

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

**Никитина Марина Викторовна**

**МЕТАБОЛИТНАЯ И ЭКСПРЕССИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ  
АКОНИТАТГИДРАТАЗНОЙ И ИЗОЦИТРАТЛИАЗНОЙ  
АКТИВНОСТИ В РАСТЕНИЯХ С РАЗНЫМ ТИПОМ МЕТАБОЛИЗМА**

Специальность 03.01.05 – физиология и биохимия растений

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель –  
доктор биологических наук, профессор  
Епринцев Александр Трофимович

Воронеж – 2014

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Физиологическая роль аконитатгидратазы и изоцитратлиазы.....	12
1.1.1. Физиологическая роль аконитатгидратазы.....	12
1.1.1.1. Обзор роли цитрата и аконитатгидратазы в основных путях энергетического метаболизма.....	12
1.1.1.2. Характеристика фермента аконитатгидратазы.....	19
1.1.1.3. Локализация и изоферментный состав аконитазы.....	24
1.1.2. Физиологическое значение изоцитратлиазы.....	26
1.1.2.1. Обзор роли изоцитратлиазы в основных метаболических путях.....	26
1.1.2.2. Характеристика фермента изоцитратлиазы.....	27
1.1.2.3. Локализация и изоферментный состав изоцитратлиазы.....	28
1.2. Физико-химические и регуляторные особенности аконитатгидратазы и изоцитратлиазы.....	29
1.2.1. Физико-химические и регуляторные свойства аконитатгидратазы.....	29
1.2.1.1. Очистка аконитазы.....	29
1.2.1.2. Молекулярная масса аконитазы из разных объектов.....	30
1.2.1.3. Каталитические свойства аконитатгидратазы .....	31
1.2.1.4. Активаторы аконитазы.....	33
1.2.1.5. Ингибиторы аконитазы.....	35
1.2.1.6. Механизм действия фермента .....	35
1.2.2. Физико-химические и регуляторные характеристики изоцитратлиазы.....	37
1.2.2.1. Очистка изоцитратлиазы.....	37

1.2.2.2.	Молекулярная масса изоцитратлиазы из разных объектов.....	38
1.2.2.3.	Каталитические свойства .....	39
1.2.2.4.	Активаторы изоцитратлиазы.....	39
1.2.2.5.	Ингибиторы изоцитратлиазы.....	40
1.2.2.6.	Механизм действия изоцитратлиазы .....	40
1.3.	Молекулярные аспекты функционирования аконитатгидратазы и изоцитратлиазы.....	41
1.3.1.	Молекулярные аспекты функционирования аконитатгидратазы.....	41
1.3.2.	Молекулярные аспекты функционирования изоцитратлиазы.....	47
	Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	51
	2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
	2.1.1. Объекты исследования.....	51
	2.1.2. Методы исследования.....	52
	2.1.2.1. Определение активности изоцитратлиазы.....	52
	2.1.2.2. Определение активности аконитатгидратазы.....	52
	2.1.2.3. Выделение и очистка изоцитратлиазы.....	53
	2.1.2.4. Выделение и очистка аконитатгидратазы.....	53
	2.1.2.5. Определение концентрации белка.....	54
	2.1.2.6. Электрофоретические исследования белков.....	55
	2.1.2.6.1. Определение гомогенности ферментов.....	55
	2.1.2.6.2. Специфическое проявление изоцитратлиазы.....	56
	2.1.2.6.3. Специфическое проявление аконитатгидратазы.....	56
	2.1.2.7. Субклеточная локализация.....	57
	2.1.2.8. Регуляция изоцитратлиазы.....	58
	2.1.2.9. Регуляция аконитатгидратазы.....	58
	2.1.2.10. Идентификация генов <i>aco1</i> , <i>aco2</i> , <i>icl1</i> и <i>icl2</i> и их экспрессия.....	58

2.1.2.10.1. Выделение суммарной клеточной популяции РНК.....	58
2.1.2.10.2. Обратная транскрипция.....	59
2.1.2.10.3. Подбор праймеров.....	59
2.1.2.10.4. Проведение ПЦР в реальном времени.....	60
2.1.2.11. Статистическая обработка данных.....	61
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	63
2.2.1. Изоферментный состав аконитатгидратазы из растений с различным типом метаболизма.....	63
2.2.2. Изоферментный состав изоцитратлиазы из растений с различным типом метаболизма.....	66
2.2.3. Внутриклеточное распределение аконитазной и изоцитратлиазной активностей в тканях кукурузы.....	70
2.2.4. Внутриклеточное распределение аконитазной и изоцитратлиазной активностей в тканях амаранта.....	73
2.2.5. Внутриклеточное распределение аконитазной и изоцитратлиазной активностей в тканях сои.....	77
2.2.6. Очистка аконитатгидратазы из кукурузы.....	80
2.2.7. Исследование гомогенности и специфической активности аконитатгидратазы из кукурузы.....	82
2.2.8. Выделение и очистка аконитазы из сои.....	83
2.2.9. Исследование гомогенности препаратов аконитатгидратазы, очищенных из сои.....	84
2.2.10. Очистка аконитатгидратазы из амаранта.....	85
2.2.11. Электрофоретические исследования аконитатгидратазы из амаранта на гомогенность и специфическую активность.....	86
2.2.12. Сравнительный анализ этапов очистки аконитазы из различных растений.....	87
2.2.13. Анализ основных показателей очищенных препаратов изоцитратлиазы из различных растений.....	89

2.2.14. Электрофоретические исследования препаратов изоцитратлиазы, очищенных из кукурузы, сои и амаранта.....	90
2.2.15. Метаболитная регуляция активности аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях.....	93
2.2.15.1. Ингибирование функционирования изоферментов аконитатгидратазы транс-аконитатом.....	93
2.2.15.2. Регуляция активности аконитатгидратазы органическими кислотами.....	97
2.2.15.3. Действие интермедиатов глюконеогенеза на активность изоцитратлиазы .....	100
2.2.15.4. Влияние органических кислот на функционирование изоцитратлиазы из разных растений.....	103
2.2.16. Воздействие перекиси водорода на активность аконитатгидратазы.....	104
2.2.17. Регуляция активности изоферментов изоцитратлиазы перекисью водорода.....	109
2.2.18. Экспрессионная регуляция аконитазной и изоцитратлиазной активности при прорастании растений.....	109
2.2.18.1. Выделение тотальной клеточной РНК из кукурузы и амаранта и получение ее кДНК.....	110
2.2.18.2. Исследование экспрессии генов <i>aco1</i> и <i>aco2</i> при прорастании семян кукурузы.....	111
2.2.18.3. Исследование экспрессии генов <i>aco1</i> и <i>aco2</i> при прорастании семян амаранта.....	114
2.2.18.4. Экспрессия генов изоцитратлиазы в проростках семян амаранта.....	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
ВЫВОДЫ.....	124
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	127

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ТЕРМИНОВ

- АГ – аконитатгидратаза, аконитаза  
АМФ – аденозинмонофосфат  
АТФ – аденазинтрифосфат  
ГТФ – гуанозинтрифосфат  
ГЦ – глиоксилатный цикл  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДТТ – дитиотрейтол  
ДЭАЭ – диэтиламиноэтил  
ИЦЛ – изоцитратлиаза  
кДНК – комплементарная ДНК  
НАД<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид  
ПААГ – полиакриламидный гель  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
СФ – спектрофотометр  
ТЕМЕД - N,N,N',N' - тетраметилэтилен диамин  
ТАК – транс-аконитовая кислота  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот  
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Важнейшим направлением современной физиологии и биохимии растений является исследование ферментативных механизмов регуляции метаболических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность растительного организма. Несмотря на значительное количество исследований по аконитатгидратазе (АГ) (КФ 4.1.2.3.) и изоцитратлиазе (ИЦЛ) (КФ 4.1.3.1.), остаются невыясненными многие вопросы, связанные с их ролью в осуществлении функционирования цикла трикарбоновых кислот, глиоксилатного пути, а также метаболизма органических кислот и превращения двухуглеродных соединений в фотодыхании. Интенсивность и координация работы этих важнейших метаболических потоков осуществляется на разных уровнях организации ферментных систем и дифференциальной экспрессии их генов. Субклеточная локализация, изоферментный состав, метаболитная регуляция аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях с разным типом основного метаболизма практически не изучены. Для решения этих проблем необходимо проведение исследований, связанных с разработкой препаративных способов получения энзимов в электрофоретически гомогенном состоянии и выяснением их генетической детерминированности. Для установления генетической детерминации аконитазы и изоцитратлиазы необходима разработка специфических праймеров, которые позволят с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени выяснить дифференциацию экспрессии генов этих энзимов на разных стадиях онтогенеза. В данном исследовании использовались растения кукурузы и амаранта, являющиеся типичными представителями, осуществляющими фотосинтез по  $C_4$ -типу. Сравнительный анализ функционирования АГ и ИЦЛ из  $C_4$ -растений с аналогичными данными из  $C_3$ -растений (соя) позволит уточнить функциональную значимость этих энзимов. Кроме того, для

некоторых объектов исследований характерна способность к накоплению в больших количествах аконитовой кислоты в транс-форме (кукуруза). Неясным остается механизм метаболитной регуляции ферментативной активности ЦТК и ГЦ у объектов, называемых «аконитовыми аккумуляторами».

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлось исследование метаболитной и экспрессионной регуляции изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы, выделенных и очищенных до электрофоретически гомогенного состояния из кукурузы, сои и амаранта.

Для выполнения целей были поставлены следующие задачи.

1. Исследовать органную специфичность изоферментного состава аконитазы и изоцитратлиазы при прорастании растений.

2. Изучить субклеточную локализацию изоферментов АГ и ИЦЛ в кукурузе, сое и амаранте.

3. Получить в электрофоретически гомогенном состоянии изоферменты аконитатгидратазы и изоцитратлиазы из растений с помощью многостадийной схемы очистки.

4. Провести изучение типа и механизма ингибирования аконитатгидратазы из растений с помощью транс-аконитовой кислоты и других органических кислот.

5. Выяснить степень ингибирования изоцитратлиазной активности в кукурузе, сое и амаранте конечными продуктами глюконеогенеза.

6. Исследовать влияние активных форм кислорода (перекиси водорода) на функционирование изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы, выделенных из растений.

7. Подобрать специфические праймеры для идентификации генов аконитатгидратазы. Исследовать экспрессионную регуляцию генов аконитатгидратазы в проростках кукурузы и амаранта.



8. С помощью специфических праймеров для генов *icl1* и *icl2* и ПЦР-РВ исследовать зависимость уровня экспрессии генов на стадии прорастания.

9. Разработать гипотетическую схему регуляции функционирования изоферментов АГ и ИЦЛ на экспрессионном и метаболитном уровне.

**Научная новизна.** Результаты, полученные в диссертационной работе, имеют важное значение для понимания роли изоферментов АГ и ИЦЛ в механизмах трансформации метаболических потоков в растительной клетке. Субклеточная локализация изоферментов АГ и ИЦЛ свидетельствует об их участии в таких важнейших процессах, как ЦТК, глиоксилатный цикл, метаболизм органических кислот двухуглеродных соединений фотодыхания. Получены данные, свидетельствующие о важной роли транс-аконитата и конечных продуктов глюконеогенеза в регуляции функционирования митохондриальных и цитоплазматических изоформ аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях с различным типом основного метаболизма. Молекулярно-биологические аспекты исследований позволили разработать специфические праймеры для идентификации генов исследуемых энзимных систем и показать, что множественные молекулярные формы АГ и ИЦЛ являются изоферментами, то есть генетически детерминированными формами. Выявлено, что функционирование аконитазной и изоцитратлиазной активности регулируется экспрессией соответствующих генов, кодирующих эти ферменты.

**Практическая значимость.** Получение в электрофоретически гомогенном состоянии препаратов изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы из кукурузы, амаранта и сои позволяет использовать их в научно-исследовательских целях для изучения регуляторных особенностей ферментативных реакций, физико-химических характеристик ферментов. Кроме того, гомогенные препараты изоферментов могут служить в качестве маркеров для иммуноферментного анализа тканей организмов, находящихся в экстремальных условиях. Материалы диссертационной работы

используются в ходе учебного процесса на биолого-почвенном факультете ВГУ при чтении лекций по «Физиологии растений», «Биохимии», а также спецкурсов «Молекулярная биология», «Энзимология», «Метаболизм органических кислот» и др. Полученные данные используются при проведении практикумов и выполнении курсовых, бакалаврских и магистерских работ.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Аконитатгидратазная и изоцитратлиазная активности в проростках всех исследованных растений характеризуются наличием изоферментного состава, представленного двумя множественными молекулярными формами с различной относительной электрофоретической подвижностью. Для изоферментов характерна специфичная субклеточная локализация у исследованных растений.

2. Установлены особенности внутриклеточного распределения АГ и ИЦЛ. Аконитатгидратаза локализована в митохондриях и цитоплазме. Изоцитратлиаза связана с глиоксисомальной и цитозольной фракциями. Такое субклеточное распределение активности исследуемых ферментов обусловлено их физиологической ролью – обеспечением функционирования ЦТК, глиоксилатного цикла, метаболизма органических кислот и превращения двухуглеродных соединений фотодыхания.

3. Применение многостадийной схемы очистки, включающей гель-хроматографию и ионообменную хроматографию, позволяет получить электрофоретически гомогенные препараты изоферментов исследуемых энзимов из кукурузы, сои и амаранта.

4. Выявлены особенности метаболитной регуляции активности АГ и ИЦЛ. Установлено, что аконитатгидратаза ингибируется транс-аконитовой кислотой по конкурентному типу. Кроме того, митохондриальный изофермент аконитазы более чувствителен к транс-аконитату. Изоцитратлиазная активность сильно ингибируется конечными продуктами

глюконеогенеза (глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом).

5. Молекулярно-биологические исследования показали, что изучаемые изоформы АГ и ИЦЛ являются изоферментами, то есть генетически детерминированными белками. Профиль экспрессии генов АГ и ИЦЛ, осуществленный с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени, указывает на его корреляцию с динамикой аконитазной и изоцитратлиазной активности в прорастающих семенах растений.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на международных, региональных и университетских конференциях. Они были представлены на 14-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пущино, 2010), на 7-й съезде Общества физиологов растений России международной научной школе «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Н. Новгород, 2011), межрегиональных конференциях, посвященных памяти А. А. Землянухина «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013), ежегодных научных сессиях отчетной конференции преподавателей и сотрудников Воронежского госуниверситета.

**Публикации.** Основные результаты настоящей диссертационной работы изложены в 14 публикациях – 10 статьях и 4 тезисах.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (208 источников). Иллюстрационный материал включает 13 таблиц и 43 рисунка.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Физиологическая роль аконитатгидратазы и изоцитратлиазы

#### 1.1.1. Физиологическая роль аконитатгидратазы

##### 1.1.1.1. Обзор роли цитрата и аконитатгидратазы в основных путях энергетического метаболизма

Аконитаза наиболее известна за ее способность катализировать обратимую изомеризацию трикарбоновых кислот - цитрата, цис-аконитата и изоцитрата [162]. Цитрат является ключевым промежуточным продуктом в нескольких крупных энергетических путях и реакциях промежуточного метаболизма. В митохондриях, цитрат является промежуточным продуктом в цикле трикарбоновых кислот, в ходе которого ацетил-КоА преобразуется в две молекулы  $\text{CO}_2$  с сопутствующей выработкой  $\text{NADH}$  и  $\text{FADH}_2$ . При повторном окислении  $\text{NADH}$  и  $\text{FADH}_2$  через электрон-транспортную сеть образуется АТФ. Скорость протекания ЦТК частично контролируется величиной активности изоцитратдегидрогеназы через аллостерическое ингибирование АТФ и через ингибирование продуктами реакции  $\text{NADH}$  [98]. Таким образом, когда потребность в синтезе АТФ низкая, цитрат накапливается и может транспортироваться через внутреннюю мембрану митохондрий через трикарбоксилатный переносчик [206]. В цитозоле, цитрат является субстратом для АТФ-цитратлиазы, которая генерирует ацетил-коэнзим А ( ацетил-КоА), блокируя биосинтез холестерина и жирных кислот в печени и жировой ткани. Цитрат также метаболизируется цитозольной аконитазой и цитозольной  $\text{NADP}^+$ -зависимой изоцитратдегидрогеназой, чтобы генерировать  $\alpha$ -кетоглутарат. Этот процесс уменьшает количество  $\text{NADP}^+$  в  $\text{NADPH}$ , которые являются существенными кофакторами многих

ферментативных реакций, участвующих в метаболизме глутатиона и биосинтезе липидов и холестерина [136].

Цитрат является ключевым интермедиатом, который соединяет метаболические пути цикла трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование в митохондриях с гликолизом и синтезом жирных кислот в цитозоле. Когда необходимость синтеза АТФ является высокой, цитрат метаболизируется через ЦТК, чтобы генерировать  $\text{NADH}$  и  $\text{FADH}_2$ , восстановительные эквиваленты, необходимые для синтеза АТФ. Когда необходимость для синтеза АТФ низкая, цитрат экспортируется в цитозоль и направляется на биосинтез жирных кислот для запасания энергии.

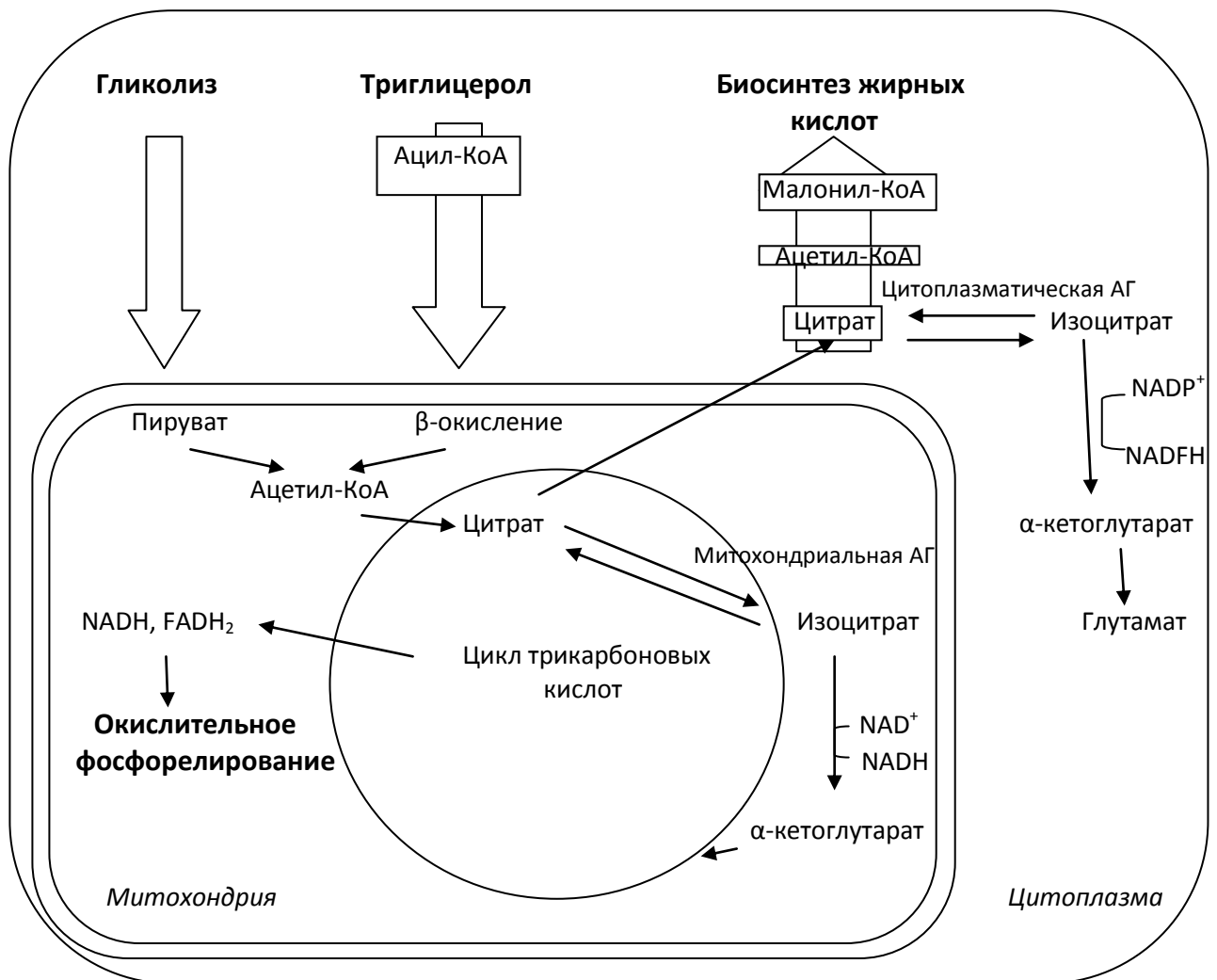


Рисунок 1. Обзор роли цитрата и аконитазы в основных путях энергетического метаболизма.

Ингибирование аконитазы из-за дефицита железа или окислительного повреждения Fe-S кластера может привести к снижению выработки АТФ, способствовать накоплению жиров, снижению темпов гликолиза, и уменьшать окисление жирных кислот.

Кроме того, снижение потока цитрата цитрат через с-аконитазу может снизить уровень синтеза NADPH в цитозоле, основного источника восстановительных эквивалентов для синтеза жирных кислот и защиту от окислительного стресса (рис.1).

Помимо роли интермедиата, цитрат также имеет регуляторное значение для гликолиза, синтеза жирных кислот и окисления. Цитрат является негативным регулятором гликолитического фермента фосфофруктокиназы [140]. Как только наблюдается отток цитрата из митохондрий, что происходит когда концентрации АТФ и NADH высоки, гликолиз будет подавляться. Цитрат также является аллостерическим активатором ацетил-КоА карбоксилазы, фермента, который генерирует малонил-коферментА [197]. С другой стороны, малонил-коферментА является мощным аллостерическим ингибитором карнитинпальмитолтрансферазы-1 [91], которая контролирует транспорт длинной цепи ацил-СоА в митохондрии, место окисления жирных кислот [51]. Увеличение концентрации малонил-СоА ингибирует процесс  $\beta$ -окисление жирных кислот и вовлекает ацетил-КоА в процесс липогенеза для накопления энергии. С другой стороны, снижение уровня малонил-СоА направляет длинную цепь ацил-СоА на  $\beta$ -окисление жирных кислот в митохондрии. Таким образом, через комплекс биологических эффектов, таких как продукция малонил-СоА, утилизация глюкозы, синтез жирных кислот и окисление, биология цитрата может повлиять на патофизиологию ожирения, резистентность к инсулину и диабету [203].

В многоклеточных организмах, сложная сеть процессов, участвующих в метаболизме энергии распределена среди различных субклеточных структур,

а также среди различных органов тела. Таким образом, система мембранного транспорта цитрата также играет существенную роль в метаболизме. Активность трикарбоксилатного переносчика в митохондриях, который выступает посредником экспорта цитрата, с низким содержанием в сердце и высоким - в печени, что отражает высокую потребность в АТФ в сердце и цитозольное расположение биогенеза жирных кислот в печени [201]. Кроме того, митохондриальный трикарбоксилатный переносчик подавляется при диабете типа I [191] и во время пищевой депривации [188], и усиливается при гипертиреозе [170]. Сыворотка содержит значительное количество цитрата (~ 0,1 мм), и уровни цитрата в сыворотке заметно изменяются между кормлениями и пищевой депривацией [152]. Недавние исследования дрозофилы показали, что снижение экспрессии цитрат-транспортера Indy в плазмалемме привело к снижению содержания липидов и увеличению продолжительности жизни [145].

### **Роль цитрата в специализированных клетках**

В холинергических нейронах, цитрат может использоваться для создания ацетил-КоА для синтеза ацетилхолина. В центральной нервной системе и сетчатке, аконитаза играет важную роль в метаболическом пути, который генерирует глутамат, основной возбуждающий нейротрансмиттер [132]. Сообщается также, что в связи с отсутствием пируваткарбоксилазы, нейроны способны синтезировать глутамат из глюкозы *de novo*, и, следовательно, зависит от источника глутамата и промежуточных соединений ЦТК, синтезированных в астроцитах [88]. Исследования, проведенные в первичных культурах показали, что цитрат синтезируется и высвобождается из астроцитов [44] и плазматической мембраны с помощью Na<sup>+</sup>-транспортеров, что как показано, выражено в головном мозге [202].

В тканях почек цитрат является важным ингибитором образования мочевого камня [62], и регуляция концентрации м-аконитазы осуществляется корой надпочечников, что влияет на экскрецию цитрата с мочой [164].

Секреция цитрата требует, чтобы скорость синтеза цитрата превышала скорость его окисления через ЦТК. Таким образом, в нормальных цитрат-секретирующих эпителиальных клеток предстательной железы, экспрессия м-аконитазы подавляется гормонами [96]. Повышение концентрации цинка может также ингибировать активность м-аконитазы [109], и может отвечать за нарушение окисления цитрата, наблюдаемое в нормальных эпителиальных клетках предстательной железы [192]. С другой стороны, при раке простаты, нормальные цитрат-секретирующие эпителиальные клетки метаболически преобразуются в злокачественные цитрат-окисляющие клетки, и истощение цинка в злокачественных клетках, как полагают, является важным фактором в этой метаболической трансформации [125].

#### **Цитрат как хелатирующий агент для двухвалентных ионов металлов**

Цитрат может хелатировать двухвалентные катионы, такие как  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , и  $\text{Zn}^{2+}$ , а также различные исследования показали, что цитрат имеет сложные функции в гомеостазе этих двухвалентных ионов металлов. Сыворотка цитрата считается одним из носителей железа, не связанным с трансферрином [85], что может способствовать загрузке печени железом при гемохроматозе [55]. Хотя было высказано предположение, что цитоплазматический цитрат может быть необходим для транспорта железа в митохондрии [99], эксперименты в пробирке и генетические исследования дрожжей показали, что комплексы цитрат-железа [178] могут способствовать автоокислению двухвалентного железа и может вызывать железозависимую интоксикацию [61]. Сыворотка цитрата может также повлиять на антикоагуляцию путем связывания  $\text{Ca}^{2+}$  [151]. Системная гипокальциемия вследствие хелатирования ионов  $\text{Ca}^{2+}$  цитратом, может угнетать функцию сердца, вызывая гипотонии, снижение сердечного выброса, остановку сердца [74]. Кроме того, относительно высокая концентрация (0,4 мМ) цитрата в цереброспинальной жидкости [47] и способность цитрата хелатировать ионы



$Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , как полагают, играет важную роль в регуляции активности рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) и возбудимости нейронов [153].

### **Цитоплазматическая аконитаза в регуляции метаболизма железа**

Биохимические и филогенетические исследования показали, что в процессе эволюции ферментов семейства аконитазы, раннее дублирование генов позволило цитозольной аконитазе развиваться независимо от митохондриальной аконитазы, а последующее дублирование цитозольной аконитазы произвело два цитозольных гомолога у животных, которые впоследствии приобрели способность связываться с РНК, и содержащие железо-реагирующий элемент (IRE) [72]. Таким образом, одноклеточные эукариоты, такие как *Saccharomyces Cerevisiae* [173] и простейшие паразиты, такие как *Trypanosoma brucei* [147], содержат один ген аконитазы который кодирует изоферменты, которые функционируют в цитозоле и в митохондриях, в то время как многоклеточные эукариоты имеют отдельные гены, кодирующие митохондриальную и цитоплазматическую АГ [45]. В случае с *C. elegans*, цитоплазматическая аконитаза не имеет способности связываться с РНК [149], тогда как в *Drosophila*, одна из двух цитоплазматических АГ также функционирует как РНК-связывающийся, железо-регуляторный белок (IRP) [162]. У млекопитающих, IRP1 переключается между аконитазной и РНК-связывающей функциями, в то время как IRP2 не имеет аконитазной активности и функционирует исключительно как РНК-связывающий белок [150].

Регуляция промежуточного метаболизма и внутриклеточного метаболизма железа железом и биогенезом Fe-S кластера в цитозоле и в митохондриях клеток млекопитающих. В митохондриях, ЦТК, дыхательные комплексы, и биосинтез гема, зависят от наличия железа и биогенеза Fe-S кластера. Кроме того, биогенез Fe-S кластера является ключевым фактором в регуляции гомеостаза железа как в цитозоле, так и в митохондриях. В большинстве тканей, в связи с низкой концентрацией кислорода и

эффективной сборки Fe-S кластера в IRP1, IRP2 предполагает большую роль в регуляции внутриклеточного гомеостаза железа, хотя значительный пул скрытой железо-связывающей активности IRP1 может быть активирован окислительным стрессом или снижением биогенеза Fe-S кластера. В митохондриях, снижение биогенеза Fe-S кластера приводит к накоплению железа в митохондриях и истощению запасов железа в цитозоле, что приводит к активации IRE-связывания IRP1 и IRP2, что может привести к изменению экспрессии TfR, ферритина, DMT1 и переносчика железа ферропортина. Помимо компарментализации процессов гомеостаза железа, пространственное разделение ассоциированных Fe-S кластеров в митохондриальной и цитоплазматической АГ также может позволить клеткам осуществлять анаболические и катаболические процессы в тонко скоординированной и эффективной модели.

Железо является жизненно важным микроэлементом, но избыток свободного железа цитотоксичен и отсутствие регуляции гомеостаза железа может способствовать реализации ряда гематологических, метаболических и нейродегенеративных заболеваний [98, 143]. В клетках млекопитающих внутриклеточный гомеостаз железа в основном достигается за счет железозависимой регуляции рецептора трансферрина (TfR) и накапливающего железо белка ферритина. мРНК TfR и ферритина содержат IRE в их нетранслируемых областях. В клетках с низким содержанием железа, связывание IRP1 и IRP2 к IRE приводит к стабилизации мРНК TfR и ингибированию трансляции мРНК ферритина, что приводит к увеличению TfR-зависимому поглощению железа и снижению поглощения железа ферритином. И наоборот, снижение IRP/IRE взаимодействия в клетках с высокой концентрацией железа, приводит к деградации TfR мРНК и трансляцией ферритина. Список IRE-содержащих транскриптов также включает в себя переносчик железа ферропортин [143] и один из сращенных форм транспортера ионов двухвалентных металлов DMT1 [196], хотя точная

роль IRPs в регуляции этих белков находится на стадии исследования.

Хотя IRP1 и IRP2 высоко гомологичны, они определяют уровень железа в цитоплазме с помощью различных механизмов. IRP2 регулируется посредством деградации белков в присутствии железа и кислорода. Различные исследования показали, что железо может участвовать в планировании IRP2 деградации путем прямого связывания с IRP2 или косвенно через механизм, который включает в себя гем или Fe(II),  $\alpha$ -кетоглутаратзависимые оксигеназы [96, 150]. В противоположность этому, IRP1 регистрирует концентрацию железа и наличие окислительного стресса в цитоплазме через его лабильный Fe-S кластер [150]. При отсутствии Fe-S кластера, IRP1 теряет аконитазную активность и связывается с IRE с высоким сродством. В условиях избытка железа, Fe-S кластер эффективно регенерируется, и IRP1 функционирует в основном в качестве аконитазы. Эксперименты *in vitro* показали, что IRP1 и IRP2 связывают с аналогичным сродством с IRE-содержащими транскриптами [110], а также исследования на крысах показали, что нехватка потребления железа может модулировать активность как IRP1, так и IRP2 в печени крыс [61].

Как упоминалось выше, присутствие IRE в мРНК митохондриальной аконитазы млекопитающих делает его потенциальной мишенью для регулирования IRPs. В самом деле, исследования показали, что дефицит железа приводит к уменьшению количества митохондриальной аконитазы [190], и более широкой утилизации цитрата в печени крыс, хотя увеличение липогенеза в печени в ходе исследования не наблюдалось [181].

### **1.1.1.2. Характеристика фермента аконитатгидратазы**

Фермент аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3) обеспечивает протекание реакции взаимного превращения трех трикарбоновых кислот – цис-аконитовой, лимонной и изолимонной. Название данного соединения по

международной номенклатуре – цитрат (изоцитрат) гидролаза [176], но очень часто его называют аконитазой. Это связано с тем, что официальное название не дает полного описания функции данного фермента, т.к. АГ является одновременно и изомеразой, обеспечивающей реакцию взаимного превращения цитрата и изоцитрата, и гидратазой, осуществляющей реакцию образования цис-аконитата.

К настоящему моменту показано, что АГ присутствует в организмах различных групп и уровней организации [41], что может объясняться участием этого фермента в превращениях, являющихся частью дыхательного метаболизма, в частности звеном цикла Трикарботовых кислот (Кребса). Функции данного фермента в живых клетках не ограничиваются лишь обеспечением протекания одной из реакций цикла Кребса. Значимость АГ определяется осуществлением протекания важнейших анаболических и катаболических процессов в клетке. Также функционирование АГ связано с глиоксилатным циклом, в процессе протекания которого у растений, микроорганизмов и низших животных образуются трикарбоновые кислоты, моно- и олигосахариды. Однако показано, что у разных групп живых организмов выявлены различные особенности функционирования АГ [104].

У микроорганизмов *Bacillus cereus* показано наличие двух форм АГ [66], одна из которых, проявляет максимальную активность при возрасте культуры 5 часов, в тот период, когда большинство органических кислот утилизируется через цикл Трикарбоновых кислот; вторая форма наиболее активна при возрасте культуры 12 часов, и, по-видимому, принимает участие в глиоксилатном цикле.

Роль фермента АГ в клетках животных организмов связана с катализом протекания процессов, связанных с энергетическими и синтетическими потребностями клетки.

Обнаружены цитоплазматическая и митохондриальная формы АГ в различных тканях животных клеток. Согласно исследованиям [124],

выделено процентное соотношение распределения митохондриальной и цитоплазматической АГ в клетках животных тканей. Относительное количество цитоплазматической формы АГ по сравнению с общей активностью в клетке составляет: 60-70% в клетках печени человека, 10-15% в клетках коры головного мозга кролика, 2% - в клетках сердца свиньи, 24% - в клетках коры почки свиньи, 70-80% - в клетках печени крысы.

Показано, что цитоплазматическая форма АГ обеспечивает протекание реакций, продукты которых имеют синтетическую важность; а митохондриальная – катализирует реакции, связанные с образованием энергии. Этим можно объяснить внутриклеточное распределение форм АГ, в зависимости от типа обмена ткани организма. В клетках мышечной ткани преимущественно идут реакции окисления субстратов через ЦТК для получения энергии, следовательно в этой ткани содержание митохондриальной формы является преимущественным. Напротив, в клетках печени и селезенки преобладают синтетические реакции, поэтому естественно преобладание цитоплазматической формы АГ.

В высших растениях функционирование АГ связано с несколькими аспектами. Имеются данные, что растительные клетки способны накапливать большие количества органических кислот, таких как аконитовая, лимонная, изолимонная, яблочная и др. В связи с тем, что первые три из них являются субстратами для АГ, не остаются сомнений, что этот фермент принимает участие в накоплении органических кислот в растительной клетке.

Роль АГ в клетках растений также связана с протеканием процессов катаболизма и анаболизма, осуществляемых через глиоксилатный цикл и цикл трикарбоновых кислот.

В клетках растений АГ обеспечивает протекание различных физиолого-биохимических процессов, заключающихся в распаде дыхательных субстратов, накоплением продуктов обмена, синтезом *de novo* разнообразных веществ в клетке. Значение АГ в процессе протекания конструктивного

метаболизма заключается в обеспечении работы глиоксилатного цикла. Данный синтетический процесс играет важнейшую роль при прорастании семян масличных растений, когда происходит превращение накопленного пула жирных кислот в форму углеводов. Многими авторами показано [205], что на начальных этапах прорастания семян значительно увеличивается активность маркерных ферментов глюконеогенетических процессов – изоцитратлиаза (КФ 4.1.3.1) и малатсинтаза (КФ 4.1.3.2) и др. В последующие дни, в связи с истощением запаса жиров, активность этих ферментов резко снижается.

Известно, что ГЦ локализован в специализированных органеллах – глиоксисомах, где у растений может происходить накопление ряда органических кислот, а также аминокислот. В связи с вышесказанным, можно предположить наличие у растений специализированной глиоксисомальной формы АГ, обеспечивающей протекание ГЦ.

К настоящему времени установлено [5] присутствие в растительных клетках цитоплазматической и глиоксисомальной форм АГ, из чего следует предположение о различных функциональных особенностях данных форм фермента.

Физиологическое значение синтеза органических кислот для растительного организма состоит в осуществлении интегральной связи между процессами дыхания и синтеза белков, жиров и др. [16, 43]. Имеются сведения об участии АГ в накоплении лимонной кислоты, которая содержится в клетках всех растений, а в значительном количестве может накапливаться в цитрусовых, бобовых и др. [122, 112]. Авторы делают предположение о возможности образования лимонной кислоты и через ЦТК, и через ГЦ, причем наиболее вероятным выступает второй путь.

Особое внимание следует уделить вопросу об образовании и накоплении аконитовой кислоты в растительных клетках, которая является доминирующей кислотой в листьях злаков и листьях аконитума [4, 174].

При функционировании ЦТК, под действие аконитазы, при дегидратации лимонной кислоты, образуется аконитовая кислота. Однако, проанализировав исследования [187], можно увидеть, что часть аконитовой кислоты может синтезироваться не в ЦТК и ЦДК, а посредством другого анаболического пути.

Подтверждением этому служит тот факт, что существуют растения, способные к накоплению аконитовой кислоты в транс-форме («аконитовые аккумуляторы») [8, 198]. Образование транс-формы аконитовой кислоты происходит при воздействии аконитатизомеразы на цис-изомер, который есть результат работы АГ. Известно, что в листьях кукурузы синтез трансаконитата образуется через цисаконитат и в цитоплазме, и в митохондриях [163]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что в животных клетках сильным конкурентным ингибитором аконитазы является трансформа аконитовой кислоты [159].

Обращая внимание на вышеперечисленное, а также на данные о возможности накопления некоторыми растениями транс-аконитовой кислоты, следует, что АГ в растительных клетках обладает большей устойчивостью к этому веществу. Имея данные о наличии митохондриальной и цитоплазматической форм АГ в растительных клетках, можно сделать предположение о более активном участии в накоплении трансаконитовой кислоты именно цитоплазматической формы АГ. На основании всего вышеперечисленного напрашивается вывод о функциональных различиях двух форм АГ – цитоплазматической и митохондриальной.

Приведенная выше информация свидетельствует о значительной роли АГ в протекании важнейших физиолого-биохимических процессах в растительной клетке, а также о полифункциональности этого фермента в зависимости от локализации в компартментах клетки.

### 1.1.1.3. Локализация и изоферментный состав аконитатгидратазы

Исследование внутриклеточного распределения, а также физико-химических характеристик форм АГ позволит выявить функциональную значимость этого фермента при протекании различных метаболических процессов в клетках живых организмов различных групп и уровня организации.

Согласно данным, полученным многими исследователями [17], в клетках животных организмов присутствуют две формы АГ — митохондриальная и цитоплазматическая, причем их соотношение варьировало в зависимости от типа исследуемой ткани. Например, изучение внутриклеточной локализации форм АГ в *Drosophyla melanogaster*, показало наличие ферментативной активности в цитоплазме (65% от общей величины активности АГ) и в митохондриальной фракции (35%), причем в цитоплазме обнаружено пять изоформ АГ, а в митохондриальной лишь три формы.

В исследованиях ряда ученых [69, 139, 146] показано присутствие у *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus niger* двух форм АГ, причем одна из них, с наибольшей молекулярной массой, способна к осуществлению протекания только одной реакции — превращения цитрата в цис-аконитат.

Изучение внутриклеточного распределения АГ в растительных клетках показало, что наибольшее количество фермента содержится в цитоплазме, то время как присутствие фермента в митохондриальной фракции является незначительным [111]. Например, количество митохондриальной АГ в процентном соотношении от общей активности фермента в клетке, из листьев *Brassica oleracea* составляет лишь 5%, в *Sinapis alba* — 17%, в *Vicia faba* — 13% .

В литературе [8] имеются данные об оптимальном значении рН для работы АГ из растительных клеток. При превращении цис-аконитата в



цитрат для АГ из митохондрий котиленонов люпина и проростков гороха данный показатель составил 6,5, а при превращении изоцитрата в цис-аконитат – 5,8.

Интересным представляется получение данных о присутствии АГ в глиоксисомах, микротельцах, в которых протекает глиоксилатный цикл. В глиоксисомах были идентифицированы все ферменты глиоксилатного цикла, причем процентное содержание, по сравнению с общим количеством в клетке, маркерных ферментов - изоцитратлиазы и малатсинтазы – составило 90% [9]. По мнению ряда исследований [11] процессы глюконеогенетического превращения запасных жиров в углеводы осуществляются в глиоксисомах и имеют следующий вид (рис.2).

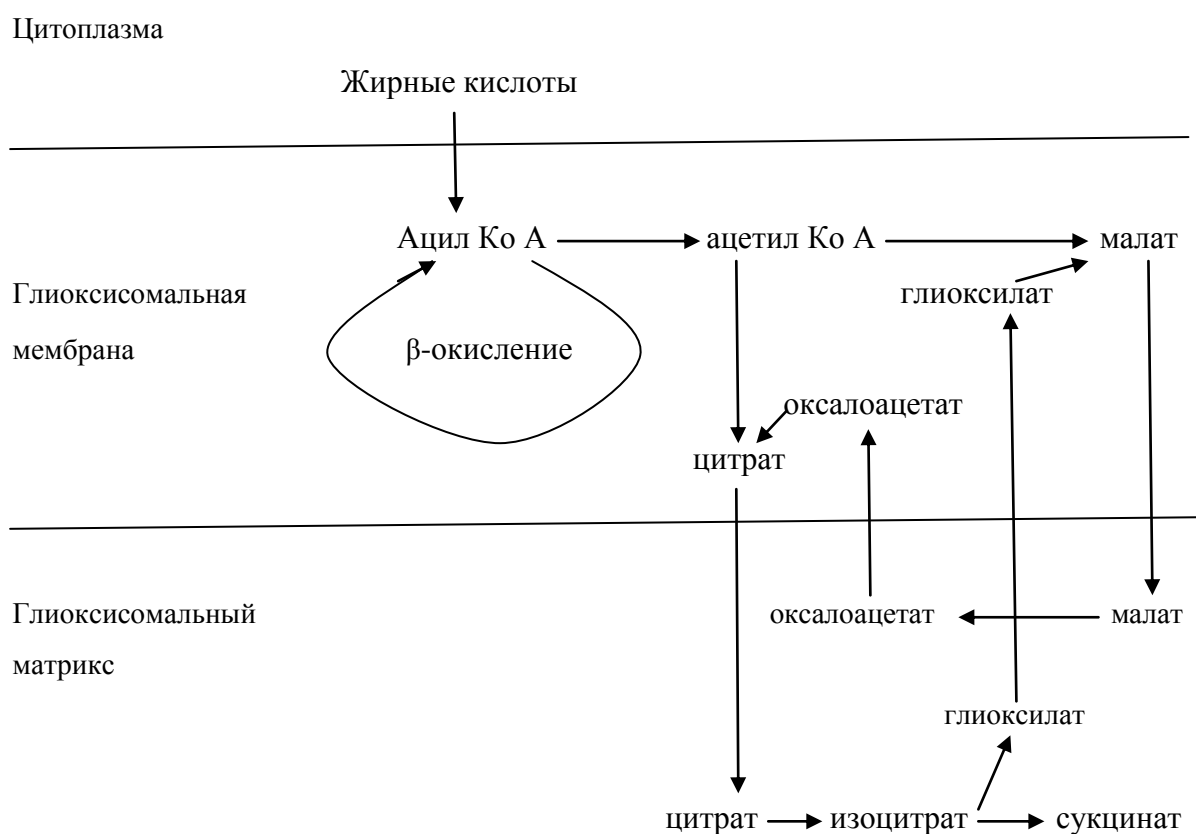


Рисунок 2. Схема процесса глюконеогенетического превращения запасных жиров в углеводы.

Как показывает данная схема, В-окисление жирных кислот локализовано в межмембранном пространстве, а процессы глиоксилатного цикла протекают в матриксе глиоксисомы, а также в межмембранном пространстве. Исходя из рисунка можно отметить, что для протекания данных процессов, необходимо наличие достаточного количества АГ в матриксе глиоксисомы.

## 1.1.2. Физиологическое значение изоцитратлиазы

### 1.1.2.1. Обзор роли изоцитратлиазы в основных метаболических путях

Глюконеогенез – это комплекс ряда метаболических процессов и циклов, суть которых заключается в превращении запасных жиров в форму углеводов. Данный процесс играет важнейшую роль при прорастании растений, старения и пищевой депривации организмов. Начальные два этапа глюконеогенеза ( $\beta$ -окисление жирных кислот и глиоксилатный цикл) протекают, преимущественно, в глиоксисомах, ЦТК осуществляется в митохондриях, а последующие процессы локализованы в растворимой части цитоплазмы.

Впервые глиоксилатный цикл был идентифицирован Корнбергом и Кребсом в 1957 году в клетках бактерий рода *Pseudomonas*, выращиваемых на ацетате [12]. У растений данный цикл был обнаружен в эндосперме клещевины [18]. В ходе глиоксилатного цикла протекают две реакции декарбоксилирования цикла трикарбоновых кислот, в результате чего имеется возможность использовать  $C_2$ -соединения в качестве субстрата для глюконеогенетических процессов [4].

Глиоксилатный цикл представляет собой пять реакций, причем суммарное уравнение имеет вид:



Имеются литературные данные, подтверждающие широкое распространение данного цикла в природе, причем у организмов различных таксономических групп и на разных физиологических этапах развития организмов [8].

Основной функцией глиоксилатного цикла у высших растений является конверсия запасных липидов в форму растворимых углеводов на этапах прорастания семян и спор (автотрофный тип питания).

Протекание глиоксилатного цикла установлено у различных растительных организмов, в частности у папоротников *Dryopteris filixmas*, *Polypodium vulgare* и хвоща *Equisetum arvense* [31], у голосеменных (некоторые виды сосны [37], а также в гинго [126]). Установлено, что интенсивность протекания глиоксилатного цикла напрямую связаны со степенью маслянистости семян. Наличие ГЦ было установлено для созревающих плодов банана [31], зрелых плодов авокадо [30].

Глиоксилатный цикл в тканях покрытосеменных растений распространен повсеместно, причем наличие активности маркерного фермента ГЦ – изоцитратлиазы может быть связано не только с глюконеогенезом, но и приспособлением организма к неблагоприятным условиям внешней среды.

### **1.1.2.2. Характеристика фермента изоцитратлиазы**

Изоцитратлиаза (КФ 4.1.3.1; трео-D<sub>s</sub>-изоцитрат-глиоксилат-лиаза) обеспечивает протекание обратимой реакции альдольного расщепления изоцитрата на сукцинат и глиоксилат, являясь высокоспецифичный энзимом. Изоцитратлиаза играет ключевую роль в протекании глиоксилатного цикла, а также принимает участие в биосинтезе серина и глицина, образовании щавелевой кислоты в клетках высших растений. У микроорганизмов ИЦЛ дает возможность использовать ацетат как единственный источник углерода.

### 1.1.2.3. Локализация и изоферментный состав изоцитратлиазы

На данный момент в литературных источниках имеются противоречивые данные о локализации ферментов глиоксилатного цикла и изоцитратлиазы в частности. Имеются данные о присутствии ферментов глиоксилатного цикла в жирозапасающих тканях высших растений исключительно в глиоксисомах, за исключением аконитатгидратазы, локализованной в цитозоле. Но последние данные по этому вопросу говорят о присутствии маркерных ферментов глиоксилатного цикла в фракции митохондрий при использовании метода изоплотностного центрифугирования у *Euglena gracilis* [33]. Ферменты глиоксилатного цикла у *Ascaris lumbricoides* присутствуют в специальном типе митохондрий, которые отвечают за протекание этого цикла [199], тогда как у нематоды *Coenorhabditis elegans* эти ферменты локализованы в глиоксисомоподобных микротельцах [193, 194].

Изучение локализации протекания реакций глиоксилатного цикла у высших животных показало присутствие активности маркерных ферментов в пероксисомах при использовании метода изоплотностного центрифугирования [2], данными гистохимии и световой микроскопии. В состояниях, вызывающих индукцию глюконеогенетических процессов, наблюдается рост числа пероксисом в клетках, а также их тесная связь с липидными и новообразованными гликогеновыми включениями [20].

Изоферментами называются формы энзима, генетически детерминированные, т.е. кодируемые различными генами, имеющими как правило различную локализацию в клетке и обеспечивающие протекание различных метаболических процессов.

При прорастании семян высших растений показано присутствие изоцитратлиазы в виде нескольких молекулярных форм [14], причем одна из которых обеспечивает протекание глиоксилатного цикла и находится в

глиаксисомах, а вторая не принимает участие в ГЦ и имеет митохондриальную локализацию [14]. У нематоды *Turbatrix acetii* было выявлено пять изоформ изоцитратлиазы, причем имеются данные об их связи с процессами старения организма [25]. У бактерии *Pseudomonas sp.*, растущей на питательной среде с добавлением ацетата и метиламина, идентифицированы две формы данного фермента [48]. В клетках печени крыс в состоянии пищевой депривации обнаруживается лишь одна форма ИЦЛ [19].

У льна и люпина было выявлено наличие двух форм изоцитратлиазы [194], тогда как в проростках *Pinus pinea* обнаружены три изоформы данного фермента [158, 121].

На основании имеющихся литературных данных можно сделать предположение, что множественность форм изоцитратлиазы обусловлена двумя факторами: генетической детерминированностью с одной стороны, и с активностью протеаз, способных отщеплять фрагменты полипептидной цепи, с другой стороны [115].

## **1.2. Физико-химические и регуляторные особенности аконитатгидратазы и изоцитратлиазы**

### **1.2.1. Физико-химические и регуляторные свойства аконитатгидратазы**

#### **1.2.1.1. Очистка аконитазы**

Впервые АГ получена в высокоочищенном состоянии из сердца свиньи путем многократного фракционирования сульфатом аммония и спиртом, где примеси составили 20-25% [40]. Более эффективными являются методы многостадийной очистки, основными стадиями которой являются: выпадение в осадок белка сульфатом аммония и спиртом, ионообменная хроматография

на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой или КМ-целлюлозой в зависимости от pH оптимума фермента, гель-хроматография на колонке с сефадексом G-100, G-150, G-200.

Японские ученые приводят данные [49] о получении высокоочищенного препарата АГ в кристаллическом виде из *Candida lipolytica*, которые выращивались на фторацетате, что индуцировало синтез АГ. Электрофорез в полиакриламидном геле показал гомогенность полученного препарата, при этом степень очистки фермента составила 100 раз.

В литературе встречаются данные и об очистке АГ из тканей растений [144], в частности АГ из листьев *Sinapis alba* АГ очищена до удельной активности 2 Е по реакции превращения изоцитрата в цис-аконитат.

Получение препаратов аконитазы в высокоочищенном состоянии позволило изучить физико-химические и регуляторные характеристики этого фермента из организмов различных групп и уровней организации.

#### **1.2.1.2. Молекулярная масса аконитазы из разных объектов**

Как показали литературные данные, значение молекулярной массы из организмов различных групп и уровней организации варьирует в достаточно широких пределах. Максимальное значение молекулярной массы получено ультрацентрифугированием из *Salmonella typhimurium* для цитратдегидрогеназы (реликтовый фермент) и составило 530000 Да [138]. Значение данного показателя для форм аконитазы «поздней» и «ранней» (как их назвали авторы) выявлено путем гель-фильтрации и составило 160000 Да и 80000 Да соответственно. Данные, полученные рядом авторов [71], свидетельствуют, что величина молекулярной массы АГ из *Candida lipolytica* составляет 68500 Да. Варьируют сведения, полученные о величине этой характеристики АГ из сердечной мышцы свиньи в зависимости от способа определения. Так, при использовании метода ультрацентрифугирования,

молекулярная масса АГ составила 89000 Да, тогда как при работе с колонкой, наполненной сефадексом, она равнялась 66000 [137].

### 1.2.1.3. Каталитические свойства аконитатгидратазы

Как известно, аконитатгидратаза обладает каталитической активностью в отношении трех субстратов, а именно цитрата, изоцитрата, цис-аконитата. При этом установлено, что лишь один изомер изоцитрата 2R-3S, из четырех возможных, является субстратом для АГ, что может быть связано с стереоспецифичностью энзима [97]. В системе, известной как аконитазное равновесие, цитрат является преобладающим соединением, при этом существует ряд факторов, которые оказывают влияние на смещение данного равновесия, среди них: ионная сила раствора, наличие кофакторов в среде, температура. Примерные значения величин концентраций кислот в равновесной системе составляют: цитрата – 88,4%, изоцитрата – 7,5%, цис-аконитата – 4,1% [107]. Прослеживается определенная закономерность во взаимопревращениях этих трех кислот, в частности цис-аконитат преобразуется в цитрат и изоцитрат с одинаковыми скоростями, а цитрат и изоцитрат превращаются в цис-аконитат быстрее, чем друг в друга. Напрашивается вывод о том, что АГ осуществляет реакцию гидратации и дегидратации быстрее, чем реакцию изомеризации, а показатель максимумов для этих субстратов увеличивается в следующем порядке: цитрат, изоцитрат, цис-аконитат [102].

Проанализировав литературные данные о величинах таких характеристик АГ, оптимальное значение концентрации ионов водорода в среде, сродство к различным субстратам, энергия активации и др, можно увидеть вариабельность данных показателей фермента из организмов различных групп и уровня организации.

Проведенные исследования оптимального значения рН для аконитазы

определили различия в величинах данного показателя в зависимости от природы используемого буфера, в частности для фосфатного – 7,7, глицерофосфатного – 7,5, веронал-ацетатного – 8,6, N-этил-морфолинового – 8,1. Значение рН оптимума для АГ из листьев *Sinapis alba*, по данным исследователей, составило 8-8,5 в трис-буфере, из ревеня – 7,2.

Из печени крысы были выделены и идентифицированы цитоплазматическая и митохондриальная формы аконитазы, что позволило определить рН оптимум для работы форм фермента, при этом, показано, что для цитоплазматической формы фермента этот показатель составил 7,3, а для митохондриальной формы – 5,8 и 7,3 [93]. Такое же значение оптимальной концентрации ионов водорода в среде получено для митохондриальной АГ из люпина. Такое низкое значение величины этой характеристики может быть обусловлено увеличением проницаемости мембраны митохондрий для субстрата при снижении рН.

Исходя из литературных данных, величина сродства аконитатгидратазы к субстратам имеет значительный разброс у организмов разного уровня организации и систематических групп. Например, сродство АГ из сердца свиньи к цис-аконитату составило 0,015 - 0,19 мМ, к цитрату – 0,62 - 3,6 мМ, к изоцитрату – 0,2 - 0,6 мМ. Показано, что аконитаза из растительных организмов обладает в 20 раз меньшим сродством к цитрату, чем энзим из животных тканей, а именно, по данным литературы [79],  $K_m$  для АГ из листьев горчицы составила 4 мМ, а  $K_m$  для АГ из печени быка – 0,2 мМ. При использовании изоцитрата как субстрата для АГ, фермент их животных тканей имел большее только в пять раз значение показателя сродства энзима к субстрату [42]. Не смотря на присутствие вариабельности, можно отметить, что максимальное сродство АГ наблюдается при использовании в качестве субстрата цис-аконитовой кислоты.



#### 1.2.1.4. Активаторы аконитазы

Научные исследования показали, что активность аконитазы из сердца свиньи может сохраняться в течение длительного времени в присутствии цистеина и двухвалентных ионов железа [46]. Последние принимают непосредственное участие в реакции взаимодействия между ферментом и субстратом, образуя тройной комплекс: фермент – субстрат – металл, причем связь между АГ и субстратом осуществляется через ион железа. Имеются сведения, что для активации аконитазы, выделенной из дрожжей, необходима предварительная инкубация [52].

Данные по изучению оптических спектров аконитатгидратазы, очищенной из сердца свиньи, показали широкую не специфическую адсорбцию в пределах от 320 до 600 нм, что может быть связано с наличием ионов железа [135]. По-видимому, на 1 моль аконитатгидратазы содержится 3 атома железа. Есть сведения, полученные методом атомной абсорбции о содержании 1 моль железа на 89000 г АГ из сердца свиньи, и 0,8 моль при использовании ESR спектроскопии. Данный показатель представляет собой высокий спин трехвалентного иона железа. Видимо он представляет собой не каталитический, а структурный компонент, что может быть подтверждено отсутствием его взаимодействия с субстратом и возможностью его удаления ЭДТА. Выполнение железом интегральной функции также подтверждается одинаковым спектром поглощения для активной и инактивированной форм АГ из сердца свиньи [73].

Доказано увеличение активирующего эффекта железа при его действии с цистеином, в отличие от инкубации АГ только лишь с цистеином, что может объясняться восстанавливающей функцией цистеина, который поддерживает ион железа в восстановленной двухвалентной форме, причем цистеин может быть заменен другими восстановителями, но с снижением эффекта [83].

Данные об активирующем влиянии на АГ из растительных тканей носят противоречивый характер. Так, учеными сообщается об активировании митохондриальной аконитатгидратазы из тканей заразики [134]. В работах [168] имеются сведения о максимальном активирующем эффекте, наблюдаемом при инкубировании АГ из проростков гороха и вигны с железом и восстановителями [165]. В опытах доказано, что активность АГ и листьев *Glycine max* возрастает и стабилизируется при действии ионов двухвалентного железа. Также есть утверждения, что ионы двухвалентного железа способны стабилизировать активность аконитатгидратазы при хранении.

Исследования влияния недостатка железа в почве на активность аконитатгидратазы из листьев горчицы доказали, что в листьях растений, выращенных в условиях железодефицита, исследуемая величина составила лишь половину от таковой в контроле. При устранении недостатка железа в питательной среде, активность АГ восстанавливалась до нормального уровня, но в экстрактах при добавлении железа и восстановителей, исследуемый показатель не увеличивался ни в нормальных, ни в железодефицитных листьях [198].

В работе [21] приводятся данные о влиянии ионов двухвалентного железа на активность аконитатгидратазы из *Sinapis alba*. После получения АГ в высокоочищенном состоянии с применением таких стадий очистки, как гель-фильтрация через колонки с сефадексом и диализ, величина активности в присутствии ионов двухвалентного железа и цистеина не изменялась, следовательно был сделан вывод о независимости каталитических свойств АГ растительных организмов от железа. В пользу этого вывода в качестве аргумента можно привести данные о содержании количества железа в белке, которое явилось не значительным и составило лишь 0,21 мкг на мг белка.

### 1.2.1.5. Ингибиторы аконитазы

В исследованиях многих ученых [38] приведены данные об инактивации АГ в присутствии хелатирующих соединений таких как пиколовая кислота, фенантролин. Действие данных соединений имеет неконкурентный характер и снимается при добавлении в среду ионов двухвалентного железа.

Также показано, что ингибирующий эффект наблюдается при добавлении в среду веществ, вступающих в реакцию с сульфгидрильной группой, например, иодобензоат, оксибензоат, хлористая ртуть [204].

Для аконитатгидратазы из животных тканей определен специфический ингибитор конкурентного типа – фторцитрат, причем значение константы ингибирования фторлимонной кислотой для аконитазы из печени крысы составило  $10^{-6}$ М, а из сердца свиньи -  $2,9 \cdot 10^{-4}$ М [39]. АГ из растительных тканей обладает в 2000 раз меньшую чувствительность к данному соединению, что может объясняться способностью растительных организмов накапливать фторацетат, тогда как в животных тканях фторацетат превращается в фторлимонную кислоту – сильнейший ингибитор АГ.

Встречаются и другие ингибиторы аконитатгидратазы, работающие по конкурентному типу, среди них: фумарат, транс-аконитат, оксалоацетат и некоторые аналоги цитрата [8].

### 1.2.1.6. Механизм действия

К настоящему моменту сложилось мнение, что аконитатгидратаза из тканей животных организмов имеет один активный центр. В пользу данного утверждения можно привести ряд аргументов, например, оптимальное значение концентрации ионов водорода в среде для всех реакций, катализируемых АГ [1]. Помимо этого стоит отметить, что при добавлении в среду одинаковых концентраций цитрата и изоцитрата, скорость образования

цис-аконитовой кислоты будет равняться средней величине скоростей дегидратаций субстратов, а не сумме этих скоростей [190].

Исследования с применением изотопов дейтерия показали, что возможно прямое взаимопревращение цитрата и изоцитрата, минуя цис-аконитат [144]. Методы x-лучевой кристаллографии и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР позволили получить данные об образовании аконитазо- $\text{Fe}^{2*}$ -субстратного комплекса, который является ключевым звеном в механизме действия аконитатгидратазы [190]. Были идентифицированы металлосвязанные конфигурации ионизированной цитратной гидроксильной группы в виде комплексов тетроионизованных онов цитрата с двухвалентным железом, что дало возможность сделать предположение о присоединении иона двухвалентного железа к аконитазе двумя из своих шести координационных связей и образует комплекс с цитратом, причем прикрепление идет по трем точкам (отсюда строгая стереоспецифичность) [9]. АГ отщепляет водород от второго углеродного атома цитрата, который превращается в карбанион, а гидроксильная группа от третьего углеродного атома переносится на двухвалентное железо. Аконитазо- $\text{Fe}^{2*}$ -комплекс вращается вокруг осей его координационных связей, переносит ОН-группу от  $\text{Fe}^{2*}$  ко второму углеродному атому. Водород, отщепленный аконитатгидратазой раньше, возвращается снова к третьему углеродному атому; по такой схеме образуется изоцитрат. Цис-аконитовая кислота находится в связанном состоянии с АГ, но может производиться ее отщепление и образование цис-аконитовой кислоты в свободном виде [9].

На основании полученных данных о присутствии в активном центре аконитазы из сердца свиньи остатка аргинина, исследователи разработали модель активного центра аконитатгидратазы, которая учитывает наличие в нем сульфгидрильной группы цистеина и двухвалентного железа. Данная модель предполагает наличие одного связывающего участка для субстратов и ингибиторов АГ [16].

Авторы данной модели механизма действия АГ считают, что группа цистеина и двухвалентное железо представляют собой каталитические группы, а остаток аргинина – связывающая группа.

Данная модель механизма действия аконитазы предусматривает обратимую гидратацию в транс-положении и логично доказывает высокую стереоспецифичность фермента. Имеются предположения, что процесс окисления и восстановления железа играет определенную роль в реакциях превращения цис-аконитовой кислоты в лимонную и изолимонную кислоты.

## **1.2.2. Физико-химические и регуляторные характеристики изоцитратлиазы**

### **1.2.2.1. Очистка изоцитратлиазы**

На данный момент имеются данные о получении очищенного до гомогенного состояния препарата изоцитратлиазы из многих видов различных организмов, в частности бактерий [192], клещей [64], насекомых [6], крыс [19], грибов [108], высших растений [10]. Для получения очищенной ИЦЛ из нематоды *Caenorhabditis elegans* применялась следующая схема очистки: высаливание сульфатом аммония (предел насыщения 33-55%), хроматография на колонках с Сефарозой 6В и ДЭАЭ-целлюлозой [13], в результате получен гомогенный препарат, удельная активность составила 2 Е/мг белка, а выход - 4%. Имеются определенные закономерности при разработке схемы очистки ИЦЛ: основными стадиями являются фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрация на различных сефадексах и ионнообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой.

Имеются научные публикации о получении очищенной до гомогенного состояния изоцитратлиазы из печени крыс и реактивированных куколок

бабочки [36]. Для осуществления очистки применяли разработанную схему с модификациями для определенных объектов исследования, при этом очищены препараты изоцитратлиазы из куколок бабочек *Papilio machaon* L., причем удельная активность составила 5.5 ферментативных единиц на 1 мг белка, выход в 6%, а степень очистки 98 раз [36], Изоцитратлиаза из печени крыс, подверженных пищевой депривации, получена в гомогенном очищенном состоянии с активностью 9.5 ферментативных единиц на 1 мг белка, степень очистки 110 раз и выход 8% [15].

#### 1.2.2.2. Молекулярная масса изоцитратлиазы из разных объектов

Исследования молекулярной массы изоцитратлиазы показали что данный фермент имеет субъединичное строение, причем количество субъединиц является четным, а молекулярная масса составляет  $60 \pm 8$  кДа. Очищенный препарат ИЦЛ, полученный в гомогенном состоянии из нематоды *Caenorhabditis elegans* имел молекулярную массу 250 кДа, при этом состоял из четырех субъединиц, вес каждой из которых составил 61,1 [195]. Также в литературе имеются данные исследований молекулярной массы ИЦЛ из семян *Lupinus*, согласно которым данная характеристика составляет 260 кДа, а нативный фермент является тетрамером, который состоит из субъединиц с  $M_r$  66 кДа [76]. Изоцитратлиаза из куколок *P.machaon* имеет молекулярную массу  $138 \pm 5$  кДа [32], из печени крыс -  $180 \pm 5$  кДа [29]. Молекулярная масса ИЦЛ у высших растений колеблется в достаточно широких пределах, так у кукурузы она равняется 104 кДа [22], у клещевины - 140 кДа [14], у люпина - 175 кДа [10], у огурца - 260 кДа [8], у льна 264 кДа [8], у сосны 270 кДа [8].

### 1.2.2.3. Каталитические свойства

Оптимальное значение концентрации ионов водорода в среде для проявления наиболее высокой активности изоцитратлиазы составляет 7,5, и зависит от природы используемого буфера. Так, максимум активности изоцитратлиазы семян *Lupinus* находится в области pH 7,0 – 7,5 [141]. Исследования показали, что для эмбрионов клещей *Hyalomma dromedarii* оптимальное значение pH для ИЦЛ в фосфатном буфере составило 7,4 [75], для щитков кукурузы - 7,4 – 7,5 по лиазной реакции и при pH 7,0-7,1 по синтазной реакции [75], для ИЦЛ из *E. coli* - pH 7,3 [75].

Исследовав литературные данные, можно сделать заключение что изоцитратлиаза подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, за исключением фермента, выделенного из *Chlorella vulgaris* (ИЦЛ проявляет аллостерические свойства) [80].

### 1.2.2.4. Активаторы изоцитратлиазы

Как показали опыты по исследованию выявления активирующего воздействия металлов на изоцитратлиазу, таким свойством обладают ионы  $Mg^{2+}$ , причем их концентрация достигала значения 5 мМ [50]. Также активирующее воздействие на ИЦЛ оказывают ионы  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  в связи с их способностью замещать  $Mg^{2+}$ , необходимый для стабилизации фермент-субстратного комплекса.

Также для проявления максимальной активности ИЦЛ, необходимо наличие восстанавливающих агентов в среде, таких как ЭДТА, глутатион, дитиотрейтола. Необходимость присутствия восстанавливающих агентов можно объяснять их способностью поддерживать тиольные группы фермента в восстановленном состоянии.

В ходе исследования было установлено, что именно комплекс  $Mg^{2+}$  с изоцитратом является истинным субстратом для взаимодействия с ИЦЛ [180].

#### 1.2.2.5. Ингибиторы изоцитратлиазы

Интересным остается вопрос о метаболической регуляции активности изоцитратлиазы. Имеются данные об ингибировании ИЦЛ из бактерий такими важными клеточными интермедиатами, как фосфоенолпируват, пируват, но у более высокоорганизованных организмов такой тенденции обнаружено не было.

Существуют данные об ингибирующем воздействии цитрата на активность изоцитратлиазы из растительных объектов, что было подтверждено исследованиями, проведенными на нашей кафедре [8].

Имеются исследования, в которых изучено и доказано ингибирующее влияние клеточных метаболитов на активность изоцитратлиазы, так из семян сои ИЦЛ конкурентно ингибируется сукцинатом, 3-фосфоглицератом, и глюкозой, неконкурентно – D-малатом и по смешанному типу глюкозо-6-фосфатом [169].

Существуют данные, доказывающие ингибирование активности ИЦЛ ионами металлов, таких как ( $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) [142].

#### 1.2.2.6. Механизм действия

Согласно литературным данным, изоцитратлиаза является очень высокоспецифичным ферментом по отношению к субстратам как в прямой, так и в обратной реакциях. За проявление каталитической активности и поддержание конформационно-активного состояния ответственны имидазольная, гуанидиновая и сульфгидрильная группы.  $C_5$  и  $C_6$ -



карбоксильные группы изоцитрата образуют связи с имидазольной группой. Предположительно, ионы магния стабилизируют данное состояние, а реакция протекает через образование фермент-магний-субстратного комплекса. Повидимому, гуанидиновая группа принимает участие во взаимодействии с  $C_1$ - карбоксильной группы, вследствие чего образуется напряжение в молекуле изоцитрата (за счёт перераспределения электронной плотности), и следовательно разрыв  $C_2$ - $C_3$ -связей. В результате образуется карбанион сукцината и протонированный глиоксилат. Вполне вероятно, что глиоксилат в момент освобождения сукцината связан с сульфгидрильной группой цистеина [90].

### **1.3. Молекулярные аспекты функционирования аконитатгидратазы и изоцитратлиазы**

#### **1.3.1. Молекулярные аспекты функционирования аконитатгидратазы**

Аконитаза катализирует реакцию обратимой изомеризации цитрата в изоцитрат через промежуточный продукт цис-аконитат. Две изоформы аконитазы были обнаружены во всех эукариотических клетках: митохондриальная аконитаза, которая участвует в цикле трикарбоновых кислот и цитозольная аконитаза, которая участвует в нескольких процессах, таких как метаболизм цитрата в цитозоле [95, 183] и глиоксилатный цикл [117, 119]. Стоит также отметить, что аконитазы являются многофункциональными белками. В дополнение к ферментативной активности, было показано, например, что митохондриальная аконитаза из дрожжей является компонентом митохондриального нуклеоида и может взаимодействовать с митохондриальной ДНК [114], в то время как цитозольная аконитаза обладает РНК-связывающей активностью, связанную

с гомеостазом железа у животных и устойчивостью к окислительному стрессу как животных, так и растений [128].

Семейство аконитатгидратаз было подробно описано только у *Arabidopsis* [129, 130, 131]. Тем не менее, большое количество растительных геномов, секвенированных в полном объеме в последние годы, позволяет провести широкий филогенетического анализа у этих видов. Интересным вопросом остается роль генов аконитаз у цитрусовых в кислотном гомеостазе, а также изучение их экспрессии в нескольких кислотных и бескислотных генотипах цитрусовых.

Для того чтобы определить кДНК, кодирующую белки *Aco*, проводили поиск BLASTX с EST-маркерами, доступными в GenBank, с использованием аминокислотных последовательностей *Aco* белков арабидопсиса. Тот факт, что все EST-маркеры объединены в 3 гена показывает, что семейство аконитатгидратаз из цитрусовых состоит, по крайней мере, из трех единиц транскрипции. Три гена были также представлены в *A. thaliana*, единственного вида растения, у которого семейство семейство было описано подробно [154].

Один кДНК-клон, представляющий каждую единицу транскрипции, был выбран из нормализованной полной длины гена в геной библиотеке, построенного из различных тканей и органов на разных стадиях развития и под воздействием различных абиотических стрессов [148, 182]. Клоны IC0AAA40BB02RM1, IC0AAA5BE08RM1 и IC0AAA7DC07RM1 секвенировали, в результате чего были получены 3 последовательности 3218, 3331 и 3433 п.н. соответственно, которые были представлены в GenBank. Концептуальный перевод из последовательностей кДНК показал, что клоны IC0AAA40BB02RM1, IC0AAA7DC07RM1 и IC0AAA5BE08RM1, содержащие ORFs кодирующие белки, от 900, 898 и 898 аминокислот, соответственно, названные *aco1*, *aco2* и *aco3* гены, на основе их сходства с генами *Arabidopsis* (табл. 1). Ген аконитазы из *Citrus limon*, о котором

говорились ранее [GenBank: AF073507], был на 99% идентичен *aco3* из *C. Clementina*.

Таблица 1. Гены аконитатгидратазы из *Citrus limon*.

Гены	Клон кДНК	Асс N°	Длина мРНК	Позиция стартового кодона	Позиция стоп-кодона	Длина ORF	Длина белка, аа
<i>Aco1</i>	IC0AAA40BB02RM1	FN552254	3218	103	2805	2700	900
<i>Aco2</i>	IC0AAA7DC07RM1	FN552256	3433	520	3216	2694	898
<i>Aco2</i>	IC0AAA5BE08RM1	FN552255	3331	443	3139	2694	898

Сравнение белков *Arabidopsis* и *Clementine* с помощью ClustalX обнаружило высокую степень консервативности между шестью белками, с 627 идентичными остатками и 142 консервативными заменами, представляющими общее сходство более 85%.

```

Col_Aco1 674 NFGDSITTDHISPAGSIHKDSPAACYLMERGVDRRDFNSYGSRRGNDEIMARGTFANIRL [34] 733
Ath_Aco1 674 NFGDSITTDHISPAGSIHKDSPAACYLMERGVDRRDFNSYGSRRGNDEIMARGTFANIRI [34] 733
Ath_Aco3 666 NFGDSITTDHISPAGNIQKDSPAAKFLMERGVDRKDFNSYGSRRGNDEIMARGTFANIRI [34] 725
Col_Aco3 703 NFGDSITTDHISPAGSIHKDSPTAKYLLERGVDRRDFNSYGSRRGNDEVMARGTFANIRL [34] 762
Col_Aco2 674 NFGDSITTDHISPAGSIHKDSPAACYLLERGVDRKDFNSYGSRRGNDEVMARGTFANIRI [34] 733
Ath_Aco2 771 NFGDSVTTDHI SPAGNIQKTS PAAKFLMDRGVISED FNSYGSRRGNDEVMARGTFANIRI [34] 830
      *****:*****:.*:* **:*:*:*:*:*** .*****:*****:*****:

Col_Aco1 734 GHDTVILAGAEYSGSSRDWAAKGPMLLGVKAVIAKSFERIHRSNLVGMG [1] IPLCF [12] 801
Ath_Aco1 734 GRDTIILAGAEYSGSSRDWAAKGPMLLGVKAVISKSFERIHRSNLVGMG [1] IPLCF [12] 801
Ath_Aco3 726 GEDTIIILAGAEYSGSSRDWAAKGPMLQGKAVIAKSFERIHRSNLVGMG [1] IPLCF [12] 793
Col_Aco3 763 GHGTIILAGAEYSGSSRDWAAKGPMLLGVKAVIAKSFERIHRSNLVGMG [1] IPLCF [12] 830
Col_Aco2 734 GHETIVLAGAEYSGSSRDWAAKGPMLLGVKAVIAKSFERIHRSNLVGMG [1] IPLCF [12] 801
Ath_Aco2 831 EQDTIILAGAEYSGSSRDWAAKGPLLGVKAVIAKSFERIHRSNLAGMG [1] IPLCF [12] 898
      . * : : *****:*****:*****: * *****:*****:*****: *****

Col_Aco1 802 GHERYTIDL 811
Ath_Aco1 802 GQELYTIEL 811
Ath_Aco3 794 GHERYTIHL 803
Col_Aco3 831 GHERFSIDL 840
Col_Aco2 802 GHERYTINL 811
Ath_Aco2 899 GHERYTVHL 909
      ** * : : : *

```

Рисунок 3. Сравнительный анализ предшественников белков у *Arabidopsis* и *Clementine*.

Анализ предшественников белков у цитрусовых с помощью PFAM [175] показал сохранение каталитического домена [189], из чего можно сделать предположение, что белки цитрусовых способны катализировать взаимопревращение изоцитрата и цитрат через цис-аконитат (рис. 3).

С целью изучения эволюционной истории семейства аконитатгидратаз в растениях, были найдены последовательности аконитатгидратазы генов у видов двудольных растений: *Populus trichocarpa* [164], *Vitis vinifera* [61], *Carica papaya* [157], *Ricinus communis* [61], *Medicago truncatula* [159], and *Glycine max* [61]; и видов однодольных растений: *Oryza sativa* [61], *Zea mays* [61], *Sorghum bicolor* [157], *Brachypodium distachyon* [164]; а также у мха *Physcomitrella patens* [61]. С помощью поиска в BLASTX определены 3 гена аконитатгидратазы у всех видов. У сои и тополя обнаружены 6 и 4 генов АГ соответственно (табл.2).

Чтобы понять физиологические роли генов *CcAco1*, *CcAco2* и *CcAco3* у цитрусовых и их участие в контроле уровня фруктовых кислот, проводился RT-PCR анализ экспрессии генов АГ на различных этапах созревания фруктов из отборных сортов мандаринов, апельсинов и лимонов.

Количественный RT-PCR анализ позволил выявить транскрипты для генов *CcAco1*, *CcAco2* и *CcAco3*, определив, что эти последовательности соответствуют функциональным генам аконитазы. Экспрессия гена *CcAco3* наблюдалась на низких уровнях на протяжении всех этапов развития плодов во всех сортах цитрусовых, используемых для данного исследования. Таким образом, эти исследования предполагают, что *CcAco3* не будет глубоко вовлечен в процесс восстановления кислотности, который локализован в цитозоле в период созревания и, что продукт работы гена *CcAco3* может иметь митохондриальную локализацию и, следовательно, принимать участие в цикле трикарбоновых кислот, локализованном в митохондриях. Тем не менее, цитозольная и митохондриальная компартиментализация не являются

взаимоисключающими, поскольку имеются доказательства одновременной локализации АГ у растений и дрожжей в цитоплазме и митохондриях [178].

Таблица 2. Гены аконитатгидратазы у растений.

Название вида	ORF Acc. N <sup>0</sup>	Protein Acc. N <sup>0</sup>	Локус	Класс аконитаз	Associated ESTs
<i>A. thaliana</i>	NM_119749	NP_195308	At4g35830	Aco1	47
	NM_126589	NP_178634	At2g05710	Aco2	183
	NM_118831	NP_567763	At4g26970	Aco3	131
<i>C. clementina</i>	FN552254	CBE71056	-	Aco1	46
	FN552256	CBE71058	-	Aco2	93
	FN552255	CBE71057	-	Aco3	35
<i>C. papaya</i>	DS981532	-	-	Aco1	7
	DS981607	-	-	Aco2	1
	DS981526	-	-	Aco3	14
<i>M. truncatula</i>	CR932965_17	-	MT060719-3729.M00012	Aco1	61
	AC173287_15	-	MT060719-39496.M00013	Aco2	40
	AC144481_23	-	MT060719-2520.M00023	Aco3	2
<i>P. trichocarpa</i>	XM_002327692	XP_2327728	POPTRDRAFT_593790	Aco1	29
	XM_002331719	XP_2331755	POPTRDRAFT_585679	Aco1	4
	XM_002301587	XP_2301623	POPTRDRAFT_816803	Aco2	57
	XM_002321090	XP_2321126	POPTRDRAFT_246575	Aco2	5
<i>R. communis</i>	XM_002530589	XP_002530635	RCOM_0782740	Aco1	2
	XM_002524138	XP_002524184	RCOM_0487910	Aco2	12
	XM_002532518	XP_002532564	RCOM_0082520	Aco3	0
<i>V. vinifera</i>	XM_002263301	XP_2263337	LOC100242027	Aco1	29
	XM_002279224	XP_2279260	LOC100256776	Aco2	18
	XM_002278102	XP_2278138	LOC100253811	Aco3	38
<i>G. max</i>	BT095399	-	Glyma01g36750	Aco1	435
	AK286137	-	Glyma11g08550	Aco1	61
	-	-	Glyma06g46190	Aco3	38
	AK244974	-	Glyma12g10580	Aco3	25
	AK286541	-	Glyma12g32000	Aco3	55
	-	-	Glyma13g38480	Aco3	55
<i>Z. mays</i>	NM_001165757	NP_001159229	LOC100304315	Aco1	188
	NM_001143012	NP_001136484	LOC100216599	Aco4	301
	NM_001153959	NP_001147431	-	Aco5	128

В общем, увеличение экспрессии генов *CcAco1* и *CcAco2* наблюдается начала в течение 150 дней. Таким образом, индукция этих генов совпадает или немного предшествует пику кислотности. Это говорит о том, что продукты генов *CcAco1* и *CcAco2* предположительно связаны с функцией цитозольной аконитазы метаболизировать цитрат в период созревания [184].

Интересно, что плоды *Clemenules* не показали индукцию гена *CcAco2*, это наблюдение свидетельствует о возможной мутации в регуляторных областях этого гена, так как в кодирующей последовательности никаких изменений не было обнаружено. Несмотря на отсутствие индукции гена *CcAco2* в *Clemenules*, кислотность и уровни мРНК генов *CcAco1* и *CcAco2* у *Fortune* были по-прежнему выше, чем в *Clemenules*. Таким образом, различия в количестве лимонной кислоты между этими двумя сортами может быть связано с дополнительными регуляторными этапами, такими как активность мембранных транспортеров, опосредующих отток цитрата из вакуоли при созревании [87]. Хотя механизмы, контролирующие компартментализацию цитрата в цитрусовых, остаются до конца не выясненными, несколько регуляторных точек были предложены для транспортировки цитрат-аниона по всему тонопласту, в том числе термодинамический транспорт через анионные каналы [185] и активный АТФ-зависимый механизм транспорта [185]. Выяснение механизмов, участвующих в контроле компартментализации цитрата, может помочь понять различия в уровнях кислотности обнаруженные между этими разновидностями мандаринов.

Самые высокие уровни мРНК генов *CcAco1* и *CcAco2* были обнаружены в мякоти бескислотного апельсина *Sucreña*. Сверхэкспрессия этих генов когда лимонная кислота продуцируется в митохондриальном матриксе, транспортируется в цитозоль и затем в вакуоль, может быть причиной бескислотного фенотипа сорта, так как более высокая активность аконитазы будет снижать уровень лимонной кислоты, не допуская его накопление в вакуолях.

Сравнение *Dulce*, представителем бескислотных лимонов, с *Fino*, представителем лимонов с нормальной кислотностью, не показало существенных различий в экспрессии предполагаемых цитозольных генов аконитазы. Это говорит о том, что за фенотипы апельсинов (*Sucreña*) и лимонов (*Dulce*) отвечают различные механизмы. Было показано, что на начальных стадиях развития плодов лайма, частичное ингибирование ферментативной активности митохондриальной аконитазы допускает продукцию больших количеств лимонной кислоты в на начальных стадиях развития плода. Это снижение активности коррелирует с увеличением концентрации цитрамалата - конкурентного ингибитора аконитазы [74]. В бескислотном сладком лайме, уровень цитрамалата был ниже [74], предполагая, что бескислотный фенотип этого сорта в основном связан с синтезом лимонной кислоты, вместо удаления лимонной кислоты из цитоплазмы. Эта возможность совпадает с наблюдением, что в бескислотном лимоне сорта *Dulce*, экспрессия генов, вовлеченных в перемещение цитрата была на нормальном уровне, а уровень экспрессии одного аконитазного гена, наблюдаемого при 79 и при 116 DPA, был немного увеличен.

Исследователями был сделан вывод о том, что, несмотря на накопление в больших количествах лимонной кислоты в лимонах, содержание мРНК гена *CcAco2* аконитазы было сравнимо с его концентрацией в апельсинах и мандаринах. Это предполагает, что цитрат, в процессе созревания лимона, не может быть доступен для аконитазы; а также это может свидетельствовать о регуляторных различиях в переносчиках тонопласта.

### **1.3.2. Молекулярные аспекты функционирования изоцитратлиазы**

Исследование молекулярных аспектов функционирования изоцитратлиазы у *E.coli* подтвердило наличие гена *Icl* в области ацетатного оперона, при этом регуляция этого гена осуществляется с помощью

специального белка-репрессора IclR [77]. В результате изучения механизма регуляции ИЦЛ у *S. cerevisiae* были получены данные об инактивации фермента глюкозой, что осуществляется посредством цАМР-зависимой протеинкиназой [56]. Также выявлены данные о том, что промоуторный участок, ответственный за начало синтеза изоцитратлиазы, является общим для генов, которые кодируют ферменты глюконеогенетических процессов [177, 179].

Проведенные исследования механизмов индукции глюконеогенеза и глиоксилатного цикла в частности из печени позволили сделать следующие заключения. Регуляция метаболизма липидов осуществляется посредством жирных кислот, что в свою очередь активирует рецепторы пролиферации пероксисом, образуется гетеродимер с рецептором ядра – ретиноидом X. На примере жирового тела у грызунов, показано, что при активировании вышеуказанного гетеродимера экспрессируется ген фосфоенолпируваткарбоксикиназы путем связывания с двумя областями, расположенными между 451 – 439 и 999 – 987 п.н., [172]. Также, доказан интересный факт, что в прокариотических и эукариотических клетках, которые были выращены на среде с глюкозой, гены которые кодируют ферменты, обеспечивающие протекание глюконеогенетических процессов, оказались выключенными [53]. Но в случае роста организмов в присутствии альтернативных источников углерода (например лактата, ацетата, глицерола), наблюдается экспрессия генов, которые кодируют ферменты глюконеогенеза [59]. Также получены данные об ингибировании гена ИЦЛ глюкозой посредством воздействия на две области (801-569 и 421-379 п.н.), при этом ацетат способен увеличивать транскрипцию данного гена через другие две области, расположенные в 728-569 и 370-356 п.н.

В результате проведенных исследований можно сделать вывод о совместном регулировании генов, кодирующих ферменты глюконеогенеза.,



причем рецепторы пролиферации пероксисом в этом случае играют роль координаторов [108].

Недавние исследования позволили дать характеристику гену изоцитратлиазы из метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* [56]. Посредством скрининга геномной библиотеки *P. Pastoris*, была найдена последовательность продукта гена ИЦЛ, что позволило клонировать данный ген методом ПЦР при помощи вырожденных праймеров. Проведенные исследования позволили получить размноженный ген ИЦЛ, который имел открытую рамку считывания размером 1563 н.п., при этом белок, полученный в результате секвенирования имел в своем составе 551 аминокислот [118].

Изучение данного вопроса на объекте *Strongyloides stercoralis* позволило получить белок, состоящий из 450 аминокислот [120].

Получены данные об идентификации нескольких генов изоцитратлиазы из семян сосны *Pinus taeda* L. Выявлено, что в структуре кДНК имеются открытые рамки считывания размером 1740 и 1729 п.н., при этом размеры белков составили 580 и 573 аминокислотных остатков, соответственно [54]. Идентичность полученных аминокислотных последовательностей составляет 79%, а для изоцитратлиазы из покрытосеменных растений этот показатель составил 75%. Исследования с использованием РНК-блот анализа выявили, наличие в небольших количествах мРНК ICL 8 и ICL 12 в гаметофитах зрелых семян, а также было показано, что на этапах прорастания семян уровень экспрессии этих генов заметно увеличивался. В период старения гаметофита также наблюдалась экспрессия генов ИЦЛ в небольших количествах. Имеются предположения о транскрипционной природе временного регулирования экспрессии генов изоцитратлиазы, а также о значительной роли посттранскрипционной модификации [57].

Изучение и анализ структуры генов изоцитратлиазы из *Brassica napus* L. с помощью современным методов молекулярной биологии, таких как

сиквенс нуклеотидов, рестрикционной картирование, ДНК блот-гибридизационный анализ кДНК и геномных клонов, позволили сделать заключение о присутствии шести генов, кодирующих ИЦЛ. Данные гены можно разбить на два подсемейства на основании различий в 5' и 3' нетранслируемых областях генома. Было показано, что имеет место накопление мРНК изоцитратлиазы на этапах прорастания, а также эмбриогенеза, причем экспрессия ряда генов ИЦЛ наблюдается на каждой из стадий развития растения.

## Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1.1. Объекты исследования

В данной работе проводились исследования растительных объектов с различным типом метаболизма, следовательно, в качестве объектов исследования использовались:

- семядоли четырехдневных проростков сои *Glycine max L.*, сорт «Игор», выращенных гидропонным способом при температуре 25°C;
- щитки четырехдневных проростков кукурузы *Zea mays* сорта «Воронежская 76», выращенные гидропонным способом при температуре 25°C;
- прорастающие семена амаранта *Amaranthus caudatus L.* сортов «Рыжик», выращенные гидропонным способом при температуре 25°C.

Для выделения АГ навеску исследуемого материала массой 2,0 г растирали на холоде со средой выделения следующего состава: 100 мМ Трис-НСl буфер, (рН 8.0), с добавлением 10мМ цитрат натрия, 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ ДТТ, в соотношении 1:10. Чтобы очистить гомогенат от неразрушенных тканей, его фильтровали, далее центрифугировали при 5 тыс.g в течение 15 мин [27].

Для выделения ИЦЛ и гомогенизации 1 грамма использовали среду (соотношение 1/5): 50 мМ Tris-НСl, рН 7,5; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>; 5 мМ ДТТ; 3 мМ ЭДТА. Для осаждения неразрушенных тканей использовали метод центрифугирования, которое проводили в течение 5 минут при 5000g.

## 2.1.2. Методы исследования

### 2.1.2.1. Определение активности изоцитратлиазы

Активность изоцитратлиазы определяли с помощью спектрофотометрического метода на спектрофотометре СФ-2000. Коэффициент молекулярной экстинкции составил  $0,18 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  при длине волны равной 324 нм. Измерения проводили в среде калориметрирования с добавлением 20 мкл гомогената. Среда спектрофотометрирования для определения активности изоцитратлиазы включала следующие компоненты: 50 ммоль/л Tris-HCl буфер, pH 7,5; 5 мМ изоцитрат натрия; 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 4 ммоль/л фенилгидразин солянокислый. В основе данного метода лежит факт образования комплекса фенилгидразина с глиоксилатом, который поглощает при 324 нм [27].

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за одну минуту при  $25^\circ\text{C}$  и оптимальном значении pH.

### 2.1.2.2. Определение активности аконитатгидратазы

Активность аконитатгидратазы определяли спектрофотометрически на СФ-2000 по разнице поглощения цитрата и изоцитрата по сравнению с цис-аконитовой кислотой при 240 нм по увеличению оптической плотности раствора.

Среда спектрофотометрирования представляла собой 100 мМ Tris-HCl-буфер, pH 8,0; 50 мМ цитрат натрия. Данный метод определения активности основан на учете увеличения оптической плотности при 240 нм за 5 мин, что свидетельствует об образовании продукта реакции (цис-аконитата), содержащего в своей структуре двойные связи [27].

За единицу ферментативной активности принимали такое количество аконитатгидратазы, которое обеспечивало образование 1 микромоль цис-аконитат за 1 мин при  $t = 25^{\circ}\text{C}$  и  $\text{pH}=8,0$ .

Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$\Phi\text{E} = \frac{0,984 * D * V_1}{t * V_2}$$

Где: 0,984 - пересчетный коэффициент

D - прирост оптической плотности при 240 нм

$V_1$ - полный объем вытяжки, мл

$V_2$ - объем внесения, мл

t – время, мин.

### **2.1.2.3. Выделение и очистка изоцитратлиазы**

Для очистки изоцитратлиазы из различных объектов исследования была использована следующая схема:

1. Гомогенизация материала.
2. Высаливание сульфатом аммония в пределах 0-70 % насыщения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .
3. Гель-фильтрация на сефадексе G-25.
4. Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Исследования проводились с использованием линейного градиента KCl (50 – 150 мМ).

### **2.1.2.4. Выделение и очистка аконитатгидратазы**

Для получения высокоочищенных препаратов аконитатгидратазы была использована разработанная ранее схема очистки [6], с небольшими модификациями, включающая 5 стадий. Все стадии проводились при температуре  $0-4^{\circ}\text{C}$  [34].

### 1. Получение гомогената

Навеску растительного материала ( $m=2\text{г}$ ) гомогенизировали в соотношении 1:10 со средой выделения следующего состава: 100 мМ Трис-НСl буфер (рН 8.0), содержащий 10мМ цитрата натрия, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2мМ ДТТ. Центрифугировали 15 мин при 5000g.

### 2. Высаливание сульфатом аммония:

Фракционирование белков сульфатом аммония проводилось в пределах насыщения 40-70%. Полученный раствор центрифугировали 20 мин при 10000g.

### 3. Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25.

Для освобождения от низкомолекулярных примесей ферментативный препарат наносили на колонку, заполненную сефадексом G-25. Элюцию осуществляли 50 мМ трис-НСl буфером (рН 8), со скоростью 15-20 мл в час.

### 4. Гель-хроматография на колонке с сефадексом G-150.

Ферментный препарат наносили на колонку с сефадексом G-150, элюцию проводили со скоростью 15-20 мл в час 50 мМ трис-НСl буфером (рН 8).

### 5. Ионообменная хроматография.

Ионообменную хроматографию проводили на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенной 50 мМ трис-НСl буфером, рН 8,0. Фермент десорбировали с колонки линейным градиентом концентрации от 60 мМ до 120 мМ КСl в 50 мМ трис-НСl буфере (рН 8) [23].

## **2.1.2.5. Определение концентрации белка**

Определение общего количества белка проводили по методу Лоури [27]. Метод основан на образовании комплексного окрашенного соединения в результате взаимодействия белка со щелочным раствором сульфата меди (биуретовая реакция) и вольфрамом и молибдатом натрия (реакция

Фолина на тирозиновые и цистеиновые радикалы). Количество белка рассчитывали по формуле:

$$A = 0,37 \cdot D \cdot V_1 / V_2,$$

где  $D$  – оптическая плотность при 750 нм;

$V_1$  – объём фракции или общий объём гомогената, мл;

$V_2$  – объём внесения, мл;

0,37 – коэффициент поглощения раствора Фолина.

Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) при 750 нм.

Содержание белка в высокоочищенных препаратах определяли по поглощению при 280 и 260 нм, используя формулу:

$$B = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}$$

$A_{280}$  и  $A_{260}$  – поглощение раствора при длинах волн соответственно 280 и 260 нм [23].

### **2.1.2.6. Электрофоретические исследования белков**

#### **2.1.2.6.1. Определение гомогенности ферментов**

Электрофоретическое исследование проводили по методу Девиса [3].

Для концентрирования белкового раствора готовили крупнопористый 6% полиакриламидный гель. Разделение осуществляли на разделяющем (мелкопористом) 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ). Растворы мелко- и крупнопористого гелей готовили, согласно рекомендациям Мауэра [3]. Электрофорез ферментативных препаратов проводили при постоянном токе силой 2,0 мА из расчета на одну пробу, а затем силу тока увеличивали до 4-5 мА.

Для определения гомогенности очищенных препаратов АГ и ИЦЛ вносили 3-5 мкг белка исследуемого раствора. При проявлении на белок

использовали методику с нитратом серебра [26].

Для хранения гели помещали в 7% -ный раствор уксусной кислоты.

#### **2.1.2.6.2. Специфическое проявление изоцитратлиазы**

Методика основана на способности взаимодействия глиоксилата и модифицированного реагента Шиффа, в результате чего образуется окрашенное соединение, которое стабильно, достаточно специфично и не сразу диффундирует в гель [26].

Гели окрашивали путём помещения их в инкубационную среду следующего состава: 50 мМ трис- HCl буфер, pH 7,5; 1 мМ ЭДТА; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 3 мМ ДТТ; 10 мМ изоцитрат (трёхнатриевая соль); 1,2 мл модифицированного реагента Шиффа. Гель инкубировали при 37 °С до появления ярко-красной полосы в месте локализации ИЦЛ.

#### **2.1.2.6.3. Специфическое проявление аконитатгадратазы**

Для специфической идентификации АГ использовали тетразолиевый метод. Данный метод успешно применяется для выявления неокислительных ферментов, таких как аконитаза, каталитическая активность которых определяется с использованием NADP<sup>+</sup>-зависимой изоцитратдегидрогеназы в качестве вспомогательного фермента. Под действием NADP<sup>+</sup>-зависимой изоцитратдегидрогеназы в присутствии субстрата происходит восстановление NADP<sup>+</sup>. При участии феназинметасульфата (который выполняет роль вспомогательного переносчика) водород затем переносится на нитросиний тетразолий. Краситель в окисленном состоянии имеет желтую окраску и хорошо растворим в воде. Его восстановленная форма (диформазан) практически нерастворима в воде и окрашена в фиолетовый



цвет. Восстановленная форма красителя сорбируется на той белковой фракции в геле на которой произошло восстановление  $\text{NADP}^+$  [27].

Для специфической идентификации АГ использовалась среда проявления следующего состава: 50мМ Tris-HCl-буфер, pH 8,0, 20мМ цис-аконитовая кислота, 2мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1ФЕ  $\text{NADP}^+$ -изоцитратдегидрогеназы, 1мМ  $\text{NADP}^+$ , 3,3мМ PMS, 0,5мг на 1мл данной среды NTB. Инкубация проводилась в темноте при  $37^\circ\text{C}$ . Гели, с проявившимися в местах локализации АГ полосами, хранили в среде фиксации: смесь этанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 10:1:30

### **2.1.2.7. Субклеточная локализация**

Исследование субклеточной локализации энзимов проводили с помощью дифференциального центрифугирования на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) и изоплотностного центрифугирования на центрифуге Beckman (США).

Материал (3г) гомогенизировали со средой выделения следующего состава: 50мМ трис-HCl-буфер pH 8,0, 25 мМ сахароза, 1мМ ЭДТА. Центрифугировали 10 мин 2500g, осадок отбрасывали. Затем супернатант центрифугировали 15 мин 10000g. Осадок, содержащий фракцию клеточных органоидов (митохондрий и микротелец), разрушали осмотическим шоком и далее использовали для измерения активности ферментов. Супернатант представлял собой растворимую фракцию цитоплазмы.

Для проведения изоплотностного центрифугирования осадок (полученный как указывалось выше, но ресуспендированный в среде с сахарозой) наслаивали на вершину градиента плотности сахарозы со ступенями 1,3М, 1,5М, 1,8М, 2,3М, 2,5М; центрифугировали 100000g 90 минут. Далее фракции с органеллами осторожно отбирали, ресуспендировали и использовали для определения активности ферментов. Степень

перекрестного загрязнения определяли с помощью маркерных ферментов. Для пероксисомальной фракции в качестве маркера использовали каталазу, для митохондрий – сукцинатдегидрогеназу [28].

#### **2.1.2.8. Регуляция изоцитратлиазы**

Регуляторные свойства изоцитратлиазы исследовали на электрофоретически гомогенных препаратах. В ходе работы изучалось влияние различных соединений на активность ИЦЛ. Рассматривалось воздействие: глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата на фермент. Определение констант ингибирования проводилось с помощью графика зависимости  $1/V$  от  $[S]$  (по Диксону) [28].

#### **2.1.2.9. Регуляция аконитатгидратазы**

Регуляторные свойства аконитазы исследовали на электрофоретически гомогенных препаратах. В ходе работы изучалось влияние различных соединений на активность АГ. Рассматривалось воздействие: транс-аконитата, сукцината, малата, фумарата, глиоксилата, пероксида водорода на фермент. Определение констант ингибирования проводилось с помощью графика зависимости  $1/V$  от  $[S]$  (по Диксону) [28, 27].

#### **2.1.2.10. Идентификация генов *aco1*, *aco2*, *icl1* и *icl2* и их экспрессия**

##### **2.1.2.10.1. Выделение суммарной клеточной популяции РНК**

Суммарную клеточную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [63] со следующими модификациями. Для ингибирования РНКаз

на стадии получения клеточного лизата использовали 42,6% гуанидин тиоцианат. Очистку РНК проводили при помощи осаждения хлоридом лития. Качественный анализ препаратов РНК проводили путём неденатурирующего электрофореза в 1% (в/о) геле агарозы при напряжённости электрического поля 7 В/см. Окрашивание геля производилось 0,1% водным раствором бромистого этидия. Визуализация результатов проводилась с использованием трансиллюминатора с длиной волны 312 нм. Результаты фиксировались цифровой видеокамерой Samsung и обрабатывались с помощью пакета программ Gel Explorer 1.0.

#### **2.1.2.10.2. Обратная транскрипция**

Обратную транскрипцию проводили с использованием ревертазы RevertAid M-MuLV (Fermentas, Литва) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Для проведения обратной транскрипции использовали 1 мкг суммарной клеточной РНК [7]. В качестве затравочного использовался олиго-(dT)<sub>20</sub> праймер. Для предотвращения деградации матриц РНК в реакционную смесь вносилось 20 ед. ингибитора РНКаз IRNasine.

#### **2.1.2.10.3. Подбор праймеров**

Так как специфичность ПЦР, т.е. отсутствие посторонних ампликонов, принципиально важна для количественного анализа, подбор праймеров был важным этапом работы. При этом в первую очередь учитывались GC – состав, уникальность последовательности в геноме, а также отсутствие самокомплементарности внутри праймера и в паре. При подборе праймеров для обратной транскрипции и ПЦР анализа оптимальными считали праймеры, имеющие >50% G/C – пар и не имеющие в геноме других мишеней, комплементарных более чем к 10-11 нуклеотидам на 3'-конце.

Подбор праймеров осуществляли на основе сравнения аминокислотных последовательностей изоцитратлиазы из разных организмов. Поиск гомологичных последовательностей в геномах нематоды, прокариот и растений проводился с использованием базы данных NCBI [207]. Для этого проводили выравнивание последовательностей с помощью программы AliBee – Multiple alignment Release 2.0 [208] с целью выявления наиболее консервативных участков. Подобранные на основе аминокислотных последовательностей праймеры проверяли на наличие образования димеров и вторичных структур с помощью программы FAST PCR.

#### 2.1.2.10.4. Проведение ПЦР в реальном времени

Для выяснения изменения уровня экспрессии генов аконитазы и изоцитратлиазы кукурузы и амаранта, проводили ПЦР-РВ на приборе DNA Engine<sup>®</sup> Thermal Cycler «Chromo4» (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I [7].

В качестве праймеров, подобранных с помощью программного обеспечения Primer3 [171], использовали следующие нуклеотидные последовательности к гену *aco1*:

прямой – 5'-GCTGAGCGGTACCAGCAGGC-3';

обратный – 5'-GCGGGTCTCCTGAGAGGCCA-3';

к гену *aco2*:

прямой – 5'-CCGCCTTCCTGTTCAGTTTG-3';

обратный – 5'-TGTAGAGGGAGTGCTGTCATCAA-3'.

Параметры амплификации: предварительная денатурация 95 °С – 5 мин., затем цикл: 95 °С – 30 сек., 60 °С – 30 сек., 72 °С – 30 сек. (детекция), финальная элонгация - 72 °С – 10 мин.

Праймеры для ПЦР-РВ анализа экспрессии генов изоцитратлиазы были следующими: для *icl1*:

прямой 5'- GCCACTTGAATAGTT-3',  
 обратный - 5'- ACATAAGGCAACTTC-3', температура отжига 54<sup>0</sup>С;  
 для *icl2*: прямой 5'- GGATAGGACTTACTA-3',  
 обратный - 5'- AGCTTGTCCCTTAGAA-3', температура отжига 56<sup>0</sup>С.

Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* с ген-специфичными праймерами [102]. В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции.

Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением 2<sup>-ΔΔCt</sup>-метода [127] с использованием программного обеспечения Opticon Monitor<sup>TM</sup> Software (Biorad, США).

#### 2.1.2.11. Статистическая обработка данных

Все измерения и опыты в данной работе осуществлялись в трех повторностях, а аналитическое определение для каждой пробы проводили в двух повторностях. Данные типичных опытов, представленные в таблицах, являются средним арифметическим значением. При математической обработке данных применяли статистический критерий Стьюдента.

Из полученных при проведении опытов данных (вариант  $x_i$ ) выявляли среднее арифметическое  $\bar{x}$  (M); затем вычисляли отклонения каждой варианты от среднего значения ( $x_i - \bar{x}$ ), после чего рассчитывали квадраты отклонения варианты от среднего значения  $(x_i - \bar{x})^2$ , затем находили сумму квадратов отклонений  $\sum (x_i - \bar{x})^2$ . Далее вычисляли среднее квадратичное отклонение вариант от среднего арифметического ( $\sigma$ ) для контроля и опыта по формуле:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n-1}, \text{ где } n - \text{ число вариантов.}$$

После определяли погрешность данных контроля и опыта, затем отклонение ( $t$ ). Значение  $t$ , то есть оценка достоверности различий между контролем и опытом, сравнивалась по таблице распределения Стьюдента. Разница в эксперименте считалась достоверной, если вычисленное значение совпадает с табличным или больше его [24, 35].

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.2.1. Изоферментный состав аконитатгидратазы из растений с различным типом метаболизма

Множественные молекулярные формы или изоформы аконитатгидратазы в растительных организмах встречаются в разном количестве в зависимости от вида, органа, возраста и условий внешней среды [22]. В нашем исследовании получены данные по изоферментному составу аконитазы в разных органах кукурузы, сои и амаранта. Исследованные объекты отличаются по типу основного метаболизма. Кукуруза и амарант относятся к  $C_4$ -фотосинтезирующим организмам малатного и аспартатного типов [18]. Соя является классическим представителем растений, для которых характерен  $C_3$ -фотосинтез. Анализ полученных данных показывает, что в кукурузе в зависимости от используемого органа обнаруживается от 1 до 2 множественных форм фермента. Аконитатгидратаза в семенах и корнях кукурузы имеет одну изоформу с относительной электрофоретической подвижностью – 0,58. В пробах из листьев и щитка кукурузы выявлены две формы исследуемого фермента, характеризующиеся разными значениями  $R_f$ . Быстродвижущаяся изоформа АГ в щитках и листьях имела относительную электрофоретическую подвижность равную 0,58. Медленнодвижущаяся молекулярная форма аконитазы характеризовалась относительной электрофоретической подвижностью равной 0,52 (рис. 4).

Анализ данных распределения изоформ АГ в разных органах сои приведен на рисунке 5. Полученные результаты свидетельствуют, что в семенах этого растительного организма функционирует одна-единственная форма аконитазы с относительной электрофоретической подвижностью 0,54. Количество изоформ исследуемого фермента в корневой системе и листьях сои увеличивается до двух молекулярных форм.

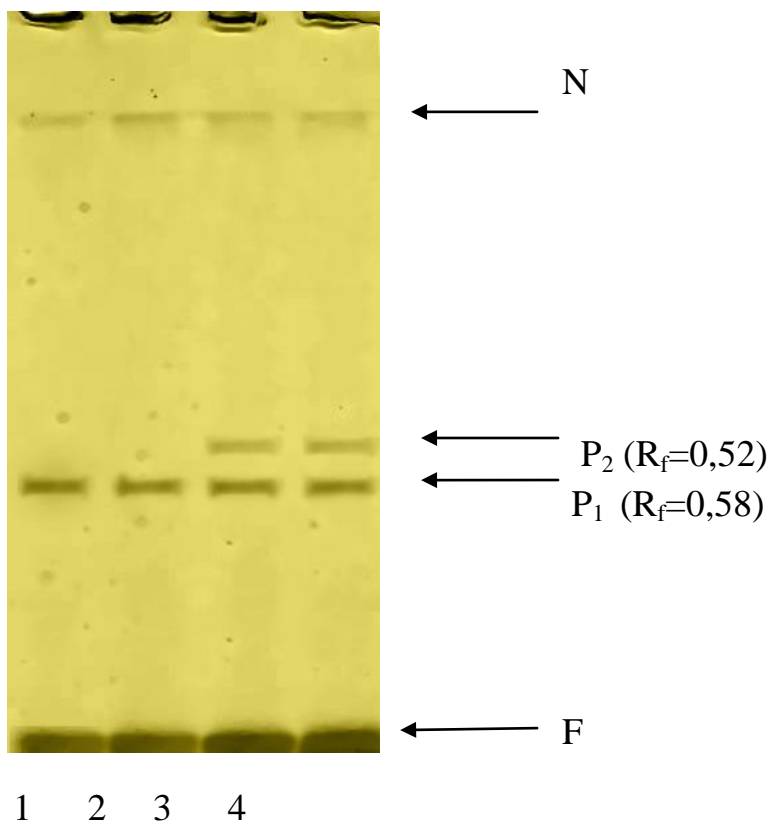


Рис. 4. Изоферментный состав АГ в различных органах кукурузы

N – граница разделяющего и концентрирующего гелей

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

F – фронт красителя

1 - семена

2 – корни

3 – щитки

4 - листья

Относительная электрофоретическая подвижность выявленных изоформ равняется 0,54 (быстродвижущаяся форма) и 0,49 (медленнодвижущаяся). Сравнительный анализ полученных данных по изоферментному составу позволяет заключить, что в физиологически развитых органах, где функционируют все основные физиологические процессы, присутствуют две изоформы фермента. Можно предположить, что они выполняют разные метаболические функции.

Характерной особенностью изоферментного состава



аконитатгидратазы, выделенной из амаранта, является наличие одной белковой полосы для семян и корней. Анализ данных по электрофоретическому исследованию изоферментного состава аконитазы свидетельствует о том, что в листьях этого растения появляется вторая изоформа фермента. Значения относительной электрофоретической подвижности незначительно отличаются от этого показателя для изоформ АГ из кукурузы и сои.

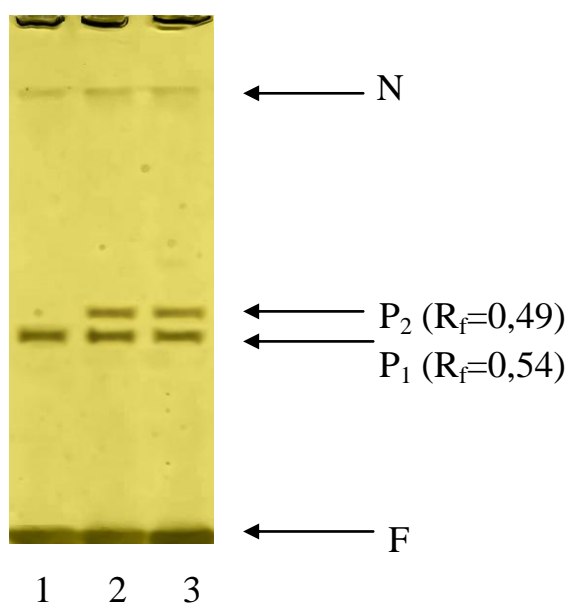


Рис. 5. Изоферментный состав АГ в различных органах сои

N – граница разделяющего и концентрирующего гелей

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

F – фронт красителя

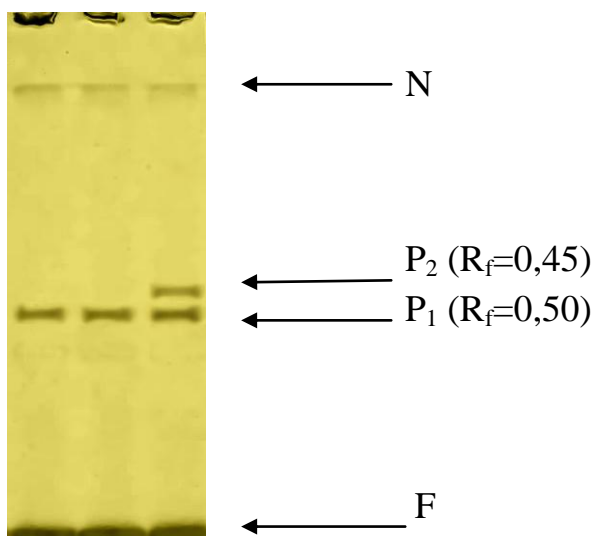
1 - семена

2 – корни

3 – листья

Так, быстродвижущаяся форма аконитатгидратазы характеризовалась значением  $R_f$  0,50, а относительная электрофоретическая подвижность медленнодвижущейся формы равнялась 0,45 (рис. 6). Следовательно, аналитическое рассмотрение полученных данных позволяет сделать предположение о том, что две изоформы аконитатгидратазы функционируют в разных метаболических процессах. Одна обеспечивает работу цикла

трикарбоновых кислот, а вторая участвует в метаболизации органических кислот, в том числе в функционировании важнейшего анаболического процесса - глиоксилатного пути.



1 2 3

Рис. 6. Изоферментный состав АГ в различных органах амаранта

N – граница разделяющего и концентрирующего гелей

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

F – фронт красителя

1 - семена

2 – корни

3 – листья

### 2.2.2. Изоферментный состав изоцитратлиазы из растений с различным типом метаболизма

Многие исследователи относят изоцитратлиазу к маркерным ферментам глиоксилатного цикла. Однако, в современной литературе присутствуют данные, свидетельствующие о наличии в разных организмах нескольких изоформ этого энзима. Для большинства растений характерно наличие двух изоформ. Так, у льна и люпина выделены две формы фермента [163]. Однако, большее количество изоформ ИЦЛ было обнаружено в нематоде [122]. Три множественные молекулярные формы изоцитратлиазы

обнаружены в проростках *Pinus pinea* [139]. Проведенные электрофоретические исследования изоферментного состава изоцитратлиазы в разных органах кукурузы, сои и амаранта приведены на рисунках 7-9.

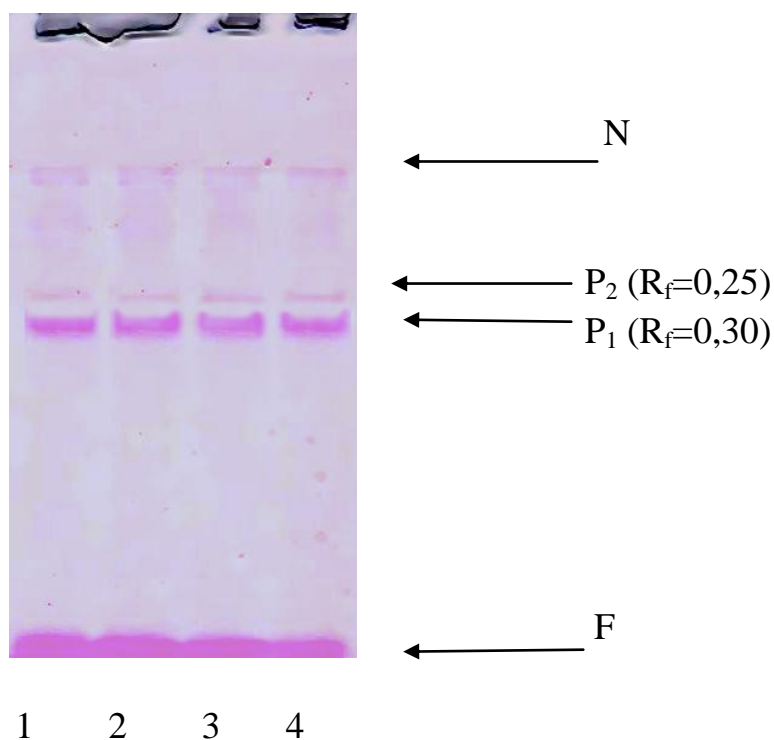


Рис. 7. Изоферментный состав ИЦЛ в различных органах кукурузы

N – граница разделяющего и концентрирующего гелей

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

F – фронт красителя

1 - семена

2 – корни

3 – щитки

4 - листья

Анализ изоферментного состава ИЦЛ в кукурузе показал наличие двух изоформ в семенах, щитках, корнях, листьях. Выявленные формы фермента отличались по относительной электрофоретической подвижности. Так, быстродвижущаяся изоформа ИЦЛ характеризовалась относительной электрофоретической подвижностью 0,30, а медленнодвижущаяся – 0,25. Характерной особенностью изоферментного состава кукурузы является

наличие двух изоформ исследуемого фермента во всех органах. Следует отметить, что наблюдается тенденция, связанная с более интенсивным проявлением быстродвижущейся изоформы ИЦЛ ( $R_f = 0,30$ ). Возможно, это объясняется различным количеством изоформ, характерных для данного этапа развития кукурузы.

На рисунке 8 приведены результаты исследований с помощью электрофореза в полиакриламидном геле изоферментного состава в разных органах сои. Полученные данные позволяют заключить, что в семенах, корневой системе и листьях выявлены две множественные молекулярные формы ИЦЛ, отличающиеся по электрофоретической подвижности.

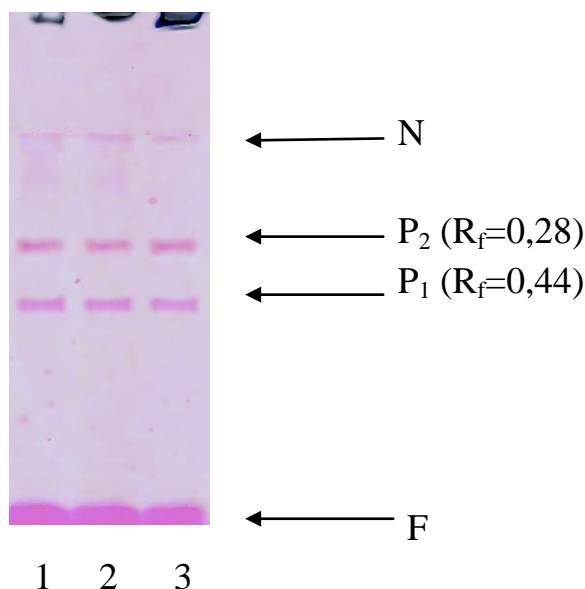


Рис. 8. Изоферментный состав ИЦЛ в различных органах сои

N – граница разделяющего и концентрирующего гелей

$P_1$ ,  $P_2$  – белковые полосы

F – фронт красителя

1 - семена

2 – корни

3 – листья

Быстродвижущаяся форма исследуемого фермента характеризуется величиной относительной электрофоретической подвижности равной 0,44. Медленнодвижущийся изофермент ИЦЛ имел величину  $R_f = 0,28$ .

Сравнительный анализ позволяет заключить, что обе выявленные изоформы ИЦЛ в разных органах сои имели примерно одинаковую интенсивность окраски. Это может свидетельствовать о равных долях изоцитратлиазной активности, приходящихся на быстродвижущуюся и медленнодвижущуюся формы фермента.

Изоферментный состав изоцитратлиазы в разных органах амаранта, являющегося представителем  $C_4$ -типа растений, представлен на рисунке 9.

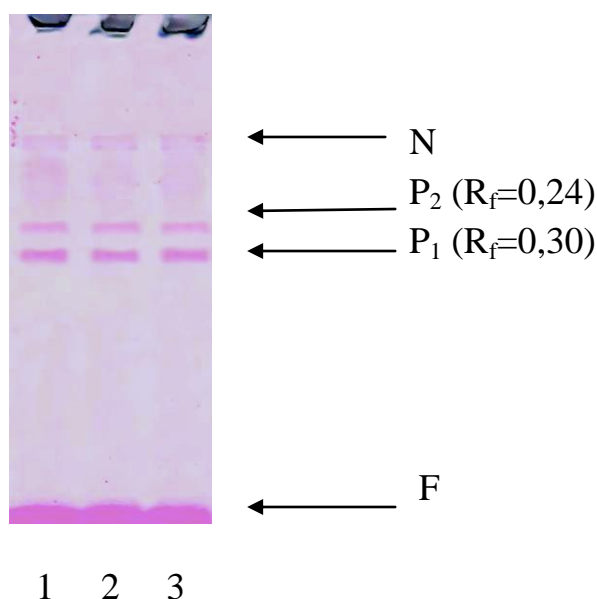


Рис. 9. Изоферментный состав ИЦЛ в различных органах амаранта

N – граница разделяющего и концентрирующего гелей

$P_1$ ,  $P_2$  – белковые полосы

F – фронт красителя

1 - семена

2 – корни

3 – листья

Анализ полученных данных указывает на наличие двух множественных молекулярных форм исследуемого фермента в этом объекте. Для быстродвижущейся формы ИЦЛ характерна величина относительной электрофоретической подвижности, равная 0,30, для медленнодвижущейся значение  $R_f$  составляло 0,24.

Следовательно, данные по изоферментному составу изоцитратлиазы в

разных органах кукурузы, сои и амаранта показывают наличие у большинства объектов двух изоформ исследуемого энзима. Учитывая, что обязательной функцией ИЦЛ является участие энзимов в функционировании глиоксилатного цикла (маркерный фермент), можно предположить, что вторая изоформа выполняет другие метаболические функции, связанные с ее лиазной или синтазной активностями.

### 2.2.3. Внутриклеточное распределение аконитазной и изоцитратлиазной активностей в тканях кукурузы

Наличие двух изоформ, обнаруженных в исследуемых растениях, как правило, указывает на их различную функциональную значимость и специфическую внутриклеточную локализацию. В наших исследованиях применялось изоплотностное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, обеспечивающее разделение митохондриальной и глиоксисомальной фракций. О перекрестном загрязнении митохондрий, глиоксисом и цитоплазматической фракции судили по активности маркерных ферментов – каталазе и сукцинатдегидрогеназе.

Таблица 3.

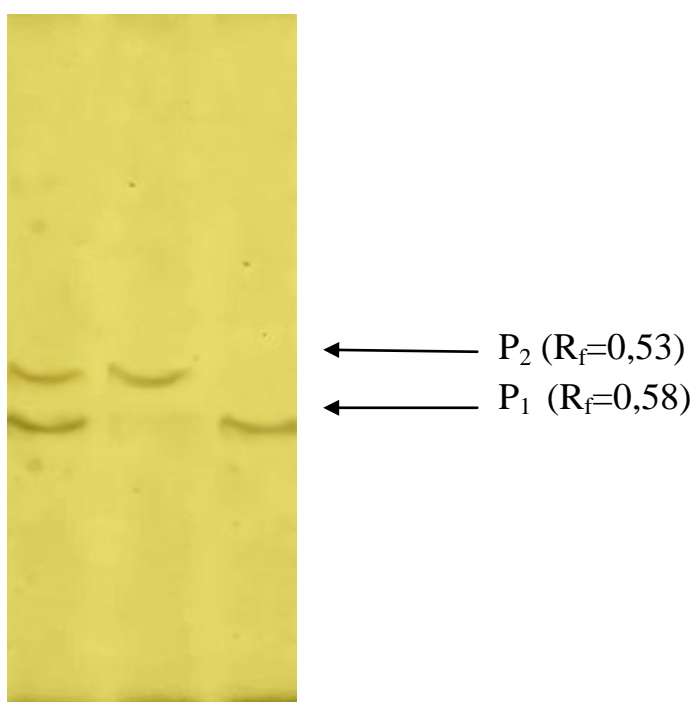
Субклеточная локализация аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активностей в кукурузе ( $n = 5$ ;  $p \leq 0,05$ )

Фракция органонидов	Цитоплазма		Митохондрии		Глиоксисомы	
	1	2	1	2	1	2
АГ	0,308	47	0,679	41	0,365	12
ИЦЛ	0,219	23	0,096	5	1,462	72
Каталаза	0,211	22	0,089	5	0,988	73
СДГ	0,027	4	0,064	93	0,012	3

1 – удельная активность фермента (Е/мг белка),

2 - % активности фермента от общего содержания

Как видно из полученных данных, приведенных в таблице 3, аконитатгидратазная активность обнаружена в цитоплазматической (47%), митохондриальной (41%) и глиоксисомальной фракциях (12%). Уровень перекрестного загрязнения отдельными фракциями не превышал 8%, что соответствует методическим условиям выделения фракций и разделения их в условиях изоплотностного центрифугирования. Анализ полученных результатов свидетельствует, что основная доля аконитазной активности приходится на цитоплазматическую и митохондриальную фракции.



1      2      3

Рис. 10. Специфическое проявление аконитазы из кукурузы в различных фракциях.

1 – цитоплазматическая фракция

2 – митохондрии

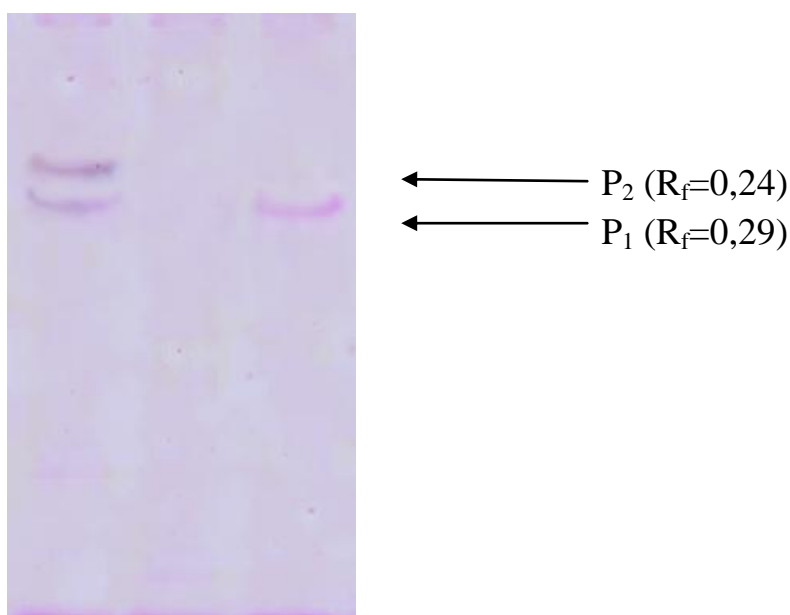
3 – глиоксисомы

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

Анализ распределения изоцитратлиазной активности имеет свои характерные особенности (табл. 3). Основная доля активности изоцитратлиазы сосредоточена в глиоксисомальной фракции и составляет

72% от общей активности изоцитратлиазы в клетке. Значительное количество активности этого фермента обнаружено в цитоплазме (12%), что может быть следствием элюции фермента из микротелец в процессе выделения и центрифугирования. Доминирование изоцитратлиазной активности в глиоксисомах указывает на участие этого энзима в функционировании глиоксилатного цикла – важнейшего этапа глюконеогенеза.

Результаты электрофоретического исследования изоферментного состава аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в разных компартментах растительной клетки кукурузы приведены на рисунках 10 и 11.



1 2 3  
Рис. 11. Специфическое проявление изоцитратлиазы из кукурузы в различных фракциях.

1 – цитоплазматическая фракция

2 – митохондрии

3 – глиоксисомы

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

Аконитатгидратазная активность в глиоксисомах и митохондриях проявлялась в форме двух специфично локализованных изоформ фермента. Быстродвижущаяся изоформа АГ с R<sub>f</sub> 0,58 была обнаружена в



глиоксисомальной фракции. В митохондриях была выявлена изоформа АГ с относительной электрофоретической подвижностью 0,53. Интересно, что в цитоплазматической фракции встречаются оба изофермента, что может в определенной степени быть следствием ее загрязнения митохондриями и глиоксисомами.

Анализ данных электрофоретических исследований, распределение изоформ изоцитратлиазы в субклеточных фракциях кукурузы показывает, что в глиоксисомах обнаружена быстродвижущаяся форма фермента с  $R_f$  0,29. В митохондриальной фракции не выявлено наличие изоформы ИЦЛ, то есть активность фермента была чрезвычайно низкая. В цитозольной фракции, где сосредоточено почти 12% изоцитратлиазной активности, при специфическом проявлении обнаружено два изофермента с  $R_f$  0,29 и  $R_f$  0,24. Следует отметить, что медленнодвижущаяся изоформа была специфичной для этого компартмента и, по-видимому, для нее характерна своя уникальная метаболическая функция. Изофермент с  $R_f$  0,29 имел общую локализацию с глиоксисомами и, по-видимому, можно считать его следствием перекрестного загрязнения органоидной изоцитратлиазы цитоплазмы.

#### **2.2.4. Внутриклеточное распределение аконитазной и изоцитратлиазной активностей в тканях амаранта**

Результаты исследования субклеточной локализации аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активностей приведены в таблице 4. Анализ полученных данных свидетельствует, что аконитатгидратаза встречается, главным образом, в митохондриальной (40%) и цитоплазматической фракциях. В глиоксисомах обнаружено примерно 10% активности этого энзима. По-видимому, данное количество АГ в глиоксисомальной фракции связано с перекрестным загрязнением, то есть попаданием аконитазы из цитоплазматической фракции, где она находится в доминирующем

количестве. Однако, эти рассуждения могут быть несправедливыми, так как в микротельцах функционирует глиоксилатный цикл, для работы которого необходима аконитатгидратаза. По-видимому, окончательный ответ на место локализации этого фермента дадут исследования электрофоретической подвижности обнаруженных изоформ в растительной клетке. Данные по перекрестному загрязнению аконитазной активности выделяемых органоидов приведены в таблице 2. Как видно из приведенных результатов, перекрестное загрязнение варьирует в пределах 5-8%, что считается достаточно достоверным результатом.

Активность изоцитратлиазы в проростках амаранта обнаружена в глиоксисомальной, митохондриальной и цитоплазматической фракциях. Однако, анализ результатов субклеточного разделения ИЦЛ, приведенный в таблице 2, показывает, что доминирующее количество этого фермента обнаруживается в глиоксисомах, где изоцитратлиазная активность составляет 71%. Значительное количество активности этого энзима обнаружено в цитоплазме (24%), незначительное содержание изоцитратлиазной активности проявляется в митохондриальной фракции (5%).

Таблица 4.

Субклеточная локализация аконитазы и изоцитратлиазы в проростках амаранта (n = 5; p ≤ 0,05)

Фракция органоидов	Цитоплазма		Митохондрии		Глиоксисомы	
	1	2	1	2	1	2
АГ	0,327	50	0,596	40	0,348	10
ИЦЛ	0,226	24	0,181	5	1,128	71
Каталаза	0,236	18	0,085	4	0,998	78
СДГ	0,041	5	0,073	92	0,028	3

1 – удельная активность фермента (Е/мг белка),

2 - % активности фермента от общего содержания

Анализ распределения изоформ с помощью электрофореза позволит определить специфичность локализации изоцитратлиазы в отдельных органоидах.

Результаты электрофоретических исследований изоформ АГ из разных субклеточных фракций клеток амаранта приведены в виде электрофореграмм на рисунке 12.

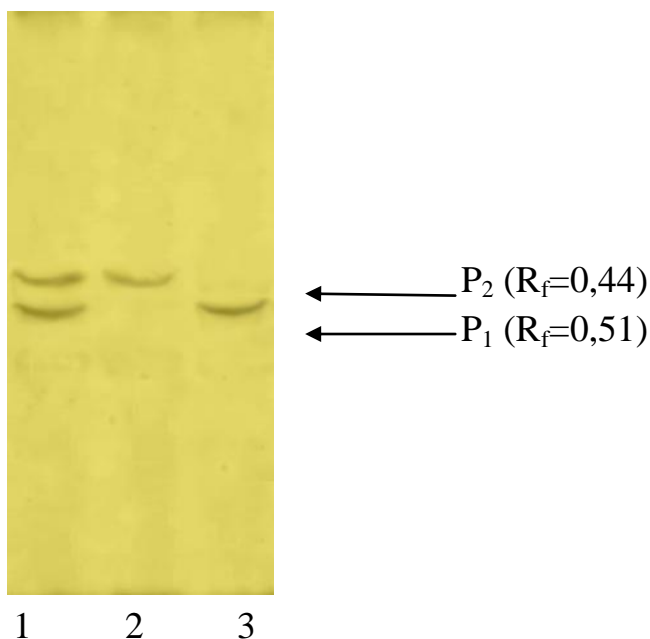


Рис. 12. Специфическое проявление аконитазы из амаранта в различных фракциях.

1 – цитоплазматическая фракция

2 – митохондрии

3 – глиоксисомы

$P_1, P_2$  – белковые полосы

Полученные данные свидетельствуют, что в глиоксисомальной фракции обнаруживается одна-единственная изоформа с относительной электрофоретической подвижностью равной 0,51. В митохондриях выявлена медленнодвижущаяся форма исследуемого энзима с  $R_f$  0,44. Две изоформы с относительной электрофоретической подвижностью 0,44 и 0,51 проявляются в цитоплазме исследуемых клеток. Аналитическое рассмотрение полученных данных позволяет предположить, что изоформа АГ с  $R_f$  0,44, обнаруженная в митохондриальной фракции, выполняет катаболические функции. Согласно

современным литературным данным, кроме митохондриальной фракции, аконитатгидратаза обнаружена во фракции микротелец (глиоксисом) и цитоплазме. В каждом органоиде, где встречается аконитазная активность, функционируют метаболические процессы, обеспечивающие жизнедеятельность клетки. Так, в глиоксисомах функционирует глиоксилатный путь, в митохондриях – цикл трикарбоновых кислот, в цитоплазме – метаболизм органических кислот, обеспечивающий их накопление или участие кетокислот в азотном обмене.

Электрофорез в полиакриламидном геле показал внутриклеточное распределение отдельных изоформ, которые характеризовались специфической субклеточной локализацией. Как видно из данных, приведенных на рисунке 13, изоцитратлиазная активность обнаруживается в глиоксисомах и цитозольной фракции амаранта.

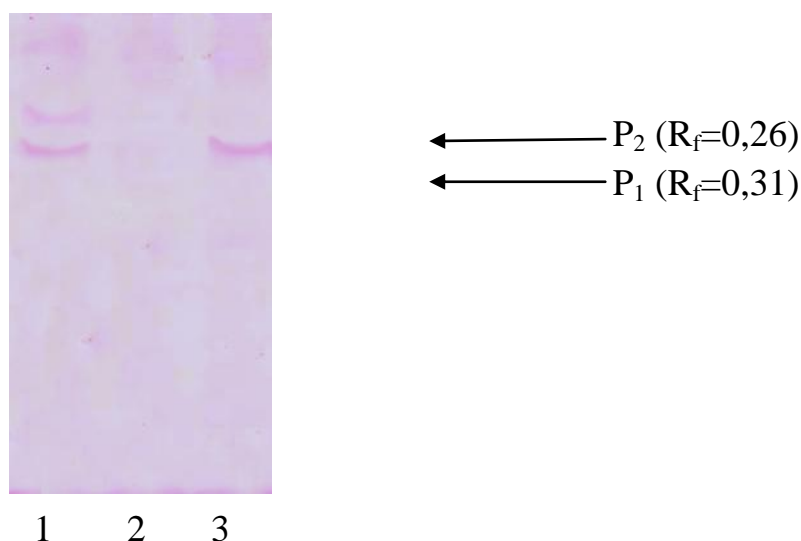


Рис. 13. Специфическое проявление изоцитратлиазы из амаранта в различных фракциях.

1 – цитоплазматическая фракция

2 – митохондрии

3 – глиоксисомы

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

Быстродвижущаяся форма с относительной электрофоретической подвижностью 0,26 имела специфическую локализацию в глиоксисомальной

фракции. С полной уверенностью можно считать, что эта изоформа изоцитратлиазы выполняет функцию обеспечения работы глиоксилатного цикла. Если в митохондриальной фракции не обнаружена специфическая локализация изоформ ИЦЛ, то в цитозоле выявлено две формы этого энзима. Быстродвижущаяся изоформа имела точно такой же  $R_f$ , как глиоксисомальная (0,26). Медленнодвижущаяся форма ИЦЛ характеризовалась величиной относительной электрофоретической подвижности – 0,31. Можно предположить, что именно эта изоформа изучаемого фермента специфично локализована в цитоплазме, а быстродвижущаяся  $R_f$  0,26 является следствием перекрестного загрязнения цитозольной фракции глиоксисомальной изоцитратлиазой.

### 2.2.5. Внутриклеточное распределение аконитазной и изоцитратлиазной активностей в тканях сои

Данные, приведенные в таблице 5, показывают особенности внутриклеточного распределения активностей АГ и ИЦЛ в листьях сои.

Таблица 5.

Внутриклеточное распределение аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в тканях сои ( $n = 5$ ;  $p \leq 0,05$ )

Фракция органоидов	Цитоплазма		Митохондрии		Глиоксисомы	
	1	2	1	2	1	2
АГ	0,329	34	0,401	63	0,896	3
ИЦЛ	0,197	26	0,073	3	1,652	71
Каталаза	0,202	19	0,057	4	1,130	77
СДГ	0,016	3	0,089	94	0,012	3

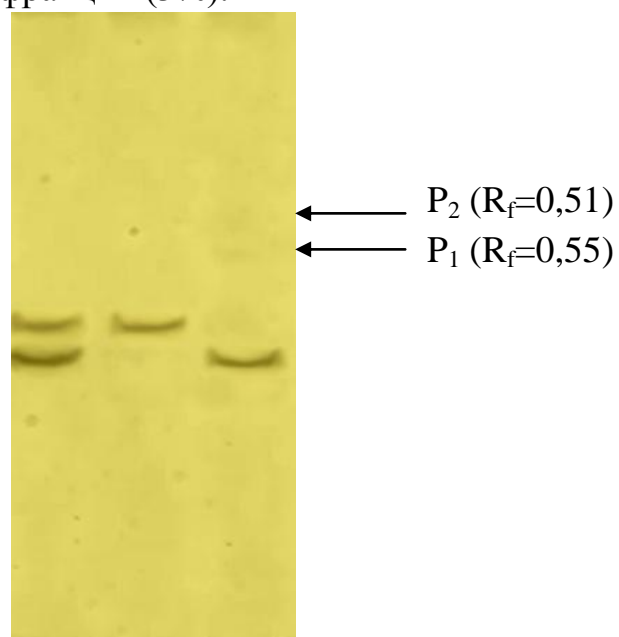
1 – удельная активность фермента (Е/мг белка),

2 - % активности фермента от общего содержания

Аконитатгидратаза обнаружена в цитоплазме, митохондриях и глиоксисомах клеток. Наибольшая активность наблюдалась в митохондриальной фракции, где аконитатгидратазная активность составляла 63%.

Значительная доля активности этого фермента обнаружена в цитоплазме (34%). Минимальная активность АГ по сравнению с другими фракциями обнаружена в глиоксисомах, где активность аконитазы составляла не более 3%.

Внутриклеточное распределение изоцитратлиазной активности характеризуется доминированием этого показателя в глиоксисомальной фракции, где она составляла 71% от общей активности ИЦЛ в растительной клетке. Большое количество активности ИЦЛ обнаружено в цитоплазме (34%) и незначительное содержание зафиксировано в митохондриальной фракции (3%).



1      2      3

Рис. 14. Специфическое проявление аконитазы из сои в различных фракциях.

1 – цитоплазматическая фракция

2 – митохондрии

3 – глиоксисомы

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

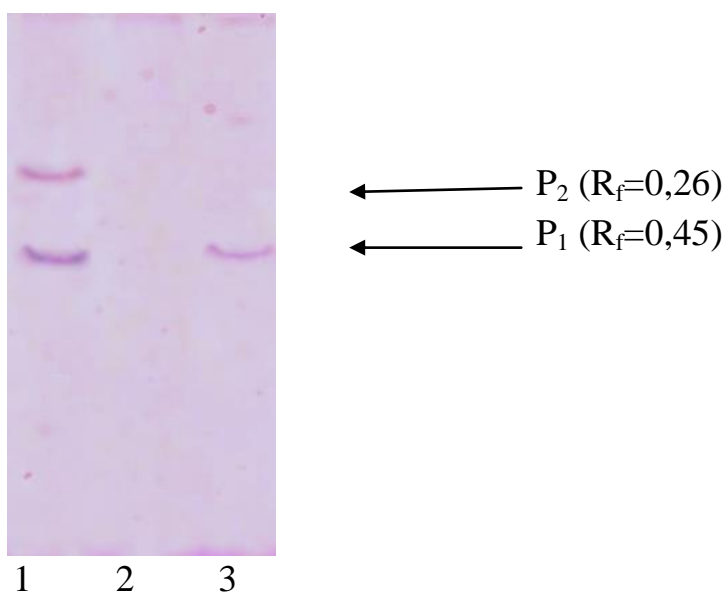


Рис. 15. Специфическое проявление изоцитратлиазы из сои в различных фракциях.

- 1 – цитоплазматическая фракция
- 2 – митохондрии
- 3 – глиоксисомы
- P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

Аналитическое рассмотрение полученных результатов позволяет заключить, что субклеточная локализация АГ и ИЦЛ имела сходное распределение независимо от типа основного обмена исследуемых растений.

Как видно из данных, приведенных на рисунке 15, в глиоксисомальной фракции обнаруживается одна-единственная быстро движущаяся форма ИЦЛ с относительной электрофоретической подвижностью 0,26.

В митохондриях, выделенных из клеток сои, не удалось проявить с помощью специфического окрашивания изоцитратлиазную активность. В то же время в цитозольной фракции было обнаружено наличие двух изоформ исследуемого фермента. Медленно движущаяся форма ИЦЛ (R<sub>f</sub> 0,26) совпадала по относительной электрофоретической подвижности с изоцитратлиазой из глиоксисом, что может быть следствием перекрестного загрязнения, произошедшего при выделении органоида. Быстро движущаяся форма ИЦЛ с R<sub>f</sub> 0,45 являлась строго специфичной и встречалась только в цитоплазматической фракции. Анализ полученных данных позволяет

предположить, что изолирование отдельных метаболических путей в разных частях клеток осуществляется с помощью специфических по локализации изоформ этого энзима.

### **2.2.6. Очистка аконитатгидратазы из кукурузы**

Использование многостадийной схемы очистки, включающей высаливание сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G-25, ионообменную хроматографию и гель-хроматографию на сефадексе G-150, позволяет получать препараты ферментов цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного пути с высокой удельной активностью, большой степенью очистки и значительным выходом ферментативной активности [5]. Применение в нашем исследовании пятистадийной схемы позволило получить в гомогенном или высокоочищенном состоянии препараты фермента аконитатгидратазы из листьев кукурузы (табл.6). Этапы очистки чередовались таким образом, что обеспечивали постепенное снижение количества сопутствующих белков и увеличение удельной активности исследуемого фермента. На первой стадии очистки АГ количество белка в гомогенате составляло 329 мг.

Почти в 10 раз его количество уменьшилось после фракционирования сульфатом аммония (50-65% насыщения). При этом его количество составило 25-36 мг. Особое значение в подобных схемах имеет стадия гель-фильтрации на сефадексе G-25, которая обеспечивает удаление низкомолекулярных примесей, сопутствующих белковой фракции. Ферментный препарат после обессоливания на сефадексе G-25 состоял исключительно из однородных молекул белков. Принципиально важным для конечного успеха в получении электрофоретически гомогенных препаратов фермента является использование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.



Этот этап позволяет разделить имеющиеся изоформы аконитатгидратазы на отдельные фракции. Десорбцию аконитазной активности после ионообменной хроматографии осуществляли линейным градиентом от 75 до 120 мМ КСl в среде элюирования.

Таблица 6.

## Стадии очистки АГ из листьев кукурузы (n=3, P&lt;0,05)

Стадии очистки	Объем, мл	Активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	50	17,250	329	0,05	1	100
Высаливание сульфатом аммония (50-65%)	3,5	5,945	25,367	0,23	4,6	34
Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25	2,5	5,112	20,144	0,25	5	30
Гель-хроматография на колонке с сефадексом G-150	2,5	1,510	1,943	0,78	15,6	9
Гель-хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	2,5	0,494	0,125	3,95	79	3
	2,5	0,601	0,118	5,09	100	3

После ионообменной хроматографии (табл. 6) были получены высокоочищенные препараты изоформ аконитатгидратазы с удельной

активностью 3,95 и 5,09 Е/мг белка. При этом степень очистки изозимов АГ составила 79 и 100 раз, соответственно. Выход ферментативной активности после пятистадийной очистки составил около 3%, что является вполне приемлемым вариантом для получения препаратов энзимов.

### 2.2.7. Исследование гомогенности и специфической активности аконитатгидратазы из кукурузы

Электрофоретические исследования проводились в системе полиакриламидного геля по методике Дэвиса и Орнстайна [28]. Анализ полученных данных показывает, что электрофореграммы проявляли только одну белковую полосу при универсальном окрашивании нитратом серебра (рис. 16). Универсальное проявление позволило установить, что после пятистадийной очистки удалось получить в гомогенном состоянии две изоформы исследуемого фермента. Быстродвижущаяся форма аконитазы имела относительную электрофоретическую подвижность 0,58, вторая форма фермента характеризовалась величиной  $R_f = 0,52$ .

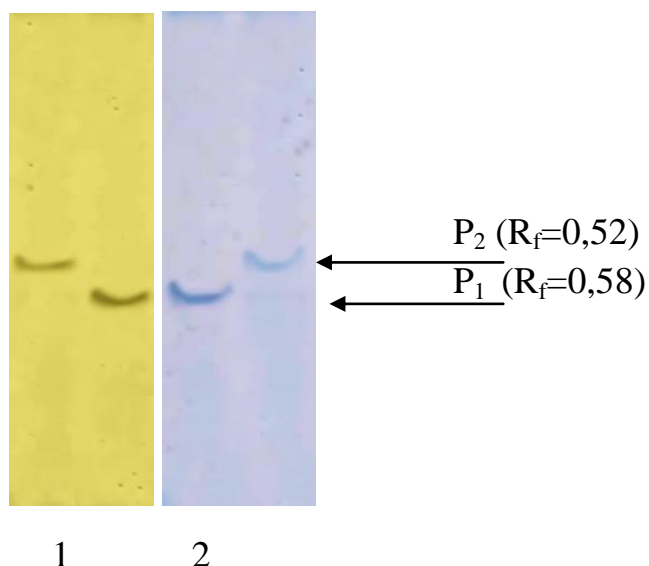


Рис. 16. Подтверждение гомогенности полученных форм АГ из кукурузы  
 1 – специфическое проявление АГ  
 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок)  
 $P_1, P_2$  – белковые полосы

### 2.2.8. Выделение и очистка аконитазы из сои

Для получения гомогенных и высокоочищенных препаратов из проростков сои использовали пятистадийную очистку, аналогичную схеме получения препаратов АГ из кукурузы.

Таблица 7.

Стадии очистки АГ из сои (n=3, P&lt;0,05)

Стадии очистки	Объем, мл	Активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	40	15,486	238	0,065	1	100
Высаливание сульфатом аммония (50-70%)	3	4,756	9,150	0,52	8	31
Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25	2	4,105	6,321	0,65	10	27
Гель хроматография на колонке с сефадексом G-150	2	1,293	0,921	1,4	21,5	8
Гель-хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	2	0,421	0,082	5,2	80	3
	2	0,409	0,080	5,4	83	3

Как видно из полученных данных (табл. 7), выделены два изофермента аконитазы с высокой удельной активностью. Для разделения изоформ АГ решающую роль сыграла ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Использование плавного градиента хлористого калия позволило дифференцировать аконитазную активность на два энзима,

характеризующихся высокой удельной активностью. Первый изофермент характеризовался величиной удельной активности 5,2 Е/мг белка с большой степенью очистки (80 раз) и выходом 3%. Для второй формы были получены близкие результаты, в частности, величина удельной активности составляла 5,4 Е/мг белка, степень очистки 83 раза и выход 3%. Интересно отметить, что полученные результаты очистки хорошо согласуются с данными из других источников [61].

### 2.2.9. Исследование гомогенности препаратов аконитатгидратазы, очищенных из сои

Анализ электрофоретических исследований полученных препаратов изоформ аконитатгидратазы после пятистадийной очистки проводили традиционным способом с использованием универсального красителя нитрата серебра и специфического проявления тетразолиевым методом.

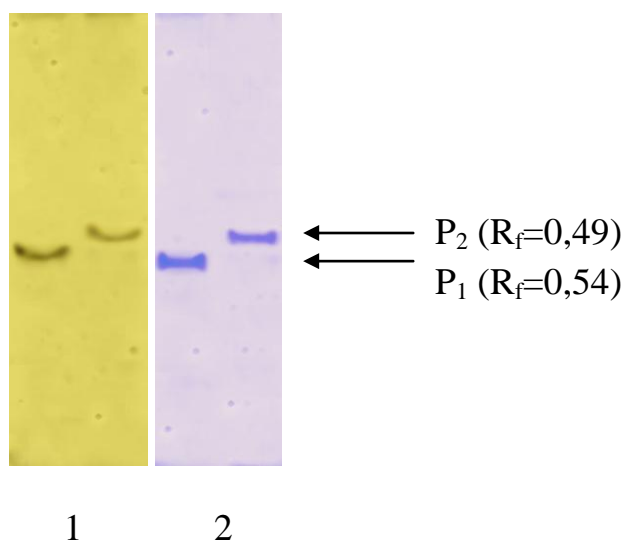


Рис. 17. Подтверждение гомогенности полученных форм АГ из сои

1 – специфическое проявление АГ

2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок)

$P_1, P_2$  – белковые полосы

Полученные результаты (рис. 17) свидетельствуют, что исследуемые ферментные препараты были гомогенными, так как проявляется одна белковая полоса аконитазы.

Специфическое и универсальное окрашивание показало, что быстродвижущаяся изоформа АГ имеет относительную электрофоретическую подвижность 0,54, а медленнодвижущаяся - 0,49. Следовательно, в сое обнаружены две множественные молекулярные формы аконитатгидратазы, очистка которых позволила получить их в электрофоретически гомогенном состоянии.

### 2.2.10. Очистка аконитатгидратазы из амаранта

Данные по очистке изоформ АГ из амаранта приведены в таблице 8.

Таблица 8.

Стадии очистки АГ из амаранта (n=3, P<0,05)

Стадии очистки	Объем, мл	Активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	25	9,137	203	0,045	1	100
Высаливание сульфатом аммония (50-70%)	3	4,028	14,920	0,27	6	44
Гель-фильтрация на колонке с сефадексом G-25	2	3,898	12,110	0,32	7,1	43
Гель-хроматография на колонке с сефадексом G-150	2	1,344	1,041	1,29	28,6	15
Гель-хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	2	0,340	0,061	5,8	128	4
	2	0,371	0,060	6	122	4

Высокая эффективность была обеспечена постепенным использованием различных стадий, позволивших избавиться от большинства сопутствующих белков. Важнейшее значение для разделения изоформ исследуемого фермента имела стадия ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. С помощью плавного градиента хлористого калия (от 52 до 155 мМ) были получены два пика изоцитратлиазной активности. Величина удельной активности первого изофермента ИЦЛ составляла 5,8 Е/мг белка, при этом степень очистки достигала 128 раз, а выход активности фермента на этой стадии равнялся 4%.

Значение удельной активности второй изоформы изоцитратлиазы было несколько выше и составляло 6 Е/мг белка, степень очистки – 122 раза, выход – 4%.

### 2.2.11. Электрофоретические исследования аконитатгидратазы из амаранта на гомогенность и специфическую активность

Электрофоретические исследования изоформ ИЦЛ из амаранта позволили установить гомогенность полученных препаратов и выявить специфичность изоцитратлиазной активности.

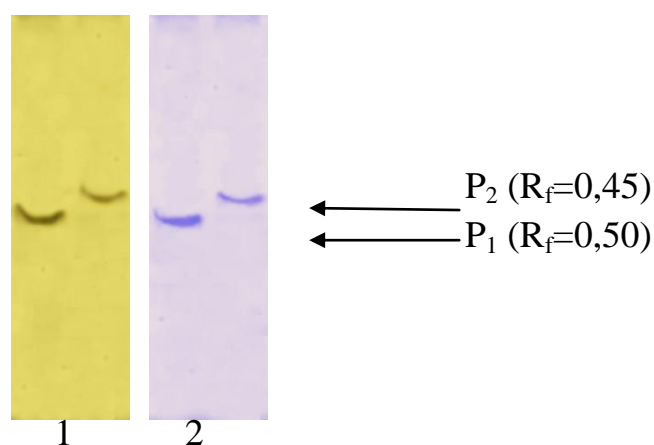


Рис. 18. Подтверждение гомогенности полученных форм АГ из амаранта  
1 – специфическое проявление АГ  
2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок)

$P_1, P_2$  – белковые полосы

Как видно из полученных данных (рис. 18), очищенные препараты изоцитратлиазы характеризовались разной электрофоретической подвижностью, составляющей  $R_f = 0,5$  для первого изофермента и  $R_f = 0,45$  для второй формы исследуемого фермента. Специфическое проявление быстродвижущейся и медленнодвижущейся изоформ показало наличие лиазной активности, дающей цветную реакцию в тетразолиевой цепи превращения. Образующийся диформазамазан имел четкую локализацию в месте нахождения белковых образцов, о чем свидетельствует совпадение значений относительной электрофоретической подвижности при универсальном и специфическом проявлении (рис. 18).

#### **2.2.12. Сравнительный анализ этапов очистки аконитазы из различных растений**

Анализ полученных результатов очистки изоформ аконитатгидратазы из растений с различным типом метаболизма свидетельствует, что применение пятистадийной схемы очистки позволило получить препараты исследуемого фермента в высокоочищенном или гомогенном состояниях. Данные по значениям удельной активности, степени очистки и выхода ферментативной активности, приведенные в таблице 9, указывают, что для гомогенных препаратов аконитазы из кукурузы, сои и амаранта наблюдаются незначительные колебания этих показателей. Из всех изучаемых растений получено две формы аконитатгидратазы, причем эффективное разделение изоферментов было обеспечено применением ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. С помощью линейных градиентов концентрации хлористого калия удалось десорбировать активность исследуемого фермента в виде двух пиков. При этом значения концентраций  $KCl$ , обеспечивающих десорбцию изоферментов, варьировали в небольших пределах. Величина

эффективного градиента укладывалась, как правило, в интервал от 45 до 155 мМ. Степень очистки аконитатгидратазы из разных растений варьировала в значительной мере от 79 до 133 раз в зависимости от объекта выделения.

Таблица 9.

Результаты очистки аконитазы из тканей различных растений  
(n = 5; p ≤ 0,05)

Название растений – объектов исследования	Изоформа	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Кукуруза	АГ <sub>1</sub>	3,95	79	3
	АГ <sub>2</sub>	5,09	100	3
Соя	АГ <sub>1</sub>	5,2	80	3
	АГ <sub>2</sub>	5,4	83	3
Амарант	АГ <sub>1</sub>	5,8	128	4
	АГ <sub>2</sub>	6,0	133	4

Величина степени очистки зависела в основном от двух показателей. Это удельная активность на первой стадии и величина этого показателя гомогенного препарата. Самым консервативным показателем был выход активности ферментов, составляющий от 3 до 4%. Следует отметить, что данная характеристика вполне адекватна результатам очисток фермента из других объектов, в том числе животного происхождения [5]. Для решения аналитических задач такой небольшой выход активности гомогенного препарата вполне уместен, так как он обеспечивает возможность исследования физико-химических, кинетических и регуляторных характеристик изоферментов.



### **2.2.13. Анализ основных показателей очищенных препаратов изоцитратлиазы из различных растений**

Для выполнения целей и задач исследования необходимо было получить гомогенные препараты изоформ изоцитратлиазы из кукурузы, сои и амаранта. В нашей работе использовали схемы очистки, разработанные на кафедре биохимии и физиологии клетки, для получения высокоочищенных препаратов изоформ изоцитратлиазы из растений [22]. Применение четырехстадийной схемы позволило получить изоферменты изоцитратлиазы с высокими значениями удельной активности.

Так, быстродвижущаяся форма ИЦЛ из кукурузы имела значение удельной активности 2,85 Е/мг белка, а медленнодвижущаяся – 3,1 Е/мг белка. Максимальные значения этого показателя были характерны для сои и амаранта. Интересно отметить, что быстродвижущиеся формы ИЦЛ из сои и амаранта обладали более высокой удельной активностью. Так, величина удельной активности этой формы из сои составляла 4,25 Е/мг белка. Характерной особенностью используемой схемы очистки изоцитратлиазы было использование ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, причем применение этой стадии позволило получить препараты двух изоформ исследуемого фермента из кукурузы, сои и амаранта. Степень очистки гомогенных препаратов изоформ ИЦЛ колебалась в пределах от 57 до 87 раз. На наш взгляд, это было обусловлено разным значением величины удельной активности в гомогенате исследуемых растений. Следует отметить, что для очистки изоцитратлиазы из растительных объектов характерен значительно более высокий уровень выхода ферментативной активности, который колебался от 6,5 у сои до 9% у амаранта (табл. 10). Более высокий уровень выхода активности при получении высокоочищенных препаратов ИЦЛ, по-видимому, можно объяснить более значительным содержанием изоцитратлиазной активности в растительных объектах.

Таблица 10.

Основные показатели очистки изоферментов ИЦЛ  
из кукурузы, сои и амаранта ( $n = 5$ ;  $p \leq 0,05$ )

Название растений – объектов исследования	Изофермент	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Кукуруза	ИЦЛ <sub>1</sub>	2,85	62	8
	ИЦЛ <sub>2</sub>	3,10	65	8,5
Соя	ИЦЛ <sub>1</sub>	4,25	87	7
	ИЦЛ <sub>2</sub>	3,60	71	6,5
Амарант	ИЦЛ <sub>1</sub>	3,63	57	9
	ИЦЛ <sub>2</sub>	4,05	67	8

**2.2.14. Электрофоретические исследования препаратов изоцитратлиазы, очищенных из кукурузы, сои и амаранта**

Для выяснения гомогенности полученных препаратов изоцитратлиазы из растительных объектов использовали электрофоретические исследования в полиакриламидном геле. Применение универсального красителя  $\text{AgNO}_3$ , характеризующегося очень высокой чувствительностью, показало, что полученные образцы проявлялись в виде одной полосы (рис. 19, 20, 21). У препаратов, выделенных из кукурузы, были обнаружены изоформы с  $R_f = 0,25$  и  $0,30$ . Интересно отметить, что специфическое проявление очищенных препаратов изоформ ИЦЛ подтвердило наличие у белков изоцитратлиазной активности с одинаковыми значениями относительной электрофоретической подвижности (рис. 19).

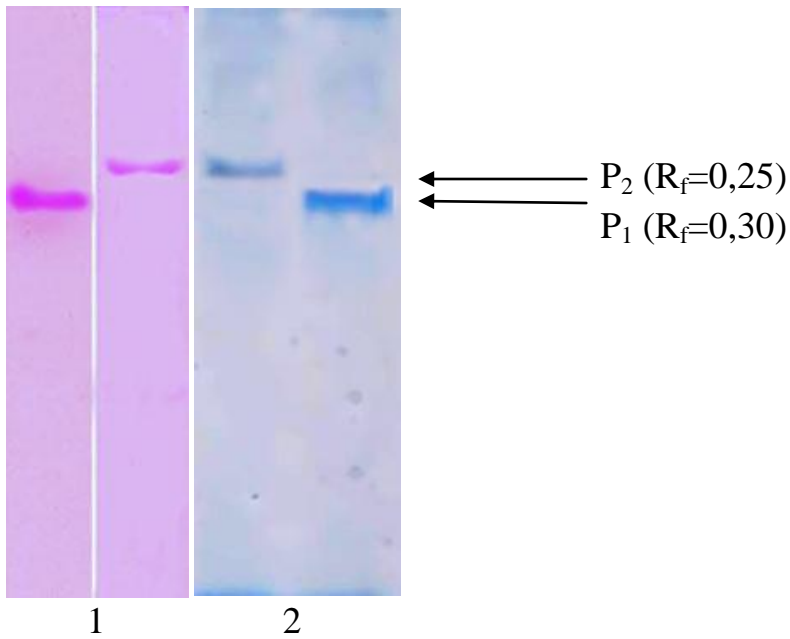


Рис. 19. Подтверждение гомогенности полученных форм ИЦЛ из кукурузы  
 1 – специфическое проявление ИЦЛ  
 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок)  
 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

На рисунке 20 приводятся результаты электрофоретического анализа препаратов изоформ изоцитратлиазы из сои.

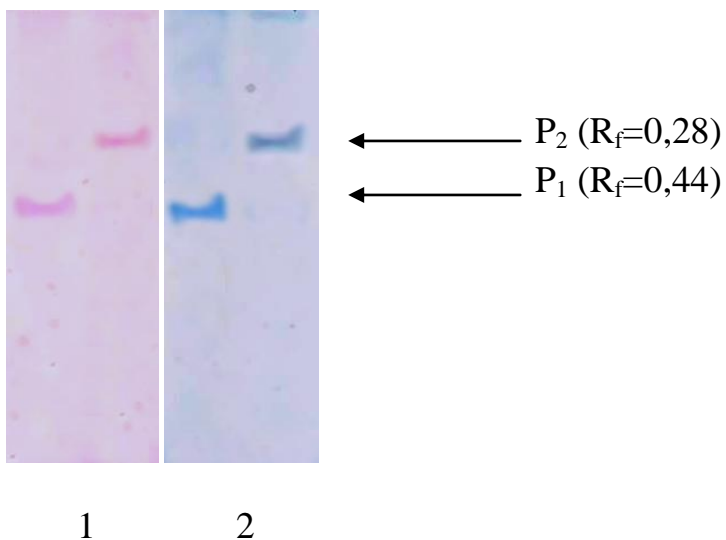


Рис. 20. Подтверждение гомогенности полученных форм ИЦЛ из сои  
 1 – специфическое проявление ИЦЛ  
 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок)  
 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

Анализ полученных данных свидетельствует, что в результате четырехстадийной схемы очистки получены электрофоретически гомогенные изоформы с  $R_f = 0,28$  и  $0,44$ . С помощью специфического проявления было подтверждено, что электрофоретически гомогенные препараты изоформ ИЦЛ из сои характеризуются специфическим проявлением. Следовательно, можно заключить, что полученные образцы являются изоформами фермента изоцитратлиазы.

Анализ данных электрофоретических исследований высокоочищенных препаратов и изоформ ИЦЛ из амаранта (рис. 21) четко указывает, что полученные образцы являются электрофоретически гомогенными и обладают изоцитратлиазной активностью. Следует отметить, что данные электрофореза в значительной степени подтверждаются другими исследователями. Было показано, что высокоочищенные препараты изоцитратлиазы из растительных объектов с удельной активностью выше  $3,5$  Е/мг белка являются гомогенными, то есть чистыми от примесей других белков [6].

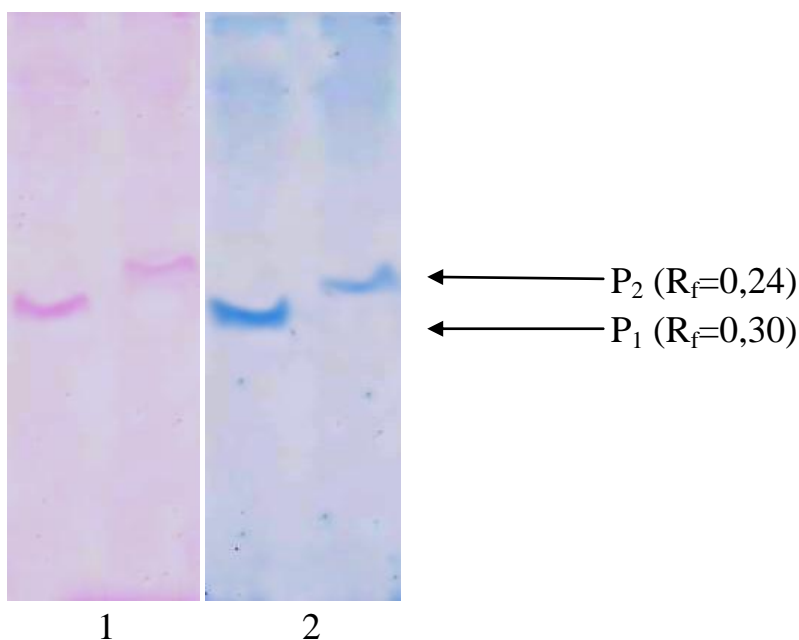


Рис. 21. Подтверждение гомогенности полученных форм ИЦЛ из амаранта  
 1 – специфическое проявление ИЦЛ  
 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок)  
 $P_1, P_2$  – белковые полосы

## **2.2.15. Метаболитная регуляция аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях**

### **2.2.15.1. Ингибирование функционирования изоферментов аконитатгидратазы транс-аконитатом**

Регуляция активности важнейших ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути открывает перспективы для разработки энзиматических механизмов функционирования ката- и анаболических процессов. Влияние на энзимы интермедиатов, относящихся к продуктам метаболизма, открывает перспективы для выяснения способов изменения активности ферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы. Характерной особенностью растительной клетки является способность накапливать в больших количествах органические кислоты. Так, транс-аконитовая кислота может достигать значительных концентраций в кукурузе, сахарном тростнике, копытне европейском и других растениях, которые называются «аконитовыми аккумуляторами» [6]. Из литературных данных известно, что транс-аконитат является сильным конкурентным ингибитором аконитазы животного происхождения. В связи с этим значительный интерес представляют данные, полученные по выяснению величин констант ингибирования и типа ингибирования, приведенные в таблице 11. Как видно из полученных результатов, транс-аконитовая кислота оказывала тормозящее действие на аконитазную активность во всех исследованных растениях. Характерно, что ингибирование для электрофоретически гомогенных препаратов изоформ АГ из кукурузы, сои и амаранта осуществлялось по конкурентному типу. Особый интерес вызывают значения  $K_i$  для АГ из кукурузы, которая способна накапливать значительные количества транс-аконитовой кислоты. Анализ величин  $K_i$  митохондриальной и цитоплазматической изоформ аконитазы свидетельствует, что значения этого

показателя для митохондриальной формы меньше ( $K_i = 2,56$  мМ), чем для цитоплазматической ( $K_i = 3,86$  мМ). Такой механизм ингибирования различно локализованных изоформ АГ является логичным, так как цитоплазматическая форма фермента находится в большем контакте с транс-аконитатом, который, по мнению многих исследователей, синтезируется в цитоплазматической фракции и накапливается в вакуоли [17].

Таблица 11.

Величина констант ингибирования транс-аконитатом изоферментов АГ из растений с различным типом метаболизма ( $n = 5$ ;  $p \leq 0,05$ )

Название вида растения	Значение $K_i$ (цитрат), мМ		Значение $K_i$ (изоцитрат), мМ	
	1	2	1	2
Кукуруза	2,56	3,845	1,77	2,58
Соя	1,89	2,46	1,34	1,89
Амарант	1,55	2,05	1,45	1,79

1 – АГ из митохондрий; 2 – АГ из цитоплазмы

Сравнительное исследование результатов ингибирования транс-аконитовой кислотой изоформ АГ из сои и амаранта показывает четко выраженную тенденцию, которая заключается в большей устойчивости к этому интермедиату аконитатгидратазы, локализованной в цитоплазме. Так, для сои значение  $K_i$  для цитоплазматического изофермента равняется 2,46 мМ, а для митохондриального – 1,89 мМ. Для амаранта характер корреляции значений констант ингибирования имеет аналогичный характер в сравнении с кукурузой и соей.

При использовании в качестве субстрата изолимонной кислоты были получены данные, свидетельствующие о конкурентном типе ингибирования аконитатгидратазы, выделенной и очищенной до гомогенного состояния из кукурузы, сои и амаранта (рис. 22, 23, 24). Кроме того, следует отметить сохранение выявленной ранее для цитрата закономерности, что величина

константы ингибирования цитоплазматической формы исследуемого фермента транс-аконитатом выше для цитоплазматической фракции (табл. 11).

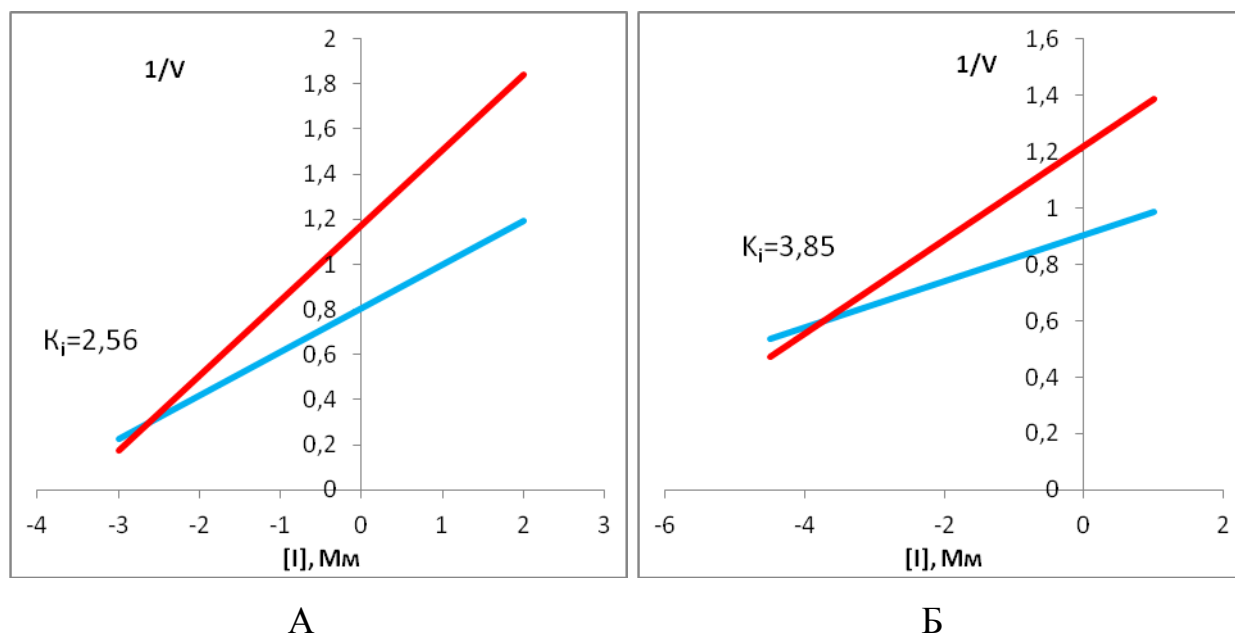


Рис. 22. Определение величины константы ингибирования митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) аконитатгидратазы из кукурузы транс-аконитатом.

— 4мМ цитрата;

— 2мМ цитрата.

Так, для кукурузы величина константы ингибирования АГ транс-аконитатом из цитоплазмы составляла 2,58 мМ, а для митохондриальной фракции – 1,77 мМ.

Следует обратить внимание, что полученные результаты указывают на то, что транс-аконитовая кислота оказывает тормозящее действие на аконитазу из кукурузы, сои и амаранта по конкурентному типу. При этом, конкурентный тип ингибирования АГ остается, как при использовании в качестве субстрата лимонной кислоты, так и изоцитрата.

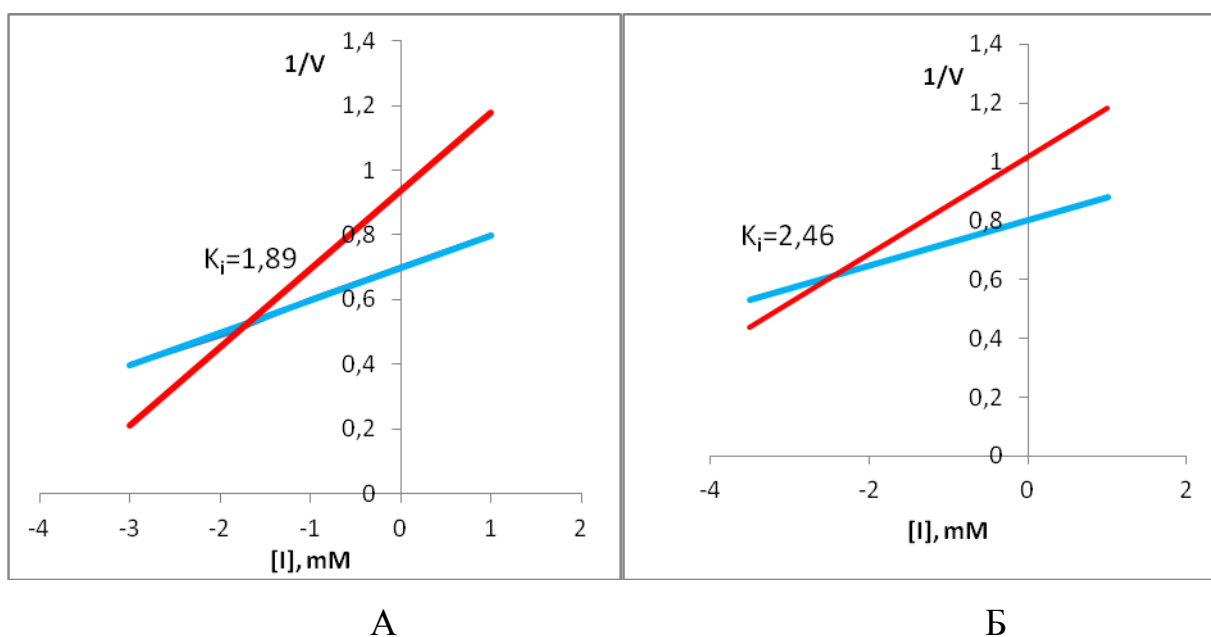


Рис. 23. Определение величины константы ингибирования митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) аконитатгидратазы из сои.

— - 4мМ цитрата;

— - 2мМ цитрата.

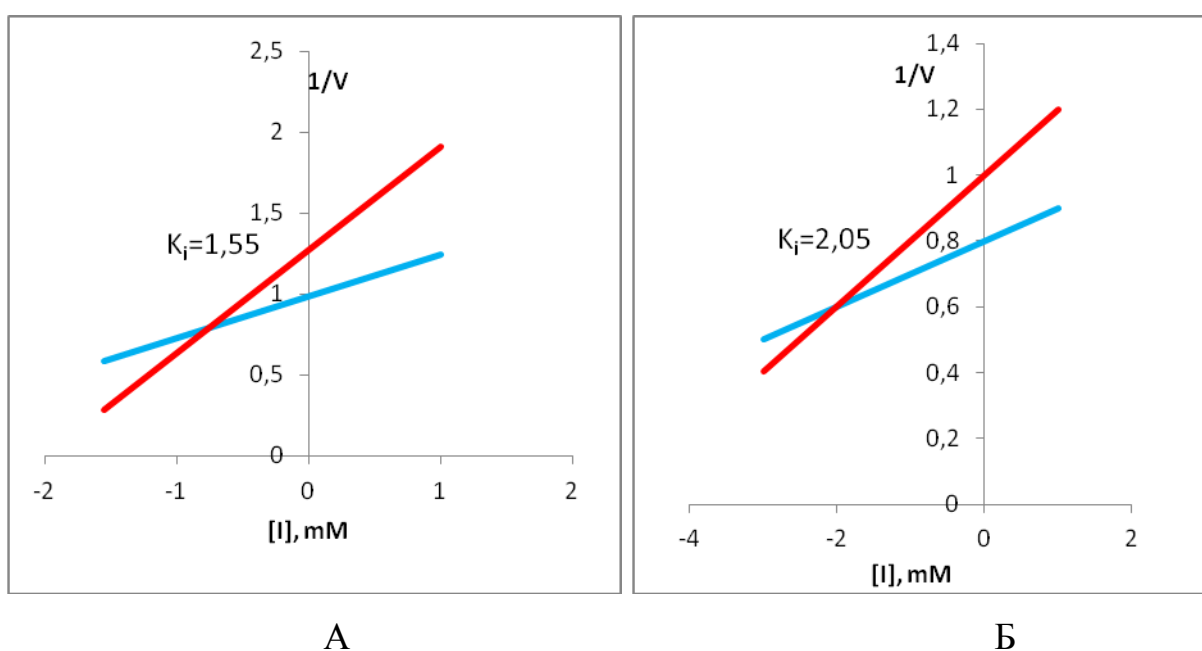


Рис. 24. Определение величины константы ингибирования митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) аконитатгидратазы из амаранта.

— - 4мМ цитрата;

— - 2мМ цитрата.



Сравнение полученных результатов по ингибированию транс-аконитатом АГ из растений с литературными данными свидетельствует о том, что по сравнению с животной АГ растительный фермент имеет значительно большую устойчивость к тормозящему действию этой кислоты.

Так,  $K_i$  для аконитазы из сердца свиньи имеет величину 1,5 мМ, а для растительной АГ, полученной из кукурузы – 3,8 мМ [6]. Следовательно, растительная аконитаза, обладающая большей устойчивостью к этому важному интермедиату, играет важную роль в осуществлении механизмов синтеза и накопления транс-аконитовой кислоты [12].

#### **2.2.15.2. Регуляция активности аконитатгидратазы органическими кислотами**

Исследование регуляторного влияния органических кислот на функционирование энзима аконитатгидратазы из исследуемых растений проводили с использованием таких важнейших интермедиатов, как малат, сукцинат, фумарат, глиоксилат. Результаты этого исследования, приведенные в таблице 12, показывают, что все использованные соединения вызывали тормозящее действие на функционирование аконитазы по конкурентному типу. Анализ значений констант ингибирования, определенных по Диксону и Уэббу, показывает варьирование величины этого показателя от 1,24 до 2,15 мМ. Наибольшее тормозящее действие оказывал фумарат, который, ингибируя активность фермента по конкурентному типу, имел  $K_i$  в пределах от 1,24 до 1,72 мМ. Определенная закономерность обнаружена для разных изоформ фермента.

Так, митохондриальная изоформа обладала меньшей устойчивостью практически ко всем исследованным органическим кислотам. Величина  $K_i$  малатом для митохондриальной формы АГ составляла 2,14 мМ, а для

цитоплазматической – 2,86 мМ. Особое место в механизмах ингибирования аконитазы занимает глиоксилат.

Таблица 12.

Величина констант ингибирования изоферментов АГ из растений с различным типом метаболизма ( $n = 5$ ;  $p \leq 0,05$ )

Название вида растения		Значение $K_i$ , мМ			
		Сукцинат	Малат	Фумарат	Глиоксилат
Кукуруза	1	1,75	2,14	1,24	2,05
	2	2,06	2,86	1,72	2,18
Соя	1	1,63	1,79	1,37	1,98
	2	1,78	1,84	1,54	2,15
Амарант	1	1,35	1,96	1,7	1,27
	2	1,69	1,87	1,62	1,36

1 – АГ из митохондрий; 2 – АГ из цитоплазмы

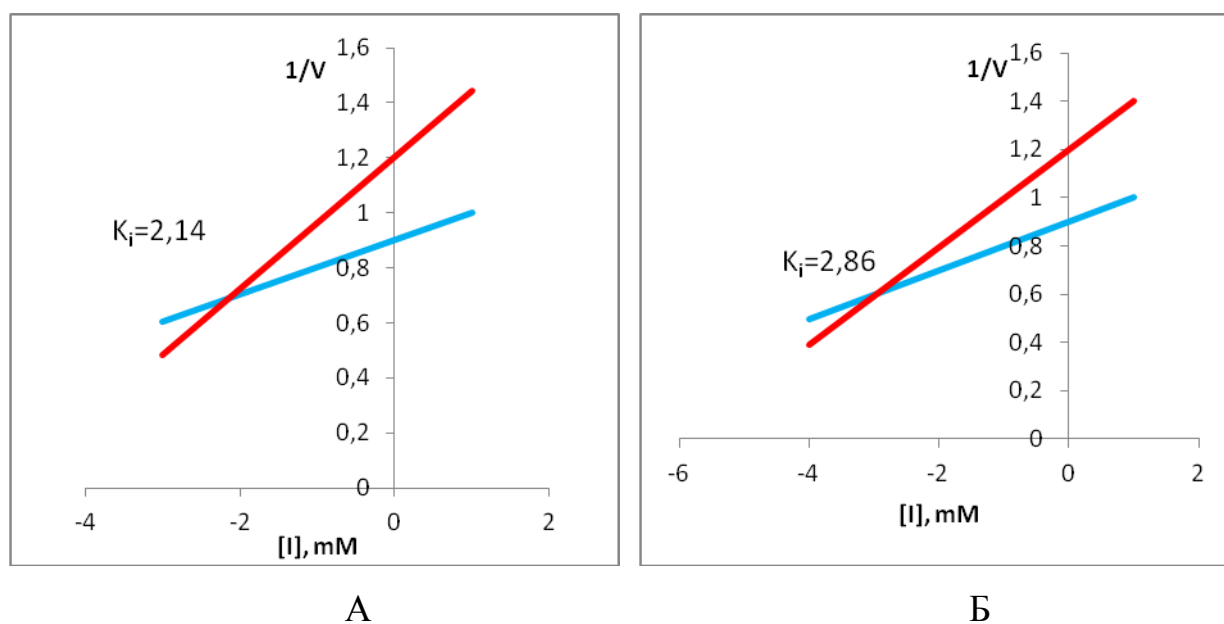


Рис. 25. Определение значения констант ингибирования малатом митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) аконитатгидратазы из кукурузы.

— - 4мМ цитрата;

— - 2мМ цитрата.

Значения констант ингибирования для обеих форм фермента колеблются незначительно и составляют от 2,05 до 2,18 для кукурузы, для фермента из сои показатели варьировали от 2,15 до 1,98 мМ, а для амаранта – от 1,27 до 1,36 мМ.

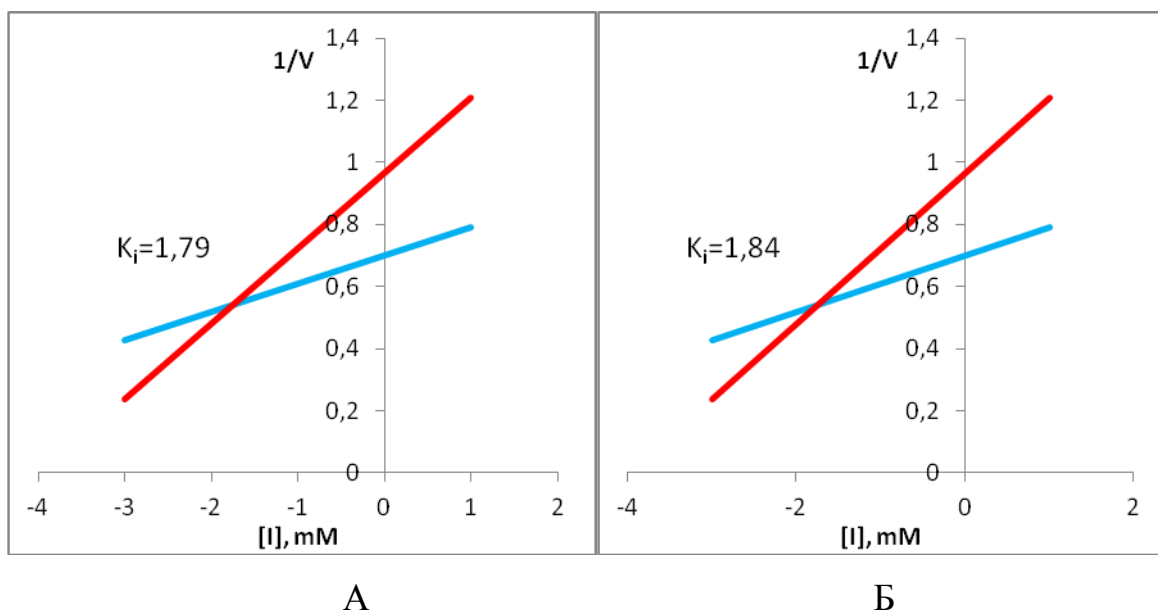


Рис. 26. Определение значения констант ингибирования малатом митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) аконитатгидратазы из сои.

— 4мМ цитрата;

— 2мМ цитрата.

Характер тормозящего действия исследованных органических кислот указывает на конкурентный тип ингибирования аконитатгидратазы из кукурузы, сои и амаранта (рис. 25, 26, 27). Анализ результатов проведенного исследования может свидетельствовать о возможной регуляторной роли этих интермедиатов в функционировании аконитазной реакции в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном пути.

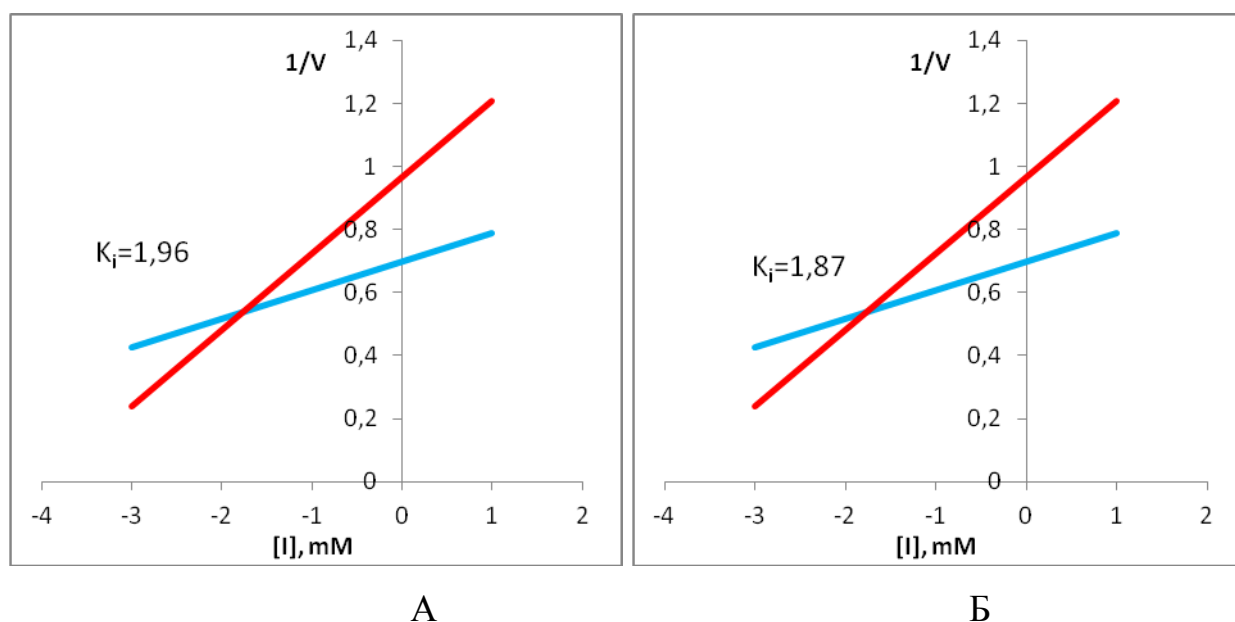


Рис. 27. Определение значения констант ингибирования малатом митохондриальной (А) и цитоплазматической (Б) аконитатгидратазы из амаранта.

— - 4мМ цитрата;

— - 2мМ цитрата.

### 2.2.15.3. Действие интермедиатов глюконеогенеза на активность изоцитратлиазы

Изоцитратлиаза, являющаяся ключевым ферментом глиоксилатного пути, имеет различные механизмы регуляции в растительной клетке. Интересным остается вопрос о способах торможения (выключения) функционирования изоцитратлиазной активности по принципу обратной связи, то есть интермедиатами, представляющими конечный этап глюконеогенеза. В нашей работе были проведены исследования ингибиторного действия глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат на изоформы изоцитратлиазы, обнаруженные в кукурузе, сое и амаранте. Как видно из полученных данных, приведенных в таблице 13, глюкозо-1-фосфат и глюкозо-6-фосфат вызывают тормозящее действие на функционирование

изоформ исследуемого фермента. Характерной тенденцией является большая устойчивость изоцитратлиазы из глиоксисом к исследуемым интермедиатам. Кроме того, анализ значений констант ингибирования для глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата свидетельствует, что конечный продукт глюконеогенеза обладает большим тормозящим действием.

С помощью метода Диксона и Уэбба были проведены графоаналитические исследования типа ингибирования. Как видно из данных, приведенных в виде рисунков 28, 29, 30, ингибирование изоформ изоцитратлиазы глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом осуществлялось по конкурентному типу. Причем, этот механизм торможения был обнаружен как для цитоплазматического изофермента, так и для глиоксисомальной формы. Конечные продукты глюконеогенеза, оказывающие ингибирующее действие на изоцитратлиазную активность, осуществляли ингибирование по конкурентному типу.

Таблица 13.

Величина констант ингибирования изоферментов ИЦЛ из растений с различным типом метаболизма ( $n = 5; p \leq 0,05$ )

Название вида растения		Значение $K_i$ (глюкозо-1-фосфат), мМ	Значение $K_i$ (глюкозо-6-фосфат), мМ
Кукуруза	1	0,973	2,106
	2	0,745	1,723
Соя	1	1,105	1,972
	2	0,986	1,654
Амарант	1	0,896	1,841
	2	0,751	1,645

1 – ИЦЛ из цитоплазмы; 2 – ИЦЛ из глиоксисом

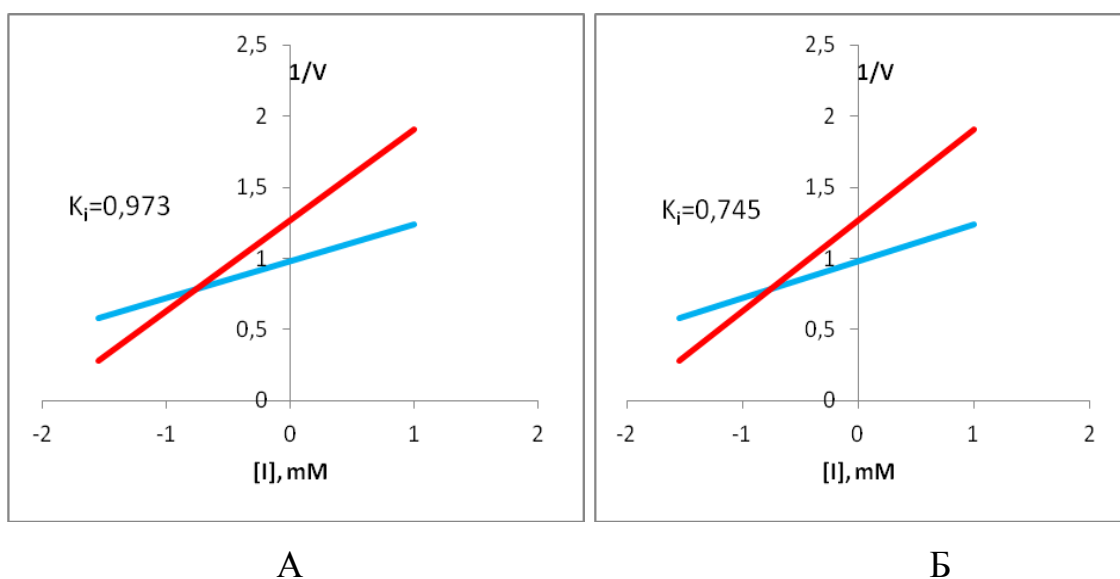


Рис. 28. Определение значения констант ингибирования цитоплазматической (А) и митохондриальной (Б) изоцитратлиазы из кукурузы глюкозо-1-фосфатом.

— 4мМ цитрата;

— 2мМ цитрата.

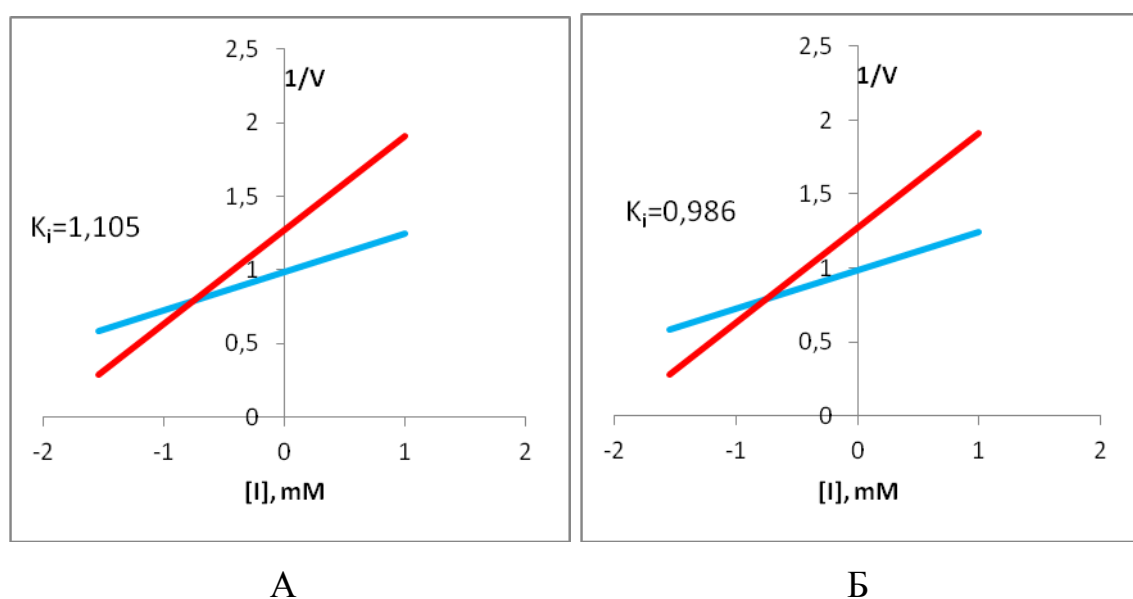


Рис. 29. Определение значения констант ингибирования цитоплазматической (А) и митохондриальной (Б) изоцитратлиазы из сои глюкозо-1-фосфатом.

— 4мМ цитрата;

— 2мМ цитрата.

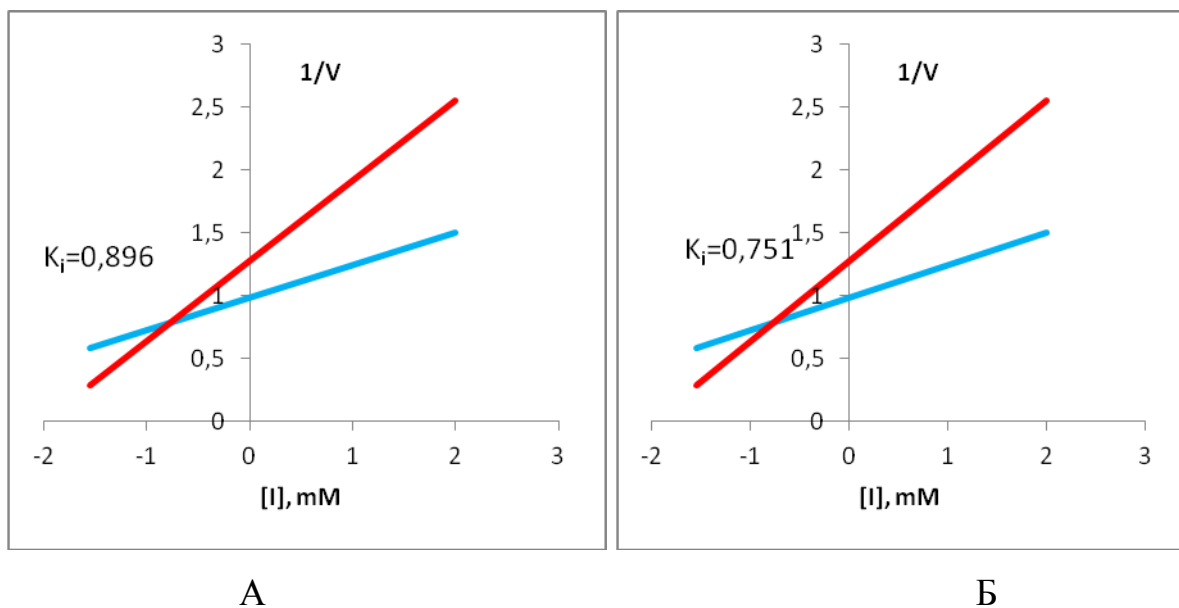


Рис. 30. Определение значения констант ингибирования цитоплазматической (А) и митохондриальной (Б) изоцитратлиазы из амаранта глюкозо-1-фосфатом.

— - 4мМ цитрата;

— - 2мМ цитрата.

#### 2.2.15.4. Влияние органических кислот на функционирование изоцитратлиазы из разных растений

Изоцитратлиаза обеспечивает функционирование глиоксилатного цикла, являющегося важнейшим этапом глюконеогенеза. Следовательно, этому ферменту присуща анаплеротическая природа, и можно предположить, что интермедиаты анаболических путей могут регулировать активность этой ферментной системы. В нашей работе было проведено изучение действия на активность изоцитратлиазы, выделенной и очищенной до гомогенного состояния, из кукурузы, сои и амаранта органических кислот (транс-аконитат, сукцинат, глиоксилат, малат и фумарат). Растительная изоцитратлиаза проявила значительную устойчивость к этим интермедиатам. Торможение активности исследуемого фермента обнаруживалось только при

концентрациях, значительно превышающих физиологический уровень. Так, изоцитратлиаза из кукурузы снижала на 20-25% свою активность при концентрации транс-аконитовой кислоты – 83 мМ. Торможение лиазной активности фермента, выделенного из амаранта, наблюдали при воздействии 76 мМ малата. Для ингибирования ИЦЛ из сои фумаратом необходимо было воздействие 110 мМ этого интермедиата. Для всех перечисленных органических кислот было обнаружено тормозящее действие изоцитратлиазы при концентрации интермедиатов выше физиологического уровня в десятки раз. Поэтому анализ полученных данных показал большую устойчивость растительной изоцитратлиазы к исследованным органическим кислотам.

#### **2.2.16. Воздействие перекиси водорода на активность аконитатгидратазы**

Активные формы кислорода играют важную роль в регуляции активности ферментов окислительного метаболизма. Наибольший вклад в изучение этих биохимических механизмов внесен исследователями по влиянию перекиси водорода на функционирование различных ферментных систем. В нашей работе учитывались факторы, обеспечивающие взаимодействие перекиси водорода с железо-серным кластером, входящим в состав аконитатгидратазы. Кроме того, сравнивалось тормозящее действие перекиси водорода на активность аконитатгидратазы, выделенной из митохондриальной и цитоплазматической фракции растительных клеток. Как видно из полученных результатов (рис. 31, 32), перекись в исследуемых концентрациях (20-300 мкМ) оказывала ингибирующее действие на функционирование аконитатгидратазной ферментной системы в сое. Установлена четкая зависимость между содержанием перекиси водорода и степенью тормозящего влияния на активность аконитатгидратазы. Использование 20 мкМ перекиси водорода вызывало снижение активности



цитоплазматической аконитатгидратазы на 28-30% при экспозиции 5 мин. Более высокие концентрации этого вещества ингибировали сильнее функционирование цитоплазматической формы фермента. Так, 70 мкМ  $H_2O_2$  вызывала ингибирующий эффект активности АГ на 60% от первоначальной активности. Наибольший тормозящий эффект наблюдался при инкубации цитоплазматической аконитатгидратазы с такими концентрациями перекиси водорода, как 100 и 300 мкМ.

Влияние активной формы кислорода, содержащейся в перекиси водорода на митохондриальную форму аконитазы было более сильным. Слабые концентрации этого соединения (20 мкМ) приводили к снижению ферментативной активности на 45%. Практически полное ингибирование функционирования митохондриальной аконитазы наблюдали при высоких значениях этого вещества (100-300 мкМ).

Анализ данных по действию перекиси водорода на активность аконитазы, выделенной из цитоплазматической и митохондриальной фракции кукурузы. Показывает сильную зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации перекиси водорода (рис. 33, 34).

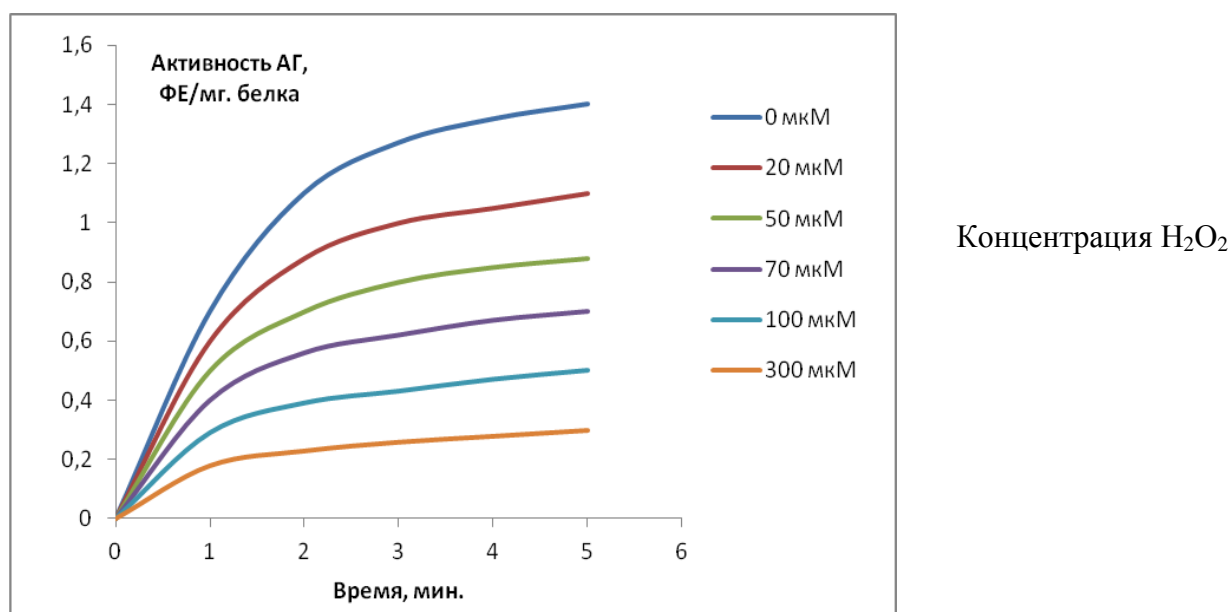


Рисунок 31. Влияние перекиси водорода на активность цитоплазматической АГ из сои.

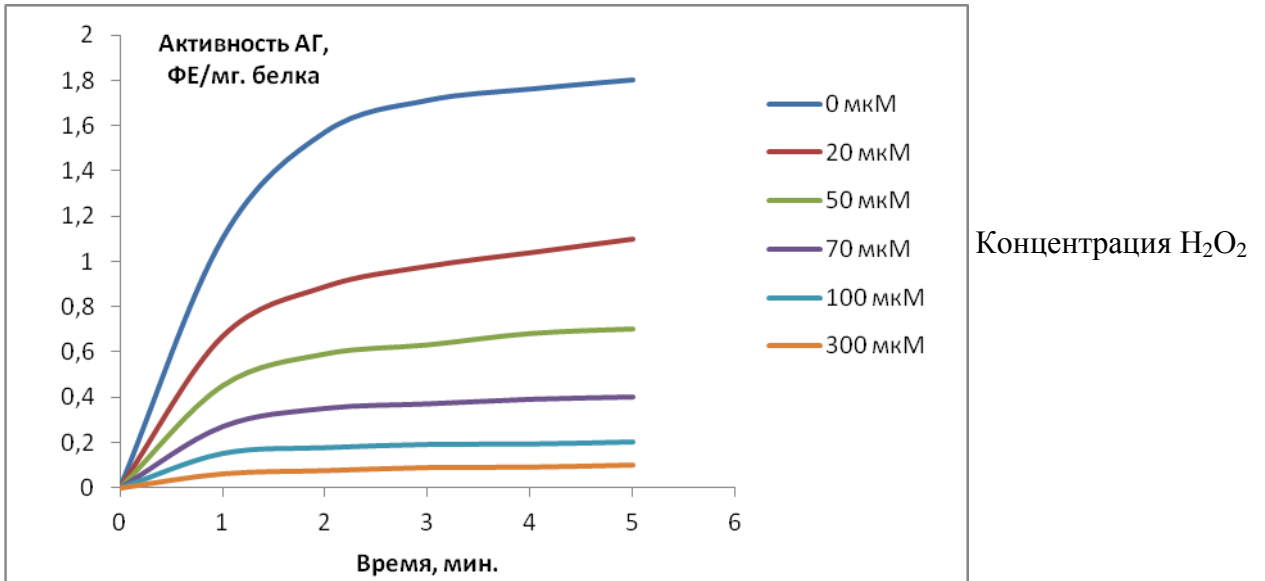


Рисунок 32. Влияние перекиси водорода на активность митохондриальной АГ из сои.

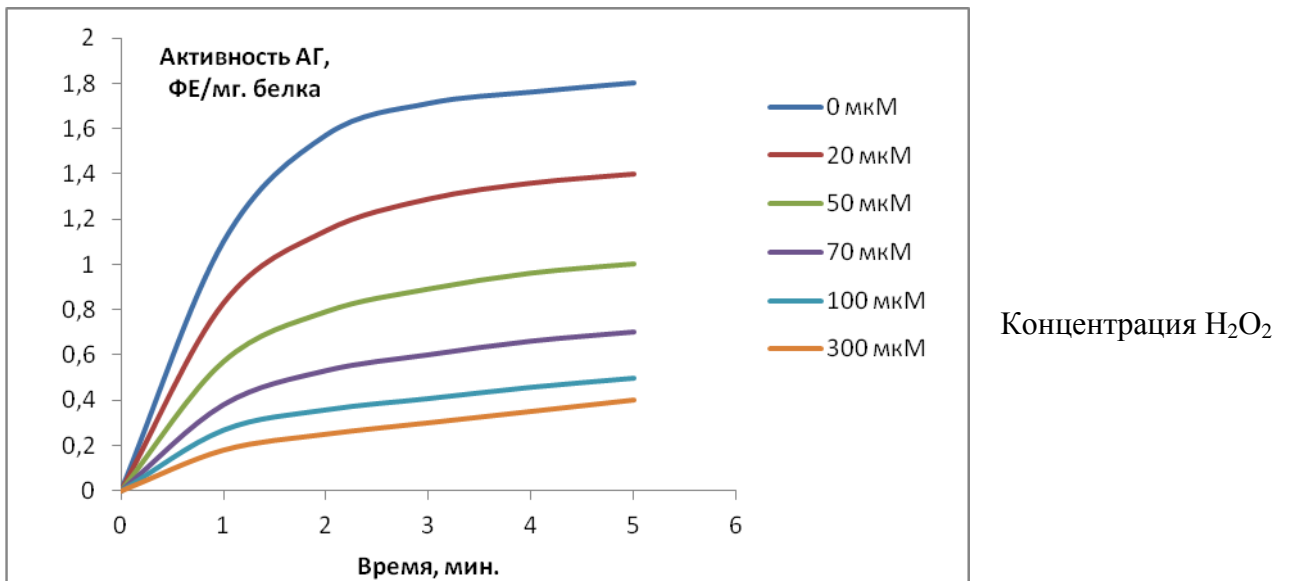


Рисунок 33. Влияние перекиси водорода на активность цитоплазматической АГ из кукурузы.

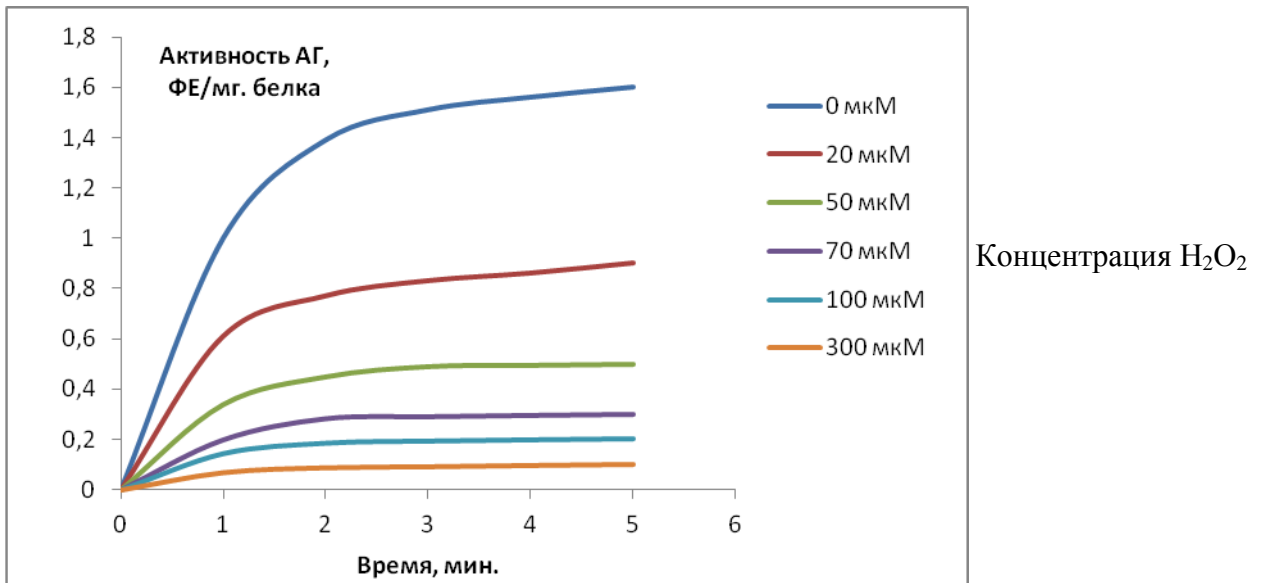


Рисунок 34. Влияние перекиси водорода на активность митохондриальной АГ из кукурузы.

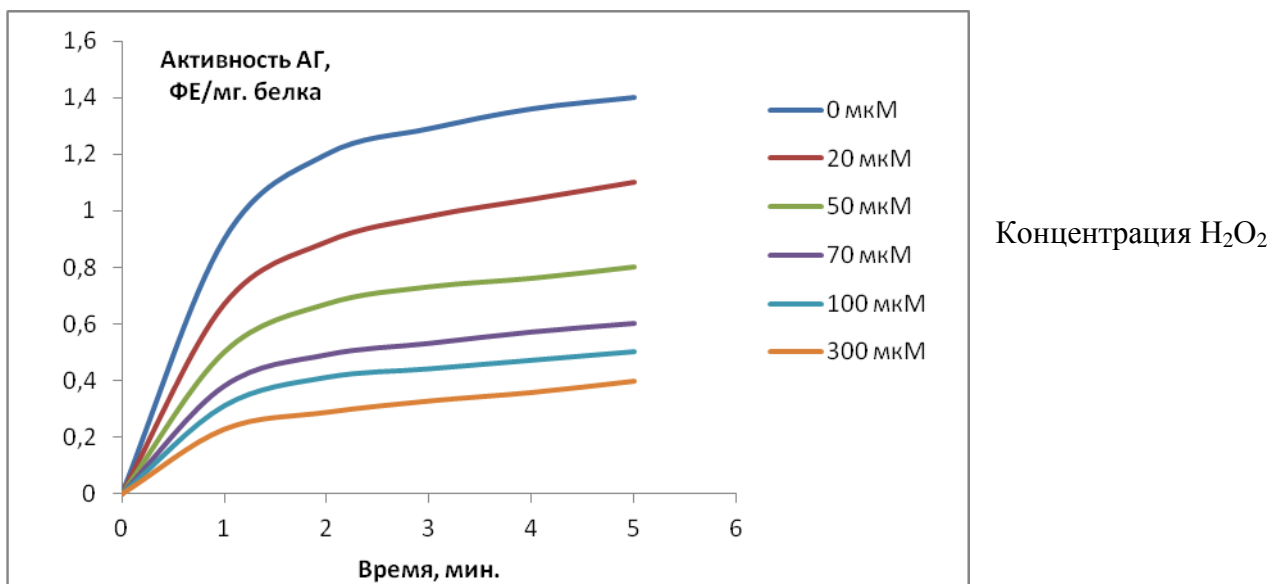


Рисунок 35. Влияние перекиси водорода на активность цитоплазматической АГ из амаранта

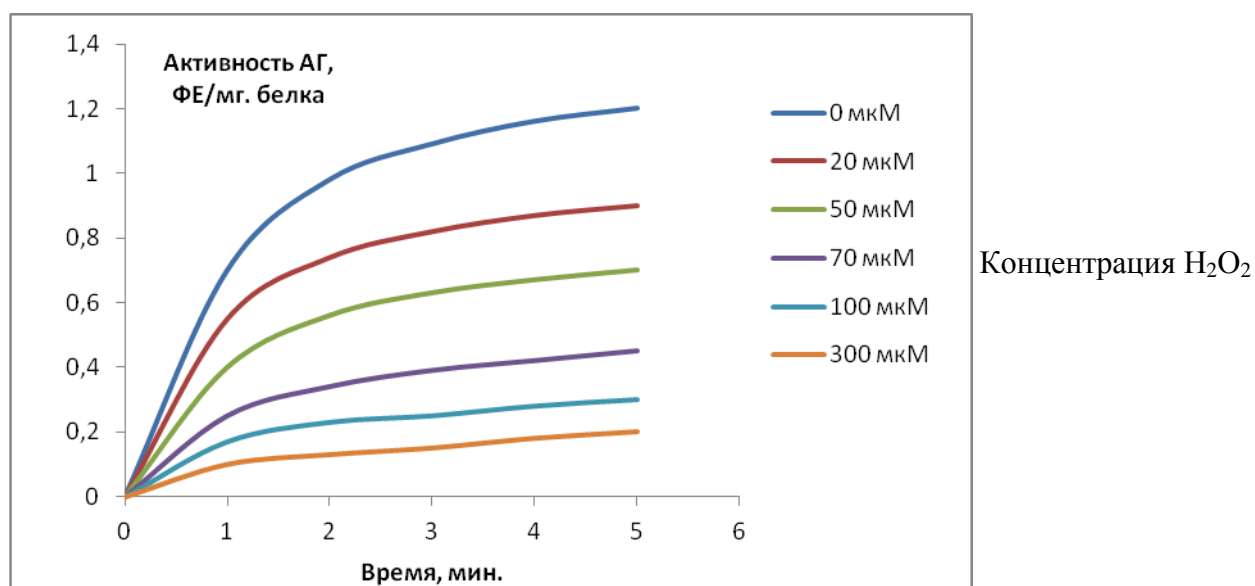


Рисунок 36. Влияние перекиси водорода на активность митохондриальной АГ из амаранта

Обнаружена различная устойчивость к перекиси водорода цитоплазматической и митохондриальной форм аконитазы, выделенной из кукурузы. Митохондриальная форма АГ подвергалась более сильному тормозящему эффекту по сравнению с цитоплазматической формой. Так, инкубация исследуемого фермента с 20 мкМ  $H_2O_2$  вызывала торможение активности митохондриальной формы на 50% от первоначальной активности, а для цитоплазматического изофермента выявлено ингибирование на 25%. Следует отметить, что анализ данных, приведенных на рисунках 33 и 34, позволяет сделать заключение о том, что высокие концентрации этого вещества (100-300 мкМ) оказывают очень сильный тормозящий эффект.

Особенности инактивирующего действия различных концентраций  $H_2O_2$  на цитоплазматическую и митохондриальную форму аконитазу, выделенную из амаранта, приведены на рисунках 35 и 36. Все основные тенденции тормозящего действия перекиси водорода на аконитатгидратазную активность в амаранте сохраняются и аналогичны

выявленным и описанным ранее изменениям функционирования аконитатгидратазы из кукурузы и сои.

### **2.2.17. Регуляция активности изоферментов изоцитратлиазы перекисью водорода**

Для проведения сравнительного изучения влияния перекиси водорода на активность изоцитратлиазы использовали концентрации этой формы активного кислорода в тех же значениях, что и в разделе 2.2.16. Концентрация перекиси водорода в модельных опытах колебалась от 20 до 300 мкМ. При проведении данных экспериментов использовали гомогенные или высокоочищенные препараты изоферментов изоцитратлиазы из разных растений. Анализ полученных данных показал, что инкубация глиоксисомального и цитоплазматического изоферментов ИЦЛ с перекисью водорода в обозначенных концентрациях не приводила к изменению функционирования энзима. Сравнение действия этого вещества на глиоксисомальную и цитоплазматическую формы фермента также показало практически полную устойчивость изоцитратлиазы. При длительной экспозиции (5-6 мин) можно было отметить небольшую активацию, составляющую 2-3% от контроля, для цитоплазматической формы изоцитратлиазы. Более краткосрочное действие  $H_2O_2$  в концентрациях от 20 до 300 мкМ не вызывало изменения в функционировании изоцитратлиазы, что свидетельствует о достаточно эффективной защите молекулы биокатализатора от активных форм кислорода.

### **2.2.18. Экспрессионная регуляция аконитазной и изоцитратлиазной активности при прорастании растений**

### 2.2.18.1. Выделение тотальной клеточной РНК из кукурузы и амаранта и получение ее кДНК

Поскольку аконитатгидратаза кодируется двумя генами, картина их экспрессии также может иметь дифференциальный характер при развитии растительного организма. В связи с этим нами проведено исследование уровня транскрипции генов *aco1* и *aco2*, кодирующих митохондриальную и цитоплазматическую формы аконитазы.

Применение гуанидинтиоцианата позволило выделить тотальную РНК практически без следов дегградации, о чем свидетельствует более высокое содержание в них 28S рРНК, по сравнению с количеством 18S рРНК. Качество полученного препарата тотальной РНК проанализировано с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (рис 37).

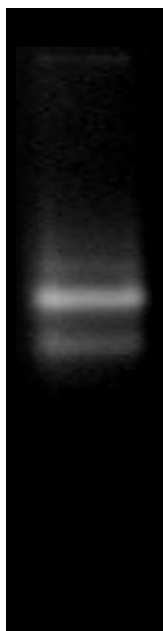


Рис. 37. Результаты выделения суммарной клеточной РНК из щитков кукурузы.

Выделенную суммарную РНК использовали для синтеза кДНК методом обратной транскрипции с M-MULV-обратной транскриптазой и праймерами олиго(dT) (рис. 38). Полученную кДНК использовали для

анализа экспрессии генов *aco1* и *aco2* с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

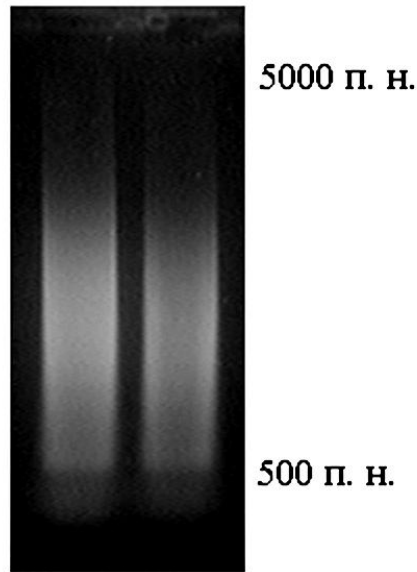


Рис. 38. Продукты обратной транскрипции суммарной клеточной РНК щитков кукурузы с использованием ревертазы M-Mulv и олиго-(dT)<sub>18</sub> праймера.

#### **2.2.18.2. Исследование экспрессии генов *aco1* и *aco2* при прорастании семян кукурузы**

Анализ результатов исследования уровня транскрипции гена *aco1* методом количественного ПЦР в реальном времени показывает, что количество мРНК исследуемого гена значительно варьирует в щитках семян кукурузы при их прорастании (рис. 39). Максимальное значение экспрессии гена *aco1* наблюдается на 3 день прорастания, однако, начиная с 6-го дня, наблюдается резкое снижение величины данного показателя. Уже на 9-ий день прорастания семян уровень транскрипции гена *aco1* в щитках кукурузы составляет 0,2% относительно максимального значения (3-ий день). Увеличение скорости транскрипции исследуемого гена аконитазы на начальных этапах развития семян, вероятно, связано с интенсификацией

метаболических процессов. При гетеротрофном типе питания происходит мобилизация запасных веществ, что требует увеличения скорости функционирования дыхательного метаболизма, в том числе и цикла трикарбоновых кислот и, соответственно, происходит увеличение активности аконитатгидратазы. Полученные данные по изменению уровня экспрессии гена *aco1* свидетельствуют, что механизмом изменения митохондриальной формы активности исследуемого фермента является регуляция скорости транскрипции гена *aco1*.

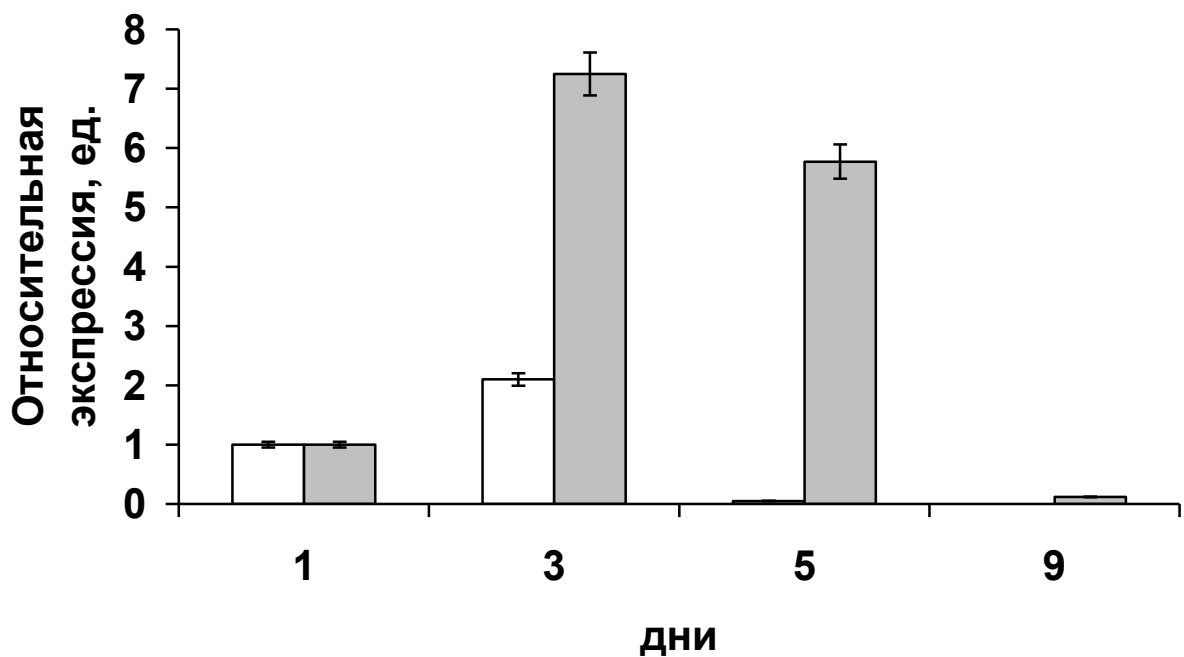


Рис. 39. Экспрессия генов аконитазы в щитках кукурузы при прорастании семян: белые (цитоплазматическая), серые (митохондриальная).

Такое резкое снижение интенсивности экспрессии гена *aco1* коррелирует со скоростью функционирования аконитатгидратазы в щитках кукурузы при прорастании.

Данные по экспрессионной активности гена *aco1* в щитках кукурузы свидетельствуют о неоднородности уровня экспрессии митохондриальной формы аконитазы в щитках при прорастании семян. Резкое уменьшение



транскрипции гена *aco1* к 9-му дню прорастания, вероятно, обусловлено снижением скорости мобилизации запасных веществ семени в связи с переходом к автотрофному типу питания.

Кроме того, была выявлена зависимость изменения уровня экспрессии гена *aco2* при прорастании семян кукурузы. Расчетные значения относительной концентрации транскрипта гена *aco2* в разных образцах кДНК представлены на рисунке 39, из которого видно, что в щитках с первого по третий день наблюдается определенный уровень экспрессии исследуемого гена, достигающий максимума на третий день прорастания. Начиная с четвертого дня, экспрессия гена *aco2* уменьшается, и уже с 5-го дня экспрессия гена цитоплазматической формы аконитатгидратазы полностью прекращается.

Полученные данные по динамике экспрессии генов аконитазы позволяют оценить изменение скорости функционирования ЦТК в щитках семян кукурузы и выдвинуть предположение о его роли при гетеротрофном типе питания и при переходе к фотосинтезу. В первые дни прорастания развивающемуся организму необходимо большое количество энергии и субстратов для биосинтетических процессов, для чего в клетке происходит интенсификация скорости транскрипции генов аконитазы. На начальных этапах развития проросток осуществляет гетеротрофный тип питания, что возможно благодаря мобилизации запасных веществ семени. В отсутствие фотосинтеза проросток получает необходимую энергию за счет работы цикла Кребса и ЭТЦ. Происходит резкая активизация всех метаболических процессов и мобилизация запасных веществ, окисляющихся через ЦТК, что подтверждается высокой скоростью экспрессии гена *aco1*.

Кроме того, в данный период наблюдается значительный уровень экспрессии гена *aco2*. Его экспрессия обеспечивает функционирование цитоплазматической формы исследуемого фермента, вероятно, участвующего в мобилизации запасных веществ через глюконеогенетический

путь.

После 5-го дня прорастания происходит переход растений к автотрофному типу питания, и функция обеспечения растения энергией переходит к фотосинтезу. При этом ЦТК ингибируется, и происходит резкое уменьшение концентрации мРНК гена митохондриальной формы аконитазы по сравнению с первыми днями. В данном случае проросток, перешедший к автотрофному типу питания, не нуждается в запасных питательных веществах, что приводит к резкому снижению скорости экспрессии генов *aco1* и *aco2* к пятому дню прорастания семян, когда начинает функционировать фотосинтетический аппарат.

### **2.2.18.3. Исследование экспрессии генов *aco1* и *aco2* при прорастании семян амаранта**

В данной работе показана зависимость изменения уровня экспрессии генов *aco1* и *aco2* при прорастании семян амаранта. Расчетные значения относительной концентрации транскрипта гена *aco1* в разных образцах кДНК представлены на рисунке 40, из которого видно, что в исследуемых растениях ген митохондриальной формы аконитазы активно транскрибируется на протяжении всего периода прорастания, однако максимума уровень данного показателя достигает на третий день прорастания. В последующие дни эксперимента обнаружено снижение интенсивности накопления мРНК гена *aco1* в семенах амаранта. Начиная с пятого дня, уровень экспрессии гена *aco1* уменьшается, и к девятому дню прорастания достигает значения 50% от максимального значения (третий день). Такое резкое снижение интенсивности экспрессии исследуемого гена коррелирует с таковым показателем для гена митохондриальной формы АГ в щитках кукурузы и обусловлено переключением основного энергетического метаболизма клетки на автотрофный тип питания.

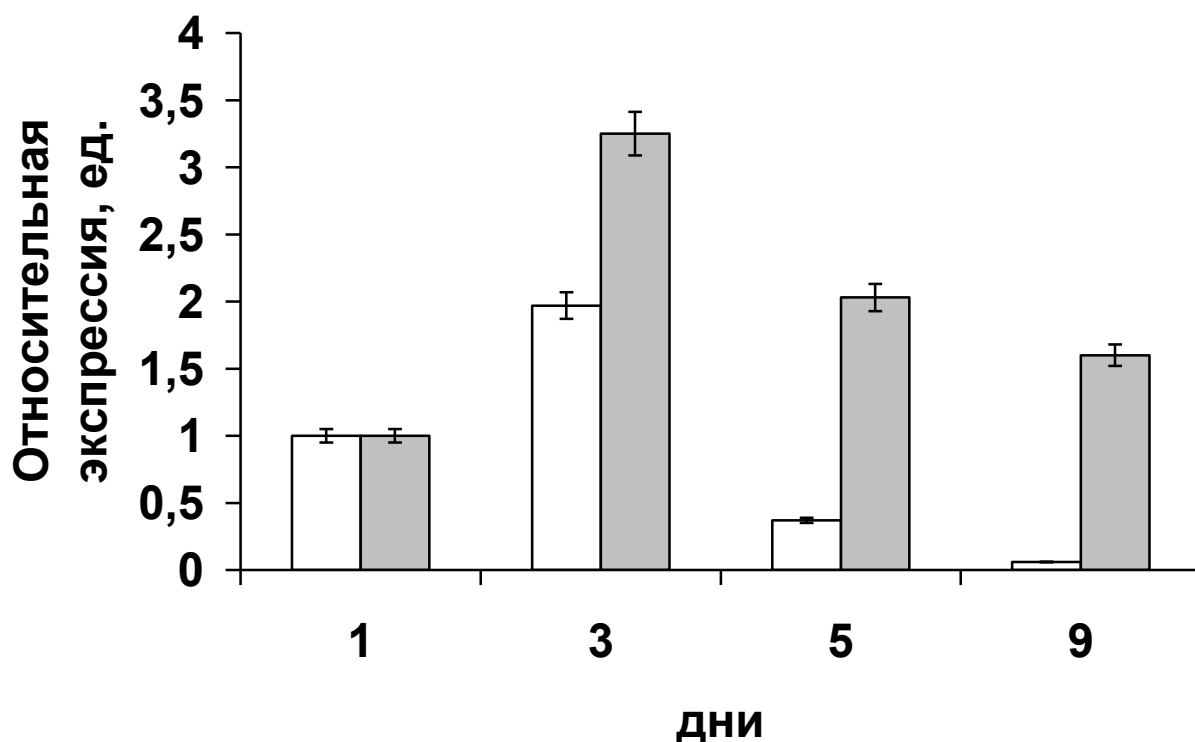


Рис. 40. Экспрессия генов аконитазы при прорастании семян амаранта: белые (цитоплазматическая), серые (митохондриальная).

При анализе изменения уровня экспрессии гена *aco2* (рис. 40) видно, что с первого по пятый день прорастания семян амаранта происходит интенсивная транскрипция данного гена, достигая максимума на третий день прорастания. Однако, на девятый день экспрессия гена *aco2* уменьшается и достигает значения 0,5%, от максимального. По мере развития проростка, к 9 дню, вновь наблюдается увеличение экспрессии гена *aco2*, что может быть связано с переходом растения к автотрофному типу питания.

#### 2.2.18.4. Экспрессия генов изоцитратлиазы в проростках семян амаранта

В результате применения оптимизированной методики выделения с использованием фенол-хлороформной экстракции была проведена

экстракция суммарной клеточной РНК из семян амаранта. В ходе выделения в качестве хаотропного агента был использован гуанидин-изотиоцианат. Кроме того, в полученных препаратах отсутствовали примеси геномной ДНК, что является важным условием успешного проведения дальнейших манипуляций с выделенной РНК и позволяет получать достоверные и воспроизводимые результаты при измерении концентрации растворов РНК и проведении полимеразной цепной реакции.

Анализ банка данных GeneBank показал, что в геноме амаранта изоцитратлиаза кодируется двумя генами, расположенными в разных хромосомах.

Полученные результаты полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами к генам изоцитратлиазы показывают, что в геноме амаранта, на стадии прорастания семян экспрессируются одновременно два гена изоцитратлиазы (рис. 41).

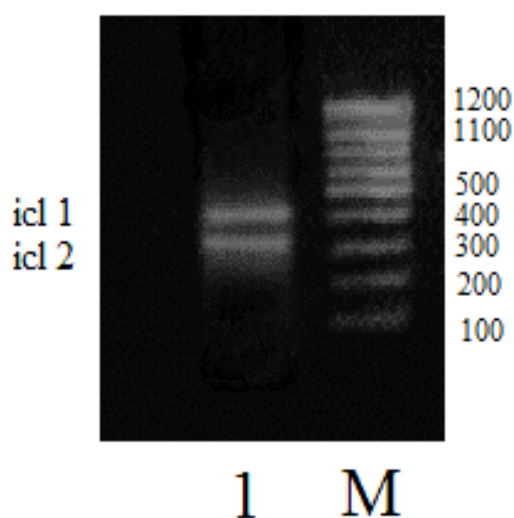


Рис. 41. Результаты полимеразной цепной реакции на матрице кДНК, выделенной из проростков амаранта сорта «Рыжик» на 3 день прорастания. М-маркеры; 1 – продукты амплификации с вырожденными праймерами.

Экспрессия двух генов в семенах амаранта связана с тем, что в период прорастания клетки зародыша нуждаются в большом количестве энергии и

материала для биосинтетических процессов. На начальных этапах прорастания семени осуществляют гетеротрофный тип питания, используя в качестве субстратов запасные вещества. В том числе, осуществляется процесс превращения запасных жиров в углеводы через глиоксилатный цикл, являющийся звеном глюконеогенеза.

Для оценки количественных показателей интенсивности работы генов, кодирующих изоферменты изоцитратлиаз, использовали метод ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя Sybr Green. Этот метод позволяет количественно оценить изменения в интенсивности работы гена в зависимости от экспериментальных условий и действия внешних факторов. Данный метод позволяет оценивать результаты работы гена, т.е. концентрацию мРНК, на основе анализа кДНК [200].

Проведенный ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами к генам *icl1* и *icl2* (рис. 42) позволил установить, что максимальная экспрессия обоих генов наблюдается на 1-2 дни прорастания семян амаранта. Высокая скорость транскрипции генов *icl1* и *icl2* обусловлена необходимостью синтеза большого количества белков глиоксисомальной и внеглиоксисомальной форм исследуемого фермента. Глиоксисомальная форма ИЦЛ принимает активное участие в протекании глюконеогенеза, в частности, глиоксилатного пути. Данный путь необходим для мобилизации запасных веществ семени, например липидов, поскольку в первые дни прорастания растения амаранта осуществляют гетеротрофный тип питания. Функция дополнительной, внеглиоксисомальной формы изоцитратлиазы, вероятно, заключается в осуществлении реакции синтеза органических веществ, накопление которых приводит к закислению внутренней среды клетки. Более кислое значение рН способствует увеличению скорости гидролиза жирных кислот, необходимых для протекания глюконеогенетических процессов.

В дальнейшем экспрессионная активность гена *icl1* постепенно снижается. После 4-х дней экспозиции наблюдается практически полное ингибирование скорости синтеза мРНК исследуемого гена. Уменьшение концентрации транскрипта гена *icl1* совпадает с этапом перехода растений к фотосинтетической активности, и, как следствие, роль запасных компонентов нивелируется. Снижение скорости транскрипции гена глиоксисомальной формы изоцитратлиазы указывает на снижение интенсивности протекания глиоксилатного пути, как этапа мобилизации запасных веществ семени и продиктовано необходимостью.

В тоже время, экспрессия гена *icl2* после 4-го дня прорастания тоже уменьшается, что также связано со снижением интенсивности использования запасных веществ, используемых при развитии растительного организма в первые периоды прорастания. Но в последующем периоде развития наблюдается увеличение скорости его экспрессии.

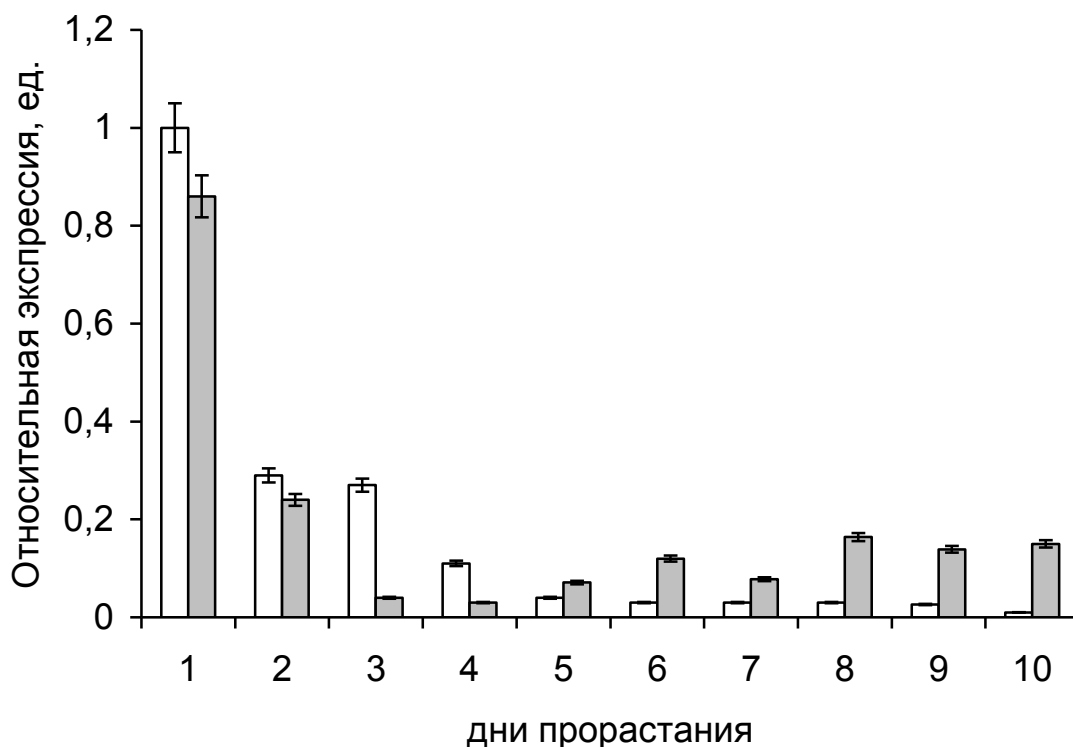


Рис. 42. Относительный уровень экспрессии генов изоцитратлиазы в проростках амаранта.

Интенсификация экспрессии гена *icl2* к 6 дню может быть связана с переходом растения к автотрофному типу питания и функционированием второй формы изоцитратлиазы в листьях, где она, по-видимому выполняет функцию утилизации фотодыхательного глиоксилата.

В результате исследования установлено, что в суммарной вытяжке РНК обнаруживаются две мРНК генов изоцитратлиазы. Полученные данные по динамике экспрессии генов изоцитратлиазы позволяют оценить изменение скорости функционирования глиоксилатного цикла и выдвинуть предположение о его роли в метаболизме при прорастании семян и переходе к фотосинтезу. На начальных этапах развития проростка он еще не способен к фотосинтезу и получает необходимую энергию и биосинтетические эквиваленты в процессе дыхания и пластического обмена. В этот период наблюдается активация глюконеогенетических процессов, физиологическая роль которых заключается в мобилизации запасных веществ, таких как липиды. Максимальная скорость накопления транскриптов генов изоцитратлиазы наблюдается в первые три дня прорастания, что связано с необходимостью индукции глиоксилатного цикла в этот период. Высокий уровень транскрипции гена *icl1* в первые три дня экспозиции связан с необходимостью синтеза большого количества изоцитратлиазы при прорастании семян для интенсивной работы глиоксилатного цикла. В то же время, высокая экспрессия гена *icl2* в этот же период прорастания, вероятно, связана с индукцией изофермента ИЦЛ, катализирующего синтазную реакцию и участвующего в анаплеротических реакциях. Снижение интенсивности экспрессии гена *icl1* на 3-4 день экспозиции свидетельствует о переключении энергетического метаболизма растительной клетки при переходе к фотосинтетической активности. По мере зеленения проростков обеспечение растения энергией осуществляется за счет фотосинтеза, что приводит к ингибированию глюконеогенеза, и как следствие, снижается скорость экспрессии исследуемых генов. На данном этапе развития снижается

потребность в метаболизации запасных жиров, выключается глюконеогенез, что приводит к ингибированию экспрессии данного гена. Увеличение экспрессии гена *icl2* на 5-7 день экспозиции можно объяснить тем, что к указанному сроку в проростках формируется фотосинтетический аппарат и ИЦЛ<sub>2</sub> принимает участие в утилизации фотодыхательного глиоксилата.

Таким образом, анализ полученных в ходе исследования данных позволяет заключить, что глиоксилатный цикл может иметь более универсальное распространение в организмах, чем считалось ранее. При этом данный метаболический путь не функционирует на протяжении всего онтогенеза, а индуцируется на определенных его стадиях и выполняет ключевую роль в мобилизации запасного пула жирных кислот.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование разработанных на кафедре биохимии и физиологии клетки многостадийных схем очистки ферментов позволило получить из кукурузы, амаранта и сои электрофоретически гомогенные препараты аконитатгидратазы и изоцитратлиазы. Электрофоретические исследования подтвердили, что полученные препараты являются гомогенными. Характеристики очищенных ИЦЛ и АГ имеют значения, аналогичные препаратам ферментов, полученных из других источников [5, 22].

С помощью электрофоретического исследования было выявлено, что аконитатгидратаза и изоцитратлиаза в проростках кукурузы, сои и амаранта характеризуются наличием изоферментного состава. Ранее в наших исследованиях и литературных публикациях сообщалось о изоферментном полиморфизме данных энзимов [5].

Результаты изучения внутриклеточного распределения аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности показали специфические особенности субклеточной локализации исследуемых ферментов. Функционирование цикла Кребса и глиоксилатного пути обеспечивается изоферментами АГ<sub>1</sub> и ИЦЛ<sub>1</sub>, локализованными, соответственно, в митохондриальной и глиоксисомальной фракциях растительных клеток. Вторая форма аконитатгидратазы, обнаруженная в цитоплазматической фракции, по-видимому, участвует в функционировании метаболизма органических кислот и в каталитическом превращении трикарбоновых кислот (цитрат → изоцитрат), обеспечивающих работу глиоксилатного пути. Регуляцию метаболизма двухуглеродных соединений фотодыхательного метаболизма осуществляет изоформа ИЦЛ<sub>2</sub>, сосредоточенная в цитоплазме. Обнаруженная в работе аконитатгидратазная активность в глиоксисомах и изоцитратлиазная в митохондриях, является, по

нашему мнению, следствием перекрестного загрязнения при выделении фракций клеток.

Анализ данных электрофоретических исследований распределения изоформ изоцитратлиазы и аконитазы в субклеточных фракциях кукурузы показывал, что множественные формы проявляют специфичность субклеточной локализации. В глиоксисомах обнаружены быстродвижущиеся формы исследуемых ферментов с  $R_f$  0,29 и 0,58, соответственно. В цитозольной фракции при специфическом проявлении обнаружили два изофермента ИЦЛ с  $R_f$  0,29 и  $R_f$  0,24 и одна АГ с  $R_f$  0,53. Следует отметить, что медленнодвижущиеся изоформы были специфичны для этого компартмента и, по-видимому, для них характерна своя уникальная метаболическая функция.

Результаты исследования метаболической регуляции аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в разных растениях позволили установить определенные закономерности. Показано, что наибольшая устойчивость к транс-аконитовой кислоте характерна для АГ из кукурузы, которая способна в процессе жизнедеятельности накапливать значительные количества этого интермедиата [12].

Изоцитратлиазная активность сильно ингибируется конечными продуктами глюконеогенеза (глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом). Определенные константы и тип ингибирования показывают, что глиоксисомальная форма ИЦЛ более устойчива ( $K_i = 0,745$  мМ) по сравнению с цитоплазматической ( $K_i = 0,973$  мМ).

Важной частью исследования являлось выяснение экспрессионной активности генов, кодирующих изучаемые ферменты. Установлено, что уровень экспрессии генов *aco1* и *aco2* максимален в первые дни прорастания семян, причём для гена *aco1* наблюдалась экспрессия на протяжении всего периода прорастания семян кукурузы и амаранта. Полученные результаты свидетельствуют о дифференциальной экспрессии генов аконитатгидратазы

при развитии растения, что обусловлено разной функциональной ролью ее изоферментов.

Анализ экспрессии генов, кодирующих изоцитратлиазу, показал, что гены *icl1* и *icl2* транскрибируются на протяжении всего периода прорастания семян, и, вероятно, также принимают участие в формировании разных функциональных форм ИЦЛ. Транскрипция гена *icl1* четко совпадает с активацией процессов метаболизма запасных жиров и, предположительно, данный ген кодирует соответствующий изофермент. Экспрессия гена *icl2*, вероятно, обуславливает синтез дополнительной формы ИЦЛ для осуществления анаэробических реакций.

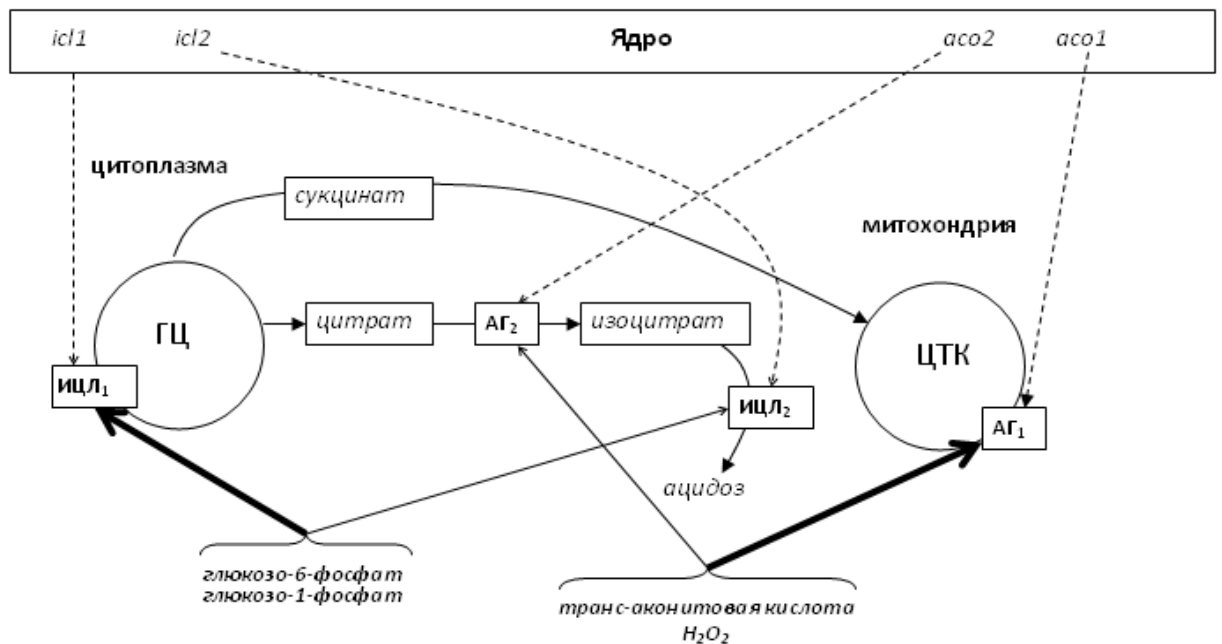


Рис. 43. Гипотетическая схема метаболической и экспрессионной регуляции функционирования изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растительной клетке.

Таким образом, полученные данные по метаболической и экспрессионной регуляции изоферментов АГ и ИЦЛ из исследуемых растений позволили разработать гипотетическую схему функционирования этих ферментных систем в растительной клетке (рис. 43).

## ВЫВОДЫ

1. Аконитатгидратаза и изоцитратлиаза в проростках кукурузы, сои и амаранта характеризуются наличием изоферментного состава, представленного одной или двумя множественными молекулярными формами с различной относительной электрофоретической подвижностью и спецификой внутриклеточного распределения.
2. Внутриклеточное распределение аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активности имеет специфические особенности. Аконитатгидратаза локализована в цитоплазматической и митохондриальной фракциях. Изоцитратлиазная активность обнаружена в глиоксисомальной и цитозольной фракциях. Такое субклеточное распределение активности исследуемых ферментов связано с их физиологической ролью обеспечения функционирования ЦТК (АГ), глиоксилатного цикла (ИЦЛ), метаболизма органических кислот и метаболизма двухуглеродных соединений фотодыхания.
3. С помощью многостадийной схемы очистки получены в электрофоретически гомогенном состоянии препараты АГ и ИЦЛ из исследованных растений. Электрофоретические исследования подтвердили, что полученные препараты являются гомогенными. Удельная активность АГ из кукурузы, сои и амаранта имела значение от 3,95 до 6,0 Е/мг белка. Значение выхода фермента из растений колебалось от 3 до 4%. Параметры очистки изоферментов ИЦЛ составляли – уд. активность от 2,85 до 4,25 Е/мг белка; выход – от 6,5 до 9%.
4. Выявлен конкурентный механизм ингибирования аконитатгидратазы из растений с помощью транс-аконитовой кислоты. Показано, что наибольшая устойчивость к этому интермедиату характерна для АГ из кукурузы, которая способна в процессе жизнедеятельности

- накапливать значительные количества этого интермедиата. Кроме того, установлено, что митохондриальный изофермент аконитазы более чувствителен к транс-аконитату ( $K_i = 2,6$  мМ) по сравнению с цитоплазматической формой фермента ( $K_i = 3,5$  мМ).
5. Изоцитратлиазная активность сильно ингибируется конечными продуктами глюконеогенеза (глюкозо-1-фосфатом и глюкозо-6-фосфатом). Определенные константы и тип ингибирования показывают, что глиоксисомальная изоформа ИЦЛ более устойчива ( $K_i = 0,745$  мМ) по сравнению с цитоплазматическим изоферментом ( $K_i = 0,973$  мМ).
  6. Исследовано ингибирующее действие различных концентраций перекиси водорода на изоферменты АГ, имеющие различную субклеточную локализацию. Установлено, что митохондриальный изофермент аконитазы более чувствителен к перекиси водорода по сравнению с цитоплазматической изоформой АГ.
  7. Использование специфических праймеров для митохондриальной и цитоплазматической форм аконитатгидратазы позволило идентифицировать их транскрипты в суммарной вытяжке РНК. Активная экспрессия генов обеих форм аконитазы в щитках кукурузы и семенах амаранта обусловлена необходимостью синтеза пептидов для протекания энергетических и биосинтетических процессов в клетках растущего растительного организма.
  8. Установлено, что уровень экспрессии генов *aco1* и *aco2* максимален в первые дни прорастания семян, причём ген *aco1* сохранял высокую активность на протяжении всего прорастания семян кукурузы и амаранта. Полученные результаты свидетельствуют о дифференциальной экспрессии генов аконитатгидратазы при развитии растения, что обусловлено разной функциональной ролью ее изоферментов.

9. Анализ экспрессии генов, кодирующих изоцитратлиазу, показал, что гены *icl1* и *icl2* транскрибируются во все периоды прорастания семян, и, вероятно, также принимают участие в формировании разных функциональных форм ИЦЛ. Транскрипция гена *icl1* четко совпадает с активацией процессов метаболизма запасных жиров и, предположительно, кодирует соответствующий изофермент. Экспрессия гена *icl2*, вероятно, обуславливает синтез дополнительной формы для осуществления анаэробических реакций.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бездудная Е. Ф. Влияние тяжелых металлов на активность ключевых ферментов глиоксилатного цикла и содержание ак-активных продуктов в семенах сои *Glycine max* L. при проращивании / Е. Ф. Бездудная, П. А. Калиман // «Биология: от молекулы до биосферы»: Материалы III Международной конференции молодых учёных. – Харьков: СПД ФЛ Михайлов Г. Г., 2008. – 496 с.
2. Волвенкин С.В. Субклеточная локализация и свойства ферментов глиоксилатного цикла в печени крыс с аллоксановым диабетом / С. В. Волвенкин, В.Н. Попов, А.Т. Епринцев // Биохимия. – 1999. – Т.64, № 9. – С. 1185-1191.
3. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических молекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – 446 с.
4. Глиоксилатный цикл растений / Землянухин А.А. [и др.] // Воронеж. Изд-во ВГУ. – 1986. – 148 с.
5. Епринцев А.Т. Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации? / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, М.Ю. Шевченко // Москва: Академкнига. – 2007. – 231 с.
6. Епринцев А.Т. Очистка и физико-химические свойства изоцитратлиазы из куколок бабочки *P. machaon* L. / А. Т. Епринцев, М. Ю. Шевченко, В. Н. Попов.// Биохимия. – 2004. – Т.69, № 4. – С. 467-472.
7. Епринцев А.Т. Полимеразная цепная реакция как универсальный метод диагностики и идентификации генов / А.Т. Епринцев, Е.А. Москалёв, В.Н. Попов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2001. – № 1. – С. 9-14.
8. Епринцев А.Т. Распространение глиоксилатного цикла у организмов различных таксономических групп / А.Т. Епринцев, М.Ю.

Шевченко, В.Н. Попов // Успехи современной биологии. – М., 2008.– Т. 128, № 3. – С. 271-280.

9. Епринцев А.Т. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов // Воронеж : Изд-во Воронеж, ун-та, 1999. - 192 с.

10. Епринцев А.Т. Физико-химические и кинетические характеристики изоформ изоцитратлиазы из кукурузы / А.Т. Епринцев, Е.В. Маслова // Биохимия. – 2009. – V. 74. – P. 528–532.

11. Епринцев А.Т. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла / А.Т. Епринцев, М. Ю. Шевченко, В. Н. Попов. – Воронеж: Центрально-Черноземное книжное издательство, 2005. – 224с.

12. Землянухин А.А. Метаболизм органических кислот растений / А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин. - Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, – 1995. – С. 150-152.

13. Землянухин Л. А. Очистка и свойства изоцитратлиазы из подсолнечника / Л. А. Землянухин, А. У. Игамбердиев, А. А. Землянухин // Биохимия. – 1984. – Т. 49, Вып. 3. – С. 387-393.

14. Игамбердиев А. У. Внеглиоксисомальная форма изоцитратлиазы в высших растениях / А. У. Игамбердиев, А. А. Землянухин, И. В. Мещерякова // Физиология растений. – 1986. – Т. 33. – С. 852-858.

15. Игамбердиев А. У. Исследование кинетических свойств и модификаций аминокислотных остатков изоцитратлиазы из щитка кукурузы / А. У. Игамбердиев, А. А. Землянухин // Биохимия. – 1987. – Т. 52, Вып. 8. – С 1286-1293.

16. Игамбердиев А.У. Микротельца в метаболизме растений / А. У. Игамбердиев. – Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 1990. – 147 с.

17. Игамбердиев А.У. Роль фотодыхательных пероксисом в интеграции метаболизма фотосинтезирующей растительной клетки / А. У. Игамбердиев // Физиология растений. – 1992. – Т. 39, вып. 4. – С. 836–843.



18. Игамбердиев А. У. Фотодыхание и биохимическая эволюция растений / А. У. Игамбердиев // Успехи совр. биологии. – 1988. – Т. 105, вып. 3. – С. 488-504.
19. Индукция ферментов глиоксилатного цикла в различных тканях голодающих крыс / В. Н. Попов и др. // Известия РАН. Серия биологическая – 2000. – № 6. – С. 663-667.
20. Климова М.А. Очистка ферментов и методы исследования их каталитических свойств / М.А. Климова, А.Т. Епринцев // Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2008. - 36 с.
21. Косулина Л.Г. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды / Л.Г. Косулина, Э.К. Луценко, В.А. Аксенова. - Ростов-на-Дону. - 1993. – 126 с.
22. Куен Ч. Т. Х. Разделение изоферментов изоцитратлиазы из щитков кукурузы с помощью ионнообменной хроматографии / Ч. Т. Х. Куен, А.Т. Епринцев, Е.В. Маслова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т.8, № 2. – С. 297-303.
23. Кузнецов В.В.. Физиология растений // В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева - М. – Абрис. – 2011. – 783 с.
24. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - Москва: Высш. шк., 1990. - 351с.
25. Магомедов И.М. Физиологические основы конкурентоспособности амаранта / И.М. Магомедов // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 5 – С. 57-59.
26. Мауэр Г. Диск-электрофорез / Г. Мауэр / Пер. с англ. – Москва: Мир, 1971. – 222 с.
27. Мешкова Н. П. Практикум по биохимии / Н. П. Мешкова, С. Е. Северин. – М. : Изд-во МГУ, – 1979. – 30 с.
28. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман // М. –

Наука, 1981. – 288с.

29. Очистка изоцитратлиазы из печени эмбрионов *Gallus domesticus* L. / М. Ю. Шевченко [и др.] // Сорбционные хроматографические процессы . – 2006. – Т. 6, Вып. 5. – С. 851-854.

30. Петрухин Ю. А. Роль окислительного метаболизма в развитии фотосинтеза зеленеющих этиолированных проростков кукурузы / Ю. А. Петрухин, М. Я. Лазор // Некоторые вопросы экологической физиологии растений : сб. науч. тр. Перм. гос. ун-т. – Пермь, 1990. – С. 167–175.

31. Полевой В. В. Физиология растений: Учеб. для биол. спец. вузов. - М.: Высш. шк., 1989. - С. 428-430.

32. Получение и свойства изоформ изоцитратлиазы из семядолей *Glycine max* L. / А.Т. Епринцев [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 1. С. 103–108.

33. Соколовский В. Ю., Белозерская Т. А. Действие стрессоров на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa* / В. Ю. Соколовский, Т. А. Белозерская // Успехи биол. химии. – 2000. – Т. 40. – С. 85-152.

34. Сравнительный анализ ключевого фермента глиоксилатного цикла, изоцитратлиазы, из организмов разных систематических групп / В.Н. Попов [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2005. - № 6. – С. 317-329.

35. Чернышев Г.А. Вероятность и статистика в биологии и химии / Г.А. Чернышев, В.Н. Стариков – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1998. – 270 с.

36. Шевченко М. Ю. Выделение и очистка изоцитратлиазы из куколок бабочки *P. machaon* L. / М. Ю. Шевченко, Е. А. Москалёв, А. Т. Епринцев // Биология – наука XXI века: Материалы 7-й Пущинской конф. молодых учёных, Пущино. – 2003. – Т.1. – С. 390-391.

37. Эдвардс Дж. Фотосинтез C3- и C4-растений : механизмы и регуляция / Дж. Эдвардс, Д. Уокер ; пер. с англ. М. И. Верховцевой ; под ред.

А. Т. Мокроносова. - М. : Мир, 1986. – 590 с.

38. Юзбеков А.К. Спектрофотометрические способы определения активности ключевых ферментов фотосинтетического метаболизма у  $C_3$ - и  $C_4$  – растений / А.К. Юзбеков. – Препринт: Киев. - 1990. - 32 с.

39. A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. / Condo I, et al // J Biol Chem 281:16750–16756, 2006

40. Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. / Chen XJ, et al // Science 307:714–717, 2005

41. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. / Moeder W, et al // Plant Mol Biol. 2007 Jan;63(2):273-87. Epub 2006 Oct 1.

42. Activation of aconitase in mouse fast-twitch skeletal muscle during contraction-mediated oxidative stress // S. J. Zhang, et al / Am J Physiol Cell Physiol, Sep 2007; 293: C1154 - C1159.

43. Aksoy E. Loss of function of Arabidopsis C-Terminal domain phosphatase-like1 activates iron deficiency responses at the transcriptional level / Emre Aksoy, In Sil Jeong, and Hisashi Koiwa / // Plant Physiol. 2013 161: 330-345.

44. Allen D. K. Carbon and nitrogen provisions alter the metabolic flux in developing soybean embryos / D. K. Allen. J. D. Young // Plant Physiol. 2013 161: 1458-1475.

45. Aluminum triggers decreased aconitase activity via fe-s cluster disruption and the overexpression of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase / Jeffrey Middaugh, et al // February 4, 2005 The Journal of Biological Chemistry, 280, 3159-3165.

46. Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer. / Dakubo GD, et al // J Clin Pathol 59:10–16, 2006

47. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). / Galy B, et al // Blood 106:2580–2589, 2005

48. Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development / F. Ebel, et al // Fungal Genet. Biol., 2006, 43:476-489.
49. Asakura M. Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium* / M. Asakura, T. Okuno, Y. Takano // Appl Environ Microbiol. 2006 September; 72(9): 6345–6354. doi: 10.1128/AEM.00988-06
50. *Aspergillus fumigatus* does not require fatty acid metabolism via isocitrate lyase for development of invasive *Aspergillosis* / F. Schöbel, et al // Infect Immun. 2007 March; 75(3): 1237–1244
51. Athanasios S. Comparison of the glyoxysomes and the glyoxysomal enzymes in *Maize* lines with high or low oil content / S. Athanasios, et al // Plant Physiol. March 1983
52. *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression / Alisa W. Serio, et al // Journal of Bacteriology, September 2006, p. 6396-6405, Vol. 188, No. 17.
53. Beeckmans S. Role of  $Mg^{2+}$  in the structure and activity of maize (*Zea mays* L.) isocitrate lyase: indications for hysteretic behavior. / S. Beeckmans, A.S. Khan, E. Van Driessche // Biochem J 327:171–176., 1996
54. Bellion E. Inhibition by itaconate of growth of methylotrophic bacteria. / E. Bellion, R. L. Kelley // J Bacteriol. 1979 May; 138(2): 519–522.
55. Biogenesis of iron–sulfur cluster proteins in plastids. / Pilon M, et al // Genet Eng (N Y). 27:101–117, 2006
56. Blasco R. Regulation of isocitrate lyase in *Rhodobacter capsulatus* E1F1 / R. Blasco, J. Cárdenas, F. Castillo. // Curr Microbiol. 1991; 22:73–76.
57. Bowyer P. Regulation of the expression of the isocitrate lyase gene (*acuD*) of *Aspergillus nidulans* / P. Bowyer, J. R. De Lucas, G. Turner // Mol. Gen. Genet. 1999, 4 242:484-489.

58. *Castor bean* isocitrate lyase lacking the putative peroxisomal targeting signal 1 ARM is imported into plant peroxisomes both in vitro and in vivo / X. Gao, et al // *Plant Physiol.* 1996
59. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* / K. H. Zu Bentrup, et al // *J Bacteriol.* 1999 December; 181(23): 7161–7167
60. Chell R. M. Isolation and characterization of isocitrate lyase from a thermophilic *Bacillus sp.* / R. M. Chell, T. K. Sundaram, A. E. Wilkinson // *Biochem J.* 1978 July 1; 173(1): 165–177.
61. Chen X. J. Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA / X. J. Chen, X. Wang, R. A. Butow // *PNAS* August 21, 2007 vol. 104 no. 34 13738-13743.
62. Chiang C-M. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators / C-M. Chiang, R. G. Roeder // *Science.* 1995; 267:531–536.
63. Chomczynski P. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* – 1987. – V. 162. – P. 156–159.
64. Cloning and sequence analysis of the gene encoding isocitrate lyase from *Rhodococcus fascians* / D. Vereecke, et al // *Gene.* 1994; 145:109–114.
65. Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme / Vanni P, et al // *Comp Biochem Physiol.* 1990; 95B:431–458.
66. Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. / Smith SR, et al // *Blood Cells Mol Dis* 36:283–287, 2006
67. Coordinate expression of transcriptionally regulated isocitrate lyase and malate synthase genes in *Brassica napus* L. / L. Comai, et al // *Plant Cell.* 1989 March; 1(3): 293–300. doi: 10.1105/tpc.1.3.293

68. Crystal structures of 2-methyl isocitrate lyase in complex with product and with isocitrate inhibitor provide insight into lyase substrate specificity, catalysis and evolution / S. Liu, et al // *Biochemistry*. 2005; 44:2949–2962.
69. Crystal structure of *Salmonella typhimurium* 2-methylisocitrate lyase (PrpB) and its complex with pyruvate and Mg(2+) / D. K. Simanshu, et al // *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 311: 193–201.
70. Crystal structure of the petal death protein from carnation flower / A. Teplyakov, et al // *Biochemistry*. 2005; 44: 16377–16384.
71. Cytosolic aconitase and ferritin are regulated by iron in *Caenorhabditis elegans* / B. L. Gourley, et al // *The Journal of Biological Chemistry*, January 31, 2003, 278, 3227-3234.
72. Cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. / Koh HJ, et al // *J Biol Chem* 279:39968–39974, 2004
73. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis. / Wingert RA, et al // *Nature* 436:1035–1039, 2005
74. Delaval E. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. / E Delaval, M Perichon, B Friguet // *Eur J Biochem* 271:4559–4564, 2004
75. Diehl P. Site-directed mutagenesis of lysine 193 in *Escherichia coli* isocitrate lyase by use of unique restriction enzyme site elimination. / P. Diehl, B. A. McFadden // *J Bacteriol*. 1993 April; 175(8): 2263–2270.
76. Diehl P. The importance of four histidine residues in isocitrate lyase from *Escherichia coli*. / P. Diehl, B. A. McFadden // *J Bacteriol*. 1994 February; 176(3): 927–931.
77. Diversity of function in the isocitrate lyase enzyme superfamily: the *Dianthus caryophyllus* petal death protein cleaves alpha-keto and alpha-hydroxycarboxylic acids / Z. Lu, et al // *Biochemistry*. 2005, 44: 16365–16376.

78. DNA sequences that activate isocitrate lyase gene expression during late embryogenesis and during postgerminative growth / J. Z. Zhang, et al // *Plant Physiol.* 1996
79. Down-regulation of iron regulatory protein 1 activities and expression in superoxide dismutase 1 knock-out mice is not associated with alterations in iron metabolism. / Starzynski RR, et al // *J Biol Chem* 280:4207–4212, 2005
80. Dunham S. M. Control of isocitrate lyase synthesis in *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. Rate of enzyme synthesis in the presence and absence of acetate measured by [35S]methionine labelling and immunoprecipitation. / S. M. Dunham, C. F. Thurston // *Biochem J.* 1978 October 15; 176(1): 179–185.
81. Effect of glucose on isocitrate lyase in *Phycomyces blakesleeanus*. / J Rúa, et al // *J Bacteriol.* 1989 November; 171(11): 6391–6393.
82. Effect of pH on the role of Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> on *Phycomyces* isocitrate lyase kinetics / Rúa J, et al // *Biochimie* 79:179–186, 1997
83. Eoh H. Multifunctional essentiality of succinate metabolism in adaptation to hypoxia in *Mycobacterium tuberculosis* / H. Eoh, K.Y. Rhee // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 April 16; 110(16): 6554–6559.
84. Evaluation of the role of constitutive isocitrate lyase activity in *Yersinia pestis* infection of the *Flea Vector* and *Mammalian Host* / F. Sebbane, et al // *Infect Immun.* 2004 December; 72(12): 7334–7337.
85. Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU1 during enterocyte-like differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 / Acquaviva F, et al // *J Cell Sci* 118:3917–3924, 2005
86. Expression of the sulfhydryl oxidase ALR (Augmenter of Liver Regeneration) in adult rat brain. / Tury A, et al // *Brain Res* 1048:87–97, 2005
87. Fishi H. The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel polA locus associated with genomic variability / H. Fishi, S. T. Cole // *Mol Microbiol.* 1995;16:909–919.

88. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. / Bulteau AL, et al // Science 305:242–245, 2004
89. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. / Meyron-Holtz EG, et al // EMBO J 23:386–395, 2004
90. Giachetti E. Effect of  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  on isocitrate lyase, a non-essentially metal-ion-activated enzyme / E. Giachetti, P. Vanni // Biochem J 276:223–230, 1991
91. Goncharov NV. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research. / NV Goncharov, RO Jenkins, AS Radilov // J Appl Toxicol 26:148–161, 2006
92. González E. Two-carbon assimilative capacity and the induction of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. / E. González // J Bacteriol. 1977 March; 129(3): 1343–1348.
93. Green L. S. Isocitrate dehydrogenase and glyoxylate cycle enzyme activities in *Bradyrhizobium japonicum* under various growth conditions / L. S. Green, D. B. Karr, D. W. Emerich. // Arch Microbiol. 1998;169:445–451.
94. Gui L. Regulated expression of a repressor protein: FadR activates IclR. J Bacteriol / L. Gui, A. Sunnarborg, D. C. LaPorte // 1996; 178:4704–4709
95. Hagins J. M. Isocitrate lyase supplies precursors for hydrogen cyanide production in a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa* / J. M. Hagins, R. Locy, L. Silo-Suh // J Bacteriol. 2009 October; 191(20): 6335–6339.
96. Hansen JM. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. / JM Hansen, YM Go, DP Jones // Annu Rev Pharmacol Toxicol 46:215–234, 2006
97. Heat shock-induced attenuation of hydroxyl radical generation and mitochondrial aconitase activity in cardiac H9c2 cells / G. Ilangoan, et al // Am J Physiol Cell Physiol 290: C313-C324, 2006.
98. Hentze MW. Balancing acts: molecular control of mammalian iron



metabolism. / MW Hentze, MU Muckenthaler, NC Andrews // Cell 117:285–297, 2004

99. Hertz L. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. / L Hertz, HR Zielke // Trends Neurosci 27:735–743, 2004

100. Hillier S. Glyoxylate bypass enzymes in *Yersinia species* and multiple forms of isocitrate lyase in *Yersinia pestis*. / S. Hillier, W. T. Charnetzky // J Bacteriol. 1981 January; 145(1): 452–458.

101. Hillier S. L. Rapid diagnostic test that uses isocitrate lyase activity for identification of *Yersinia pestis*. / S. L. Hillier, W. T. Charnetzky // J Clin Microbiol. 1981 April; 13(4): 661–665.

102. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress / N. Nicot [et al.] // J. of Exp. Bot. - 2005. - V. 56. - P. 2907–2914.

103. Hoyt J. C. Purification and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* isocitrate lyase. / J. C. Hoyt, K. E. Johnson, H. C. Reeves // J Bacteriol. 1991 November; 173(21): 6844–6848.

104. Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe–S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. / Seznec H, et al // Hum Mol Genet 13:1017–1024, 2004

105. Identification of a cysteine residue at the active site of *Escherichia coli* isocitrate lyase. / H. G. Nimmo, et al // Biochem J. 1989 July 15; 261(2): 431–435.

106. Inactivation of isocitrate lyase leads to increased production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida* / S. Klinke, et al // Appl Environ Microbiol. 2000 March; 66(3): 909–913.

107. Induction of iron regulatory protein 1 RNA-binding activity by nitric oxide is associated with a concomitant increase in the labile iron pool: implications for DNA damage. / Lipinski P, et al // Biochem Biophys Res Commun 327:349–355, 2005

108. Idnurm A. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to Canola (*Brassica napus*) / A. Idnurm, B. J. Howlett // *Eukaryot Cell*. 2002 October; 1(5): 719–724
109. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. / Ishikawa H, et al // *Mol Cell* 19:171–181, 2005
110. IRP1 Ser-711 is a phosphorylation site, critical for regulation of RNA-binding and aconitase activities./ Fillebeen C, et al // *Biochem J* 388:143–150, 2005
111. Iron alters glutamate secretion by regulating cytosolic aconitase activity. / McGahan MC, et al // *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1117–C1124, 2005
112. Iron-responsive degradation of iron-regulatory protein 1 does not require the Fe–S cluster. / Clarke SL, et al // *EMBO J* 25:544–553, 2006
113. Isocitrate lyase from higher plants / E. Giachetti, et al // *Phytochemistry*. 1987; 26:2439–2446.
114. Isocitrate lyase (AceA) is required for salmonella persistence but not for acute lethal infection in mice / F. C. Fang, et al // *Infect. Immun*, 2005. 73:2547-2549.
115. Isocitrate lyase from *Phycomyces blakesleeanus*. The role of Mg<sup>2+</sup> ions, kinetics and evidence for two classes of modifiable thiol groups. / J. Rúa, et al // *Biochem J*. 1990 December 1; 272(2): 359–367.
116. Isocitrate lyase and malate synthase genes from *Brassica napus L.* are active in pollen / J. Z. Zhang, et al // *Plant Physiol*. 1994
117. Isocitrate lyase: characterization of its true substrate and the role of magnesium ion. / E. Giachetti, et al // *Eur J Biochem* 172:85–91., 1988
118. Isocitrate lyase from *Cephalosporium acremonium*: role of Mg<sup>2+</sup> ions, kinetics, and evidence for a histidine residue in the active site of the enzyme / Perdiguero E, et al // *Biochemistry* 34:6059–6068, 1995

119. Isocitrate lyase activity is required for virulence of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* / D. M. Wall, et al // Infect Immun. 2005 October; 73(10): 6736–6741
120. Isocitrate Lyase (AceA) is required for *Salmonella* persistence but not for acute lethal infection in mice / F. C. Fang, et al // Infect Immun. 2005 April; 73(4): 2547–2549
121. Janssen B. J. / A cDNA clone for isocitrate lyase from *Tomato* / B. J. Janssen // Plant Physiol. 1995
122. Khan F. R. Embryogenesis and the glyoxylate cycle / Khan F. R. McFadden B. A. // FEBS Lett. – 1980.-Vol. 115. – P. 312-314.
123. Lewis SM. Introduction—the global problem of nutritional anemias. / SM Lewis // Hematology 10:224–226, 2005
124. Liew YF. Mitochondrial cysteine desulfurase iron–sulfur cluster S and aconitase are post-transcriptionally regulated by dietary iron in skeletal muscle of rats. / YF Liew, NS Shaw // J Nutr 135:2151–2158, 2005
125. Lill R. Iron–sulfur–protein biogenesis in eukaryotes. / R Lill, U Muhlenhoff // Trends Biochem Sci 30:133–141, 2005
126. Lingard M. J. Peroxisome-associated matrix protein degradation in *Arabidopsis* / M. J. Lingard, M. Monroe-Augustus, B. Bartel // Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 March 17; 106(11): 4561–4566.
127. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // Methods. - 2001. - V. 25. - P. 402–408
128. Maeda T. 3' Untranslated region-dependent degradation of the acea mRNA, encoding the glyoxylate cycle enzyme isocitrate lyase, by RNase E/G in *Corynebacterium glutamicum* / T. Maeda, M. Wachi // Appl Environ Microbiol. 2012 December; 78(24): 8753–8761. doi: 10.1128/AEM.02304-12

129. Matsuoka M. Isolation, hyperexpression, and sequencing of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase in *Escherichia coli*. / M. Matsuoka, B. A. McFadden // J Bacteriol. 1988 October; 170(10): 4528–4536.

130. Matsuoka M. Role and control of isocitrate lyase in *Candida lipolytica*. / M. Matsuoka, Y. Ueda, S. Aiba // J Bacteriol. 1980 November; 144(2): 692–697.

131. Matsuoka M. Characterization of *Saccharomycopsis lipolytica* mutants that express temperature-sensitive synthesis of isocitrate lyase. / M Matsuoka, T Himeno, S Aiba // J Bacteriol. 1984 March; 157(3): 899–908.

132. McFadden B. A. Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. / B. A. McFadden, S. Purohit // J Bacteriol. 1977 July; 131(1): 136–144.

133. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. / P. S. Hoffman, et al // J Bacteriol. 1996 August; 178(16): 4822–4829.

134. Meyron-Holtz EG. Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. / EG Meyron-Holtz, MC Ghosh, TA Rouault // Science 306:2087–2090, 2004

135. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron regulatory protein 2. / Cooperman SS, et al // Blood 106:1084–1091, 2005

136. Minard KI. Sources of NADPH in yeast vary with carbon source. / KI Minard, L McAlister-Henn // J Biol Chem 280:39890–39896, 2005

137. Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and non-malignant human prostate tissues. / Singh KK, et al // Mol Cancer 5:14, 2006

138. Mitochondrial cysteine desulfurase iron-sulfur cluster s and aconitase are post-transcriptionally regulated by dietary iron in skeletal muscle of rats / Y. F. Liew, N. S. Shaw // J. Nutr. September 1, 2005 vol. 135 no. 9, p. 2151-2158.

139. Modification of the active site of isocitrate lyase from *Pinus pinea* / E. Giachetti [et. al.] // Life Sci. Adv. – 1993. – Vol. 12, № 3. – P. 159-167.

140. Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin / Condò I, et al // Hum. Mol. Genet. (2010) 19 (7): 1221-1229.

141. Munoz-Elias E. J. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence / E. J. Munoz-Elias, and J. D. McKinney // Nat. Med. 11:638-644, 2005

142. Mutation of phosphotransacetylase but not isocitrate lyase reduces the virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in mice / Y. R. Kim, et al // Infect Immun. 2006 April; 74(4): 2498–2502. doi: 10.1128/IAI.74.4.2498-2502.2006

143. Napier I. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. / I Napier, P Ponka, DR Richardson // Blood 105:1867–1874, 2005

144. Napoli E. Frataxin, iron–sulfur clusters, heme, ROS, and aging. / E Napoli, F Taroni, GA Cortopassi // Antioxid Redox Signal 8:506–516, 2006

145. Non-transferrin-bound iron uptake by hepatocytes is increased in the Hfe knockout mouse model of hereditary hemochromatosis. / Chua AC, et al // Blood 104:1519–1525, 2004

146. Nitric oxide modulates the activity of Tobacco aconitase / D. A. Navarre, et al // Plant Physiology February 2000 vol. 122 no. 2 573-582.

147. Nucleotide sequence of the aceA gene coding for isocitrate lyase in *Escherichia coli*. / C. Rieul, et al // Nucleic Acids Res. 1988 June 24; 16(12): 5689

148. Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability / M. Gengenbacher, et al // Microbiology. 2010; 156: 81–87.

149. Of two cytosolic aconitases expressed in *Drosophila*, only one functions as an iron regulatory protein. / Lind MI, et al // J Biol Chem 281:18707–18714, 2006

150. Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. / K Pantopoulos // *Ann N Y Acad Sci* 1012:1–13, 2004

151. Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. / Molina-Navarro MM, et al // *FEBS Lett* 580:2273–2280, 2006

152. Proteome analysis of peroxisomes from etiolated *Arabidopsis* Seedlings identifies a peroxisomal protease involved in  $\beta$ -oxidation and development / Sh. Quan, et al // *Plant Physiol.* 2013 163: 1518-1538. First Published on October 15, 2013; doi:10.1104/pp.113.223453

153. Puig S. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. / S Puig, E Askeland, DJ Thiele // *Cell* 120:99–110, 2005

154. Purification and regulatory properties of isocitrate lyase from *Escherichia coli* ML308. / C MacKintosh, H G Nimmo // *Biochem J.* 1988 February 15; 250(1): 25–31.

155. Quan T. J. Evaluation of a qualitative isocitrate lyase assay for rapid presumptive identification of *Yersinia pestis* cultures. / T. J. Quan, J. J. Vanderlinden, K. R. Tsuchiya // *J Clin Microbiol.* 1982 June; 15(6): 1178–1179.

156. Ranaldi F. Multisite inhibition of *Pinus pinea* isocitrate lyase by phosphate / F. Ranaldi, P. Vanni, E. Giachetti // *Plant Physiol.* 2000.

157. Regulation of the HscA ATPase reaction cycle by the co-chaperone HscB and the iron–sulfur cluster assembly protein IscU. / Silberg JJ, et al // *J Biol Chem* 279:53924–53931, 2004

158. Regulation by glutathionylation of isocitrate lyase from *Chlamydomonas reinhardtii* / M. Bedhomme, et al // *J Biol Chem.* 2009 December 25; 284(52): 36282–36291. Published online 2009 October 21.

159. Regulatory roles for IscA and SufA in iron homeostasis and redox stress responses in the cyanobacterium . strain PCC 7002. / Balasubramanian R, et al // *J Bacteriol* 188:3182–3191, 2006

160. Reinscheid D. J. Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. / D J Reinscheid, B. J. Eikmanns, H. Sahm // J Bacteriol. 1994 June; 176(12): 3474–3483.

161. Relevance of NAC-2, an Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter, to life span, body size and fat content in *Caenorhabditis elegans*. / Fei YJ, et al // Biochem J 379:191–198, 2004

162. Reversible redox-dependent modulation of mitochondrial aconitase and proteolytic activity during in vivo cardiac ischemia/reperfusion / A. L. Bulteau, et al // PNAS April 26, 2005 vol. 102 no. 17 5987-5991.

163. Rickie B. T. Ontogeny of cotton seeds: gametogenesis, embryogenesis, germination, and seedling growth / B. T. Rickie, K. D. Chapman // Physiology of cotton. – 2010. – P. 332-341.

164. RNA silencing of mitochondrial m-Nfs1 reduces Fe–S enzyme activity both in mitochondria and cytosol of mammalian cells. / Fosset C, et al // J. Biol. Chem. Epub ahead of print, 2006

165. RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. / Anderson PR, et al // Hum Mol Genet 14:3397–3405, 2005

166. Robertson A. G. Site-directed mutagenesis of cysteine-195 in isocitrate lyase from *Escherichia coli* ML308. / A. G. Robertson, H. G. Nimmo // Biochem J. 1995 January 1; 305(Pt 1): 239–244.

167. Robertson E. F. Phosphorylation of isocitrate lyase in *Escherichia coli*. / E. F. Robertson, H. C. Reeves. // Biochimie, 1989, 71: 1065–1070

168. Roles of the mammalian cytosolic cysteine desulfurase, ISCS, and scaffold protein, ISCU, in iron–sulfur cluster assembly. / Li K, et al // J Biol Chem 281:12344–12351, 2006

169. Role of phosphoenolpyruvate in the NADP-isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase reaction in *Escherichia coli* / T. Ogawa, et al // J Bacteriol. 2007 February; 189(3): 1176–1178

170. Rouault TA. Iron–sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. / TA Rouault, WH Tong // Nat Rev Mol Cell Biol 6:345–351, 2005

171. Rozen S. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers / S. Rozen, H. Skaletsky // Methods Mol. Biol. – 2000. – Vol. 132. – P. 365-386.

172. Schaik E. J. *Burkholderia pseudomallei* isocitrate lyase is a persistence factor in pulmonary melioidosis: implications for the development of isocitrate lyase inhibitors as novel antimicrobials / E. J. van Schaik, M. Tom, D. E. Woods // Infect Immun. 2009 October; 77(10): 4275–4283. Published online 2009 July 20. doi: 10.1128/IAI.00609-09

173. Schöler A. A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene *icl1* is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. / A. Schöler, H. J. Schüller // Mol Cell Biol. 1994 June; 14(6): 3613–3622.

174. Serio A. W. Expression of Yeast mitochondrial aconitase in *Bacillus subtilis* / A. W. Serio, A. L. Sonenshein// Journal of Bacteriology, September 2006, p. 6406-6410, Vol. 188, No. 17.

175. Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies. / Smith SR, et al // Ann N Y Acad Sci 1012:65–83, 2004

176. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. / Han D, et al // Biochemistry 44:11986–11996, 2005

177. Spatial patterns of gene expression in *Brassica napus* seedlings: identification of a cortex-specific gene and localization of mRNAs encoding



isocitrate lyase and a polypeptide homologous to proteinases. / R. A. Dietrich, et al // *Plant Cell*. 1989 January; 1(1): 73–80

178. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. / Johnson DC, et al // *Annu Rev Biochem* 74:247–281, 2005

179. Structure and kinetics of phosphonopyruvate hydrolase from *Variovorax* sp. Pal2: new insight into the divergence of catalysis within the PEP mutase/isocitrate lyase superfamily / C. C. Chen, et al // *Biochemistry*. 2006; 45: 11491–11504.

180. Structure of isocitrate lyase, a persistence factor of *Mycobacterium tuberculosis* / V. Sharma, et al // *Nat Struct Biol*. 2000; 7: 663–668.

181. Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. / Wallace MA, et al // *J Biol Chem* 279:32055–32062, 2004

182. The B73 *Maize* genome: complexity, diversity, and dynamics / P. S. Schnable, et al // *Science* 20 November 2009

183. The crystal structure and active site location of isocitrate lyase from the fungus *Aspergillus nidulans* / K. Britton, et al // *Structure*. 2000; 8:349–362.

184. The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. / Yang M, et al // *EMBO J* 25:1775–1783, 2006

185. The essential WD40 protein Cia1 is involved in a late step of cytosolic and nuclear iron–sulfur protein assembly./ Balk J, et al // *Mol Cell Biol* 25:10833–10841, 2005

186. The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron–sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p. / Dutkiewicz R, et al // *J Biol Chem* 281:7801–7808, 2006

187. The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants/ Arnaud N, et al // *Biochem J*. 2007 Aug 1; 405(3):523–31.

188. The life-extending gene *Indy* encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates. / Knauf F, et al // *Biochem J* 397:25–29, 2006

189. The mitochondrial ATP-binding cassette transporter *Abcb7* is essential in mice and participates in cytosolic iron–sulfur cluster biogenesis. / Pondarre C, et al // *Hum Mol Genet* 15:953–964, 2006

190. The *Nfs1* interacting protein *Isd11* has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. / Adam AC, et al // *EMBO J* 25:174–183, 2006

191. The redox regulation of intermediary metabolism by a superoxide-aconitase rheostat. / Armstrong JS, et al // *Bioessays* 26:894–900, 2004

192. The role of isocitrate lyase and the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* growing under glucose limitation / R. Prasad Maharjan, et al // *Res Micro.* 2005; 156: 178–183.

193. The *Saccharomyces cerevisiae* *ICL2* gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme a metabolism / M. A. H. Luttk, et al // *J Bacteriol.* 2000 December; 182(24): 7007–7013.

194. The structure and domain organization of *Escherichia coli* isocitrate lyase / K. L. Britton, et al // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2001; 57:1209–1218.

195. Thurston C. F. Control of isocitrate lyase synthesis in *Chlorella fusca* var. *vacuolata*. The basal activity of the enzyme and the kinetics of induction. / C. F. Thurston // *Biochem J.* 1977 April 15; 164(1): 147–151.

196. Tong WH. Functions of mitochondrial ISCU and cytosolic ISCU in mammalian iron–sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. / WH Tong, TA Rouault // *Cell Metab* 3:199–210, 2006

197. Tong W. H. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron–sulfur cluster biogenesis / W. H. Tong and T. A. Rouault // *Cell Biology and Metabolism Branch, National Institute of Child Health and Human Development, NIH Bldg 18, Rm 101, Bethesda, MD 20892, USA, 2007.*

198. Transcriptomic analysis of the role of carboxylic acids in metabolite signaling in *Arabidopsis* leaves / I. Finkemeier, et al // *Plant Physiol.* 2013 162: 239-253
199. Type III secretion system expression in oxygen-limited *Pseudomonas aeruginosa* cultures is stimulated by isocitrate lyase activity / C. S. Jade, et al // *Open Biol.* 2013 January; 3(1)
200. Tzachi B. Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR / B. Tzachi // *Nucleic Acids Research.* – 2003. – Vol. 31. – P. 105-109.
201. Umbreit J. Iron deficiency: a concise review. / J Umbreit // *Am J Hematol* 78:225–231, 2005
202. Wada M. Functional characterization of Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter NaC2/NaCT expressed in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. / M Wada, A Shimada, T Fujita // *Brain Res* 1081:92–100, 2006
203. Wolfgang MJ. Control of energy homeostasis: role of enzymes and intermediates of fatty acid metabolism in the central nervous system. / MJ Wolfgang, MD Lane // *Annu Rev Nutr* 26:23–44 (Epub ahead of print), 2006
204. Wennerhold J. The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from *Corynebacterium* under Iron Limitation and is itself repressed by DtxR / J. Wennerhold1, A. Krug1, M. Bott // December 9, 2005 *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 40500-40508.
205. Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. / Regev-Rudzki N, et al // *Mol Biol Cell* 16:4163–4171, 2005
206. Yarian CS. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. / CS Yarian, D Toroser, RS Sohal // *Mech Aging Dev* 127:79–84, 2006
207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
208. <http://www.genebee.msu.su>