

На правах рукописи



Анохина Галина Борисовна

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

Специальность

1.5.4 – биохимия

1.5.21 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2022

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Епринцев Александр Трофимович

Официальные оппоненты:

Любимов Валерий Юрьевич

доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Институт фундаментальных проблем биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский центр биологических исследований Российской академии наук», ведущий научный сотрудник группы экологии и физиологии фототрофных организмов

Тютерева Елена Владимировна

кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической физиологии

Ведущая организация:

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

Защита состоится « 6 » октября 2022 года в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.2.288.02 при Воронежском государственном университете по адресу: 394036, Воронеж, Университетская пл., 1, аудитория 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и сайте ФГБОУ ВПО «ВГУ»: www.vsu.ru.

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

Автореферат разослан « 3 » сентября 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Грабович Маргарита Юрьевна

Актуальность темы. Метаболические пути обеспечивают клетку энергией и субстратами для осуществления различных биохимических процессов. Метаболизм митохондрий обеспечивает клетку энергией и сопряжен с процессами дыхания, ассимиляции азота, окислительно-восстановительным балансом, а у растений еще и с фотосинтезом (Millar et al., 2011; Araújo et al., 2012). Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) - центральное звено дыхательного метаболизма, скорость которого лимитирует 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс (2ОГДК). Таким образом происходит регуляция потока всего 2-оксоглутарата (2ОГ) (Millar et al., 2011). 2ОГ - важнейший интермедиат, который используется для синтеза первичной аминокислоты – глутамата, в результате чего происходит перенос аминогрупп и ассимиляция NH_3 (Araújo et al., 2012). Из всех соединений, поставляющих углеродные скелеты для биосинтеза аминокислот, 2ОГ играет главную роль, так как является наиболее реакционно-способным промежуточным акцептором NH_2 -групп (Nurpe, Turpin, 1994). Ранее были высказаны предположения о том, что 2-ОГ играет роль сигнального метаболита у растений (Bourelleier et al., 2009). Шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) - особый обходной путь ЦТК (Renault, Roussel, 2010), который активируется в тех случаях, когда клетке необходим дополнительный приток энергии. Связь между ЦТК и ГАМК-шунтом осуществляется посредством функционирования глутаматдегидрогеназы (ГДГ), которая обеспечивает либо синтез 2ОГ из глутамата, либо его аминирование (Lea, Mifflin, 2011).

Известно, что в некоторых растениях, таких, например, как *Hibiscus* и *Garcinia*, накапливается оксидитрат (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 оксидитратдегидратазы декарбоксилирующей (ОД) (Землянухин, 1995; Shevchenko et al, 1996). Однако данный фермент в основном изучался с точки зрения катализа реакции биосинтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями (Oliver et al, 2012). 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.

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.

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 активизирует 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.

Список принятых сокращений: 2-ОГ– 2-оксоглутарат; 2ОГДК - 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс; 2ОГДГ- 2-оксоглутаратдегидрогеназа; ГДГ – глутаматдегидрогеназа, ОД–оксицитратдегидратаза декарбоксилирующая, ССАДГ–сукцинат-семиальдегиддегидрогеназа; АМФ- аденозинмонофосфат; ГАМК–γ-Аминомасляная кислота; ДКС – дальний красный свет; ДТТ–дитиотреитол; КС–красный свет; НАД⁺– никотинамидадениндинуклеотид; НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный) ; ОЦ – оксицитрат; ПААГ – полиакриламидный гель; ПВП- поливинилпирролидон; СС – синий свет; ССА – сукциниловый семиальдегид; ТДФ – тиаминдифосфат; ФМС – феназинметасульфат; ЦТК –цикл трикарбоновых кислот; ЭГТА- этиленгуанинтетраацетат; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; Rf – общая электрофоретическая подвижность белка.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования выступала кукуруза (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76, выращенная гидропонно при десятичасовом дне с интенсивностью света 25 Вт/м² при температуре 25°C. Дополнительно использовались: сахарная свёкла *Beta vulgaris* L. сорта МС17017, пшеница *Triticum aestivum* L., сорта Московская-40; *Arabidopsis thaliana* L. четырех линий: дикого типа (Col-0) и нокаутных по генам фитохрома А (*phyA-201*), фитохрома В (*phyB-1*), криптохрома (*cry-4*) (Институт М. Планка, Германия).

Индукция солевого стресса осуществлялась путём помещения растений в 0.15 М раствор NaCl на 24 часа. Контрольная группа 24 часа находилась в воде.

Постановка эксперимента по влиянию светового спектра. 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. Пробы отбирали через 3 часа после облучения.

Индукция гипоксического стресса. 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/с. Контрольная группа находилась в воздушной среде.

Для исследования участия Ca²⁺ в регуляции ГДГ растения обрабатывались в течение 1 часа в темноте 25 мМ раствором рутения красного и 5 мкМ раствором ЭГТА.

Определение активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса проводили спектрофотометрически при 25⁰С по скорости образования НАДН при 340 нм в среде, содержащей: 0.05% Triton X-100, 0.5 мМ MgCl₂, 2 мМ НАД⁺, 0.12 мМ Li-CoA, 0.2 мМ ТДФ, 2.5 мМ цистеин, 1 мМ АМФ, 1 мМ 2-оксоглутарат калия, 0.1 М Tris-HCl буфер (pH 7.5) (Araujo et al., 2008).

Определение активности глутаматдегидрогеназы осуществляли по реакции аминирования спектрофотометрически при 340 нм в среде: 13 мМ 2-ОГ, 0.25 мМ НАДН, 1 мМ CaCl₂, 50 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1 М Tris-HCl, pH 8.0 (Sarask et al, 2016).

Определение активности оксидитратдегидратазы проводили спектрофотометрически при 340 нм путём регистрации окисленного НАД⁺ в среде: 1 мМ гидроксицитрата калия, 50 мМ NH₄Cl, 0.4 мМ НАДН, 1 мМ ДТТ, 0.2 Е ГДГ, 0.1 М Tris-HCl (pH 8.0).

Очистка глутаматдегидрогеназы. Гомогенизованный со средой выделения (1:5) материал фракционировали NH₄(SO₄)₂ в два этапа: 0 - 35% и 35 - 70% насыщения раствора, затем удаляли соли аммония путем гель-фильтрации через Sephadex G-25. Элюировали 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0). Полученный препарат подвергали ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Sephacel (GE Healthcare, Швеция). Десорбцию производили линейным градиентом NaCl от 0.15 до 0.35 М (Hudson, Daniel, 1993). Затем, для очистки препарата использовали гель-хроматографию на сефадексе G-200 (Kujo, Oshima, 1998). Все процедуры проводили при температуре + 4⁰С.

Изоферментный состав исследовали с помощью электрофореза в ПААГ по методу Дэвиса (Ornstein, Davis, 1964). Денатурирующий электрофорез проводили по Лэммли

(Laemmly, 1970). **Специфическое проявление ферментов** осуществляли тетразолиевым методом (Thurman, 1965).

Выделение ДНК проводили с использованием 2% цетримониум бромид в качестве основного компонента лизирующего буфера (Рябушкина и др., 2012). **Конверсия ДНК бисульфитом натрия** осуществлялась с помощью NaHSO_3 в три стадии по модифицированной методике Hsieh (1999).

РНК выделялась методом экстракции смесью фенола, хлороформа и изоамилового спирта, используя LiCl для очистки от ДНК (Chomczynski, Sacchi, 1987; Matz, 2002).

Real time- ПЦР проводили на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция). В качестве интеркалирующего красителя использовался SYBR Green I.

Анализ промоторов генов на наличие CpG-островков и подбор праймеров для МС-ПЦР осуществляли с помощью онлайн-сервиса MethPrimer. **Проведение метил-специфичной ПЦР**, позволившее оценить степень метилирования отдельных CG-динуклеотидов, проводили с применением ScreenMix (ЗАО «Евроген»), используя в качестве матрицы ДНК, модифицированную NaHSO_3 .

Бисульфитное секвенирование. Полученные образцы были секвенированы по методу Сэнгера в ЗАО «Евроген».

Статистическая обработка данных. Все опыты проводились в 3-4 кратной повторностях. Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. Для множественных сравнений критерий Стьюдента использовался с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения. Влияние фактора достоверно при $p \leq 0.05$ (Лакин, 1990; Zar, 1984).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние солевого стресса

Установлено, что солевой стресс оказывает активирующий эффект на функционирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса у растений кукурузы *in vivo*. В листьях кукурузы общая активность исследуемой системы увеличивается уже спустя час после инкубации в солевом растворе почти в три раза по сравнению с контролем (Рис. 1). Сходная картина наблюдалась и при исследовании 2ОГДК в

проростках свеклы, что подтверждает данные об индукции ЦТК при засолении в первые часы воздействия. Данный эффект известен как «солевое дыхание» (Kasumov et al., 1998). Инкубация более 4 часов в растворе NaCl приводит к снижению активности 2ОГДК. Изменения уровня транскриптов *OGDH1* коррелировали с динамикой ферментативной активности исследуемого комплекса – начиная с первого часа солевого воздействия уровень транскриптов *OGDH1* значительно возрастал. Анализ нуклеотидной последовательности промоторной области гена *OGDH1* не выявил ни одного CpG-островка, в то время как промотор *OGDH3* содержит два CpG-островка с размерами 116 п.н. и 591 п.н.

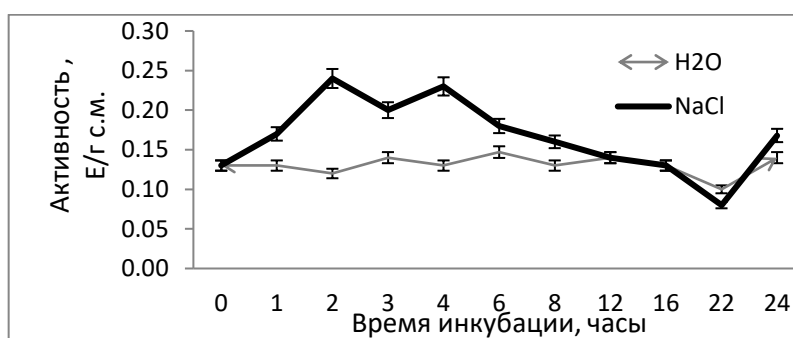


Рис.1 Общая активность 2ОГДК при солевом стрессе в листьях кукурузы

Показано, что изменение уровня мРНК гена *OGDH1* кукурузы при засолении сопряжено с трансформацией метильного статуса CpG-динуклеотидов промотора, что обеспечивает регуляцию работы данного гена (Рис.2А). Отмечена смена степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в промоторе *OGDH1* и *OGDH3* кукурузы, коррелирующая с динамикой экспрессии генов, что указывает на важную роль метилирования в регуляции работы этих генов при адаптации клетки к засолению.

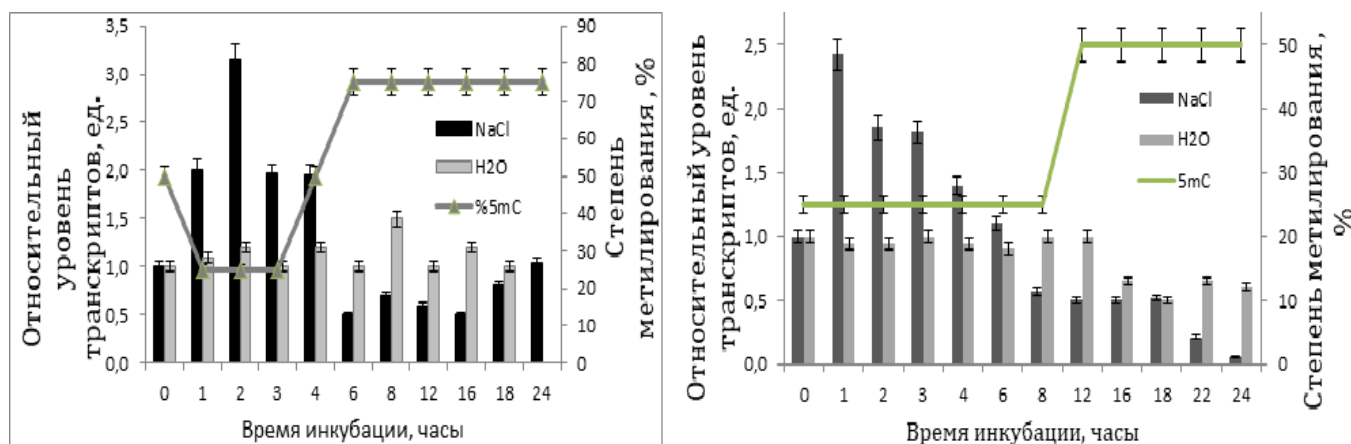


Рис. 2 Динамика метилирования промоторов генов *OGDH1* (А) и *OGDH3* (Б) и их экспрессии в листьях кукурузы при засолении

Обнаружен индуцирующий эффект солевого стресса на работу генов, кодирующих два других компонента 2ОГДК – дигидролипоамиддегидрогеназу (*DLST1*, *DLST2*) и дегидролипоамиддегидрогеназу (*DLD1*, *DLD2*), что указывает на то, что стрессовое воздействие оказывает эффект на все три белка в составе исследуемого метаболита.

Методом изоплотного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы установлено, что ГДГ локализована в цитозоле (9.53%) и в большей степени в митохондриях (86.54%), что согласуется с имеющимися литературными данными (Dubois et al., 2003). Проведение многостадийной очистки с использованием ДЭАЭ-Sephacel позволило выделить 3 изоформы ГДГ из листьев кукурузы (табл. 1). Проведение ПААГ-электрофореза с окрашиванием $AgNO_3$ показало, что один ГДГ-1 был очищен до гомогенного состояния, в то время как ГДГ-2 и ГДГ-3 являлись высокоочищенными, так как присутствовали сопровождающие белки (Рис.3А). Тетразолиевым методом была показана ГДГ-активность у очищенных изоформ белка (рис. 3Б). Значения R_f для трех форм фермента составили следующие величины: для ГДГ1 - 0.26, для ГДГ2 - 0.34 и ГДГ3 - 0.7. Физико-химические и каталитические свойства полученных препаратов ГДГ имели значительные различия, что, вероятно, связано с разницей в их структуре (табл.2).

Таблица 1 Стадии очистки изоформ ГДГ 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
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

Таблица 2 Величины констант Михаэлиса и оптимальных значений pH полученных изоферментов ГДГ (n=3, p<0.05)

Изоформа ГДГ	pH оптимум (по реакции аминирования)	Км по 2-ОГ, мМ
ГДГ1	7.5	0.34±0.01
ГДГ2	7.0	0.60±0.01
ГДГ3	8.5	0.22±0.01

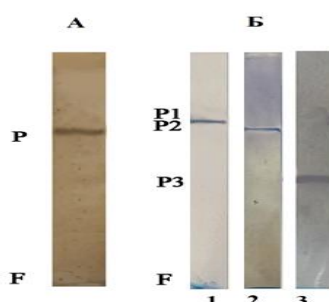


Рис.3 Электрофореграмма очищенных препаратов ГДГ. А – универсальное проявление ГДГ1 с использованием $AgNO_3$. P – белковая полоса, F – фронт красителя; Б – Специфическое проявление ГДГ. P1, P2, P3 – белковые полосы для препаратов ГДГ1(1), ГДГ2(2) и ГДГ3(3), F – фронт красителя.

Инкубация растений в солевом растворе приводит к индукции глутаматдегидрогеназы за учёт увеличения ее активности. До начала эксперимента выявлялась одна форма ГДГ со значением $R_f = 0.17$. Появление дополнительной изоформы ($R_f = 0.13$) с первого часа инкубации в солевом растворе связано с экспрессией *GDH2* (Рис. 4Б), обеспечивающего синтез α -субъединицы ГДГ, катализирующего образование 2ОГ.

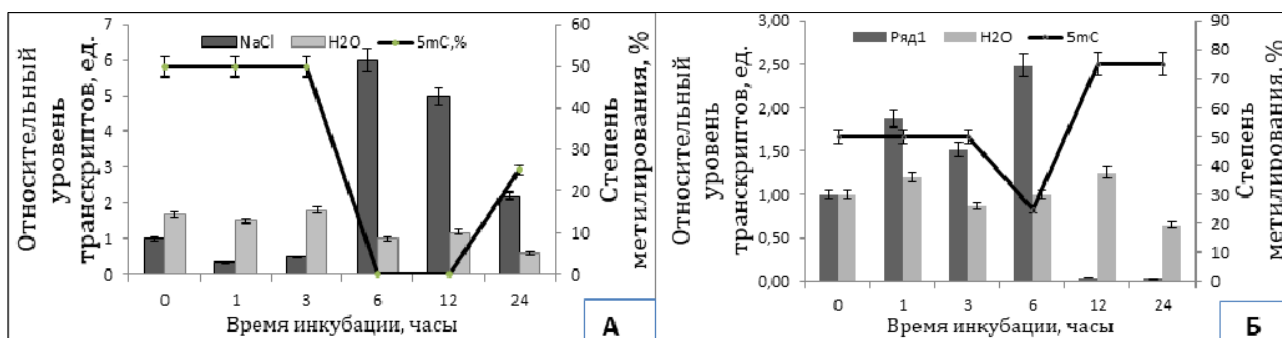


Рис. 4. Динамика относительного уровня транскриптов генов *GDH1*(А) и *GDH2*(Б) в листьях кукурузы в условиях солевого стресса

Начиная с 6 часа, активируется ген *GDH1*(Рис.4А), синтезирующий β -субъединицу ГДГ, что способствует протеканию реакции в сторону образования глутамата, идущего на синтез пролина (Келешян и др., 2017; Renault., Roussel , 2010; Carillo, 2018). Показано, что изменения экспрессии обоих генов коррелируют с колебаниями степени метилирования их промоторов.

Участвуя, главным образом, в метаболизме аминокислот, оксидитратдегидратаза катализирует превращение оксидитрата в 2ОГ. Достоверных данных о том, куда в дальнейшем поставляется 2ОГ, полученный из ОЦ, в настоящее время не установлено. Показано, что основная часть активности ОД сосредоточена в хлоропластах (91.7%), в то время как в цитоплазме обнаруживается не более 4.1%.

В первые часы солевого стресса активность ОД падает, однако, в дальнейшем восстанавливается и даже возрастает(максимум на 6 час эксперимента)(Рис.5). Инактивация фермента к 24 часу, вероятно, связана с повреждающим действием NaCl на структуру полипептида (Прусакова с со-авт., 2007). При этом, засоление вызывает изменения в уровне транскриптов *DHAD1*, полностью коррелирующие с динамикой активности фермента по реакции образования 2ОГ (Рис.5А). Анализ промоторной области гена *DHAD1* показал, что в его составе имеется два CpG-островка, размером 323 и 143 п.н., в промоторе *DHAD2* обнаружен один CpG-островок (167 п.н.). Результаты

бисульфитного секвенирования позволили выявить разнородное влияние солевого стресса на метильный статус генов (Рис.5). Степень метилирования промотора *DHAD1* несущественно менялась в течение 24 часов. Увеличение количества транскриптов *DHAD2* сопровождалось снижением доли метилированных цитозинов с 34.3% до 9.1%, а повышение метильного статуса CG-динуклеотидов в составе CpG-островка, обуславливало уменьшение экспрессии гена к концу эксперимента (Рис.5Б). Стимулирующее влияние солевого стресса на активность ОД за счёт индукции генов *DHAD1* и *DHAD2* согласуется с имеющимися в литературе данными о влиянии засоления на функционирование ОД в *A. Thaliana* (Zhang et al., 2015). Показано, что изменения транскрипционной активности гена *DHAD1* коррелируют с изменениями общей ферментативной активности ОД, что свидетельствует о роли данного гена в синтезе полипептида, ответственного за поставку 2-оксоглутарата, в то время как изофермент, кодируемый *DHAD2*, вероятно, принимает участие в синтезе аминокислот с разветвленными боковыми цепями. Выявленные изменения в степени метилирования CG-динуклеотидов промотора *DHAD2* при засолении коррелировали с колебаниями уровня транскриптов.

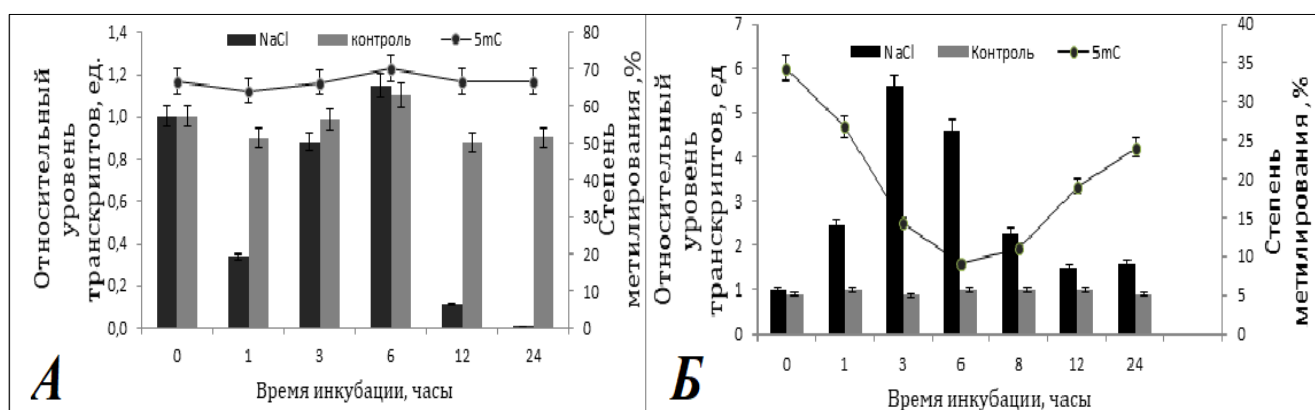


Рис.5 Изменение относительного уровня транскриптов гена *DHAD1*(А) и *DHAD2*(Б) в листьях кукурузы при действии солевого стресса

Влияние светового режима на функционирование 2ОГДК, ГДГ и ОД

Выявлено ингибирующее действие белого и красного света на активность 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (рис. 6А). Облучение проростков ДКС не влияло на функционирование 2ОГДК, в то время как синий свет ингибировал его активность. Установленный светорегулируемый характер функционирования 2ОГДГ обусловлен модуляцией экспрессии генов *OGDH1* и *OGDH3* в проростках *Zea mays* L.,

который коррелировал с изменением ферментативной активности (рис.6Б). Характер распределения относительного уровня транскриптов генов *OGDH1* и *OGDH3* при облучении светом различного спектра указывает на участие фитохромной и криптохромной систем в трансдукции светового сигнала.

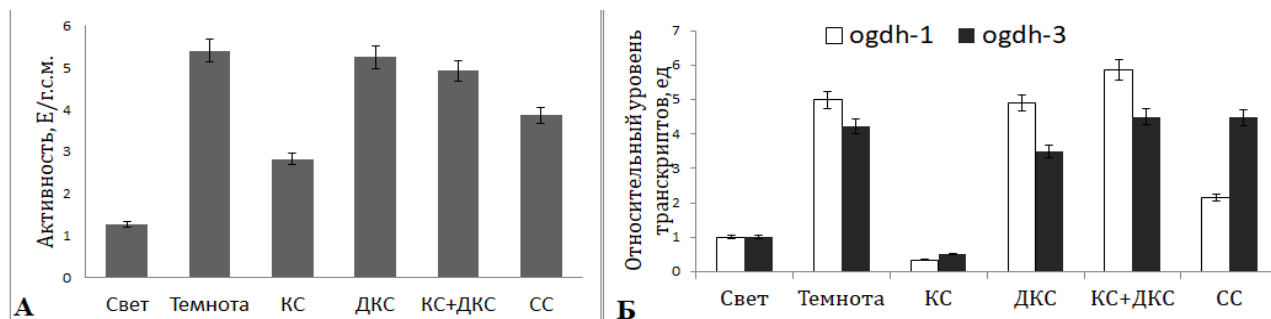


Рис.6 Влияние света различного спектрального состава на общую ферментную активность 2ОГДК (А) и относительный уровень транскриптов *OGDH1* и *OGDH3* в листьях *Zea mays* L.(Б).

Гены *OGDH1* и *OGDH2A*. *Thaliana* обнаруживают зависимость от условий светового режима, аналогичную с регистрируемой у растений *Zea mays* (рис.8В). Степень метилированных цитозинон в составе промотора гена *OGDH1* колебалась от 50 до 75%, однако, эти изменения не коррелировали с модуляциями уровня транскриптов данного гена. Метильный статус отдельных CpG-динуклеотидов в составе промоторной области гена *OGDH3* оставался на уровне 25% при действии света различного спектра. Показано, что в трансдукции светового сигнала принимают участие криптохромная и фитохромная системы. На нокаутных по гену *phyA* линиях *A. thaliana* установлено участие фитохрома А в регуляции экспрессии *OGDH1* и *OGDH2* (рис. 7А); при этом фитохром В участвует в передаче сигнала к генам 2ОГДГ (Рис. 7Б). На линиях *Arabidopsis*, у которых ген *cry-4* был инактивирован, выявлено отсутствие влияния криптохрома 4 (Рис. 7В), что, однако, не исключает участие системы криптохромов из регулирующих активность факторов.

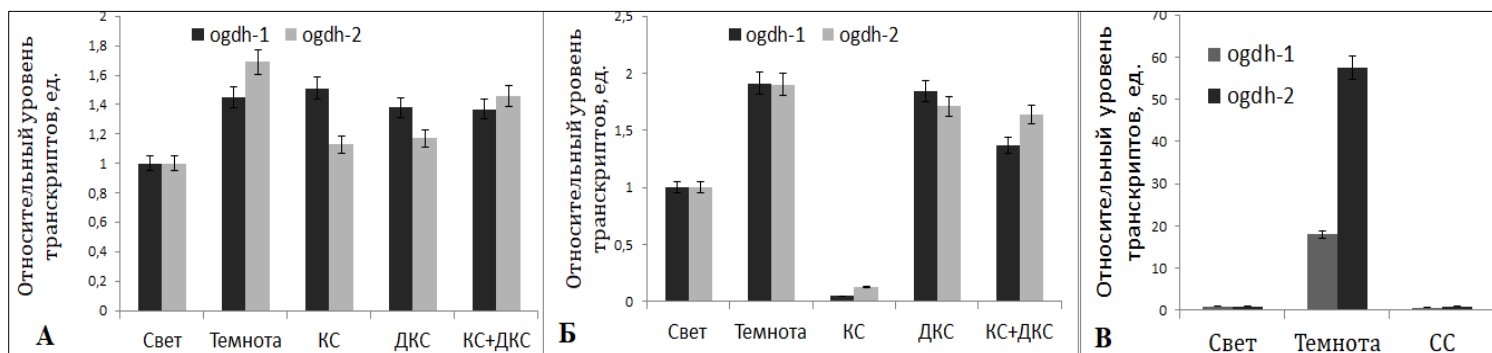


Рис.7 Влияние светового режима на относительный уровень транскриптов *OGDH1*, *OGDH2* в мутантах *A. thaliana*, нокаутных по гену *phyA* (А), *phyB* (Б) и *cry-4* (В)

Активность ГДГ при инсоляции белым и красным светом угнетается, что обусловлено переходом фитохрома в активное состояние (рис. 8А). Обратный эффект наблюдается при облучении ДКС - фитохром переходит в неактивную форму, что говорит о фитохром-зависимом механизме регуляции ГДГ.

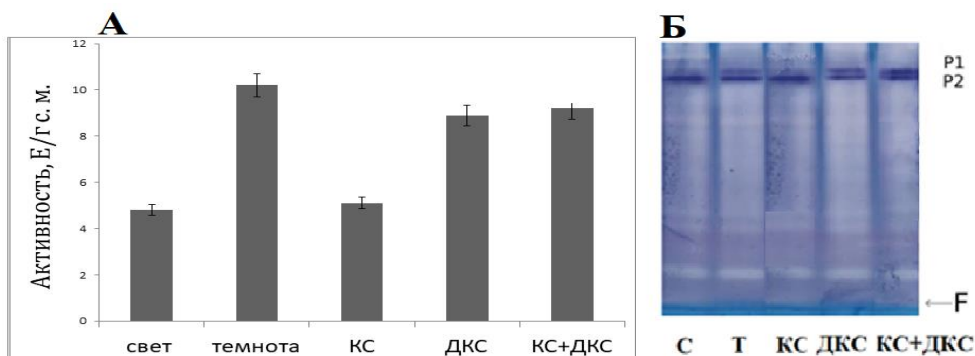


Рис.8 Активность митохондриальной ГДГ (А) при различном световом режиме и ее электрофореграмма (Б) в ПААГ. Р1,Р2 – белковые полосы; F – фронт красителя.

Высокие показатели активности ГДГ, зарегистрированные в растениях, находившихся в темноте, связаны с наличием двух изоформ ($R_f = 0.13$ и 0.17) (Рис. 8Б). У растений, экспонированных в обычных условиях, а также облученных КС выявлялась одна форма ГДГ ($R_f = 0.17$). Был установлен ингибирующий эффект действия белого и красного света на транскрипцию *GDH1* и *GDH2*, которая коррелировала с изменениями активности ГДГ (Рис. 9). Активация фитохрома при облучении растений КС индуцировала снижение содержания мРНК генов исследуемого энзима. Вероятно, существенное увеличение транскрипционной активности *GDH1* в темноте связано с синтезом формы ГДГ, поставляющей глутамат для образования аминокислот.

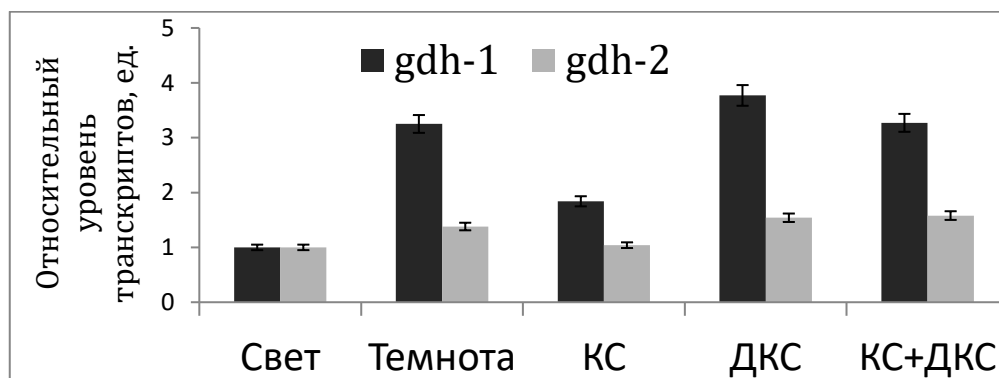


Рис. 9 Относительный уровень транскриптов генов *GDH1* и *GDH2* в листьях кукурузы при разных световых режимах

Применение ингибиторов транспорта ионов кальция показало отсутствие угнетающего эффекта действия красного света на ферментативную активность ГДГ, путём изменения транскрипционной активности генов *GDH1* и *GDH2*. Установлена роль кальций-зависимой регуляции функционирования этих генов. Анализ полученных данных свидетельствует о сложном влиянии светового режима на функционирование ГДГ в листьях кукурузы.

Установленный путь индукции ОД-активности в темноте и при облучении ДКС, а также ингибирующий эффект КС указывает на фитохром-зависимый механизм трансдукции светового сигнала в ядро (Рис.10). Паттерн экспрессии *DHAD1* коррелировал с характером общей ферментативной активности (Рис. 10Б). Увеличение степени метилирования промотора данного гена при облучении КС соответствовало модуляциям относительного уровня транскриптов *DHAD1*, хотя на свету и в темноте изменения в метильном статусе промотора не наблюдались.

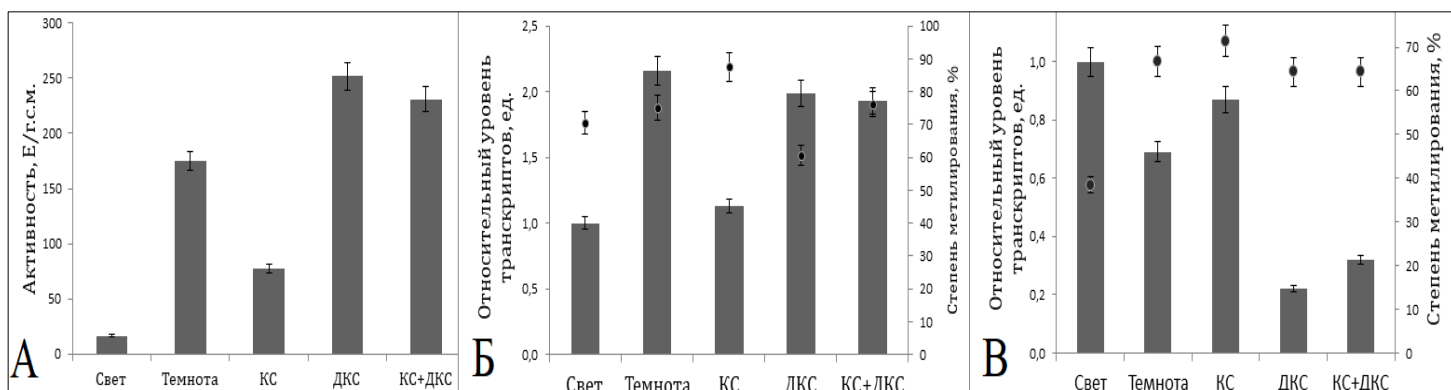


Рис. 10 Влияние света различных длин волн на общую ферментативную активность ОД(А) и на относительный уровень транскриптов генов *DHAD1*(Б) и *DHAD2*(В) в листьях кукурузы

Экспрессия *DHAD2*, наоборот, была выше на свету и при облучении КС, чем в темноте (Рис.10В). Корреляции между концентрацией мРНК при смене светового режима и степенью метилирования промотора исследуемого гена обнаружено не было.

Влияние гипоксии на функционирование ферментов метаболизма 2ОГ

Инкубация проростков кукурузы в гипоксических условиях с первых часов вызывает сильное снижение активности 2ОГДК (Рис. 11А), что коррелирует с уменьшением экспрессии генов *OGDH1* и *OGDH3* (Рис 11Б-В).

Изменение активности 2-ОГДГ в листьях кукурузы при гипоксии обусловлено состоянием генетического аппарата клетки. Колебания содержания транскриптов генов

OGDH1 и *OGDH3* сопряжены с изменением метильного статуса CG-динуклеотидов в их промоторах (Рис. 11Б-В). Эти результаты согласуются с имеющейся в литературе информацией о том, что 2ОГДК осуществляет контроль всего энергетического метаболизма клетки, в том числе и за счет переключения потока электронов через ГДГ на ГАМК-шунт (Igamberdievet al, 2006; Bouché, Fromm2004).

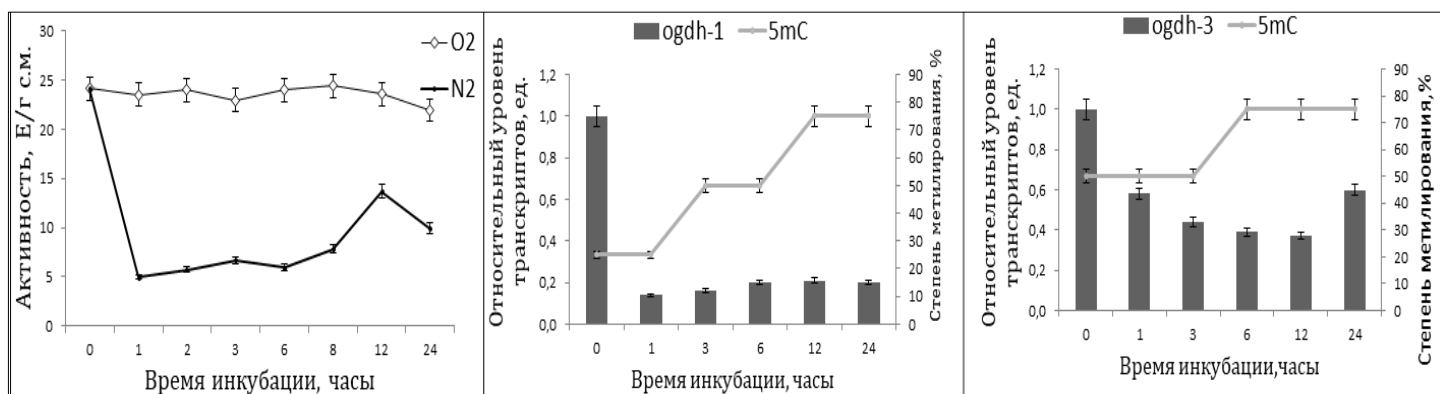


Рис. 11 Динамика ферментативной активности ГДГ (А) и относительного уровня транскриптов генов *OGDH1* (Б) и *OGDH3* (В) в листьях кукурузы при гипоксии. O₂- контрольная группа; N₂- опытная группа. Серой линией отмечена степень метилирования CG-динуклеотидов промотора (5mC, %).

В условиях действия гипоксии активность ГДГ увеличивается с первых часов инкубации (Рис. 12А), что обусловлено индукцией *GDH1*, который в геноме кукурузы кодирует β-субъединицу энзима (Рис. 12Б), активируя обходной путь через синтез глутамата (Renault, Roussel, 2010; Carillo, 2018). Стоит отметить, что изменения в экспрессии обоих генов сопряжены с колебаниями степени метилирования CpG-динуклеотидов в составе их промоторов. Синтез α-субъединиц существенно снижался за счёт инактивации *GDH2* (Рис. 12В). Обнаруженная индукция гена *SSADH1* ССАДГ при гипоксии подтверждает предположение об активации ГАМК-шунта.

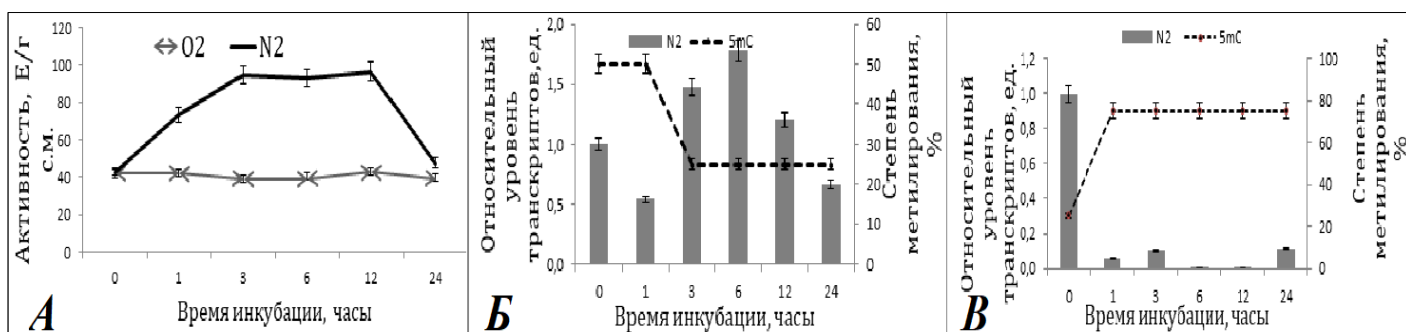


Рис. 12 Динамика ферментативной активности ГДГ (А) и относительного уровня транскриптов *GDH1* (Б) и *GDH2* (В) ГДГ в листьях кукурузы при гипоксии. Пунктирной линией показано изменение степени метилирования (5mC) CG-динуклеотидов в составе промотора.

Низкие концентрации кислорода вызывают первичное ингибирование ферментативной активности ОД, которое на третий час инкубации сменяется активацией (Рис.13А). Выявлено, что гипоксия стимулирует экспрессию генов *DHAD1* и *DHAD2* (Рис. 13Б-В).

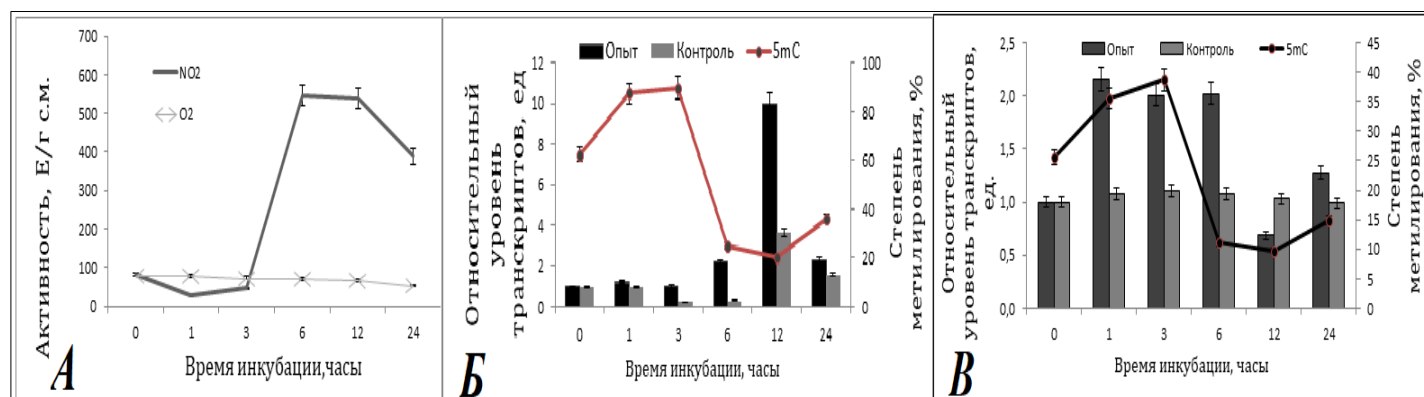


Рис.13 Динамика общей ферментативной активности ОД(А) и относительного уровня транскриптов *DHAD1*(Б) и *DHAD2*(В) в листьях кукурузы при гипоксии

Регуляция активности гена *DHAD1* в условиях гипоксии осуществляется на эпигенетическом уровне и обусловлена колебаниями степени метилирования CG-динуклеотидов в составе его промотора(Рис.13Б), в то время как изменения в метильном статусе промотора гена *DHAD2* не связаны с регуляцией транскрипции данного гена в условиях недостатка кислорода(Рис 13.В).

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 (Van Zelm et al., 2020). 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 (Skopelitis et al., 2006; Fontaine et al., 2012). 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, индуцируется *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 (Bouché, Fromm, 2004; Renault, Roussel, 2010; Carillo, 2018). Данное предположение подтверждается полученными результатами увеличения транскрипционной активности гена *SSADH1* ССАДГ в ответ на действие солевого стресса. Оксидитратдегидратаза, локализованная в хлоропластах, краткосрочно активизируется 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/деметиляции. На основе полученных данных разработана гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при действии солевого стресса (Рис. 14).

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 (Wedding, Black, 1971, Dubois et al., 2003). 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 20Г в листьях выступает субстратом для глутаматдегидрогеназы и идёт на синтез глутамата (Fontaine et al., 2012, 2013; Turano et al., 1997). 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 света различного спектрального состава на функционирование оксидитатдегидратазы показывает, что изофермент, катализирующий реакцию превращения оксидитрата в 2-оксоглутарат, более активен в темноте. Среди генов семейства *DHAD*, только ген *DHAD1* обнаруживает тот же паттерн световой регуляции, что и оксидитрат-зависимая активность. Показано, что ген *DHAD2* индуцируется на свету и не вносит существенного вклада в реакцию с оксидитратом, 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* репрессируется, вызывая снижение потока 2-оксоглутарата для поддержания ЦТК. Образующийся глутамат поступает на ГАМК-шунт, что подтверждается индукцией гена *SSADH1* сукцинат-семиальдегид-дегидрогеназой (Bouché, Fromm, 2004). При гипоксии оксидитратдегидратаза, 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.

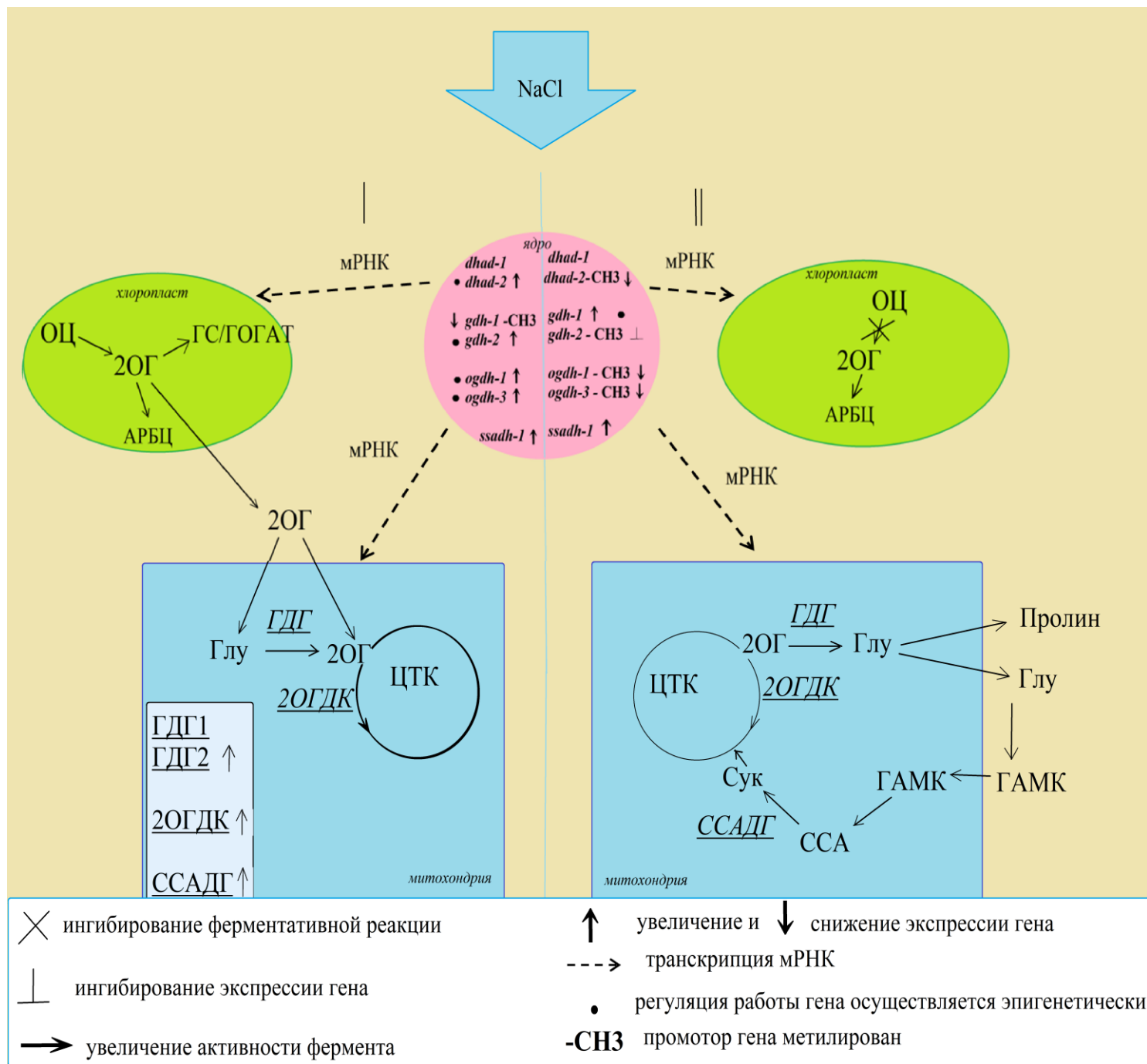


Рис.14 Гипотетическая схема регуляции функционирования ферментов, метаболизирующих 2-оксоглутарат в листьях кукурузы при действии солевого стресса. I- кратковременное воздействие NaCl (до 6 часов), II – долговременное воздействие (более 6 часов). Стрелками показано направление реакции. Сук- сукцинат, 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus, ВАК и РИНЦ:

1. Eprintsev, A. T., Fedorin, D. N., **Anokhina, G. B.**, Igamberdiev, A. U. Effects of light, anoxia and salinity on the expression of dihydroxyacid dehydratase in maize //Journal of Plant Physiology. – 2021. – Т. 265. – С. 153507. **Web of science (Q1)**
2. Епринцев, А. Т., Федорин, Д. Н., **Анохина, Г. Б.**, Гатауллина, М. О. Роль эпигенетических механизмов в регуляции активности 2-ОГДГ и МДГ в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при гипоксии //Физиология растений. – 2021. – Т. 68. – № 2. – С. 187-193. **Web of science**
3. Епринцев А. Т., Федорин, Д. Н., **Анохина, Г. Б.**, Седых, А. В. Молекулярно-биохимические аспекты световой регуляции 2-оксоглутаратдегидрогеназы в растениях //Физиология растений. – 2020. – Т. 67. – № 2. – С. 206-213. **Web of science**
4. Епринцев А. Т., **Анохина, Г. Б.**, Оя, П. С., Дедов, Я. И. Каталитические и молекулярные аспекты функционирования изоформ глутаматдегидрогеназы в кукурузе *Zea mays* L //Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57. – № 2. – С. 163-171. **ВАК**

5. **Анохина Г. Б.**, Дедов Я. И., Епринцев А. Т. Использование ионообменной хроматографии для получения гомогенного препарата глутаматдегидрогеназы из проростков пшеницы //Сорбционные и хроматографические процессы. – 2021. – Т. 21. – №. 3. – С. 400-407. **Scopus**
6. Епринцев А.Т., **Анохина Г.Б.**, Федорин Д.Н. Регуляция активности глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы *Zea mays* L. при изменении светового режима/ А.Т. Епринцев, Г.Б. Анохина, Д.Н. Федорин // Известия РАН. Серия биологическая. – 2021. - №6. - с 1-8 **ВАК**
7. **Анохина Г.Б.** и др. Влияние солевого стресса на функционирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса кукурузы (*Zea mays* L.) //Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2019. – №. 3. – С. 26-33.. **ВАК**
8. **Анохина Г.Б.**, Автореева Е.Л., Епринцев А.Т. Изменение транскрипции генов *dhad1* и *dhad2* в зеленых листьях кукурузы(*Zea mays* L.) при гипоксии/ Анохина Г.Б., Автореева Е.Л., Епринцев А.Т.// Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. — Воронеж, 2021.— №4. - С. 52-57. **ВАК**
9. **Анохина, Г. Б.**. Седых А. В., Епринцев А. Т. Анализ структуры промоторной области генов *OGDH1*, *OGDH2*, *OGDH3* 2-оксоглутаратдегидрогеназы кукурузы *Zea mays* L.// Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов.— 2020.— С. 12-19
10. **Анохина, Г. Б.**, П. С Оя, Автореева Е. Л., Вахрушева А. А. Влияние солевого стресса на функционирование глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы// Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов— 2021.— С. 19-22
11. **Анохина Г.Б. и др.** Филогенетический анализ глутаматдегидрогеназы растений// Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. –2018. –С. 26-30.
12. **Анохина Г.Б. и др.** Филогенетический анализ 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса растений //Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. –2017. –С. 27-31.
13. Дедов, Я. И., **Анохина Г. Б.**, Епринцев А. Т. Выделение и очистка глутаматдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы *Zea mays* L. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов.— 2020.— Вып. 22. - С. 46-52
14. **Анохина, Г. Б. и др.** Влияние солевого стресса на функционирование ГДГ в листьях кукурузы // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов.— 2021.— Вып. 23. - С. 19-22

Тезисы докладов

15. **Анохина, Г. Б.** Регуляция активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного ферментного комплекса в листьях кукурузы при солевом стрессе / Г. Б. Анохина, Т. Х. Т. Киеу, Н. В. Селиванова, А. Т. Епринцев // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: годичное собрание Общества физиологов растений России: сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.): в 2-х т. — Иркутск, 2018. — Ч. 1. - С. 93-97
16. **Анохина, Г. Б.** Влияние светового режима на функционирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного ферментного комплекса в листьях кукурузы *Zea mays* L. / Г. Б. Анохина, Флорес Каро Орландо де Хесус, Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев // Физиология растений -основа создания растений будущего : 9-й Съезд общества физиологов растений России, (Казань, 18-24 сентября 2019 г.) : тезисы докладов .— Казань, 2019. — С. 45
17. Оя П.С. Особенности функционирования глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы в гипоксических условиях : электронный ресурс / П.С. Оя , **Г. Б. Анохина** // Ломоносов - 2021 : материалы международного молодежного научного форума : Секция "Биология" .— Москва, 2021 .— С. 1-2
18. **Анохина Г.Б.** Действие солевого стресса на функционирование дегидратазы дигидроксикислот в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) : электронный ресурс / Г. Б. Анохина, Е.Л. Автореева // Ломоносов - 2021: материалы международного молодежного научного форума: Секция "Биология" .— Москва, 2021.- С. 1-2

№1 – 8 опубликованы в журналах, входящих в перечень списка ВАК