/деметиления. На основе полученных данных разработана гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при действии солевого стресса (Рис. 54).

Получение гомогенных и высокоочищенных препаратов ГДГ позволило исследовать физико-химические и кинетические свойства, которые показали значительные различия у изоферментов.

Процесс окисления 2-оксоглутарата до сукцинил-СоА под действием 2ОГДК протекает интенсивней в темноте и ингибируется на свету, что связано с высоким уровнем АТФ, образующегося в ходе фотосинтеза. Известно, что высокие концентрации этого энергетического эквивалента ингибируют 2ОГДК и глутаматдегидрогеназы по реакции дезаминирования глутамата по принципу обратной связи [56, 61]. Установленный нами механизм трансдукции светового сигнала обусловлен участием фитохромной и криптохромной систем. Использование мутантных линий *A. thaliana* позволило выявить участие фитохрома А в регуляции транскрипции генов *OGDH1* и *OGDH2*. На свету 2ОГ в листьях выступает субстратом для глутаматдегидрогеназы и идёт на синтез глутамата [73, 74, 104]. Высокие значения общей ферментативной активности ГДГ, наблюдаемые в темноте и при облучении дальним красным светом, обеспечивают образование глутамата для аминокислотного синтеза, что подтверждается увеличением экспрессии гена *GDH1*. Исследование влияния светового спектра на

функционирование оксидатдегидратазы показывает, что изофермент, катализирующий реакцию превращения оксидрата в 2-оксоглутарат, более активен в темноте. Среди генов семейства *DHAD*, только ген *DHAD1* обнаруживает тот же паттерн световой регуляции, что и оксидрат-зависимая активность. Показано, что ген *DHAD2* индуцируется на свету и не вносит существенного вклада в реакцию с оксидратом, судя по всему, участвуя в метаболизме аминокислот.

В гипоксических условиях в листьях кукурузы происходит ингибирование реакции окисления 2-оксоглутарата, связанное с инактивацией 2-оксоглутаратдегидрогеназы, что обусловлено увеличением степени метилирования промоторов генов *OGDH1* и *OGDH3* и, следовательно, прекращением экспрессии генов. Показанная индукция глутаматдегидрогеназы обеспечивается за счёт увеличения транскриптов *GDH1*, в то время как *GDH2* инактивируется, вызывая снижение потока 2-оксоглутарата для поддержания ЦТК. Образующийся глутамат поступает на ГАМК-шунт, что подтверждается активацией гена *SSADH1* сукцинат-семиальдегид-дегидрогеназой [36]. При гипоксии оксидратдегидратаза, вероятно, принимает участие в интенсификации вспомогательных путей метаболизма органических кислот и аминокислот. Регуляция функционирования изофермента, кодируемого геном *DHAD1*, осуществляется при помощи изменения степени метилирования CpG-динуклеотидов промотора.

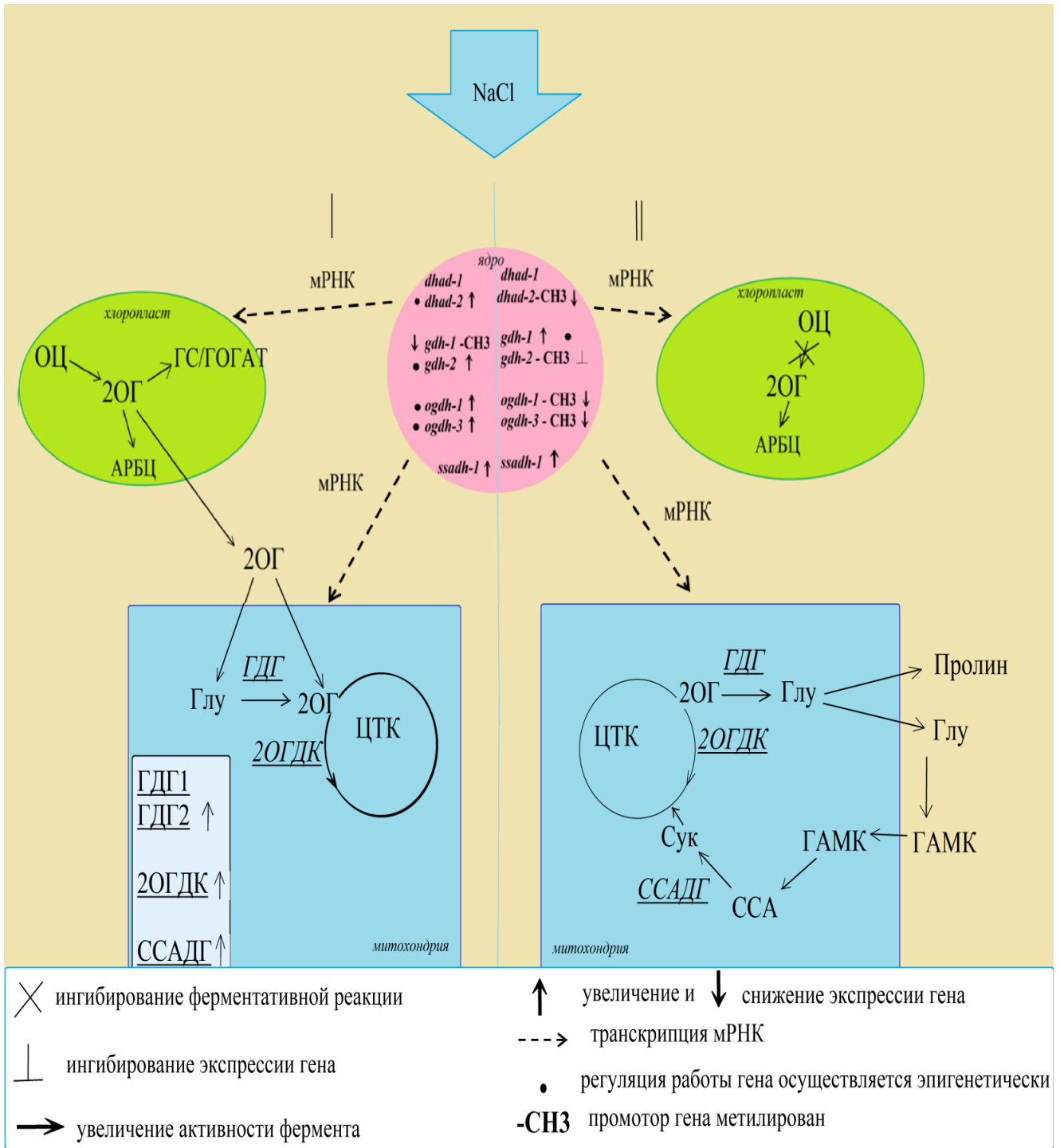


Рис.54 Гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при действии солевого стресса. I- кратковременное воздействие NaCl (до 6 часов), II – долговременное воздействие (более 6 часов). Стрелками показано направление реакции. Сук- сукцинат, 2ОГ- 2-оксоглутарат, Глу-глутамат, ССА-сукциниловый семиальдегид, ОЦ-оксицитрат, ГС/ГОГАТ – глутамин-синтетазный путь. АРБЦ – аминокислоты с разветвленными боковыми цепями. Ферменты представлены в виде подчеркнутого буквенного обозначения.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что глутаматдегидрогеназа локализована преимущественно в митохондриях (86.5%) и цитозоле (9.5%). Обнаруженная ГДГ-активность в хлоропластах (3.9%) обусловлена перекрестным загрязнением фракции. Из листьев кукурузы были получены 3 высокоочищенных изофермента ГДГ (удельная активность 195, 166 и 122.2 Е/мг белка, соответственно), а из проростков пшеницы удалось выделить один электрофоретически гомогенный препарат ГДГ с удельной активностью 377 Е/мг белка. Физико-химические и каталитические свойства выделенных изоформ различаются.
2. Показано, что оксидитратдегидратаза декарбоксилирующая имеет хлоропластную локализацию. Сравнительный анализ ферментативной активности и экспрессии генов ОД позволил предположить наличие двух изоферментов – ОД1 и ОД2, кодируемых генами *DHAD1* и *DHAD2*, соответственно.
3. Процесс окисления 2-оксоглутарата до сукцинил-СоА в первые 6 часов инкубации растений в солевом растворе активируется путем интенсификации функционирования 2ОГДК в листьях кукурузы за счёт изменения экспрессии генов *OGDH1*, *OGDH3*, *DLST1*, *DLST2*, *DLD1*, *DLD2*.
4. Активация ГДГ-активности при инкубации растений в растворе NaCl сопряжена с появлением дополнительной изоформы с $R_f = 0.13$. В первые часы солевого воздействия транскрибируется ген *GDH2* (синтез α - субъединицы), обеспечивающий образования 2-оксоглутарата. После шестичасовой инкубации транскрипция гена *GDH2* снижается, и активно экспрессируется ген *GDH1*, что приводит к смещению равновесия в сторону реакции аминирования 2ОГ до глутамата.
5. Оксидитратдегидратаза декарбоксилирующая активируется при солевом воздействии, а также в условиях дефицита кислорода за счёт увеличения экспрессии ее генов. Обнаружена корреляция активности ОД с изменением относительного уровня транскриптов ее генов. Регуляция активности ОД по

реакции образования 2-оксоглутарата в условиях действия света различного спектрального состава осуществляется посредством транскрипции гена *DHAD1*.

6. Активность 2ОГДК в растениях *in vivo* ингибируется в условиях, когда в газовой среде содержится низкая концентрация кислорода, что обусловлено репрессией генов *OGDH1* и *OGDH3*. В то же время, дефицит кислорода вызывает активацию ГДГ. Гипоксический стресс способствует перенаправлению потока 2ОГ на образование глутамата с помощью изофермента, образующегося путем экспрессии гена *GDH1*.
7. Показано, что активность 2-ОГДК и ГДГ на свету снижается за счёт изменения экспрессии кодирующих их генов *OGDH1*, *OGDH3* и *GDH1*, *GDH2*. Выявлено разнонаправленное действие света на транскрипцию генов ОД. Установлено, что трансдукция светового сигнала осуществляется с помощью фитохрома А и системы криптохромов.
8. Предложен эпигенетический механизм регуляции функционирования активности 2ОГДГ, ГДГ и ОД в листьях кукурузы в стрессовых условиях. Регуляция активности 2ОГДГ и ГДГ при действии засоления и гипоксии осуществляется за счёт изменения степени метилирования CpG - динуклеотидов в составе промоторов их генов. Показано, что эпигенетический механизм характерен для регуляции работы гена *DHAD1* в листьях кукурузы в стрессовых условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гарник Е. Ю. и др. Экспрессия гена глутаматдегидрогеназы *GDH2* арабидопсиса индуцируется под влиянием ингибитора синтеза тетрапирролов норфлуразона // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. – 2013. – Т. 9. – №. 4.
2. Генкель П. А. Физиология жаро-и засухоустойчивости растений. – Наука, 1982.
3. Детерман Г. Гель-хроматография. / Г. Детерман. — М.: Мир. — 1970. — 252 с
4. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: -Пер с англ. -М.: Мир, 1982. Т.1 - 392 с
5. Епринцев А. Т. Идентификация и исследование экспрессии генов / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов, Д. Н. Федорин. - Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2008. – 63 с.
6. Землянухин А. А., Землянухин Л. А. Метаболизм органических кислот растений //Воронеж: изд во Воро неж. ун та. – 1995. – Т. 152.
7. Келешян С. К. и др. Влияние активности глутаматдегидрогеназы на синтез L-пролина //Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – №. 5. – С. 470-476.
8. Кирнос М. Д., Александровская Н. И., Ванюшин Б. Ф. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования //Биохимия. – 1981. – Т. 46. – №. 12. – С. 1458-1474.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – Москва: Высш. шк., 1990. – 351с.
10. Лукьянова Л. Д. и др. Действие интервальной нормобарической гипоксии на кинетические свойства митохондриальных ферментов

- //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144. – №. 12. – С. 644-652.
11. Лукьянова Л. Д., Кирова Ю. И., Сукоян Г. В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции //Патогенез. – 2011. – Т. 9. – №. 3. – С. 4-14.
12. Маурер Г. Диск-электрофорез: Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле: Пер. с нем. – Мир, 1971.
13. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. – 288 с.
14. Прусакова Л. Д., Юсуфов А. Г., Алехина НД, Балнокин ЮВ Гавриленко ВФ, Жигалова ТВ, Мейчик НР, Носов АМ, Полесская ОГ, Харитонашвили ЕВ, Чуб ВВ Физиология растений/Под. ред. Ермакова ИП, М.: " Академа", 2005 //Агрехимия. – 2006. – №. 3. – С. 89-91.
15. Рябушкина Н. А., Омашева М. Е., Галиакпаров Н. Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов //Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – №. 2. – С. 9-26.
16. Солдатенков С. В., Щипарёв С. М. О превращениях оксалимонной кислоты в растениях //Вестн. Ле-нингр. ун-та. – 1970. – №. 9. – С. 155-159.
17. Сцик-Миранда К. и др. Механизмы трансляционного контроля, действующие в растениях кукурузы при недостатке кислорода //Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – №. 6. – С. 865-878.
18. Титов А.Ф. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур / Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. // М.: Наука. – 2006. – С. 143
19. Феденко Е. П., Касумов К. К., Лапко В. Н. Система цАМФ как посредник фитохрома при действии света //Физиология и биохимия культурных растений. – 1995. – Т. 27. – №. 1-2. – С. 3.

- 20.Флоренская Т.Г.; Космачевская О.В.; Топунов А.Ф.: Молекулярные формы глутаматдегидрогеназы корней сои. / Науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва Крыма. Симферополь. – 2017– №4(12). - С. 18-30
- 21.Щипарёв С. М., Солдатенков С. В. Изучение образования и превращения оксалимонной кислоты в листьях кенафа // Физиология растений. – 1972. – Т. 19. – №. 6. - С. 1261–1265
- 22.Акçай N. et al. Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants //Journal of Plant Physiology. – 2012. – V. 169. – №. 5. – P. 452-458.
- 23.Almaas E. et al. Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli* //Nature. – 2004. – V. 427. – №. 6977. – P. 839-843.
- 24.Amsterdam A. et al. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101. – №. 35. – P. 12792-12797.
- 25.Anderson B. M. et al. Purification and characterization of *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase //Archives of biochemistry and biophysics. – 1993. – V. 300. – №. 1. – P. 483-488.
- 26.Andi B. et al. Structure of the dihydrolipoamide succinyltransferase catalytic domain from *Escherichia coli* in a novel crystal form: a tale of a common protein crystallization contaminant //Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications. – 2019. – V. 75. – №. 9. – P. 616-624.
- 27.António C. et al. Regulation of primary metabolism in response to low oxygen availability as revealed by carbon and nitrogen isotope redistribution //Plant physiology. – 2016. – V. 170. – №. 1. – P. 43-56.
- 28.Araújo W. L. et al. 2-Oxoglutarate: linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis //Frontiers in plant science. – 2014. – V. 5. – P. 552.
- 29.Araujo W. L. et al. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues //Plant, cell & environment. – 2012. – V. 35. – №. 1. – P. 1-21.

30. Araujo W. L. et al. Phosphonate analogs of 2-oxoglutarate perturb metabolism and gene expression in illuminated Arabidopsis leaves //Frontiers in plant science. – 2012. – V. 3. – P. 114.
31. Araujo W. L. Inhibition of 2-oxoglutarate dehydrogenase in potato tuber suggests the enzyme is limiting for respiration and confirms its importance in nitrogen assimilation, / W. L. Araujo [et al.] // Plant Physiology. — 2008. — Vol. 148. — №. 4. — P. 1782–1796.
32. Ashapkin V. V., Kutueva L. I., Vanyushin B. F. Aging as an epigenetic phenomenon //Current genomics. – 2017. – V. 18. – №. 5. – P. 385-407.
33. Baker P. J. et al. Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase //Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 1992. – V. 12. – №. 1. – P. 75-86.
34. Binder S. Branched-chain amino acid metabolism in Arabidopsis thaliana //The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists. – 2010. – V.8.
35. Blokhina O. B., Törönen P., Fagerstedt K. V. Oxidative stress components explored in anoxic and hypoxic global gene expression data //Low-oxygen stress in plants. – Springer, Vienna, 2014. – P. 19-39.
36. Bouché N. et al. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 11. – P. 6843-6848.
37. Bouche N., Fromm H. GABA in plants: just a metabolite? //Trends in plant science. – 2004. – V. 9. – №. 3. – P. 110-115.
38. Bourrellier A. B. F. et al. Metabolite regulation of the interaction between Arabidopsis thaliana PII and N-acetyl-l-glutamate kinase //Biochemical and biophysical research communications. – 2009. – V.387. – №4. – P. 700-704
39. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //Analytical biochemistry. – 1976. – V. 72. – №. 1-2. – P. 248-254.

40. Brautigam C. A. Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD⁺/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations/ C. A. Brautigam [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – V. 350. – №3 – p. 543–552
41. Breikreuz K. E. et al. A novel γ -hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – №. 42. – P. 41552-41556.
42. Bunik V. I. et al. Enzyme-catalyzed side reactions with molecular oxygen may contribute to cell signaling and neurodegenerative diseases // *Neurochemical research*. – 2007. – V. 32. – №. 4. – P. 871-891.
43. Bunik V. I., Fernie A. R. Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation // *Biochemical Journal*. – 2009. – V. 422. – №. 3. – P. 405-421..
44. Cammaerts D., Jacobs M. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of Arabidopsis thaliana// *Planta*. –1985. –V.163 – P. 517-526
45. Carillo P. GABA shunt in durum wheat // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – V. 9. – P. 100.
46. Chandel N.S., Schumacker P.T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight / N.S. Chandel, P.T. Schumacker // *J. Appl. Physiol.* - 2000. – V. 88. – N 5. – P. 1880–1889.
47. Chen H. et al. Studying the signaling role of 2-oxoglutaric acid using analogs that mimic the ketone and ketal forms of 2-oxoglutaric acid // *Chemistry & biology*. – 2006. – V. 13. – №. 8. – P. 849-856.
48. Chen Y. M. et al. The PII signal transduction protein of Arabidopsis thaliana forms an arginine-regulated complex with plastid N-acetyl glutamate kinase // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – №. 9. – P. 5726-5733

49. Che-Othman M. H. et al. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress // *New Phytologist*. – 2020. – V. 225. – №. 3. – P. 1166-1180.
50. Chomczynski P., Sacchi N. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* – 1987. – V. 162. – P. 156–159
51. Chu T. N. et al. Plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* PS01 induces salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *BMC research notes*. – 2019. – V. 12. – №. 1. – P. 1-7.
52. Commichau F. M., Forchhammer K., Stülke J. Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism // *Current opinion in microbiology*. – 2006. – V. 9. – №. 2. – P. 167-172.
53. Condori Apfata J. A. et al. Physiological and metabolic analysis of *Arabidopsis thaliana* with low expression of 2-oxoglutarate dehydrogenase subunits. – 2016.
54. Condori-Apfata J. A. et al. The *Arabidopsis* E 1 subunit of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex modulates plant growth and seed production // *Plant molecular biology*. – 2019. – V. 101. – №. 1. – P. 183-202.
55. Consalvi V. et al. NAD-dependent glutamate dehydrogenase from the thermophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius* // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1994. – V. 109. – №. 4. – P. 691-699.
56. Craig D. W., Wedding R. T. Regulation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase lipoate succinyltransferase complex from cauliflower by nucleotide. Steady state kinetic studies // *Journal of Biological Chemistry*. – 1980. – V. 255. – №. 12. – P. 5763-5768.
57. Creux N., Harmer S. Circadian rhythms in plants // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2019. – V. 11. – №. 9. – P. a034611.

58. Daniel J., Danchin A. 2-Ketoglutarate as a possible regulatory metabolite involved in cyclic AMP-dependent catabolite repression in *Escherichia coli* K12 // *Biochimie.* – 1986. – V. 68. – №. 2. – P. 303-310.
59. Devin A., Rigoulet M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells/ A. Devin, M. Rigoulet // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* - 2007. – V. 292 – №1. – P. 52–58.
60. Dry I. B., Wiskich J. T. 2-Oxoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase activities in plant mitochondria: interaction via a common coenzyme A pool // *Archives of biochemistry and biophysics.* – 1987. – V. 257. – №. 1. – P. 92-99.
61. Dubois F. et al. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2003. – V. 41. – №. 6-7. – P. 565-576.
62. Du C. Q. et al. Overexpression of an NADP (H)-dependent glutamate dehydrogenase gene, TrGDH, from *Trichurus* improves nitrogen assimilation, growth status and grain weight per plant in rice // *Breeding science.* – 2019. – P. 19014.
63. Edwards J. W., Coruzzi G. M. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase // *The Plant Cell.* – 1989. – V. 1. – №. 2. – P. 241-248.
64. El Moukhtari A. et al. How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? // *Frontiers in plant science.* – 2020. – V. 11. – P. 1127.
65. Engel P. C. Glutamate dehydrogenases: the why and how of coenzyme specificity // *Neurochemical research.* – 2014. – V. 39. – №. 3. – P. 426-432.
66. Eprintsev A. T. et al. Expression and promoter methylation of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize under anoxic conditions // *Journal of plant physiology.* – 2017. – V. 216. – P. 197-201

67. Eprintsev A. T. et al. Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light // *Plant Science*. – 2018. – V. 272. – P. 157-163.
68. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U. Expression of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize leaves is mediated by cryptochrome // *J. Plant Physiol.* – 2018. – V. 221. – P. 81.
69. Eprintsev A. T., Fedorin D. N., Igamberdiev A. U. Ca^{2+} is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate dehydrogenase gene *sdh1-2* in *Arabidopsis* // *Journal of plant physiology*. – 2013. – V. 170. – №. 15. – P. 1349-1352.
70. Farissi M. et al. Variations in leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and membrane potential of *Medicago sativa* root cortex cells exposed to increased salinity: The role of the antioxidant potential in salt tolerance // *Archives of Biological Sciences*. – 2018. – V. 70. – №. 3. – P. 413-423.
71. Fedorin D. N., Eprintsev A. T. Regulation of aconitate hydratase activity in maize leaves with red and blue light // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. – 2017. – V. 13. – №. 3.
72. Flint D. H., Emptage M. H. Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe-2S] cluster // *Journal of Biological Chemistry*. – 1988. – V. 263. – №. 8. – P. 3558-3564.
73. Fontaine J. X. et al. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism // *The Plant Cell*. – 2012. – V. 24. – №. 10. – P. 4044-4065.
74. Fontaine J. X. et al. Further insights into the isoenzyme composition and activity of glutamate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* // *Plant signaling & behavior*. – 2013. – V. 8. – №. 3. – P. e23329.
75. Forde B. G., Lea P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling // *Journal of experimental botany*. – 2007. – V. 58. – №. 9. – P. 2339-2358.

76. Frank R. A. W. et al. Crystal structure of the E1 component of the Escherichia coli 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex //Journal of molecular biology. – 2007. – V. 368. – №. 3. – P. 639-651.
77. Franklin K. A. et al. Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis //Plant Physiology. – 2003. – V. 131. – №. 3. – P. 1340-1346.
78. Gayral M. et al. Responses to hypoxia and endoplasmic reticulum stress discriminate the development of vitreous and floury endosperms of conventional maize (Zea mays) inbred lines //Frontiers in plant science. – 2017. – V. 8. – P. 557.
79. Gilliam M., Tyerman S. D. Linking metabolism to membrane signaling: the GABA–malate connection //Trends in plant science. – 2016. – V. 21. – №. 4. – P. 295-301.
80. Grabowska A. et al. Molecular cloning and functional analysis of the second gene encoding glutamate dehydrogenase in triticale //Acta Physiologiae Plantarum. – 2017. – V. 39. – №. 1. – P. 1-11.
81. Grabsztunowicz M., Jackowski G. Isolation of intact and pure chloroplasts from leaves of Arabidopsis thaliana plants acclimated to low irradiance for studies on Rubisco regulation //Acta Societatis Botanicorum Poloniae. – 2013. – V. 82. – №. 1.
82. Grzechowiak M. et al. Structural studies of glutamate dehydrogenase (isoform 1) from Arabidopsis thaliana, an important enzyme at the branch-point between carbon and nitrogen metabolism //Frontiers in Plant Science. – 2020. – V. 11. – P. 754.
83. Hachiya T., Sakakibara H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants //Journal of Experimental Botany. – 2017. – V. 68. – №. 10. – P. 2501-2512.
84. Hare P. D., Cress W. A., Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress //Plant, cell & environment. – 1998. – V. 21. – №. 6. – P. 535-553.

85. Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages // *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. – Springer, New York, NY, 2013. – P. 25-87.
86. He W. et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors // *Nature*. – 2004. – V. 429. – №. 6988. – P. 188-193
87. Hodges M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation // *Journal of experimental botany*. – 2002. – V. 53. – №. 370. – P. 905-916.
88. Hossain M. A., Uddin S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: Morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia // *Australian journal of crop science*. – 2011. – V. 5. – №. 9. – P. 1094-1101.
89. Hsieh C. L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation // *Molecular and cellular biology*. – 1999. – V. 19. – №. 1. – P. 46-56.
90. Hudson R. C., Daniel R. M. L-glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1993. – V. 106. – №. 4. – P. 767-792.
91. Huergo L. F., Dixon R. The emergence of 2-oxoglutarate as a master regulator metabolite // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2015. – V. 79. – №. 4. – P. 419-435.
92. Huppe H. C., Turpin D. H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells // *Annual review of plant biology*. – 1994. – V. 45. – №. 1. – P. 577-607.
93. Igamberdiev A. U. et al. Phytochrome-mediated regulation of plant respiration and photorespiration // *Plant, cell & environment*. – 2014. – V. 37. – №. 2. – P. 290-299.
94. Igamberdiev A. U., Bykova N. V., Hill R. D. Nitric oxide scavenging by barley hemoglobin is facilitated by a monodehydroascorbate reductase-

- mediated ascorbate reduction of methemoglobin // *Planta*. – 2006. – V. 223. – №. 5. – P. 1033-1040.
95. Igamberdiev A. U., Hill R. D. Plant mitochondrial function during anaerobiosis // *Annals of botany*. – 2009. – V. 103. – №. 2. – P. 259-268.
96. Iqbal Z. et al. Plant defense responses to biotic stress and its interplay with fluctuating dark/light conditions // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – V. 12. – P. 297.
97. Isayenkov S. V., Maathuis F. J. M. Plant salinity stress: many unanswered questions remain // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – V. 10. – P. 80.
98. Jena B. S. et al. Chemistry and biochemistry of (–)-hydroxycitric acid from *Garcinia* // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2002. – V. 50. – №. 1. – P. 10-22.
99. Ji J. et al. Responses of GABA shunt coupled with carbon and nitrogen metabolism in poplar under NaCl and CdCl₂ stresses // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2020. – V. 193. – P. 110322.
100. Joshi V., Jander G. Arabidopsis methionine γ -lyase is regulated according to isoleucine biosynthesis needs but plays a subordinate role to threonine deaminase // *Plant physiology*. – 2009. – V. 151. – №. 1. – P. 367-378.
101. Juan E. C. M. et al. Two different lipoamide dehydrogenases (E 3 s) from *Thermus thermophilus*: crystal structures and their evolutionary relationship. *Acta Crystallographica, Section A - Acta crystallogr A*. – 2006. – V. 62. – pp. S138-S138.
102. Kami C. et al. Light-regulated plant growth and development // *Current topics in developmental biology*. – 2010. – V. 91. – P. 29-66.
103. Kholodenko B.N., Lyubarev A.E., Kurganov B.I. Control of the metabolic flux in the system with high enzyme concentrations and moiety-conserved cycles: the sum of the flux control coefficients can drop significantly below unity // *European Journal of Biochemistry*. – 1992. – V. 210. – P. 147—153.

104. Kinnersley A. M., Turano F. J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress //Critical Reviews in Plant Sciences. – 2000. – V. 19. – №. 6. – P. 479-509.
105. Klose C. et al. Molecular mechanisms for mediating light-dependent nucleo/cytoplasmic partitioning of phytochrome photoreceptors //New Phytologist. – 2015. – V. 206. – №. 3. – P. 965-971.
106. Koike M., Koike K. Structure, assembly and function of mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes //Advances in biophysics. – 1976. – P. 187-227.
107. Kujo C., Ohshima T. Enzymological characteristics of the hyperthermostable NAD-dependent glutamate dehydrogenase from the archaeon *Pyrobaculum islandicum* and effects of denaturants and organic solvents //Applied and environmental microbiology. – 1998. – V. 64. – №. 6. – P. 2152-2157.
108. Kumar R. G., Shah K., Dubey R. S. Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance //Plant Science. – 2000. – V. 156. – №. 1. – P. 23-34.
109. Labboun S. et al. Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. In vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments //Plant and cell physiology. – 2009. – V. 50. – №. 10. – P. 1761-1773.
110. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmly // Nature. — 1970. — V. 77. - №. 4. — P.680–683.
111. Lasa B. et al. Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots //Plant Physiology and Biochemistry. – 2002. – V. 40. – №. 11. – P. 969-976.
112. Lea P. J., Mifflin B. J. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants //Nature. – 1974. – V. 251. – №. 5476. – P. 614-616.
113. Lea P. J., Mifflin B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement //Annu. Plant Rev. – 2011. – V. 42. – P. 1-40.

114. Lehmann T., Ratajczak L. The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine // *J. Plant. Physiol.* – 2008. – V.165. – N.2. – P. 149 – 58.
115. LI C. R. et al. Unravelling mitochondrial retrograde regulation in the abiotic stress induction of rice ALTERNATIVE OXIDASE 1 genes // *Plant, cell & environment.* – 2013. – V. 36. – №. 4. – P. 775-788.
116. Li J. et al. Phytochrome signaling mechanisms // *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists.* – 2011. – V. 9.
117. Li W., Li Q. Effect of environmental salt stress on plants and the molecular mechanism of salt stress tolerance // *Int. J. Environ. Sci. Nat. Res.* – 2017. – V. 7. – №. 3. – P. 555714.
118. Liao Y. et al. Salicylic acid binding of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase E2 affects mitochondrial oxidative phosphorylation and electron transport chain components and plays a role in basal defense against tobacco mosaic virus in tomato // *New Phytologist.* – 2015. – V. 205. – №. 3. – P. 1296-1307.
119. Lippman E. O. Über eine neue im Rubensaff vorkommende Saure // *Ber. Deut. Chem.* – 1883. – V. 16. – №. 1078. – P. 10.1002.
120. Loulakakis K.A. The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. / Loulakakis K.A., Roubelakis-Angelakis K.A. // *Physiol Plant.* – 1996. – V. 96 – P. 29-35
121. Lowry O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of biological chemistry.* – 1951. – V. 193. – P. 265-275.
122. Lu J. et al. Characterization and modification of enzymes in the 2-ketoisovalerate biosynthesis pathway of *Ralstonia eutropha* H16 // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2015. – V. 99. – №. 2. – P. 761-774.
123. Lu Y., Yao J. Chloroplasts at the crossroad of photosynthesis, pathogen infection and plant defense // *International journal of molecular sciences.* – 2018. – V. 19. – №. 12. – P. 3900.
124. Ludewig F. et al. Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) mutants in *Arabidopsis* // *PloS one.* – 2008. – V. 3. – №. 10. – P. e3383
125. Lyubarev A.E., Kurganov B.I. Supramolecular organization of tricarboxylic acid cycle enzymes // *BioSystems.* – 1989. – V. 22. – P. 91-102.

126. Maas E. V., Hoffman G. J. Crop salt tolerance—current assessment //Journal of the irrigation and drainage division. – 1977. – V. 103. – №. 2. – P. 115-134.
127. Marchi L. et al. Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is regulated by a combined effect of nitrogen and cytokinin //Plant physiology and biochemistry. – 2013. – V. 73. – P. 368-374.
128. Marchi L. et al. Glutamate dehydrogenase isoenzyme 3 (GDH3) of *Arabidopsis thaliana* is less thermostable than GDH1 and GDH2 isoenzymes //Plant physiology and biochemistry. – 2014. – V. 83. – P. 225-231.
129. Marchi L. et al. How to easily detect plant NADH-glutamate dehydrogenase (GDH) activity? A simple and reliable in planta procedure suitable for tissues, extracts and heterologous microbial systems //Plant Science. – 2021. – V. 304. – P. 110714.
130. Matsumoto K. et al. 2-oxoglutarate downregulates expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin through decreasing hypoxia-inducible factor-1 α and inhibits angiogenesis //Journal of cellular physiology. – 2006. – V. 209. – №. 2. – P. 333-340.
131. Matz M. V. Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes //Green Fluorescent Protein. – Humana Press. – 2002. – P. 3-18.
132. McLain A. L., Szweda P. A., Szweda L. I. α -Ketoglutarate dehydrogenase: a mitochondrial redox sensor //Free radical research. – 2011. – V. 45. – №. 1. – P. 29-36.
133. Mekonnen D. W., Flügge U. I., Ludewig F. Gamma-aminobutyric acid depletion affects stomata closure and drought tolerance of *Arabidopsis thaliana* //Plant Science. – 2016. – V. 245. – P. 25-34.
134. Mifflin B. J., Lea P. J. Ammonia assimilation //Amino Acids and Derivatives. – Academic Press, 1980. – C. 169-202.
135. Millar A. H. et al. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants //Annual review of plant biology. – 2011. – V. 62. – P. 79-104.
136. Millar A.H., Hill S. A., Leaver C. J. Plant mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex: purification and characterization in potato //Biochemical Journal. – 1999. – V. 343. – №. 2. – P. 327-334
137. Miyashita Y., Good A. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced

- carbon starvation // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – V.59. – P.667 – 680
138. Mooney B. P., Miernyk J. A., Randall D. D. The complex fate of α -ketoacids // *Annual review of plant biology*. – 2002. – V. 53. – №. 1. – P. 357-375.
 139. Nagel M. et al. Glutamate dehydrogenase from *Medicago sativa* L., purification and comparative kinetic studies of the organ-specific multiple forms // *Zeitschrift für Naturforschung C*. – 1980. – V. 35. – №. 5-6. – P. 406-415.
 140. Naliwajski M. R., Skłodowska M. The relationship between carbon and nitrogen metabolism in cucumber leaves acclimated to salt stress // *PeerJ*. – 2018. – V. 6. – P. e6043.
 141. Narsai R. et al. Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia // *New Phytologist*. – 2011. – V. 190. – №. 2. – P. 472-487.
 142. Negrão S., Schmöckel S. M., Tester M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress // *Annals of botany*. – 2017. – V. 119. – №. 1. – P. 1-11.
 143. Nemeria N. S. et al. Evidence for functional and regulatory cross-talk between the tricarboxylic acid cycle 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and 2-oxoadipate dehydrogenase on the l-lysine, l-hydroxylysine and l-tryptophan degradation pathways from studies in vitro // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2018. – V. 1859. – №. 9. – P. 932-939.
 144. Nicolas B., Hillel F. GABA in plants: just a metabolite // *Trends Plant Sci*. – 2004. – V. 9. – №. 3. – P. 110-115.
 145. Noor S., Puneekar N. S. Allosteric NADP-glutamate dehydrogenase from aspergilli: purification, characterization and implications for metabolic regulation at the carbon–nitrogen interface // *Microbiology*. – 2005. – V. 151. – №. 5. – P. 1409-1419.
 146. Nunes-Nesi A. et al. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle // *Current opinion in plant biology*. – 2013. – V. 16. – №. 3. – P. 335-343.
 147. Oliveira T. et al. Crystal structure of NAD⁺-dependent *Peptoniphilus asaccharolyticus* glutamate dehydrogenase reveals determinants of cofactor specificity // *Journal of structural biology*. – 2012. – V. 177. – №. 2. – P. 543-552.

148. Oliver J. D. et al. The *Aspergillus fumigatus* dihydroxyacid dehydratase Ilv3A/IlvC is required for full virulence// *PlosOne*. – 2012. – V. 7 - №9 – P. 1-11
149. Parida A. K., Das A. B., Mitra B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora* // *Trees*. – 2004. – V. 18. – №. 2. – P. 167-174.
150. Peterson P.E. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery / P.E. Peterson, T.J. Smith // *Structure*. – 1999. – V. 7 – P. 769-782
151. Pirrung M. C., Ha H. J., Holmes C. P. Purification and inhibition of spinach. alpha.,. beta.-dihydroxyacid dehydratase // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1989. – V. 54. – №. 7. – P. 1543-1548.
152. Plaut G. W. E., Beach R. L., Aogaichi T. Substrate activity of structural analogs of isocitrate for isocitrate dehydrogenases from bovine heart // *Biochemistry*. – 1975. – V. 14. – №. 12. – P. 2581-2588.
153. Popova T. N., de Carvalho M. Â. A. P. Citrate and isocitrate in plant metabolism // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 1998. – V. 1364. – №. 3. – P. 307-325.
154. Pucciariello C. et al. Reactive oxygen species-driven transcription in *Arabidopsis* under oxygen deprivation // *Plant Physiology*. – 2012. – V. 159. – №. 1. – P. 184-196.
155. Pucciariello C., Perata P. The oxidative paradox in low oxygen stress in plants // *Antioxidants*. – 2021. – V. 10. – №. 2. – P. 332.
156. Purnell M. P., Botella J. R. Tobacco isoenzyme 1 of NAD (H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo // *Plant physiology*. – 2007. – V. 143. – №. 1. – P. 530-539.
157. Qin S. et al. Aquaporins and their function in root water transport under salt stress conditions in *Eutrema salsugineum* // *Plant Science*. – 2019. – V. 287. – P. 110199.

158. Qiu X. M. et al. Signaling role of glutamate in plants //Frontiers in plant science. – 2020. – V. 10. – P. 1743.
159. Quail P.H. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction/ P.H. Quail, M.T. Boylan, B.M. Parks // Science. – 1995. – V. 268 – №. 5211. – P. 675.
160. Ramputh A. I., Bown A. W. Rapid [γ]-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae //Plant Physiology. – 1996. – V. 111. – №. 4. – P. 1349-1352.
161. Renault H. et al. The Arabidopsis pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance //BMC plant biology. – 2010. – V. 10. – №. 1. – P. 1-16.
162. Rice J. E., Dunbar B., Lindsay J. G. Sequences directing dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) binding are located on the 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1) component of the mammalian 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex //The EMBO journal. – 1992. – V. 11. – №. 9. – P. 3229-3235.
163. Robinson, S. Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures / S. Robinson, G. Stewart, R. Phillips // Plant Physiology. – 1991. – V. 98. – P. 1190-1195.
164. Roosens N. H. et al. Proline metabolism in the wild-type and in a salt-tolerant mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* studied by¹³C-nuclear magnetic resonance imaging //Plant physiology. – 1999. – V. 121. – №. 4. – P. 1281-1290.
165. Saddhe A. A. et al. Reactive nitrogen species: paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants //Environmental and Experimental Botany. – 2019. – V. 161. – P. 86-97.
166. Saglio P., Germain V., Ricard B. The response of plants to oxygen deprivation: role of enzyme induction in the improvement of tolerance to

- anoxia //Plant responses to environmental stresses. – Routledge, 2018. – C. 373-393.
167. Sakakibara H., Fujii K., Sugiyama T. Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase //Plant and cell physiology. – 1995 – V. 36. – N. 5. – P. 789 – 797
168. Sarasqueta Gómez A. et al. Nitrogen Source and External Medium pH Interaction Differentially Affects Root and Shoot Metabolism in Arabidopsis// Front. Plant Sci.. 2016. – V. 7. – P. 1–12
169. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents //Nature. – 1936. – V. 138. – №. 3479. – P. 32-32.
170. Shchiparev S., Sazanova K., Grigoriev S. Hydroxycitrate as dominating acid in leaves of ambary (*Hibiscus cannabinus* L.) //Biological Communications. – 2013. – №. 2. – P. 41–46
171. Shevchenko A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels //Analytical chemistry. – 1996. – V. 68. – №. 5. – P. 850-858.
172. Shigeoka S. Occurrence of thiamin pyrophosphate-dependent 2-oxoglutarate decarboxylase in mitochondria of *Euglena gracilis*/ S. Shigeoka [et al.] // FEBS Lett. – 1986. – V. 195. – P. 43–47.
173. Shin D. et al. Dihydrolipoamide dehydrogenase regulates cystine deprivation-induced ferroptosis in head and neck cancer //Redox biology. – 2020. – V. 30. – P. 101418.
174. Shtereva L. A., Vassilevska-Ivanova R. D., Karceva T. V. Effect of salt stress on some sweet corn (*Zea mays* L. var. *saccharata*) genotypes //Archives of Biological Sciences. – 2015. – V. 67. – №. 3. – P. 993-1000.
175. Skopelitis D. S. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine //The Plant Cell. – 2006. – V. 18. – №. 10. – P. 2767-2781.

176. Snedden W. A. Regulation of the γ -aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium-calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress //Plant Responses to Environmental Stresses. – Routledge, 2018. – P. 549-574.
177. Stone S. R., Copeland L., Kennedy I. R. Glutamate dehydrogenase of lupin nodules: purification and properties //Phytochemistry. – 1979. – V. 18. – №. 8. – P. 1273-1278.
178. Strumilo S. Short-term regulation of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex by energy-linked and some other effectors //Biochemistry (Moscow). – 2005. – V. 70. – №. 7. – P. 726-729.
179. Sweetlove L. J. et al. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle //Trends in plant science. – 2010. – V. 15. – №. 8. – P. 462-470.
180. Thurman, D.A. Isoenzymatic nature of L-glutamic dehydrogenase of higher plants / D.A. Thurman, C. Palin, M.V. Laycock // Nature. – 1965. – V. 207. – № 4993. – P. 193–194.
181. Tripathi A., Narayanan S. Potassium doped graphitic carbon nitride with extended optical absorbance for solar light driven photocatalysis //Applied Surface Science. – 2019. – V. 479. – P. 1-11.
182. Turano F. J. et al. Characterization and expression of NAD (H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in Arabidopsis //Plant Physiology. – 1997. – V. 113. – №. 4. – P. 1329-1341.
183. Turano F. J. et al. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings //Plant Physiology. – 1996. – V. 112. – №. 3. – P. 1357-1364.
184. Uhrig R. G., Ng K. K. S., Moorhead G. B. G. PII in higher plants: a modern role for an ancient protein //Trends in plant science. – 2009. – V. 14. – №. 9. – P. 505-511.
185. Van Buskirk E. K., Decker P. V., Chen M. Photobodies in light signaling //Plant physiology. – 2012. – V. 158. – №. 1. – P. 52-60.

186. Van Dongen J. T. et al. Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways //Journal of plant physiology. – 2011. – V. 168. – №. 12. – P. 1434-1443.
187. Van Zelm E., Zhang Y., Testerink C. Salt tolerance mechanisms of plants //Annual Review of Plant Biology. – 2020. – V. 71. – P. 403-433.
188. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review //Amino acids. – 2008. – V. 35. – №. 4. – P. 753-759.
189. Voskresenskaya N. P. Blue light and carbon metabolism //Annual review of plant physiology. – 1972. – V. 23. – №. 1. – P. 219-234.
190. Voskresenskaya N. P. Effect of light quality on carbon metabolism //Photosynthesis II. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1979. – P. 174-180.
191. Wang Y. et al. KAT2A coupled with the α -KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase //Nature. – 2017. – V. 552. – №. 7684. – P. 273-277.
192. Wedding R. T., Black M. K. Nucleotide activation of cauliflower α -ketoglutarate dehydrogenase //Journal of Biological Chemistry. – 1971. – V. 246. – №. 6. – P. 1638-1643.
193. Yamaya T. et al. Synthesis of [15N] glutamate from [15N] H₄⁺ and [15N] glycine by mitochondria isolated from pea and corn shoots //Plant physiology. – 1986. – V. 81. – №. 3. – P. 754-757.
194. Yamaya T., Oaks A., Matsumoto H. Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots //Plant physiology. – 1984. – V. 76. – №. 4. – P. 1009-1013.
195. Yang N. et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming //Nature methods. – 2017. – V. 14. – №. 6. – P. 621-628.
196. Zahra N. et al. Hypoxia and Anoxia Stress: Plant responses and tolerance mechanisms //Journal of Agronomy and Crop Science. – 2021. – V. 207. – №. 2. – P. 249-284.
197. Zar J. H. Biostatistical analysis. – Pearson Education India, 1999.

198. Zhang C. et al. Dihydroxyacid dehydratase is important for gametophyte development and disruption causes increased susceptibility to salinity stress in *Arabidopsis* //Journal of experimental botany. – 2015. – V. 66. – №. 3. – P. 879-888.
199. Zhang Y. et al. New insights into physiological effects of anoxia under darkness on the iconic seagrass *Zostera marina* based on a combined analysis of transcriptomics and metabolomics //Science of The Total Environment. – 2021. – V. 768. – P. 144717.
200. Zheng J. L. et al. Exogenous proline reduces NaCl-induced damage by mediating ionic and osmotic adjustment and enhancing antioxidant defense in *Eurya emarginata* //Acta physiologiae plantarum. – 2015. – V. 37. – №. 9. – P. 1-10.
201. Zheng P. F. et al. Identification of Phytochrome-Interacting Factor Family Members and Functional Analysis of MdPIF4 in *Malus domestica* //International journal of molecular sciences. – 2020. – V. 21. – №. 19. – P. 7350.
202. Zhou J. et al. A multipronged approach unravels unprecedented protein–protein interactions in the human 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex //Journal of Biological Chemistry. – 2018. – V. 293. – №. 50. – P. 19213-19227.
203. Zhu J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants //Annual review of plant biology. – 2002. – V. 53. – №. 1. – P. 247-273

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1.

Праймеры к генам 2ОГДК, ГДГ, ОД и ССАДГ

Ген	Организм	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
<i>OGDH1</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	ATTCCAATGACCGTGACAGG	59
		Обратный	AAAAATCGGCGCATCCAATG	
<i>OGDH3</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	GAAGCCATGACTACTCTGCC	61
		Обратный	GCTCCGCATCTTGGTTCATA	
<i>DLST1</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	TCTGAGCTGAGGATAACCGAG	61
		Обратный	AGCAGCTCTATTGCTCTTGC	
<i>DLST2</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	AAAGAAAGCAACTGAGGGGG	60
		Обратный	GAAGAAGACAGCCTCTCTGC	
<i>DLD1</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	CTACCGTGAGTGAAGCCCTC	60
		Обратный	CAAGGAAGCACAAAACCCCG	
<i>DLD2</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	TCCATCCAAGGCTCTTCTGC	60
		Обратный	TGGGAGGTCCACTTCCAGAT	
<i>OGDH1</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Прямой	GCTGTGGACCGAGATGAAAC	59
		Обратный	AGAGAGCTGAAGCGGTATCC	
<i>DLST1</i>	<i>Beta vulgaris</i>	Прямой	ACTATCTGACCACCGACCAC	59
		Обратный	AGAGAGCTGAAGCGGTATCC	
<i>OGDH1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Прямой	TCTTCACAATCGGAAATAATGAAGC	60
		Обратный	CAGCACGAAACCACACCATT	
<i>OGDH2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Прямой	CGTCTAGTCCTCTGCTCTGG	60
		Обратный	ATCGGCTCTTCTTGACACCA	
<i>GDH1</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	GCGGAGAACAAGGGGATCAA	58
		Обратный	ACAGGATCTCGTCTGCCTCT	
<i>GDH2</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	TGATCCAGAGGCAGACGAGA	58
		Обратный	GTAATGCGCGGTCAATGGTC	
<i>DHAD1</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	AAGACGGAGGAAATGGACCC	60
		Обратный	TGCCACATGCAAAACCGAAC	
<i>DHAD2</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	TATGCCCTGAAGCACAGGAA	60

Ген	Организм	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
		Обратный	CCTGGCAAACAGCCTTTGAT	
<i>SSADH1</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	CACAGCCTGGGGATGTCATT	58
		Обратный	GGTGCCACCTGCGTTTGTAT	
<i>SSADH2</i>	<i>Zea mays</i>	Прямой	GTGCTTAGAAGGGCGTGAGT	58
		Обратный	CAGGTTCGAAGGTGAAGCCA	

Таблица 2.

Праймеры для метил-специфичной ПЦР к генам *OGDH1* и *OGDH3*

Ген	Положение исследуемого цитозина		Название	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига °С
	2	3			
<i>OGDH1</i>	I	-144 нукл.	прямой М	GTTTTATATTGTA AAAAATTGATCGA	52
			обратный М	AATTTTCCCATCTAATTATCTCCGT	
			прямой U	GTTTTATATTGTA AAAAATTGATTGA	52
			обратный U	AATTTTCCCATCTAATTATCTCCAT	
	II	-190 нукл.	прямой М	GTTTAGATTGGTTATGCGT	52
			обратный М	AATTTTCCCATCTAATTATCTCCGT	
			прямой U	GTTTAGATTGGTTATGTGT	52
			обратный U	AATTTTCCCATCTAATTATCTCCAT	
	III	-316 нукл.	прямой М	TTTTTTGGATGATAGTTTTGGCGT	52
			обратный М	AATTTTCCCATCTAATTATCTCCGT	
			прямой U	TTTTTTGGATGATAGTTTTGGTGT	52
			обратный U	AATTTTCCCATCTAATTATCTCCAT	
<i>OGDH3</i>	I	-197 нукл.	прямой М	TGTTATGGGAAGAAATCGC	51
			обратный М	CCCTACACAAAAACA AAAA	
			прямой U	TGTTATGGGAAGAAATTGC	51
			обратный U	CCCTGCACAAAAACA AAAA	
	II	-275 нукл.	прямой М	TTTTAGTGTTTTGTACGG	51
			обратный М	CCCTACACAAAAACA AAAA	
			прямой U	TTTTAGTGTTTTGTATGG	51
			обратный U	CCCTGCACAAAAACA AAAA	
	III	-297 нукл.	прямой М	GTGCGTAATTGTTCTGA	49
			обратный М	CCCTACACAAAAACA AAAA	
			прямой U	GTGTGTAATTGTTTGA	49
			обратный U	CCCTGCACAAAAACA AAAA	

Таблица 3.

Праймеры для метил-специфичной ПЦР к генам *GDH1* и *GDH2*

Ген	Название	Положение исследуемого цитозина		Последовательность	Температура отжига, С
<i>GDH1</i>	Прямой М	1	-779	ATTTGTAGATTTAATCGGTTGGGT	52-53
	Обратный М			AAAAАСТААААТСАСТАТТСТСГТТ	
	Прямой U			ATTTGTAGATTTAATTGGTTGGGT	
	Обратный U			AAAAАСТААААТСАСТАТТСТСАТТ	
	Прямой М	2	-419	TСGТАGТААТТТТТGТТТТGТGГ	52-53
	Обратный М			AAAAАСТААААТСАСТАТТСТСГТТ	
	Прямой U			ТТGТАGТААТТТТТGТТТТGТGГ	
	Обратный U			AAAAАСТААААТСАСТАТТСТСАТТ	
	Прямой М	3	-340	ТААGАТТGТАТАТТТТТСGГТGГТАТ	52-53
	Обратный М			AAAAАСТААААТСАСТАТТСТСГТТ	
	Прямой U			ТААGАТТGТАТАТТТТТGГТGГТАТ	
	Обратный U			AAAAАСТААААТСАСТАТТСТСАТТ	
<i>GDH2</i>	Прямой М	1	-304	AGATAAGTTAGTTATGGGATGGGC	53
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA	
	Прямой U			AGATAAGTTAGTTATGGGATGGGTG	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA	
	Прямой М	2	-263	GGTAAGTGGACGGAAAAGGA	53
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA	
	Прямой U			GGTAAGTGGATGGAAAAGGA	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA	
	Прямой М	3	-185	GGTTCGGTTTAGTTTTGAAATAAT	53
	Обратный М			TACGTCTTCTTAATAACCAAACGAA	
	Прямой U			GGTTCGGTTTAGTTTTGAAATAAT	
	Обратный U			TACATCTTCTTAATAACCAAACAAA	

Таблица 4.

Праймеры к CpG-островкам в составе промоторов генов *DHAP1* и *DHAP2*

Ген	Название	Последовательность	T отжига
<i>DDNA1</i> A	Прямой	GATAATATAAGGTTTGTTTTATTTTT	50
	Обратный	ACTAASTATAACCCCTAATTCCTAC	
<i>DDNA1</i> B	Прямой	TTTTGATATATAGGATTTTGTTGATGA AA	55
	Обратный	AAACA AAAACAATAAAA CTATAACT ATAA	
<i>DDNA2</i>	Прямой	TGGAAAATATTTAAAAGTTTAGAAA	49-50
	Обратный	ATAAATAAACAAAAAACAAAAACA	

Таблица 5.

Изменение уровня пролина (ммоль/ г с.м.) в зеленых листьях кукурузы
(n=4, p≤0.03)

	Время инкубации, часы					
	0	1	3	6	12	24
Контроль	0.60	0.70	0.75	0.60	0.50	0.50
Опыт	0.60	1.90	1.70	1.60	2.40	3.5

Таблица 6
 Субклеточная локализация 2ОГДК активности в листьях кукурузы
 (n=4, p≤0.03)

Фракция органоидов	Общая активность, Е/грамм сырой массы	% активности фермента от общего содержания
Пероксисомы	-	-
Цитоплазма	2.1	1.5
Хлоропласты	-	-
Митохондрии	137.4	98.5

Таблица 7

Активность маркерных ферментов, используемых для определения чистоты фракций (n=4, p≤0.03)

Фракция органоидов	Активность СДГ		Активность АДГ		Активность каталазы		Содержание хлорофилла	
	Е/мл	%	Е/мл	%	Е/мл	%	мг/мл	%
Цитоплазма	0.05	3.4	3.20	86.9	н/о	н/о	1.08	1.20
Хлоропласты	0.06	4.3	0.21	6.0	0.01	3.60	86.30	95.70
Митохондрии	1.36	92.3	0.22	6.0	0.02	5.70	2.79	3.10
Пероксисомы	н/о	н/о	0.04	1.1	0.25	90.70	н/о	н/о



Рис.1 Изоферментный состав 2ОГДГ в листьях кукурузы *Zea mays* L.

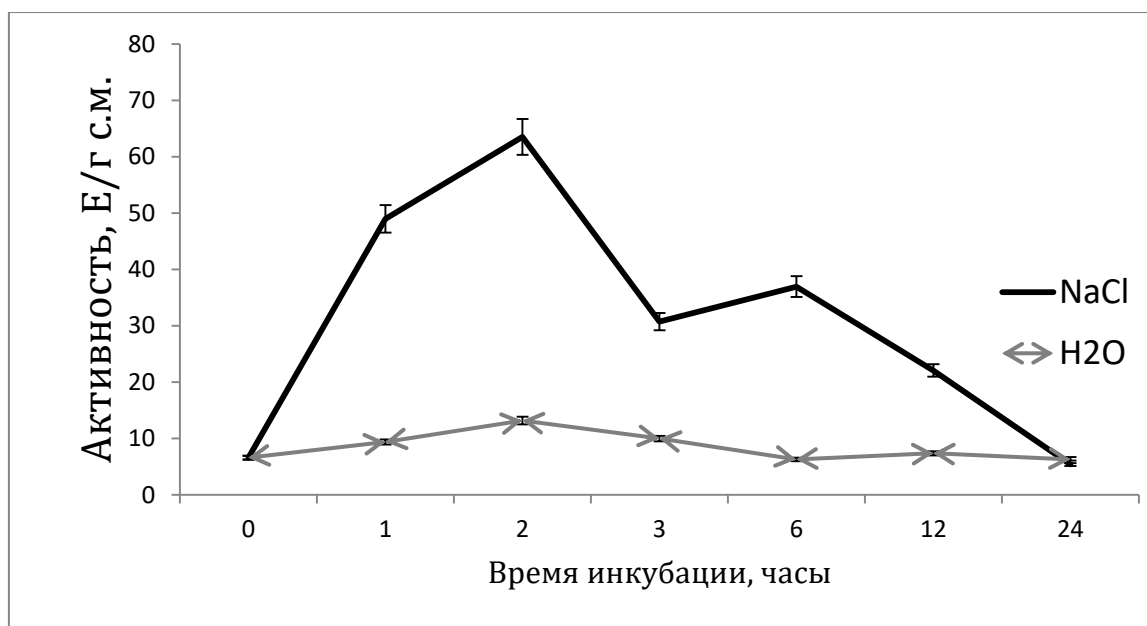


Рис.2 Общая активность 2-ОГДК в проростках сахарной свёклы при действии солевого стресса. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

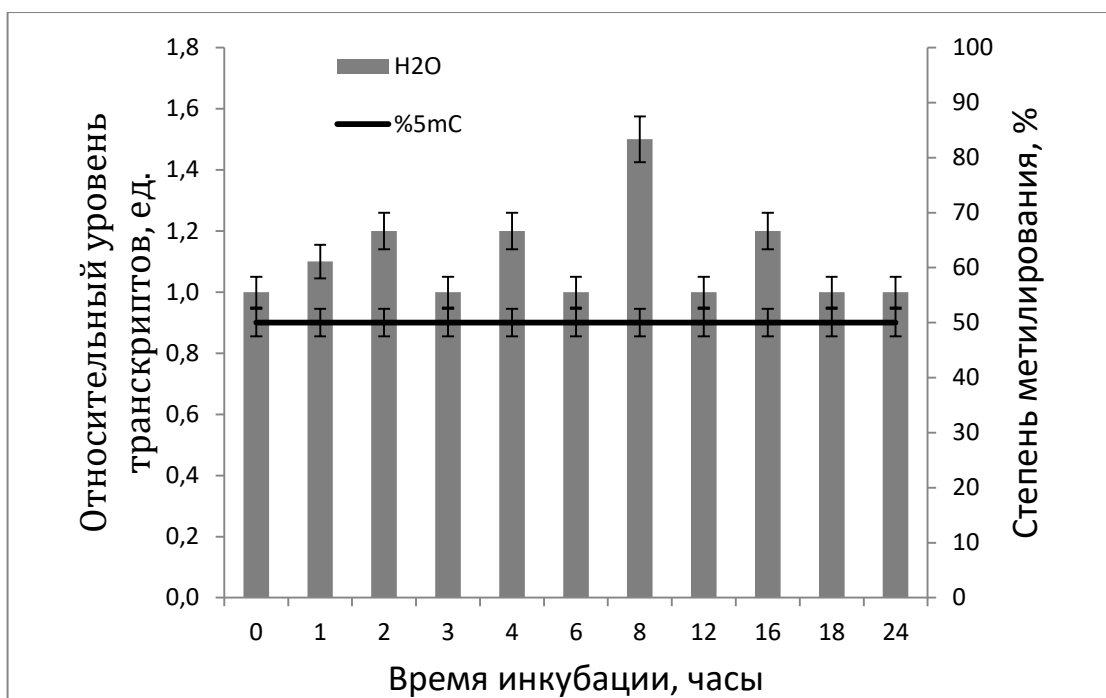


Рис. 3 Динамика метилирования (5mC) промотора гена *OGDH1* и его экспрессии в листьях кукурузы в контрольной группе.

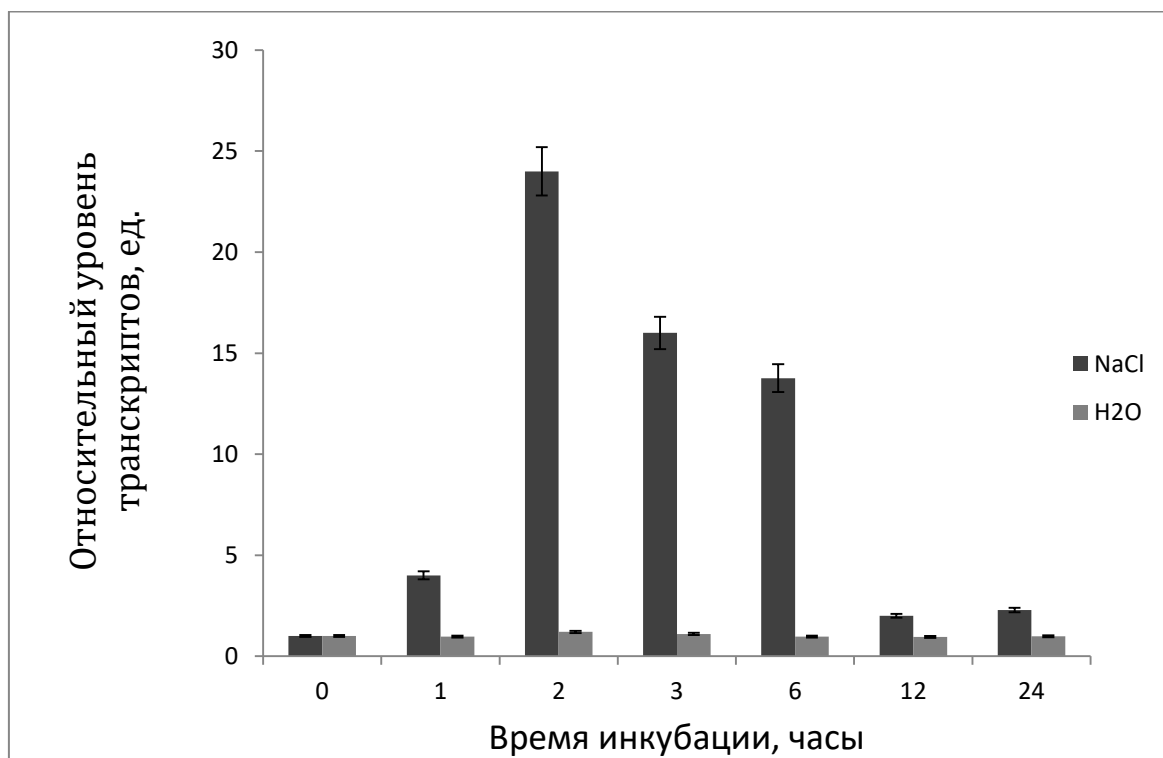


Рис. 4 Относительный уровень транскриптов гена *OGDH1 2OGDH* в проростках сахарной свёклы при действии солевого стресса. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

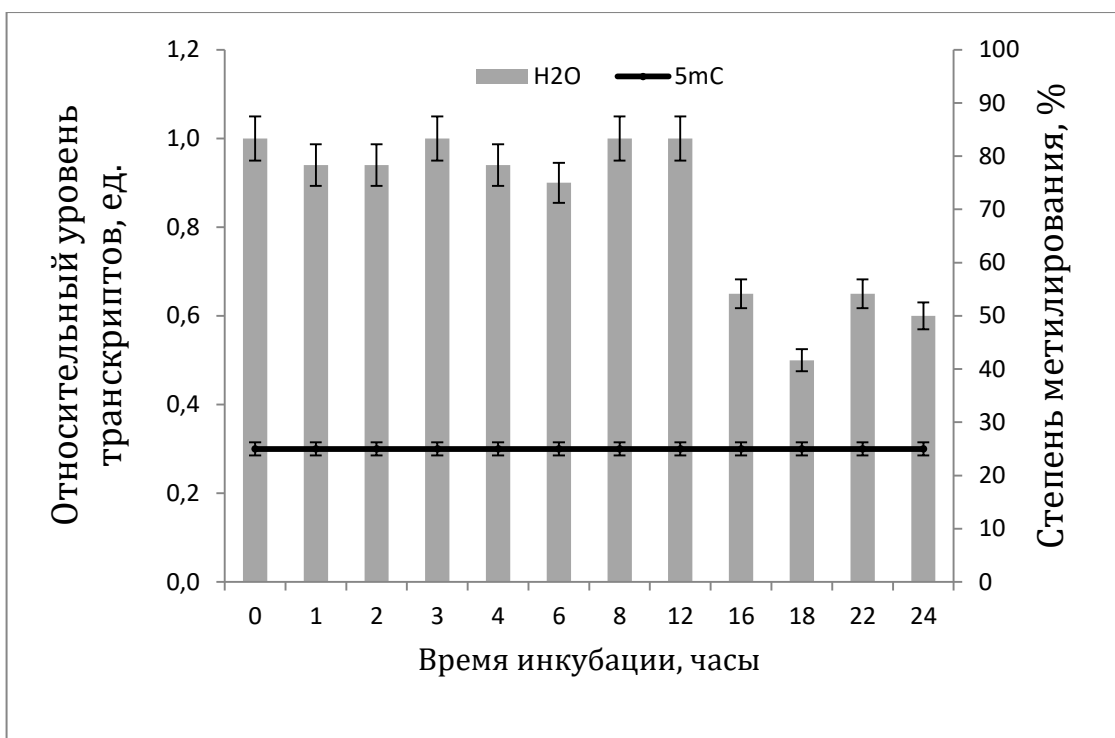


Рис. 5 Динамика метилирования (5mC) промотора гена *OGDH3* и его экспрессии в листьях кукурузы в контрольной группе

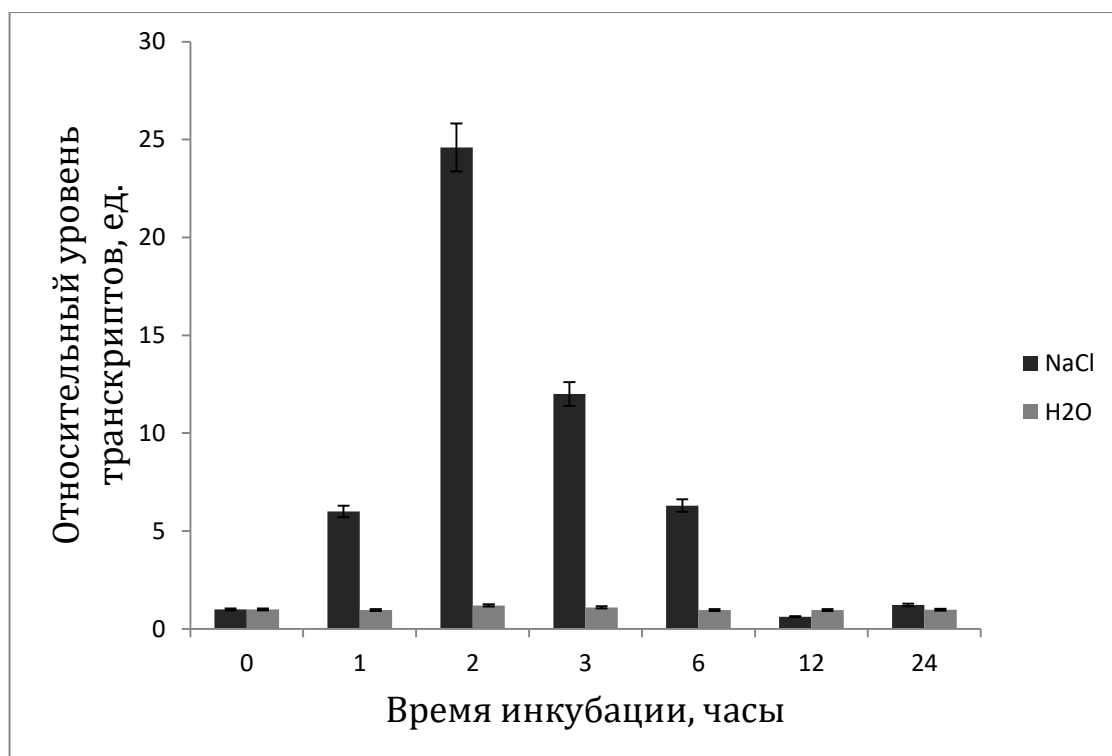


Рис.6. Относительный уровень транскриптов гена *DLST1* ДЛСТ в проростках сахарной свёклы при засолении. Различия между значениями контрольной и опытной группы статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

Таблица 8

Субклеточная локализация глутаматдегидрогеназной активности в листьях
кукурузы

Фракция органоидов	Общая активность, Е/грамм сырой массы	% активности фермента от общего содержания
Пероксисомы	-	-
Цитоплазма	15.50	9.53
Хлоропласты	6.38	3.92
Митохондрии	140.70	86.54

Таблица 9.

Активность маркерных ферментов, используемых для определения чистоты фракций

Фракция органоидов	Активность СДГ		Активность АДГ		Активность каталазы		Содержание хлорофилла	
	Е/мл	%	Е/мл	%	Е/мл	%	мг/мл	%
Цитоплазма	0.03	4.05	5.20	86.52	н/о	н/о	2.08	2.49
Хлоропласты	0.07	9.50	0.40	6.65	0.01	7.69	80.70	96.54
Митохондрии	0.64	86.50	0.35	5.82	0.01	7.69	0.81	1.51
Пероксисомы	н/о	н/о	0.06	1	0.11	84.6	н/о	н/о

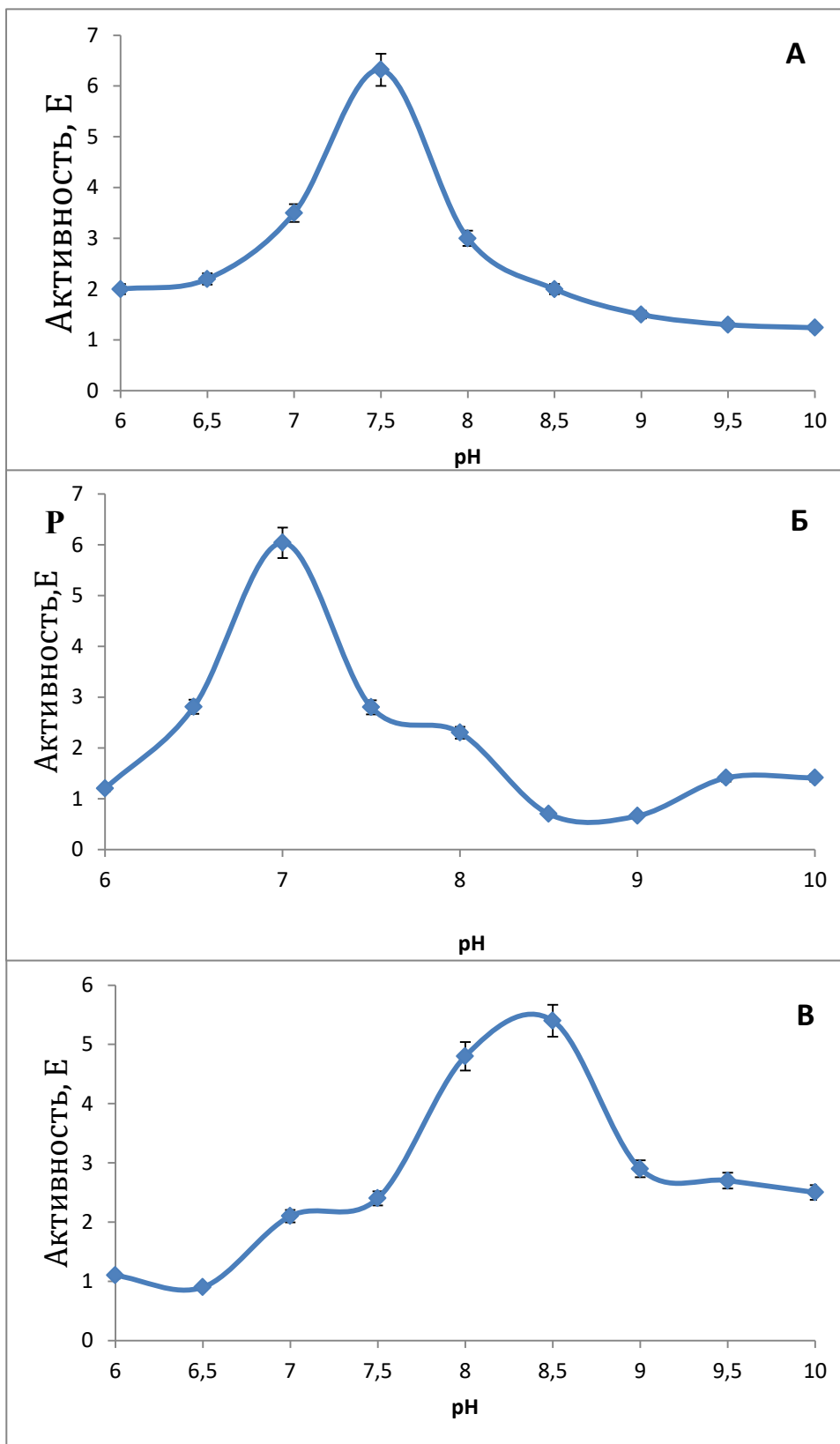


Рис.7 Зависимость активности полученного препарата глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы от значения рН для реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата: А – ГДГ1; Б – ГДГ2; Б – ГДГ

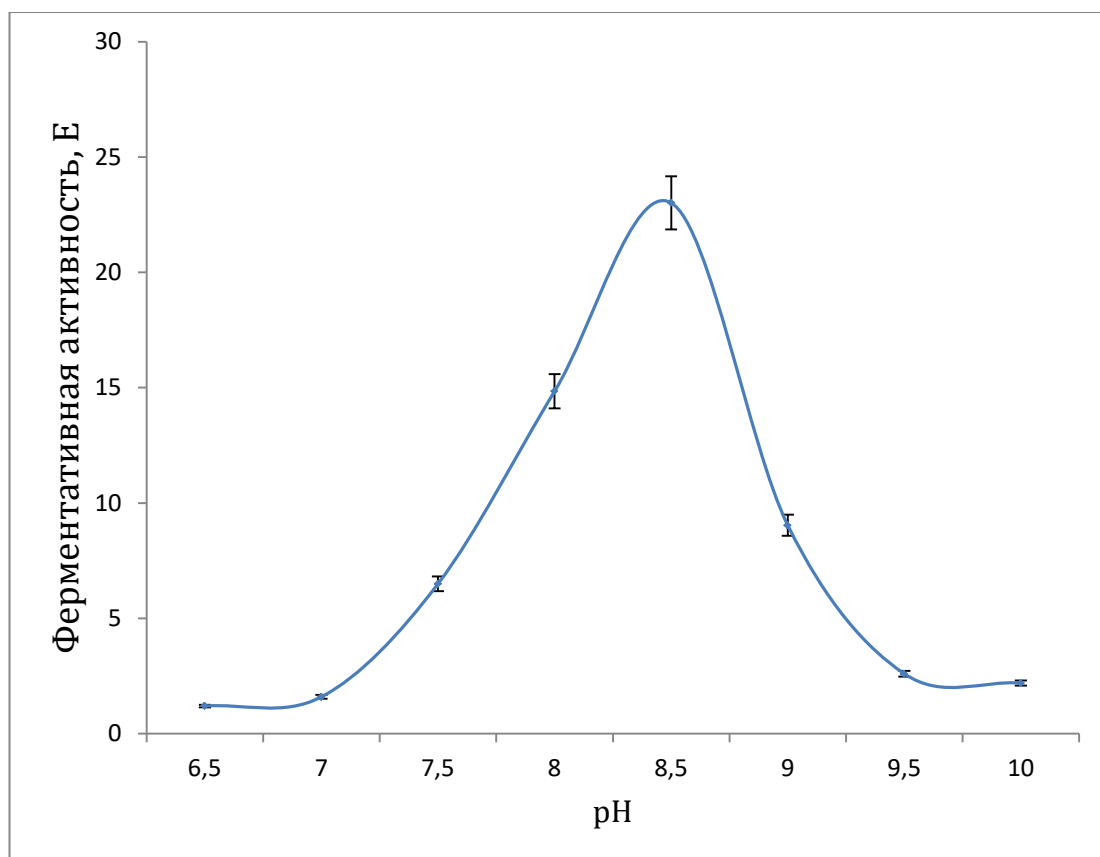


Рис.8 Зависимость активности полученного препарата ГДГ из проростков пшеницы от значения рН для реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата

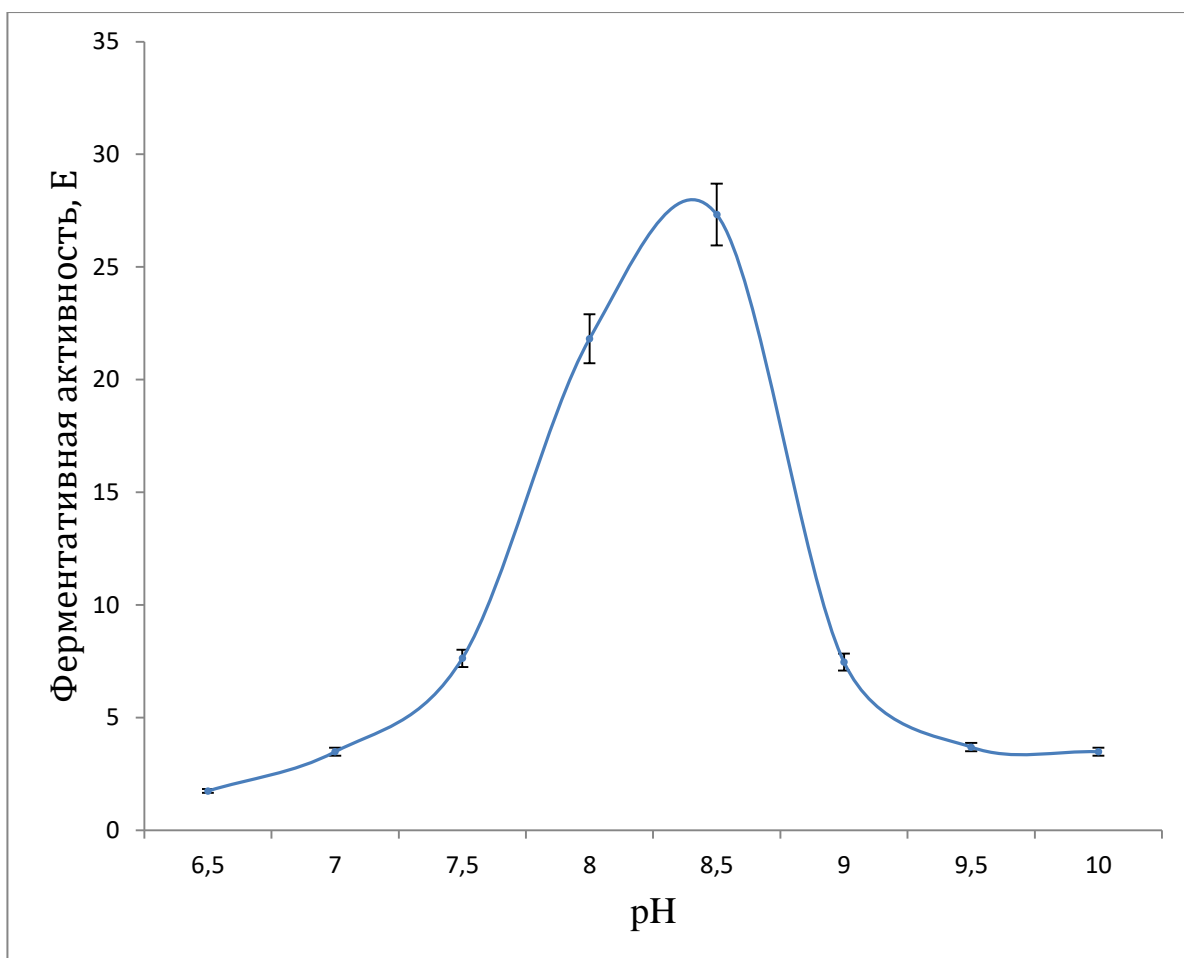


Рис.9 Зависимость активности полученного препарата ГДГ из проростков пшеницы от значения рН для реакции дезаминирования глутамата

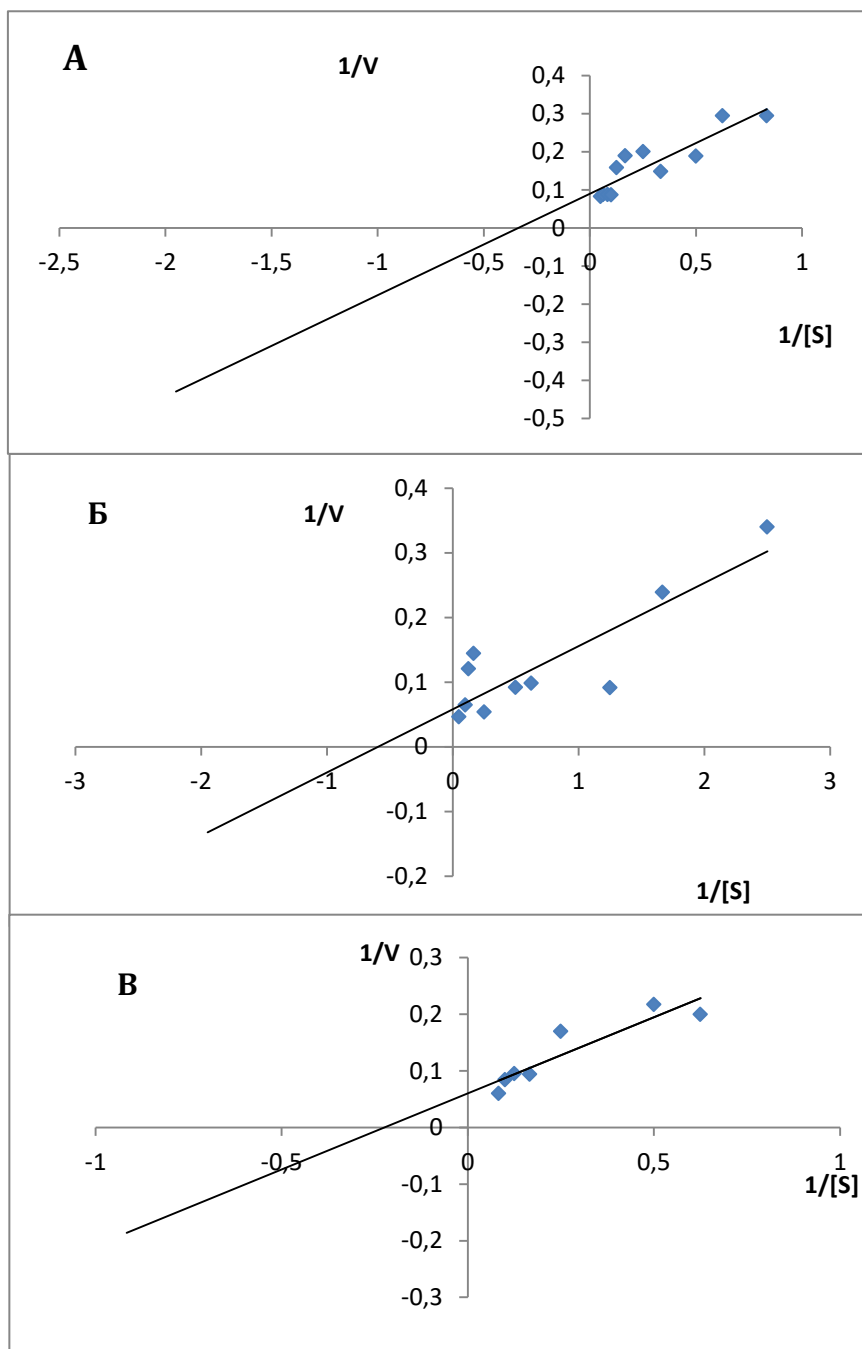


Рис.10 Определение константы Михаэлиса (по 2-оксоглутарату) полученных из листьев кукурузы ферментных препаратов ГДГ: А – ГДГ1; Б – ГДГ2; В – ГДГ3

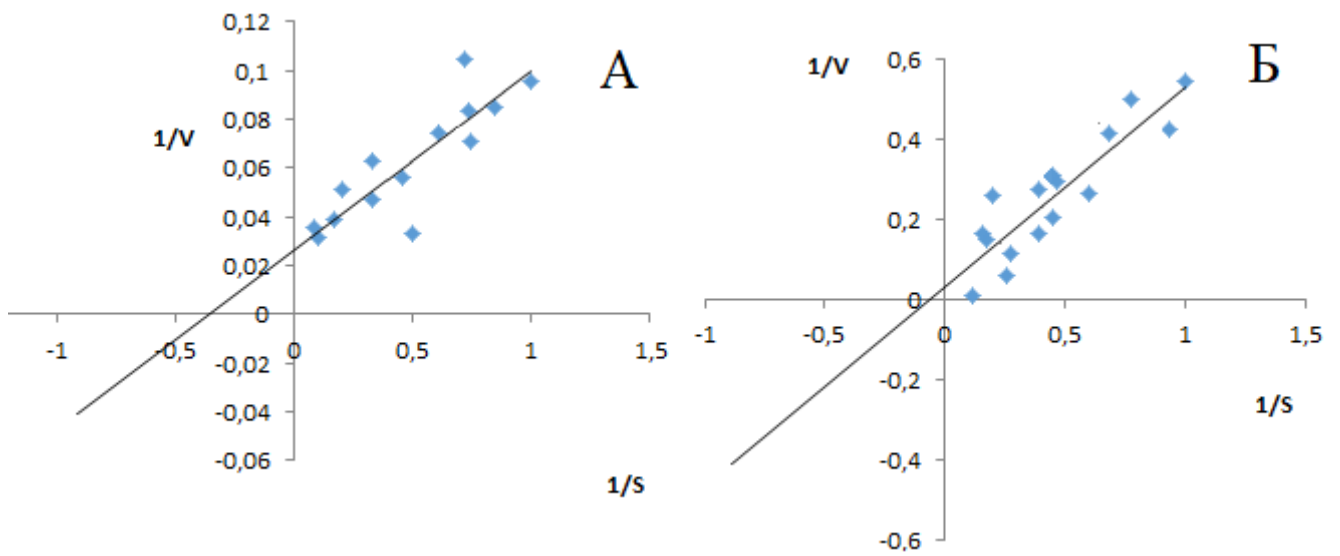


Рис. 11 Определение константы Михаэлиса полученного ферментного препарата ГДГ из проростков пшеницы: А - по 2-оксоглутарату; Б – по глутамату.

Таблица 10

Значения констант Михаэлиса и оптимальных значений pH для
препарата ГДГ пшеницы

	Км по 2- Ог, мМ	Км по Глут, мМ	pH- оптимум по реакции аминирования	pH- оптимум по реакции дезаминирования
ГДГ	2.75±0.01	14.9±0.01	8.5	8.5

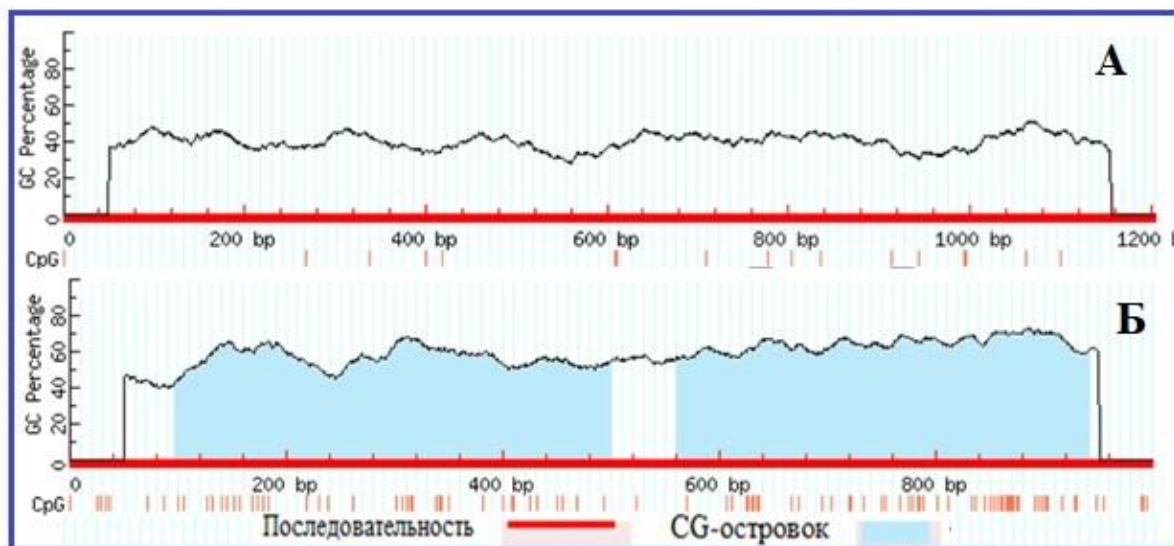


Рис.12 Анализ промоторов генов *GDH1* (А) и *GDH2* (Б) *Zea mays* L. на наличие CpG-островков

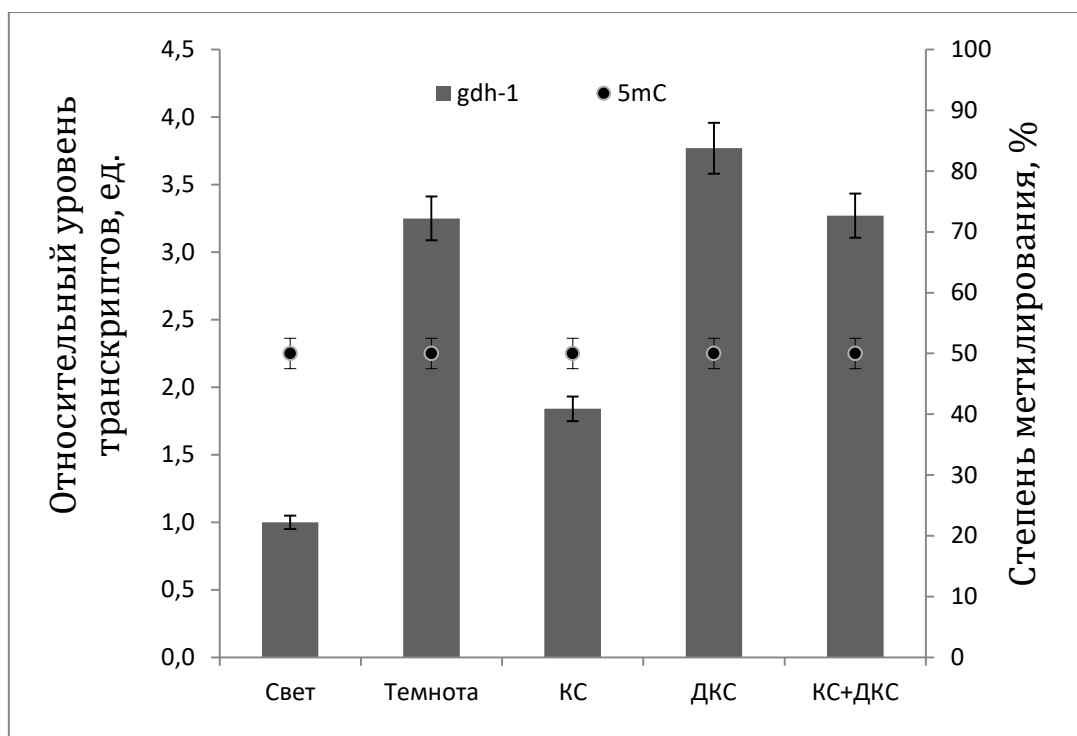


Рис. 13 Относительный уровень транскриптов гена *GDH1* и динамика метилирования CpG-динуклеотидов (5mC) в составе его промотора в листьях кукурузы в при облучении светом различных длин волн

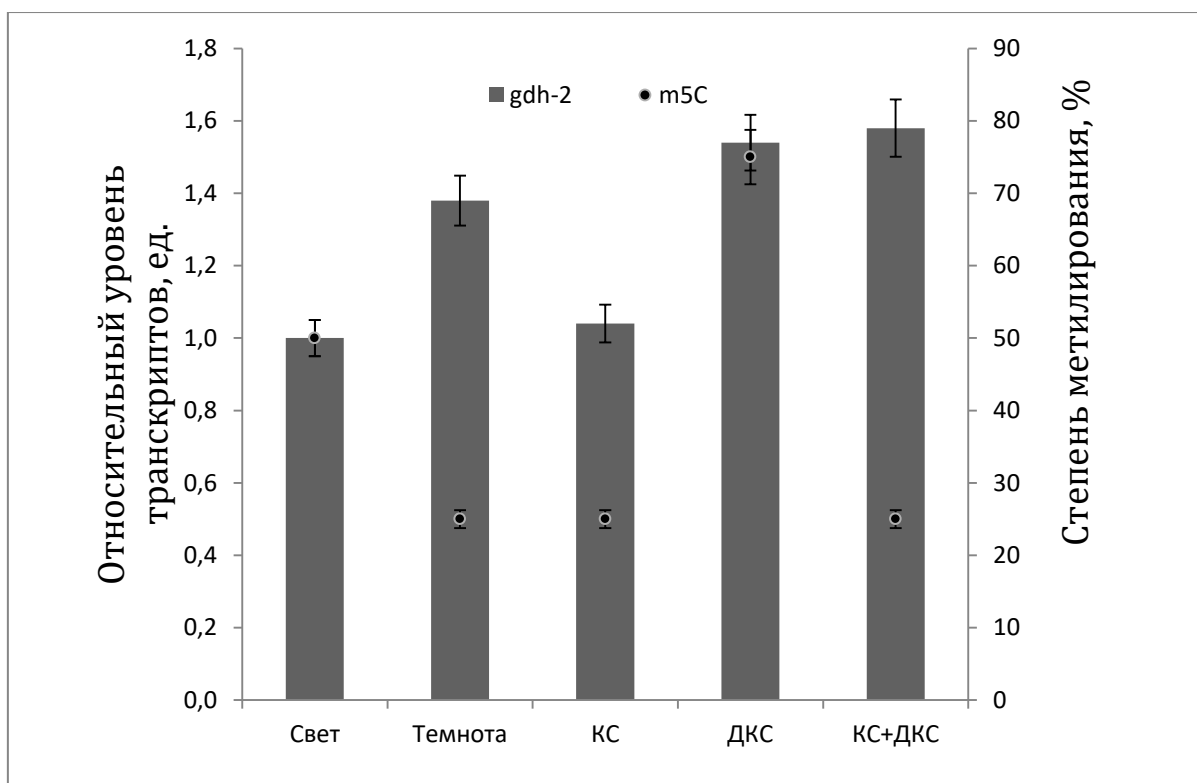


Рис. 14 Относительный уровень транскриптов гена *GDH2* и динамика метилирования CpG-динуклеотидов (5mC) в составе его промотора в листьях кукурузы при облучении светом различных длин волн

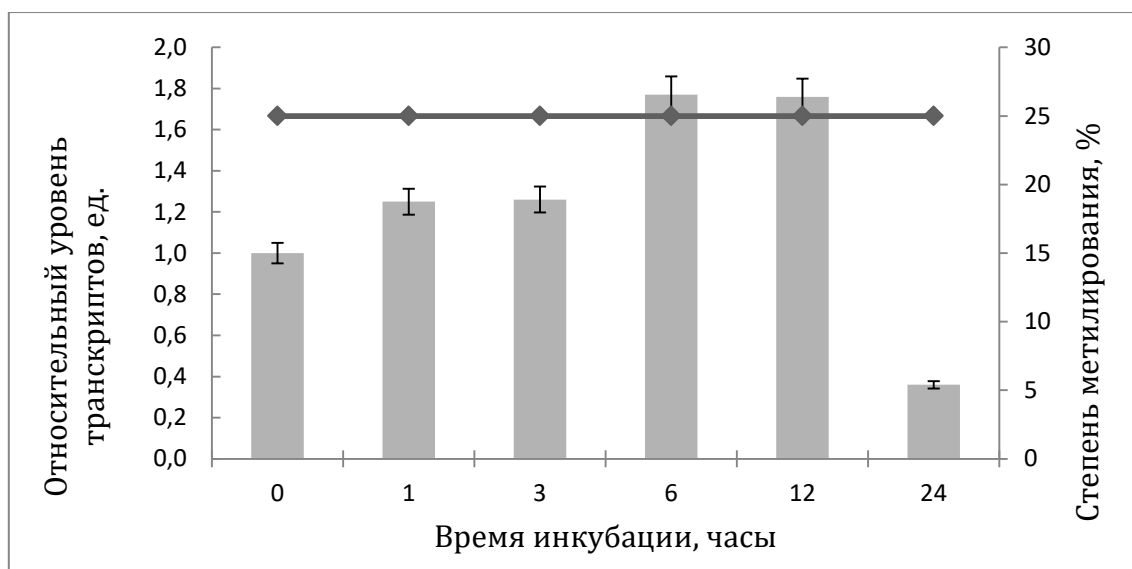


Рис. 15 Относительный уровень транскриптов гена *OGDH1* (серые столбцы) и динамика метилирования CpG-динуклеотидов (линия) в составе его промотора в листьях кукурузы в нормальных условиях

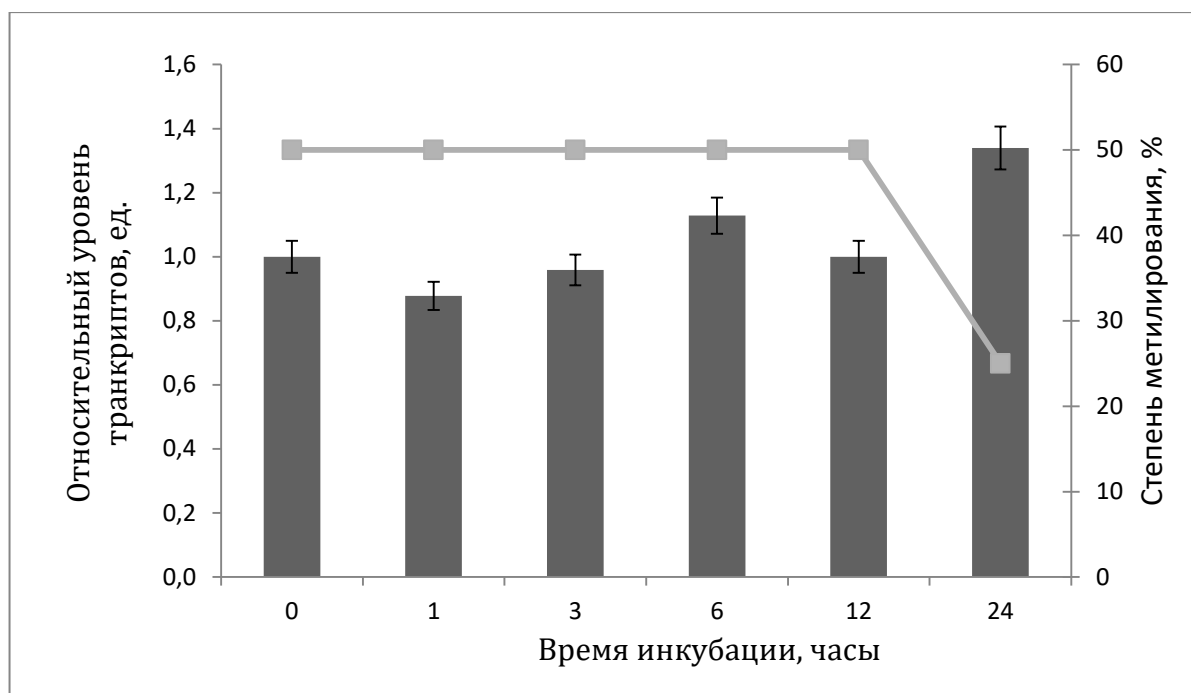


Рис. 16 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *OGDH3* от степени метилирования (5mC) его промотора в листьях кукурузы в нормальных условиях

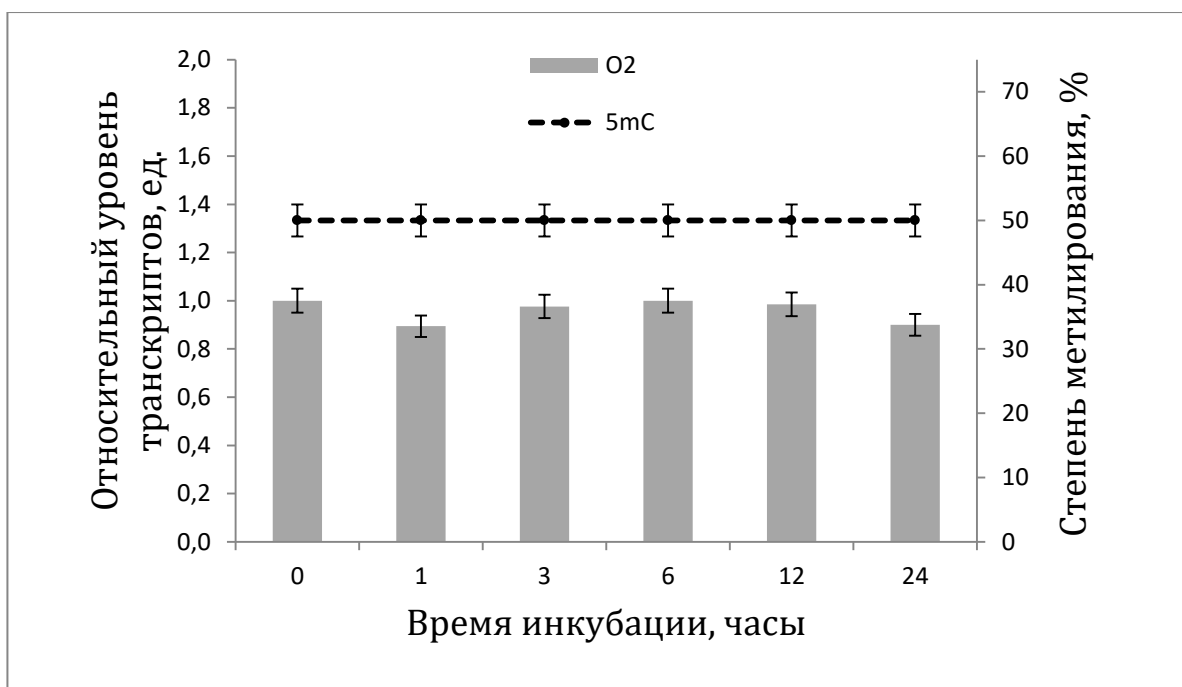


Рис.17 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH1* от степени метилирования (5mC) его промотора в листьях кукурузы в нормоксических условиях

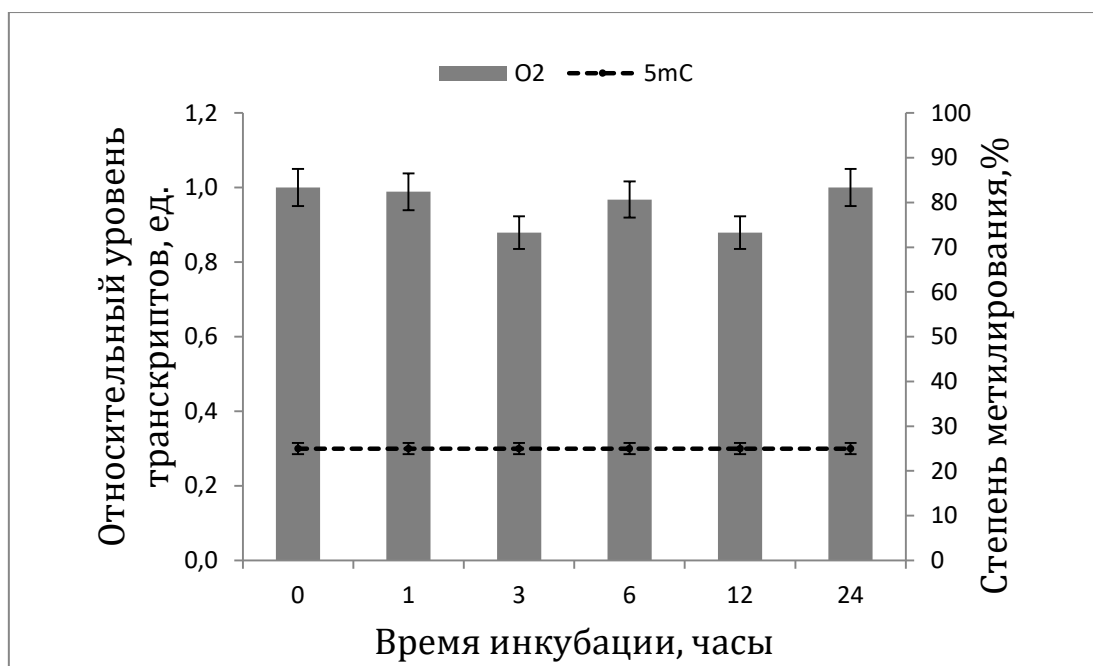


Рис. 18 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH2* от степени метилирования (5mC) его промотора в листьях кукурузы в нормоксических условиях

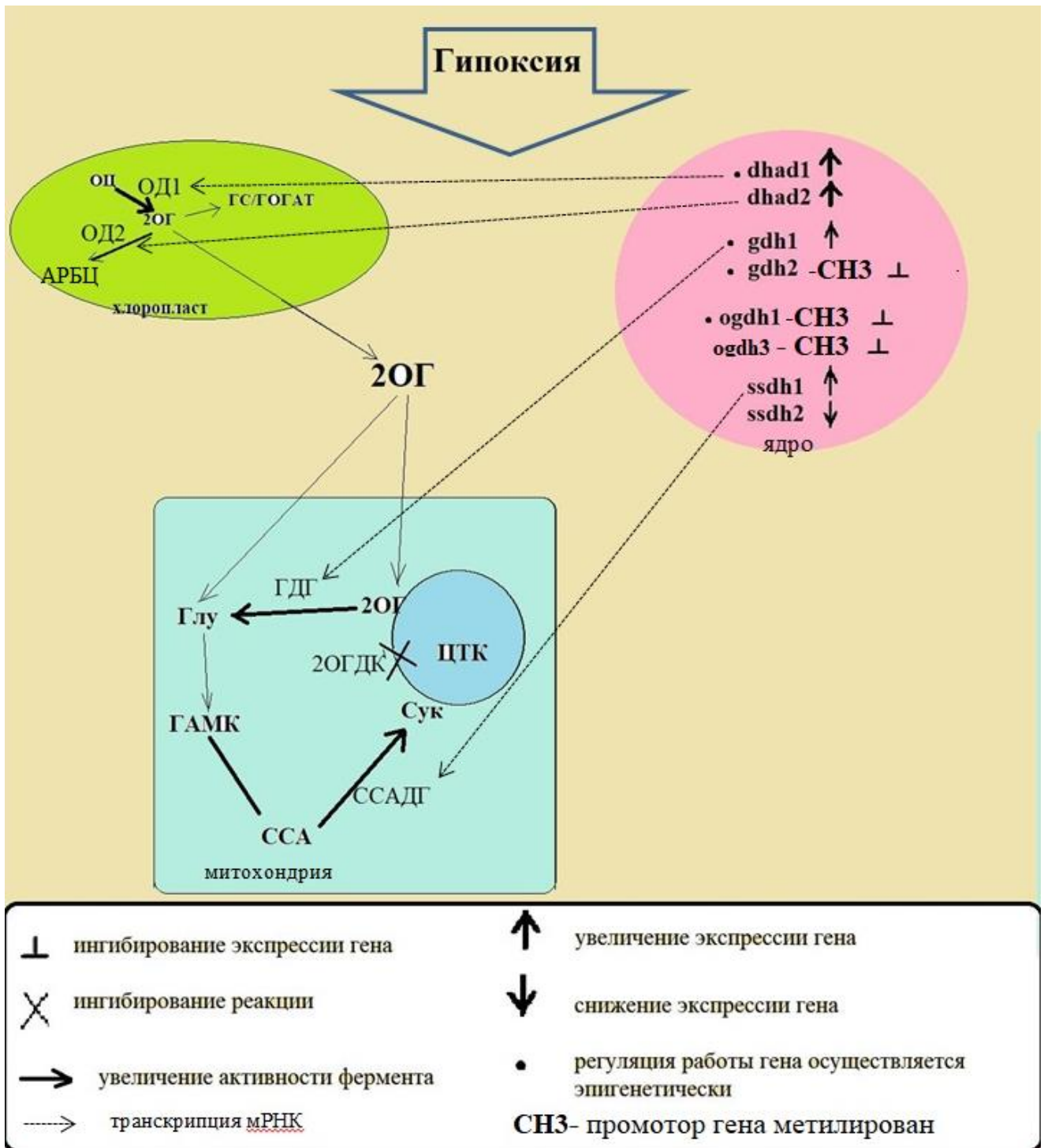


Рис. 19 Гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы в гипоксических условиях.

Жирным шрифтом обозначены основные метаболиты. Стрелками показано направление реакции. Сук- сукцинат, 2OG-2-оксоглутарат, Глу-глутамат, ССА-сукциниловый семиальдегид, ОЦ-оксицитрат, ГС/ГОГАТ – глутамин-синтетазный путь. АРБЦ – аминокислоты с разветвленными боковыми цепями.

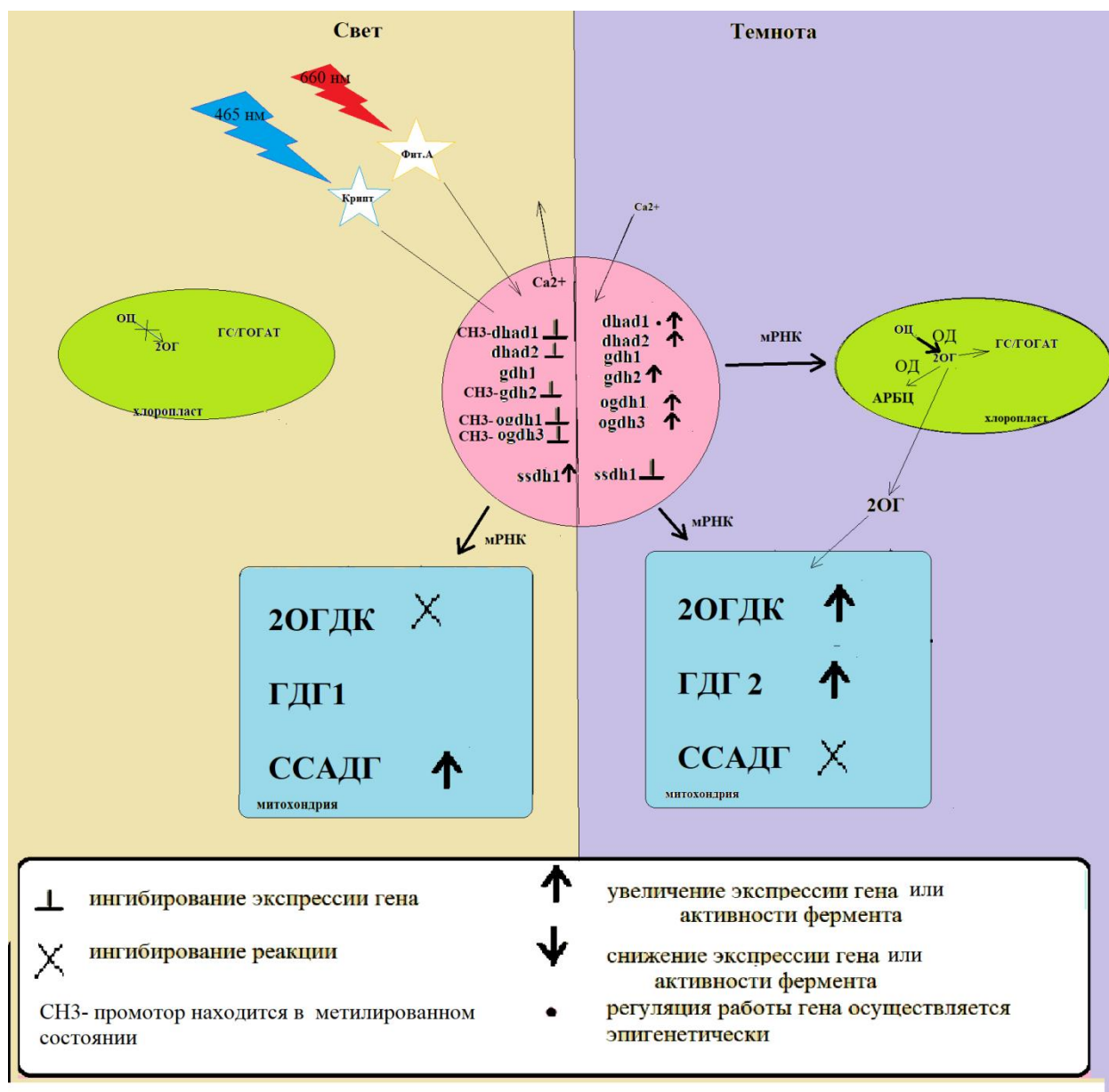


Рис. 20 Гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при смене светового режима.

Жирным шрифтом обозначены основные метаболиты. Стрелками показано направление реакции. Сук- сукцинат, 2ОГ-2-оксоглутарат, Глу-глутамат, ССА-сукциниловый семиальдегид, ОЦ-оксицитрат, ГС/ГОГАТ – глутамин-синтетазный путь. АРБЦ – аминокислоты с разветвленными боковыми цепями.