

*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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет»

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор

**Епринцев Александр Трофимович**

**Официальные оппоненты:**

**Ершова Антонина Николаевна,**  
доктор биологических наук, профессор,  
Воронежский государственный  
педагогический университет,  
кафедра биологии растений  
и животных, заведующая

**Гойкалова Ольга Юрьевна,**  
кандидат биологических наук, доцент  
Воронежский государственный  
университет инженерных технологий,  
кафедра биохимии и биотехнологии,  
доцент

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки «Институт физиологии  
растений» им. К.А. Тимирязева  
Российской Академии наук

Защита состоится 19 декабря 2014 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.02 при Воронежском государственном университете по адресу: 394006, Воронеж, Университетская пл., 1, аудитория 335.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и сайте Воронежского государственного университета: [http:// www.science.vsu.ru](http://www.science.vsu.ru).

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

Автореферат разослан « \_\_\_ » 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Брехова Любовь Ивановна

## 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 органный 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 уровнях.

**Научная новизна.** Полученные результаты 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 и обмен 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.** Выделение 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 диссертации используются в учебном процессе 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, как правило, двумя множественными молекулярными формами с различной относительной электрофоретической подвижностью. Для изоферментов характерна специфичная субклеточная локализация.

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 144 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Объекты и методы исследования.** Исследования проводили на растениях с различным типом метаболизма: соя (*Glycine max L.*, сорт Игор), кукуруза (*Zea mays* сорта «Воронежская 76»), амарант (*Amaranthus caudatus L.* сорта «Рыжик»), выращенные гидропонным способом при температуре 25°C.

**Определение активности исследуемых ферментов.** Активность изоцитратлиазы и аконитатгидратазы определяли с помощью спектрофотометрического метода на СФ-2000 при длине волны равной 324 и 240 нм, соответственно [Епринцев А.Т. и др., 2007].

**Выделение и очистка ферментов.** Очистку ферментов осуществляли по следующей схеме: 1. Гомогенизация материала. 2. Высаливание сульфатом аммония. 3. Гель-фильтрация на сефадексе G-25. 4. Хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой с использованием линейного градиента KCl (50 – 150 мМ) для изоцитратлиазы и KCl (60 – 120 мМ) для аконитатгидратазы.

**Электрофоретические исследования белков.** Электрофоретическое исследование проводили по методу Девиса [Davis V.J., 1994]. Универсальное окрашивание на белок осуществляли нитратом серебра [Nesterenko M.V. et al., 1994]. Специфическое проявление на активность ИЦЛ проводили с использованием модифицированного реагента Шиффа [Kornberg H.L., 1957]. Для специфической идентификации АГ использовали тетразолиевый метод.

**Субклеточная локализация.** Исследование субклеточной локализации энзимов проводили с помощью дифференциального центрифугирования на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) и изоплотностного центрифугирования в градиенте сахарозы на центрифуге Beckman (США).

**Регуляция активности изоцитратлиазы и аконитазы.** Регуляторные свойства ИЦЛ и АГ исследовали на электрофоретически гомогенных препаратах. Определение констант ингибирования проводили с помощью графика зависимости  $1/V$  от  $[S]$  [Диксон М., 1982].

**Выделение суммарной клеточной популяции РНК и получение кДНК.** Суммарную клеточную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции

[Chomczynski P., 1987]. Обратную транскрипцию проводили с использованием ревертазы M-MuLV (Fermentas, Литва).

**Проведение ПЦР в реальном времени.** Для выяснения изменения уровня экспрессии генов аконитазы и изоцитратлиазы кукурузы и амаранта применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе Chromo4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I [Епринцев А.Т. и др, 2001]. Использовали следующие нуклеотидные последовательности к гену *aco1*: прямой – 5'-GCTGAGCGGTACCAGCAGGC-3'; обратный – 5'-GCGGGTCTCCTGAGAGGCCA-3'; к гену *aco2*: прямой – 5'-CCGCCTTCCTGTTTCAGTTTG-3'; обратный – 5'-TGTAGAGGGAGTGCTGTCATCAA-3'. Температура отжига для обеих пар праймеров составляла 60 °С.

Праймеры для ПЦР-РВ анализа экспрессии генов изоцитратлиазы были следующими: для *icl1*: прямой 5'-GCCACTTGAATAGTT-3', обратный - 5'-ACATAAGGCAACTTC-3', температура отжига 54 °С; для *icl2*: прямой 5'-GGATAGGACTTACTA-3', обратный - 5'-AGCTTGTCCCTTAGAA-3', температура отжига 56 °С. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* с ген-специфичными праймерами [Nicot N. et al., 2005]. Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода [Livak K.J., et al., 2001].

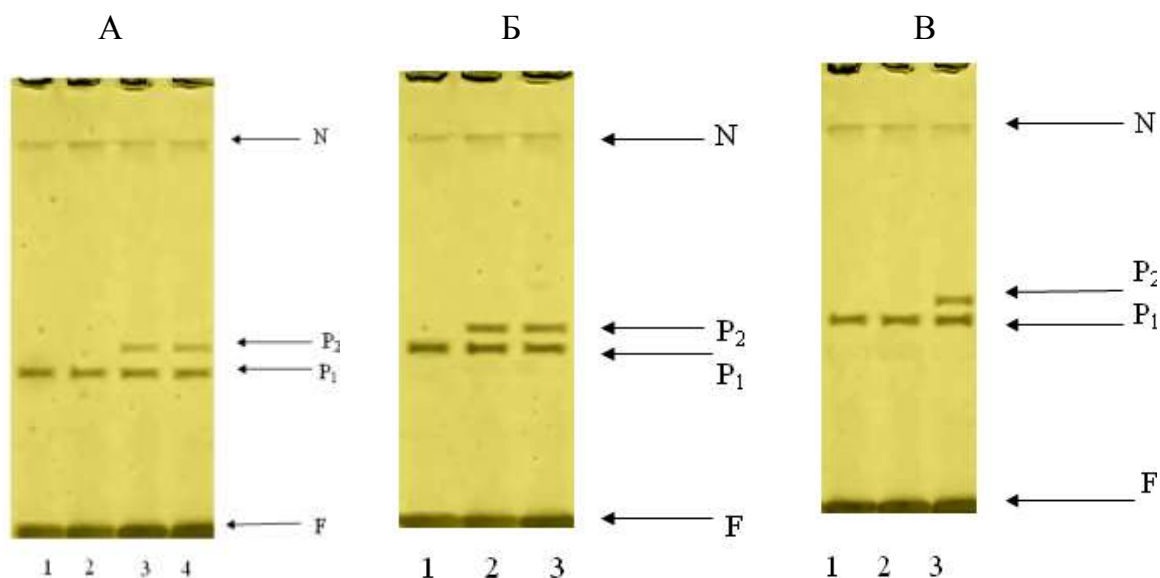
**Статистическая обработка данных.** Опыты проводили в 5-8 биологических повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Полученные данные обрабатывали с применением стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента [Лакин Г.Ф., 1990].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

В нашем исследовании получены данные по изоферментному составу аконитазы в разных органах кукурузы, сои и амаранта. Анализ полученных результатов показывает, что в кукурузе в зависимости от исследуемого 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 щитков кукурузы выявлены две формы исследуемого фермента, характеризующиеся разными значениями  $R_f$  (рис. 1).

Данные распределения изоформ АГ в разных органах сои, приведенные на рисунке 1, свидетельствуют, что в семенах этого растительного организма функционирует одна-единственная форма аконитазы с относительной электрофоретической подвижностью 0,54.



**Рис. 1.** Изоферментный состав АГ в различных органах кукурузы (А), сои (Б) и амаранта (В). 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 данных по электрофоретическому исследованию изоферментного состава аконитазы в амаранте свидетельствует о том, что в листьях этого растения появляется вторая изоформа фермента. Так, быстродвижущаяся форма аконитатгидратазы характеризовалась значением  $R_f$  0,50, а относительная электрофоретическая подвижность медленнодвижущейся изоформы равнялась 0,45 (рис. 1). Одна форма обеспечивает работу цикла трикарбоновых кислот, а вторая участвует в метаболизации органических кислот, в том числе в функционировании важнейшего анаболического процесса - глиоксилатного пути.

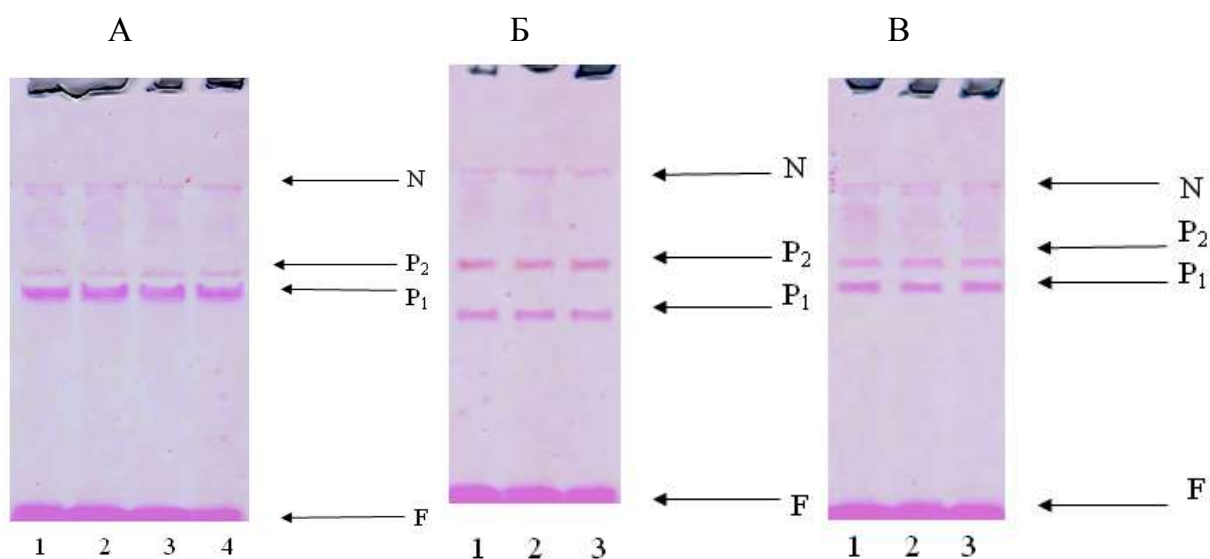
#### **Изоферментный состав изоцитратлиазы в органах растений**

Анализ изоферментного состава ИЦЛ в кукурузе показал наличие двух изоформ в семенах, щитках, корнях и листьях (рис. 2). Так, быстродвижущаяся изоформа ИЦЛ характеризовалась относительной электрофоретической подвижностью 0,30, а медленнодвижущаяся – 0,25. Аналогичная картина наблюдается при анализе сои и амаранта. Быстродвижущаяся форма ИЦЛ сои характеризуется величиной относительной электрофоретической подвижности равной 0,44, а медленнодвижущаяся - 0,28. Для быстродвижущейся формы ИЦЛ из амаранта характерна величина относительной электрофоретической подвижности, равная 0,30, для медленнодвижущейся значение  $R_f$  составляло 0,24 (рис. 2).

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.



**Рис. 2.** Изоферментный состав ИЦЛ в различных органах кукурузы (А), сои (Б) и амаранта (В). 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.

### Внутриклеточное распределение активности АГ и ИЦЛ

Наличие двух изоформ, обнаруженных в исследуемых растениях, как правило, указывает на их различную функциональную значимость и специфическую внутриклеточную локализацию. Как видно из полученных данных, приведенных в таблице 1, 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 деления их в условиях изоплотного центрифугирования.

Анализ распределения изоцитратлиазной активности имеет свои характерные особенности (табл. 1).

Таблица 1.

Субклеточная локализация аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активностей в кукурузе (1 – Е/мг белка, 2 - % от общей активности) (n = 5; p ≤ 0,05)

Фракция органоедов	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

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.

Результаты исследования субклеточной локализации аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активностей приведены в таблице 2. 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.

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%.

Таблица 2.

Субклеточная локализация аконитазы и изоцитратлиазы в проростках амаранта (1 – Е/мг белка, 2 - % от общей активности) (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

Данные, приведенные в таблице 3, показывают особенности внутриклеточного распределения аконитатгидратазной и изоцитратлиазной активностей в листьях сои. Аконитатгидратаза обнаружена в цитоплазме, митохондриях и глиоксисомах клеток. Наибольшая активность наблюдалась в митохондриальной фракции, где аконитатгидратазная активность составляла 63%. Внутриклеточное распределение изоцитратлиазной активности характеризуется доминированием этого показателя в глиоксисомальной фракции, где она составляла 71% от общей активности ИЦЛ в растительной клетке.

Таблица 3.

Внутриклеточное распределение аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в тканях сои (1 – Е/мг белка, 2 - % от общей активности) (n = 5; p ≤ 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

Значительное количество активности ИЦЛ обнаружено в цитоплазме (34%) и незначительное содержание зафиксировано в митохондриальной фракции (3%).

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

### Очистка аконитатгидратазы из растений

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 [Остерман Л.А., 1981].

Анализ полученных результатов очистки изоформ аконитатгидратазы из растений с различным типом метаболизма (табл. 4) свидетельствует, что применение пятистадийной схемы очистки позволило получить препараты исследуемого фермента в высокоочищенном или гомогенном состояниях. Данные по величинам удельной активности, степени очистки и выхода ферментативной активности, приведенные в таблице 4, указывают, что для гомогенных препаратов аконитазы из кукурузы, сои и амаранта наблюдаются незначительные колебания значений этих показателей.

Таблица 4.

Результаты очистки аконитазы из тканей различных растений (n = 3; 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

АГ<sub>1</sub> и АГ<sub>2</sub> - изоферменты.

Из всех изучаемых растений получено две формы аконитатгидратазы, причем эффективное разделение изоферментов было обеспечено применением ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Степень очистки аконитатгидратазы из разных растений варьировала в значительной мере от 79 до 133 раз в зависимости от объекта выделения. Самым консервативным показателем был выход активности ферментов, составляющий от 3 до 4%.

Следует отметить, что данные характеристики АГ вполне сопоставимы с результатами очисток фермента из других объектов, в том числе животного происхождения [Епринцев А.Т. и др., 2007].

#### **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 [Епринцев А.Т. и др., 2005, Куен Ч.Т.Х. и др., 2008]. Применение четырехстадийной схемы позволило получить изоферменты изоцитратлиазы с высокими значениями удельной активности.

Так, быстродвижущаяся форма ИЦЛ из кукурузы имела величину 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.

Таблица 5.

#### **Основные показатели очистки изоферментов ИЦЛ из кукурузы, сои и амаранта (n = 3; p ≤ 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

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. 5).

## Метаболическая регуляция аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растениях

Характерной особенностью метаболизма 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» [Chen X.J., et al., 2005, Tong W.H., 2007]. Из литературных данных известно, что транс-аконитат является сильным конкурентным ингибитором аконитазы животного происхождения [Епринцев А.Т. и др., 2005]. В связи с этим значительный интерес представляют данные, полученные в работе по величинам констант ингибирования и типа ингибирования, приведенные в таблице 6. Сравнительный анализ 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.

Таблица 6.

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

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.

### Регуляция активности аконитатгидратазы органическими кислотами

Изучение регуляторного влияния органических кислот на функционирование аконитатгидратазы из исследуемых растений проводили с использованием таких важнейших интермедиатов, как малат, сукцинат, фумарат, глиоксилат. Результаты, приведенные в таблице 7, показывают, что все использованные соединения вызвали тормозящее действие на функционирование аконитазы по конкурентному типу.

Величины 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

Анализ значений констант ингибирования, определенных по Диксону и Уэббу, показывает варьирование величины этого показателя от 1,24 до 2,86 мМ. Наибольшее тормозящее действие оказывал фумарат, который, ингибируя активность фермента по конкурентному типу, имел величину  $K_i$  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. 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. Характер тормозящего действия исследованных органических кислот указывает на конкурентный тип ингибирования аконитатгидратазы из кукурузы, сои и амаранта. Анализ результатов проведенного исследования может свидетельствовать о возможной регуляторной роли этих интермедиатов в функционировании АГ в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном пути.

#### **Действие интермедиатов глюконеогенеза на активность изоцитратлиазы**

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 8, 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 конечные продукты глюконеогенеза обладают сильным тормозящим действием на активность ИЦЛ.

Таблица 8.

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

#### **Воздействие перекиси водорода на активность аконитатгидратазы и изоцитратлиазы**

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 [W. H. Tong and T. A. Rouault, 2007]. Кроме того, сравнивалось тормозящее действие перекиси водорода на активность аконитатгидратазы, выделенной из митохондриальной и цитоплазматической фракции растительных клеток.

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 полученных данных позволяет сделать заключение о том, что высокие концентрации этого вещества (100-300 мкМ) оказывают очень сильный тормозящий эффект.

Установлены особенности инактивирующего действия различных концентраций  $H_2O_2$  на цитоплазматическую и митохондриальную формы

аконитазы, выделенную из амаранта. Все основные тенденции тормозящего действия перекиси водорода на аконитатгидратазную активность в амаранте сохраняются и аналогичны выявленным и описанным ранее изменениям функционирования аконитазы из кукурузы и сои.

Для проведения сравнительного изучения влияния перекиси водорода на активность изоцитратлиазы использовали концентрации этой формы активного кислорода в тех же значениях, что и при исследовании АГ. 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.

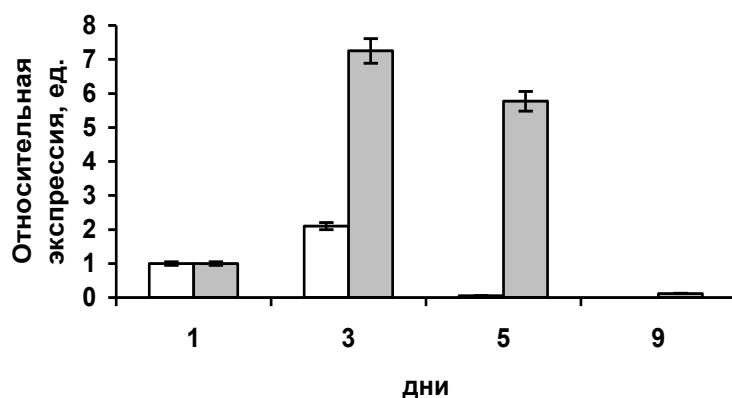
### **Экспрессионная регуляция аконитазной активности при прорастании растений**

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. 3).

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 3, 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.



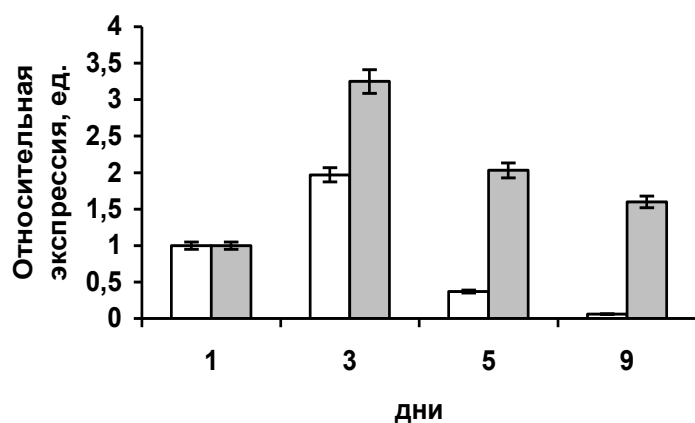


**Рис. 3.** Экспрессия генов аконитазы в щитках кукурузы при прорастании семян: белые столбики (цитоплазматическая), серые (митохондриальная).

Полученные результаты 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 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*. 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.

Схожие данные получены при исследовании экспрессии генов *aco1* и *aco2* при прорастании семян амаранта. 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 4, 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.

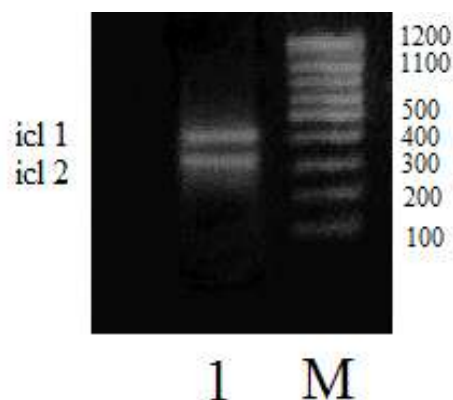
Начиная с пятого дня, уровень экспрессии гена *aco1* уменьшается, и к девятому дню прорастания достигает значения 50% от максимального значения (третий день). Резкое снижение интенсивности экспрессии исследуемого гена коррелирует с таковым показателем для гена митохондриальной формы АГ в щитках кукурузы и обусловлено переключением основного энергетического метаболизма клетки на автотрофный тип питания.



**Рис. 4.** Экспрессия генов аконитазы при прорастании семян амаранта: белые столбики (цитоплазматическая), серые (митохондриальная).

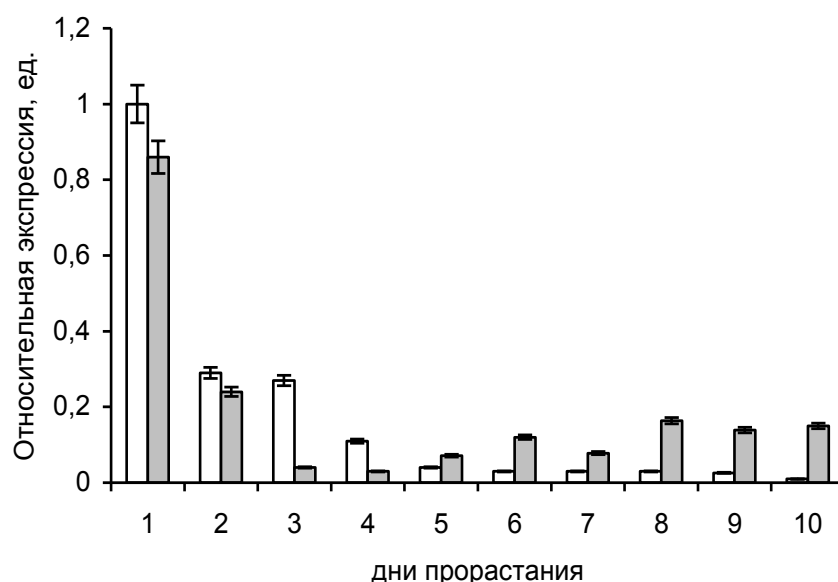
#### Экспрессия генов изоцитратлиазы в проростках семян амаранта

Результаты исследования полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами к генам изоцитратлиазы показывают, что в геноме амаранта, на стадии прорастания семян экспрессируются одновременно два гена изоцитратлиазы (рис. 5).



**Рис. 5.** 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.

Проведенный ПЦР в реальном времени со специфическими праймерами к генам *icl1* и *icl2* (рис. 6) 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 цикла. Данный путь необходим для мобилизации запасных веществ семени, например липидов, поскольку в первые дни прорастания растения осуществляют гетеротрофный тип питания [Епринцев А.Т. и др. 2007]. Функция дополнительной, внеглиоксисомальной формы изоцитратлиазы, вероятно, заключается в осуществлении реакции синтеза органических кислот (изоцитрат), накопление которых приводит к закислению внутренней среды клетки. Более кислое значение рН способствует увеличению скорости гидролиза жирных кислот, необходимых для протекания глюконеогенетических процессов.



**Рис. 6.** Относительный уровень экспрессии генов изоцитратлиазы в проростках амаранта: белые столбики (глиоксисомальная), серые (цитоплазматическая).

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. В то же 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. 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 гликоксилата.

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 гликоксилатного 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 гликоксилатного 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 гликоксилатного цикла. В то же время,

высокая экспрессия гена *icl2* в этот же период прорастания, вероятно, связана с индукцией изофермента ИЦЛ, участвующего в анаплеротических реакциях. На 3-4 день 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.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование разработанных на кафедре биохимии и физиологии клетки многостадийных схем очистки ферментов позволило получить из кукурузы, амаранта и сои электрофоретически гомогенные препараты изоферментов 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 [Епринцев А.Т. и др., 2007, 2005, Куен Ч.Т.Х. и др, 2008].

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 [Епринцев А.Т. и др. 2007].

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.

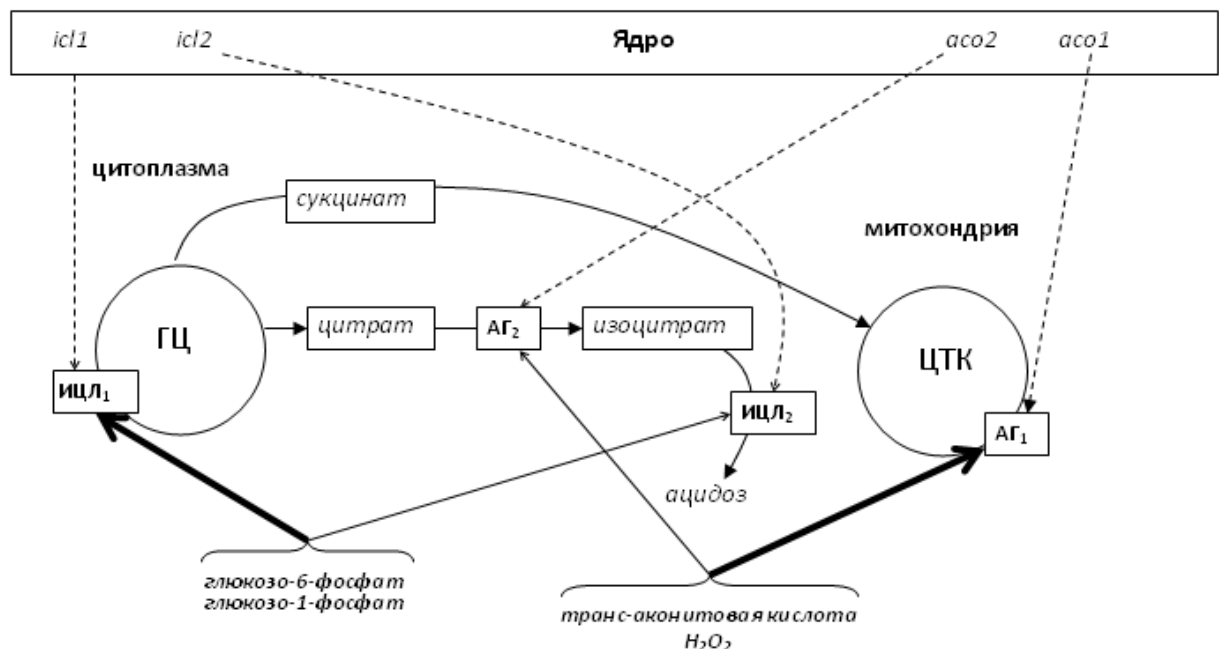
Анализ данных электрофоретических исследований распределения изоформ изоцитратлиазы и аконитазы в субклеточных фракциях кукурузы показывал, что множественные формы проявляют специфичность субклеточной локализации. В глиоксисомах обнаружены быстро движущиеся формы исследуемых ферментов с  $R_f$  0,29 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 [Землянухин А.А., 1995].

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.



**Рис. 7.** Гипотетическая схема метаболической и экспрессионной регуляции функционирования изоферментов аконитатгидратазы и изоцитратлиазы в растительной клетке (→ сильное ингибирование; → слабое ингибирование).

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 метаболизации запасных жиров и, предположительно, данный ген кодирует соответствующий изофермент. Экспрессия гена *icl2*, вероятно, обуславливает синтез дополнительной формы ИЦЛ для осуществления анаплеротических реакций.

Таким образом, полученные данные по метаболитной и экспрессионной регуляции изоферментов АГ и ИЦЛ из исследуемых растений позволили разработать гипотетическую схему функционирования этих ферментных систем в растительной клетке (рис. 7).

### 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. Исоцитратлиазная 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 анаплеротических реакций.

#### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изоферментный состав изоцитратлиазы в разных органах С3- и С4- растений / Е.В. Маслова [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегион. сб. науч. работ. — Воронеж, 2008. — Вып. 10. - С. 160-164.
2. Регуляция активности изоформ изоцитратлиазы в онтогенезе высших растений / Е.В. Маслова [и др.] // Биология - наука 21 века : 12-я междунар. Пущинская шк.-конф. молодых ученых, 10-14 нояб. 2008 г. : сб. тез. — 2008. — С. 94.
3. Регуляторные аспекты функционирования изоформ изоцитратлиазы в различных органах *Zea mays* L. / А.Т. Епринцев [и др.] // Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений : тез. докл. Междунар. науч. конф., Екатеринбург, 6-10 окт. 2008 г. — Екатеринбург, 2008. — С. 166-167.

4. Некоторые регуляторные свойства изоцитратлиазы из семян сои / М.В. Зайчикова (Никитина) [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегион. сб. науч. работ. — Воронеж, 2009. — Вып. 11. - С. 90-95.
5. Очистка цитоплазматической аконитатгидратазы и исследование ее регуляторных свойств / М.В. Зайчикова (Никитина) [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегион. сб. науч. работ. — Воронеж, 2010. — Вып. 12. - С. 97-102.
6. Регуляция экспрессии изоцитратлиазы в семенах сои на этапах прорастания семян / Т.В. Лыкова [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегион. сб. науч. работ. — Воронеж, 2010. — Вып. 12. - С. 137-141.
7. Применение ионообменной хроматографии для получения высокоочищенных препаратов аконитатгидратазы / М.А. Альнассер, [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. — Воронеж, 2010. — Т. 10, вып. 6. - С. 943-949. — ISSN 1680-0613.
8. Чан Тхи Хоанг Куен. Физико-химические и регуляторные свойства изоформ изоцитратлиазы из растений / Чан Тхи Хоанг Куен, М.В. Зайчикова (Никитина), А.В. Сальников // Биология - наука XXI века : сб. тез. 14-й Междунар. Пущинской шк.-конф. молодых ученых. — Пущино, 2010. — Т. 1. - С. 67.
9. Физико-химические и регуляторные свойства аконитазы в организмах разного уровня организации / Зайчикова М.В. (Никитина) [и др.] // Биология - наука XXI века : сб. тез. 14-й Междунар. Пущинской шк.-конф. молодых ученых. — Пущино, 2010. — Т. 1. - С. 25-26.
10. Регуляторные и кинетические характеристики цитоплазматической аконитатгидратазы из растительных и животных тканей / М.В. Зайчикова (Никитина), [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. — Воронеж, 2010. — № 2. - С. 81-84. — ISSN 0234-5439. — ISSN 1609-0675.
11. Выделение аконитатгидратазы из щитков кукурузы и исследование ее внутриклеточной локализации / М.В. Зайчикова (Никитина) [и др.] // Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий : 7-й Съезд О-ва физиологов растений России, 4-10 июля 2011 г. Н. Новгород : Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции : Междунар. науч. шк. : материалы докл. Ч. 1. — Н. Новгород, 2011. — С. 262-263.
12. Епринцев А.Т. Изоферменты изоцитратлиазы и их роль у организмов разного уровня организации / А.Т. Епринцев, А.В. Сальников, Зайчикова М.В. (Никитина) // Успехи современной биологии – Москва, 2013. – Т. 133, № 6. – С. 531-544.
13. Никитина М.В. Регуляция транс-аконитатом аконитатгидратазной активности в растениях с разным типом основного метаболизма / Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегион. сб. науч. работ. — Воронеж, 2014. — Вып. 16. – С. 103-108.
14. Разработка специфических праймеров для идентификации генов изоцитратлиазы из амаранта / Сальников А.В., [и др.] // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегион. сб. науч. работ. — Воронеж, 2014. — Вып. 16. – С. 136-142.

Работы № 7, 10, 12 опубликованы в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК.