

На правах рукописи

Гатауллина Марина Олеговна

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ
В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Специальность 03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2021

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Епринцев Александр Трофимович

Официальные оппоненты:

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

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

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт физиологии
растений им. К.А. Тимирязева Российской
академии наук.

Защита состоится «27» апреля 2021 года в 15:30 часов на заседании диссертационного совета при Воронежском государственном университете по адресу: 394036, Воронеж, Университетская пл., 1, аудитория.

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

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

Автореферат разослан « » 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Грабович Маргарита Юрьевна

Актуальность проблемы

Одним из главных направлений развития биохимии является выявление механизмов регуляции метаболизма в живых организмах. Среди множества проблем данной области науки важное место занимает изучение ферментативных систем, и их роли в регуляции поддержания жизнедеятельности в нормальных условиях и адаптации к различным неблагоприятным факторам.

Малатдегидрогеназная система представлена четырьмя ферментами: НАД⁺-малатдегидрогеназа (1.1.1.37), НАДФ⁺-малатдегидрогеназа (1.1.1.82), НАД⁺-малик-энзим (1.1.1.39) и НАДФ⁺-малик-энзим (1.1.1.40).

Данная ферментативная система играет важную роль в регуляции протекания метаболизма живых организмов. Двойной путь утилизации малата (оксидоредуцирующий и декарбоксилирующий) уменьшает зависимость организма от гликолиза в процессах анаболизма и катаболизма. Растительная МДГ является необходимым регулирующим компонентом клеточного метаболизма, обеспечивающим его изменения при адаптации к стрессовым условиям.

Особый интерес представляет изоферментный состав и субклеточная локализация изоформ различных малатдегидрогеназ. Кроме того, важными, но малоизученными аспектами исследований энзимов являются функции и механизмы регуляции их активности на генетическом и эпигенетическом уровнях. Одним из наиболее интересных и перспективных направлений исследования эпигенетических механизмов является метилирование промоторов генов.

В настоящее время, все статьи, посвященные малатдегидрогеназам, не рассматривают эти ферменты как целостную взаимосвязанную систему. В данной работе предпринимается попытка обобщить биохимические, молекулярные и эпигенетические аспекты регуляции активностей всех четырех ферментов малатдегидрогеназной системы.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение физико-химических и каталитических характеристик изоформ ферментов малатдегидрогеназной

системы растений и молекулярно-эпигенетических механизмов их функционирования в нормальных и стрессовых условиях.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изоферментный состав НАД(Ф)⁺-зависимых малатдегидрогеназ и их субклеточную локализацию в листьях кукурузы;
2. Получить электрофоретически гомогенные препараты исследуемых ферментов малатдегидрогеназной системы;
3. Изучить физико-химические и регуляторные свойства некоторых изоферментов оксидоредуцирующих и декарбоксилирующих МДГ;
4. Определить локализацию, структуру и регуляцию генов, кодирующих различные малатдегидрогеназы;
5. Изучить особенности биохимических и молекулярных механизмов регуляции функционирования малатдегидрогеназной системы в листьях кукурузы при различном световом режиме;
6. Исследовать особенности регуляции работы малатдегидрогеназной системы в ходе адаптации клеточного метаболизма к стрессовым условиям, вызванным гипоксией;
7. Выявить роль статуса метилирования промоторов генов исследуемых изоформ в регуляции работы малатдегидрогеназных ферментов.

Научная новизна и значимость работы.

Были получены гомогенные препараты трех НАД⁺-зависимых и одной НАДФ⁺-зависимой оксидоредуцирующих малатдегидрогеназ, локализованных в различных компартментах клетки, а также трех малик-энзимов. Свойства полученных ферментов, изученные в одной лаборатории, позволили провести достоверное сравнение их между собой.

Исследование уровня метилирования промоторов генов, кодирующих малатдегидрогеназы кукурузы при различных световых режимах, показало, что эпигенетические механизмы играют важную роль в регуляции экспрессии данных генов. Так, для *nadf-me* установлена четкая зависимость между уровнем транскриптов и статусом метилирования отдельных CG-динуклеотидов. Высокий метильный уровень промоторов этих генов приводит к снижению содержания транскриптов генов НАД⁺-зависимых малик-энзимов. Зависимость экспрессии гена от метильного статуса промотора показана также

для одного из цитоплазматических изоферментов НАД⁺-МДГ. Следовательно, обнаружен эпигенетический механизм регуляции функционирования некоторых изоформ малатдегидрогеназной ферментной системы.

Практическая значимость.

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов малатдегидрогеназных генов, впервые проведенный в работе, позволил подобрать метил-специфичные праймеры, которые можно использовать в научно-исследовательских лабораториях при изучении эпигенетического контроля за функциональным состоянием ферментных систем.

Модифицированная методика очистки пероксисомальной малатдегидрогеназы может быть использована для исследования других микротельцовых ферментов. Полученные препараты изоформ МДГ могут применяться в других научных исследованиях.

Результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по биохимии, физиологии растений, спецкурсов, а также при проведении практикумов и выполнении курсовых, бакалаврских и магистерских работ.

Практическая значимость данной работы состоит не только в проведении фундаментальных исследований. Изучение механизмов работы малатдегидрогеназной системы необходимо при создании модифицированных сортов растений с повышенной экспрессией генов, позволяющих адаптировать растение к неблагоприятным условиям.

Полученные результаты по влиянию светового режима на метаболизм растений открывают возможности для создания светильников, обладающих оптимальными спектральными характеристиками для выращивания растений.

Положения, выносимые на защиту.

1. В мезофилле листьев кукурузы обнаружены 11 различных изоформ оксидоредуцирующих и декарбоксилирующих малатдегидрогеназ, для которых выявлена субклеточная локализация в митохондриях, хлоропластах, пероксисомах и цитоплазме. Для различно локализованных изоферментов МДГ обнаружены отличия в физико-химических, каталитических и регуляторных свойствах. Для них характерна специфическая физиологическая роль в регуляции клеточного метаболизма в стрессовых условиях.

2. Все изученные изоформы энзимов МДГ являются изоферментами, то есть генетически детерминированными формами. Обнаружены 10 генов НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы, из них 4 цитоплазматических, 1 глиоксисомальная и 2 митохондриальных, а также псевдогены и гены с неизвестной локализацией. Кроме того, выявлены гены для декарбоксилирующих малатдегидрогеназ и НАДФ⁺-МДГ. Был проанализирован нуклеотидный состав их промоторов и подобраны специфические праймеры для исследуемых генов.

3. Исследование генетической детерминации генов МДГ и МЭ показало, что их большое количество позволяет экспрессировать отдельные формы фермента, что дает возможность растениям адаптироваться к различным условиям. Наличие CpG-островков в промоторах генов позволяет сделать заключение о важной роли эпигенетических механизмов в регулировании экспрессии ферментов в экстремальных условиях.

4. Исследовано действие светового режима на функционирование малатдегидрогеназ. Установлено, что НАД⁺-зависимые малатдегидрогеназы листьев кукурузы обладают более высокой активностью в темноте, что обуславливает усиление функционирования цикла Кребса и процессов, связанных с ним. Однако одна из цитоплазматических НАД⁺-МДГ и одна изоформа НАД⁺-МЭ демонстрировали высокую активность на свету, характерную для НАДФ⁺-зависимых форм.

5. Установлено, что пероксисомальная МДГ и НАДФ⁺-МЭ участвуют в адаптационном ответе растительной клетки на стрессовые условия, вызванные гипоксией. Так, в условиях гипоксии протекание ЦТК ингибируется, что сопряжено со снижением экспрессии митохондриальных ферментов. В то же время запускается интенсификация экспрессии пероксисомальной формы МДГ.

6. Выявлен эпигенетический механизм в регулировании отдельных изоформ малатдегидрогеназной системы. Установлено влияние метилирования CG-динуклеотидов промоторов генов *nadf-me* и *cyt-mdh2* в листьях растений при смене светового режима. Однако при гипоксии такой зависимости не обнаружено.

Апробация работы.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на международных, региональных и университетских конференциях. Они были представлены на 19-ой, 20-ой, 21-ой, 22-ой и 23-ей международных Пущинских конференциях молодых учёных «Биология – наука 21-ого века» (Пущино, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019), 8, 9, 10, 11 съездах общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных технологий» (2016, 2017, 2018, 2019); межрегиональных конференциях, посвященных памяти профессора А.А. Землянухина “Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов” (Воронеж, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019). Основные результаты настоящей диссертационной работы изложены в 18 публикациях – тезисах и статьях, среди которых 7 статей, опубликованных в журналах, включенных в список ВАК.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (164 источника). Иллюстрационный материал включает 44 рисунка и 8 таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом исследования являлись листья 10-ти дневных проростков кукурузы (*Zeamays L.*) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом.

Постановка эксперимента по созданию светового режима. Растения выдерживались в темноте 24 часа, после чего облучались светом различных длин волн (красный, дальний красный, синий) в течение 15 минут. Кроме того, изучались образцы растений, экпонируемые на свету и в темноте.

Постановка эксперимента по созданию гипоксического стресса.

Моделирование гипоксии осуществляли путем замены атмосферного воздуха углекислым газом или азотом в течение 24 часов. Процент гипоксии составлял 100 %, т.е. опыты проводились в условиях аноксии.

Определение активности малатдегидрогеназы и малик-энзимов.

Активность МДГ и МЭ определяли спектрофотометрически при 340 нм.

Определение изоферментного состава ферментов. Для определения изоферментного состава ферментов использовали электрофорез в полиакриламидном геле. Специфическое проявление МДГ осуществляли тетразолиевым методом.

Очистка ферментов. Очистка ферментов выполнялась по четырехстадийной схеме. Для пероксисомальной НАД⁺-МДГ была добавлена стадия изоплотностного центрифугирования.

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

Выделение суммарной клеточной РНК. Для выделения суммарной клеточной РНК использовался метод фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl.

Проведение ПЦР в реальном времени. ПЦР-РВ проводили на приборе Bio-Rad DNA Engine ThermalCycler Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green I.

Модификация ДНК бисульфитом натрия. Модификацию ДНК бисульфитом натрия проводили согласно ранее опубликованному протоколу (Warnecke et al., 2002) с некоторыми изменениями.

Анализ промоторов малатдегидрогеназных генов и подбор праймеров для метил-специфичной ПЦР. Для анализа промотора генов исследуемых ферментов на наличие CpG-островков использовали программу MethPrimer-LiLab, UCSF (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>).

Проведение метил-специфичной полимеразной цепной реакции. ПЦР с метил-специфичными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (“Хеликон”, Россия). Реакцию ПЦР проводили на приборе Терцик (“ДНК-Технология”, Россия).

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ субклеточной локализации и изоферментного состава МДГ в растении

Данные электрофоретических исследований НАД⁺-МДГ активности в разных субклеточных структурах с использованием специфического проявления приведены на рисунке 1. Распределение изоформ в листьях кукурузы демонстрирует строгую специфичность, зависимую от типа клеточного компартмента. В цитоплазматической фракции обнаружены 4 изоформы фермента с относительной электрофоретической подвижностью Rf-0,34; 0,43; 0,54; 0,6. В митохондриях - две формы МДГ с Rf-0,4; 0,51. В пероксисомальной (глиоксисомальной) фракции растительных клеток проявлялась единственная форма исследуемого энзима, имеющая относительную электрофоретическую подвижность 0,48. Подобное распределение изоферментного состава МДГ в органоидах растительной клетки обусловлено полифункциональностью малатдегидрогеназной ферментной системы, обеспечивающей функционирование разных метаболических процессов.

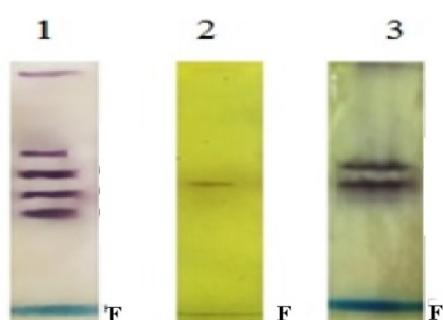


Рис.1. Изоферментный состав малатдегидрогеназы в различных компартментах клеток листьев кукурузы

- 1-цитоплазма,
- 2 –пероксисомы(глиоксисомы),
- 3-митохондрии

Были выявлены две изоформы митохондриального НАД⁺-зависимого малик-энзима. Первая изоформа имеет Rf=0,44, вторая – 0,49.

НАДФ⁺-МДГ характеризуется Rf=0,4, а НАДФ⁺-МЭ - Rf=0,1. Обе изоформы локализованы в хлоропластах листьев исследуемых растений.

2. Получение в гомогенном состоянии различных малатдегидрогеназ мезофилла листьев кукурузы

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

Были получены высокоочищенные препараты двух изоформ НАД⁺-малик-

энзимов и одной формы НАДФ⁺-малик-энзима. Использование многостадийной схемы очистки позволило получить препараты трех изоферментов НАД⁺-МДГ и одного НАДФ⁺-МДГ, локализованных в разных органоидах клетки (табл 1).

Таблица 1.
(n=3; p≤0,05)

Сравнительная характеристика показателей очистки малак-дегидрогеназ

Исследуемый фермент	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазматическая НАД-МДГ	640	9,2	46
Митохондриальная НАД-МДГ	990	9,5	71
Пероксисомальная НАД-МДГ	266	15	242
НАД-МЭ 1	76	5	126
НАД-МЭ 2	65	3	108
НАДФ-МЭ	92	15	109
НАДФ-МДГ	91	6	57

Электрофорез в ПААГ показал для всех очищенных ферментов наличие одной полосы при универсальном и специфическом окрашивании.

3. Физико-химические свойства МДГ и малик-энзима

3.1. Определение молекулярной массы нативных молекул МДГ и малик-энзимов

Величина молекулярной массы нативных молекул энзимов была определена методом гель-фильтрации на колонке G-200. Показано, что молекулярная масса МДГ варьируется от 48 кДа (пероксисомальная оксидоредуцирующая НАД⁺-МДГ) до 225 кДа (оксидоредуцирующая НАДФ⁺-МДГ).

3.2. Измерение молекулярной массы субъединиц препаратов энзимов

Электрофорез в ПААГ с добавлением додецилсульфата натрия позволил определить, что все изоформы состоят из одинаковых субъединиц и имеют димерное или тетрамерное строение с одинаковыми субъединицами, кодирующимися одним геном.

3.3. Кинетические характеристики

Значения K_m по малату составили 22 мМ для цитоплазматической НАД⁺-МДГ, 14,2 мМ для митохондриальной и 11,6 мМ для пероксисомальной. Значения констант Михаэлиса для обоих НАД⁺-зависимых малик-энзимов были равны, соответственно: по малату – 3 мМ и 3,5 мМ; для НАДФ⁺-зависимого малик-энзима – 5,5 мМ, а для НАДФ⁺-МДГ – 12,5 мМ. Приведенные данные указывают на большее сродство к малату декарбоксилирующих малатдегидрогеназ, чем оксидоредуцирующих. Кроме того, сродство к субстрату различается для одного типа фермента в разных компартментах. Так, сродство митохондриальной и пероксисомальной НАД⁺-зависимой МДГ к малату выше по сравнению с цитоплазматической изоформой этого энзима.

Для обратной реакции K_m по оксалоацетату для цитоплазматической НАД⁺-зависимой МДГ равняется 172 мкМ, для митохондриальной 209 мкМ, а для пероксисомальной – 265 мкМ. Для НАДФ⁺-МДГ характерно меньшее сродство, константа Михаэлиса равна 588 мкМ.

Декарбоксилирующие малатдегидрогеназы в качестве субстрата для обратной реакции используют пируват. Константы Михаэлиса для НАД⁺-МЭ-1 и 2 были равны 1,6 мМ и 1,3 мМ соответственно, что показывает большее сродство к субстрату для второго изофермента. НАДФ⁺-МЭ имеет еще большее сродство к пирувату, так как величина константы Михаэлиса имеет низкое значение $K_m = 1,3$ мМ.

Величина K_m по НАД⁺ для цитоплазматической НАД⁺-МДГ = 435 мкМ, митохондриальной – 270 мкМ и пероксисомальной – 129 мкМ. Значения K_m по НАДН — 100 мкМ, 205,8 мкМ и 220 мкМ соответственно. НАДФ⁺-зависимая малатдегидрогеназа характеризуется K_m по НАДФ⁺ – 500 мкМ; а по НАДФН – 438 мкМ.

НАД⁺-зависимые малик-энзимы, в целом, имеют меньшее сродство к коферментам. Константы Михаэлиса для изофермента-1 и для изофермента-2 были равны, соответственно: по НАД⁺ – 350 мкМ и 370 мкМ; по НАДН – 150 мкМ и 180 мкМ.

Значения константы Михаэлиса для НАДФ⁺-зависимого малик-энзима составили: по НАДФ⁺ – 4,5 мМ; по НАДФН – 900 мкМ

3.4. Определение оптимальных значений рН малатдегидрогеназных реакций

Было выяснено что рН-оптимум прямой реакции равен 8,5 для цитоплазматической и 9,5 для митохондриальной и пероксисомальной изоформ.

Для обратной реакции максимальная активность цитоплазматической, митохондриальной и пероксисомальной изоформ наблюдалась при рН, равном 7,5; 8,5; 9 соответственно.

Для НАДФ⁺-МДГ характерны рН-оптимумы 8 для обратной и 9,5 для прямой реакции.

Для НАД⁺-зависимых малик-энзимов рН-оптимум лежит в слабо-кислой среде. Для первой изоформы – 6,4 для второй - 6,9. рН-оптимум обратной реакции малик-энзимов, как и рН-оптимум МДГ, сдвигается в более щелочную сторону (6,7 и 7,3).

Были определены рН-оптимумы работы НАДФ⁺- зависимого малик-энзима, которые составили рН=8,0 – для прямой и обратной реакции.

3.5. Изучение влияния металлов на скорость малатдегидрогеназных реакций

Было исследовано влияние ионов Mg²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺ на активность очищенных изоформ. Для цитоплазматической изоформы НАД⁺-зависимой МДГ характерна активация ионами магния, кальция и бария. Митохондриальную и пероксисомальную формы активирует только магний. Ионы марганца являются ингибиторами для всех трех изоформ.

Исследование влияния ионов двухвалентных металлов на очищенный препарат НАДФ-МДГ показало, что ионы магния в концентрации до 5 мМ активируют фермент, в то время как ионы бария и марганца ингибируют его. Ионы кальция не влияют на активность фермента.

Для малик-энзимов характерна активация ионами магния и марганца. Активация ферментов ионами марганца является главным отличием декарбоксилирующих малатдегидрогеназ от оксидоредуцирующих и позволяет отделить их друг от друга.

Ионы бария и кальция, как и магний и марганец, в больших концентрациях ингибируют ферментативную активность исследуемых энзимов.

4. Молекулярные аспекты функционирования малатдегидрогеназной системы в мезофилле листьев кукурузы

В международной базе данных GenBank 2019 года нами были обнаружены 10 генов НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы, в том числе цитоплазматических форм, расположенных в хромосоме 1 (Gene ID: 542598), 2 (Gene ID: 103648465), 5 (Gene ID: 100280767), 7 (Gene ID: 103633793). Гены глиоксисомальных форм находятся в хромосомах 1 (Gene ID: 100282134), мнимый ген в 3 хромосоме (Gene ID: 100193491) и псевдоген в первой (Gene ID: 103640709). Митохондриальные гены в хромосомах 6 (Gene ID: 100274264) и 8 (Gene ID: 100273428). Кроме того, найдены 4 гена с неопределенной локализацией: в хромосомах 1 (Gene ID: 100193743), 3 (Gene ID: 100272900) и 4 (Gene ID: 100193663).

НАДФ⁺-зависимая малатдегидрогеназа кодируется одним хлоропластным геном *nadf-mdh* (Gene ID: 542374), расположенным в хромосоме 1.

НАД⁺-зависимый малик-энзим (МЭ) представлен двумя изоферментами, кодируемыми ядерными генами. Ген НАД⁺-МЭ 1 расположен в хромосоме 5 (LOC100501486, Gene ID: 100501486). Ген НАД⁺-МЭ 2 расположен в хромосоме 5 (psol15183b, Gene ID: 100191942).

НАДФ⁺-зависимый малик-энзим имеет в геноме кукурузы не менее 6 генов и 4 псевдогена. При этом, в листьях кукурузы функционирует одна хлоропластная форма гена, расположенного в хромосоме 3 (*nadf-me*, Gene ID: 542233).

5. Влияние светового режима на функционирование малатдегидрогеназной системы в листьях кукурузы

Свет играет важную роль в жизнедеятельности растений за счет изменения интенсивности фотосинтеза и фотоморфогенеза.

На рисунке 2 приведены данные, показывающие, что режим освещенности влияет на общую активность НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы. В темноте и при облучении дальним красным и синим светом активность выше, чем на свету и при освещении красным светом. Стоит отметить, что при последовательном облучении образца красным и дальним красным светом влияние первого нивелируется (образец КС+ДКС).

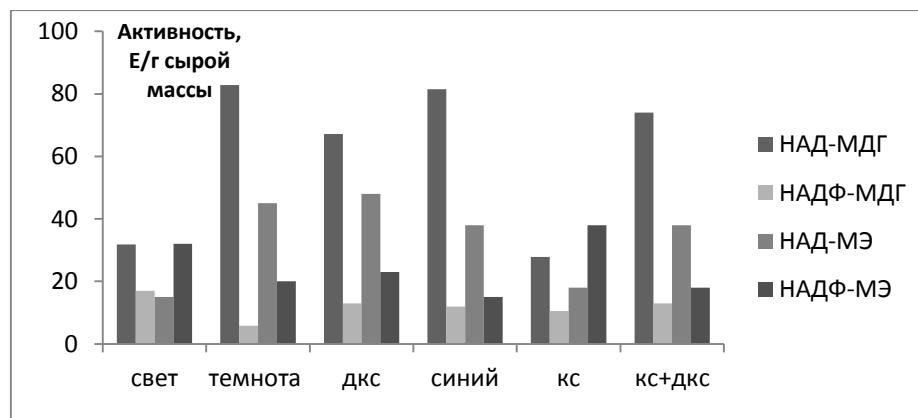


Рис.2.Изменение общей активности различных малатдегидрогеназв разных условиях освещенности. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; синий – растения, освещенные светом с длиной волны 480 нм; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; ДКС - растения, освещенные светом с длиной волны 730 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

Цитоплазматические изоформы МДГ, по видимому, играют анаплеротическую роль, что имеет существенное значение при трансформациях клеточного метаболизма, обуславливающих адаптивную реакцию.

Для генов *cyt-mdh1* и *cyt-mdh2* характерно увеличение транскрипции при облучении синим светом. Однако ген первой цитоплазматической изоформы МДГ(рис.3) увеличивает экспрессию в темноте и при облучении красным светом, а второй ген *cyt-mdh2* (рис.4), напротив, интенсифицирует экспрессию в световых условиях и при облучении красным светом.

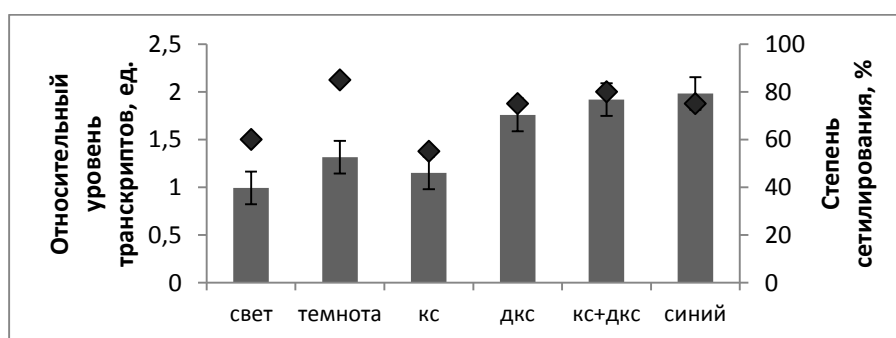


Рис. 3. Уровень относительных транскриптов и статус метилирования *cyt-mdh1* в листьях кукурузы при разных условиях освещения.

Кроме того, для второй цитоплазматической изоформы найдена зависимость между экспрессией гена и его статусом метилирования, в то время как экспрессия *cyt-mdh1*, очевидно, регулируется иными механизмами.

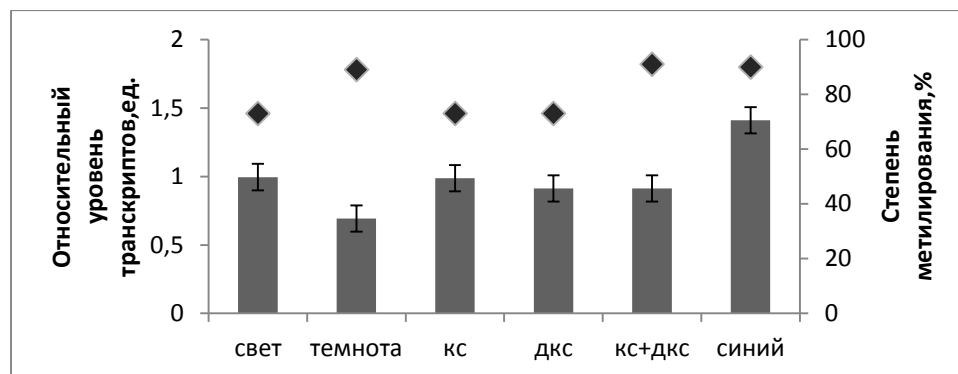


Рис.4. Уровень относительных транскриптов и статус метилирования *cyt-mdh2*.

Для обеих митохондриальных изоформ характерно увеличение транскрипции их генов в темновых условиях (рис. 5), что может быть связано с участием МДГ в интенсифицирующемся цикле Кребса. При этом степень метилирования промоторов генов не меняется.

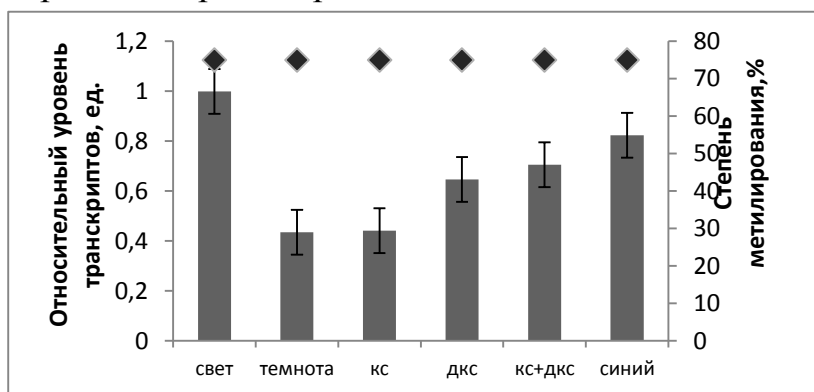


Рис.5. Относительный уровень транскриптов гена *m-mdh2* и степень метилирования его промотора в листьях кукурузы в условиях различного освещения.

Световой режим оказывает четкое действие на активность пероксисомальной малатдегидрогеназы в мезофилле листьев кукурузы. Световой режим снижает активность данной формы фермента по сравнению с темновыми условиями. Интересно отметить, что красный свет ($\lambda = 660$ нм) оказывает избирательное ингибирующее действие на пероксисомальную форму этой энзимной системы.

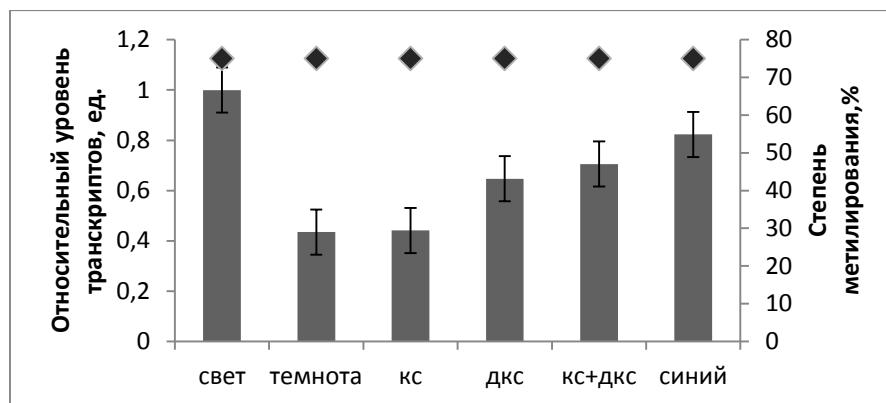


Рис.6. Относительный уровень транскриптов гена *nadf-mdh* и степень метилирования его промотора в листьях кукурузы в условиях различного освещения.

НАДФ⁺-зависимая малатдегидрогеназа в листьях кукурузы активизируется при свете и ингибируется в темноте (рис. 2,6). Однако при этом активность фермента при облучении красным светом уменьшается, а при облучении синим светом увеличивается. Степень метилирования промоторов гена исследуемого фермента в различных световых режимах не изменяется.

На рисунке 2 изображена зависимость варьирования активности НАД⁺- и НАДФ⁺-МЭ под действием света разных длин волн. Показано, что НАД⁺-зависимый фермент, в отличие от НАДФ⁺-МЭ ингибируется на свету.

Установлено, что фитохромная система регулирует работу НАД⁺- МЭ путем снижения содержания мРНК гена *nad-me1* при освещении растений кукурузы красным светом (660 нм). Противоположное действие вызывает облучение дальним красным светом, так как наблюдается 3,5-кратное увеличение содержания транскриптов по сравнению с растениями, экспонируемыми на свету. Вероятно, активация данного гена в условиях темноты необходима для интенсивной работы ЦТК, как поставщика энергии при отсутствии фотосинтеза.

Иная форма регуляции наблюдается при исследовании влияния светового режима на уровень транскриптов генов *nad-me2* и *nadf-me* (Рис. 7.). В данном случае наблюдается инактивация работы исследуемых генов в темноте и при облучении растений дальним красным светом (730 нм). Можно заключить, что фитохромная система является регулятором работы генов малик-энзимов при изменении светового режима. При изучении влияния синего света на уровень транскриптов генов малик-энзимов показано, что светозависимость проявляют

гены *nad-me2* и *nadf-me*, уровень мРНК которых в листьях кукурузы увеличивается при их облучении синим светом в 1,47 раза по сравнению с таким показателем у растений в темноте.

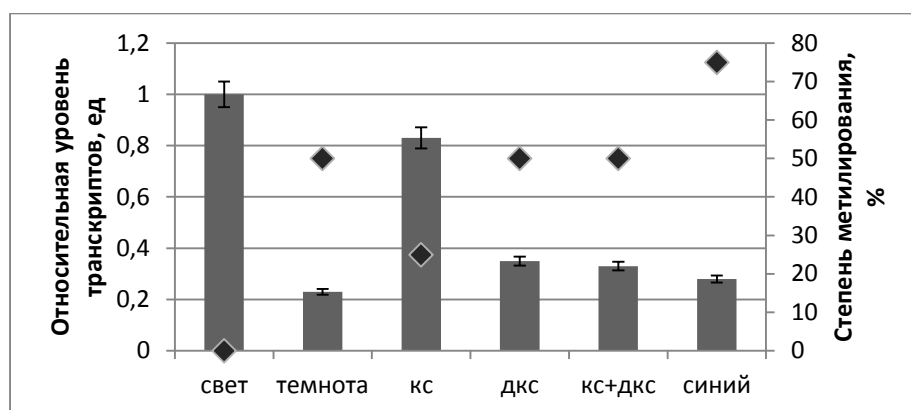


Рис. 7. Уровень относительных транскриптов и статус метилирования *nadf-me*.

Для гена *nadf-me* установлена четкая зависимость между уровнем транскриптов и статусом метилирования отдельных CG-динуклеотидов. Высокий метильный уровень промоторов данных генов приводит к снижению содержания транскриптов генов НАД⁺-зависимых малик-энзимов.

6. Влияние гипоксии на функционирование малатдегидрогеназной системы в листьях кукурузы

Анализируя динамику общей активности НАД⁺-МДГ (рис.8), был сделан вывод, что компенсаторную функцию в условиях гипоксии в первые часы берет на себя пероксисомальная МДГ, а в последующее время - митохондриальные изоферменты. При этом, при вытеснении кислорода углекислым газом цитоплазматические формы ингибируются на протяжении суток с момента начала эксперимента, а при инкубации в азоте их активность поддерживается на постоянном уровне.

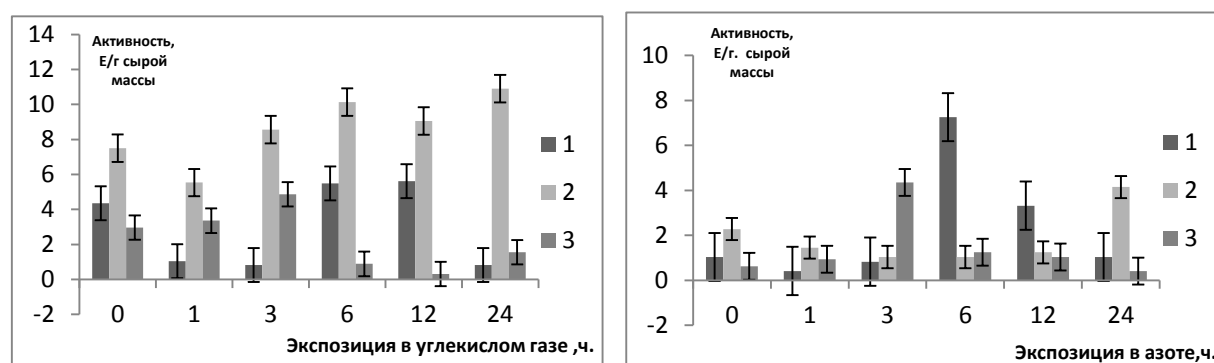


Рис.8. Активность НАД⁺-МДГ в листьях кукурузы в условиях гипоксии (инкубация в углекислом газе и азоте) в 1) митохондриях, 2) цитоплазме, 3) пероксисомах.

Цитоплазматические изоферменты в условиях гипоксии в углекислом газе,

по-видимому, снижают активность за счет уменьшения экспрессии соответствующих генов. Стоит отметить, что ингибирование экспрессии цитоплазматических генов происходит в течение первого часа гипоксии. При экспозиции в углекислом газе низкая экспрессия обоих цитоплазматических генов сохраняется в течении 24 часов, после чего увеличивается. Восстановление экспрессии генов при экспозиции в азоте происходит раньше – на 6 час для *cyt-mdh1* и 12 для *cyt-mdh2*.

Стабильный уровень активности цитоплазматических изоформ при гипоксии, вызванной азотом, поддерживается либо путем последовательного увеличения экспрессии всех четырех генов, либо за счет изменения конформационных свойств ферментов

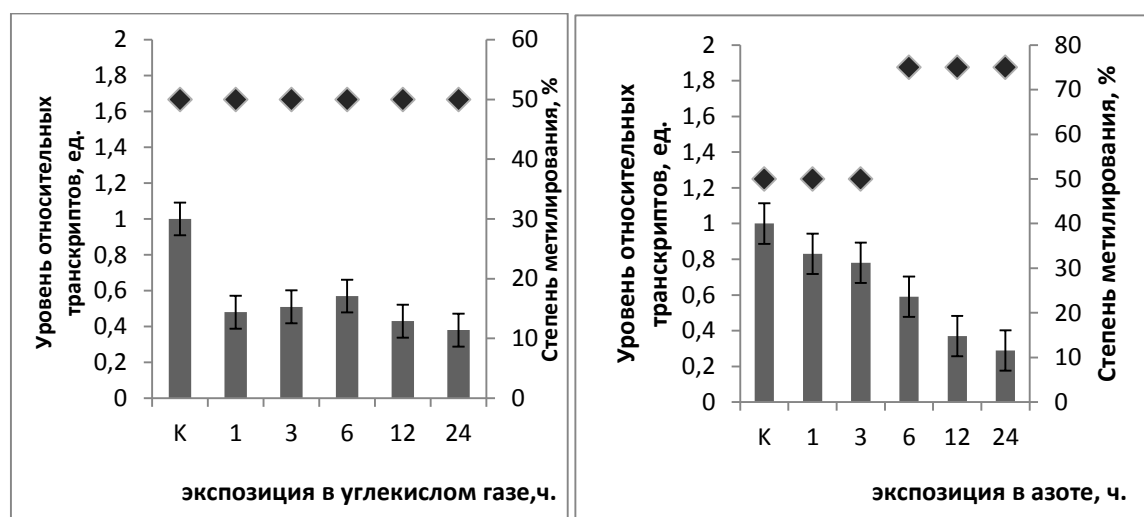


Рис. 9. Экспрессия *mtz-mdh1* в листьях кукурузы в условиях гипоксии и степень метилирования CpG-островков.

В условиях гипоксии нарушается работа цикла Кребса, что можно объяснить низкой экспрессией обоих митохондриальных генов, кодирующих изоформы малатдегидрогеназы. При этом высокая митохондриальная активность МДГ, вероятно, связана с изменением конформационных состояний ферментов (рис. 9).

Пероксисомальная форма в условиях гипоксии играет важную компенсаторную роль в клетке.

Активность НАДФ⁺-МДГ в условиях гипоксии подавляется (рис. 10). При этом, в случае экспозиции в азоте экспрессия *nadf-mdh* снижается примерно в 2 раза и стабилизируется, в то время как изменение экспрессии в условиях углекислого газа носит линейный характер (рис. 14).

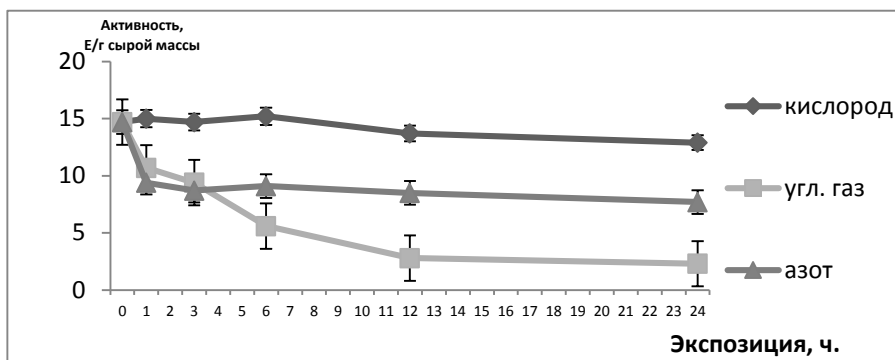


Рис.10. Общая активность НАДФ⁺-МДГ в листьях кукурузы в условиях гипоксии.

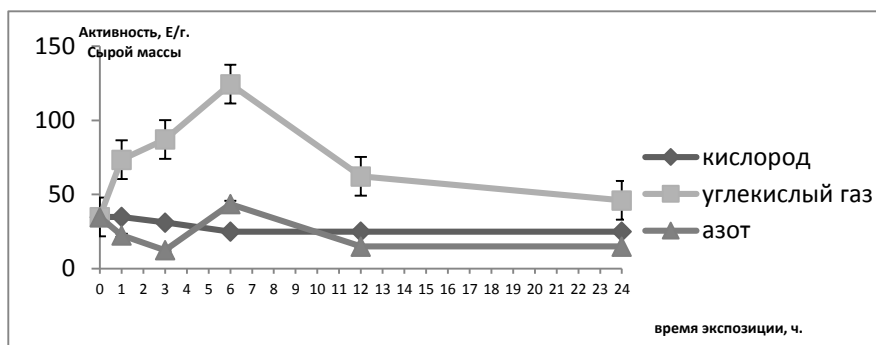


Рис.11. Общая активность НАД⁺-МЭ в листьях кукурузы в условиях гипоксии

Для общей активности НАД⁺-МЭ характерно возрастание на 3-6 час экспозиции растений, затем наблюдается падение до исходного уровня или снижение (рис 11).

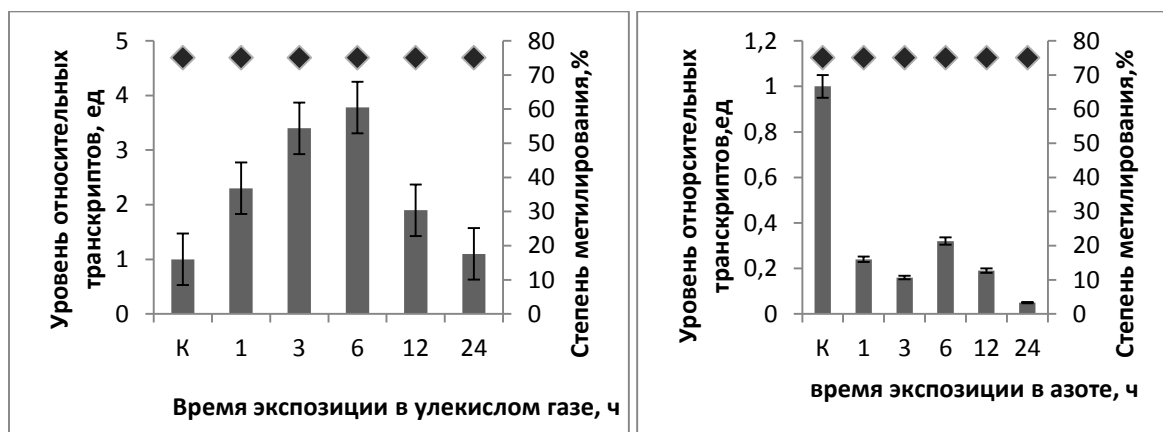


Рис. 12. Экспрессия *nad-mel* в листьях кукурузы в условиях гипоксии и степень метилирования CpG-островков.

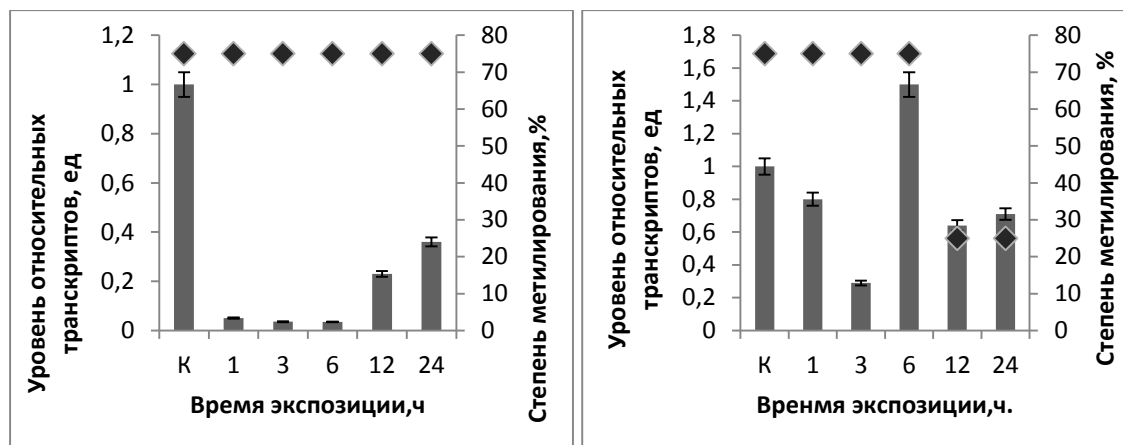


Рис. 13. Экспрессия *nad-me2* в листьях кукурузы в условиях гипоксии и степень метилирования CpG-островков

Интересно, что разные изоформы исследуемой ферментной системы оказывают неодинаковое компенсирующее действие для стрессоров различной природы. Так, при действии углекислого газа резко возрастает экспрессия *nad-me1* при ингибировании гена второй изоформы (рис.12,13). Однако в случае гипоксии в азоте экспрессия первой изоформы падает в 3 раза, а экспрессия *nad-me2* – увеличивается.

Активность и экспрессия НАДФ⁺-зависимого малик-энзима при гипоксическом стрессе также резко возрастают (рис.14,15).

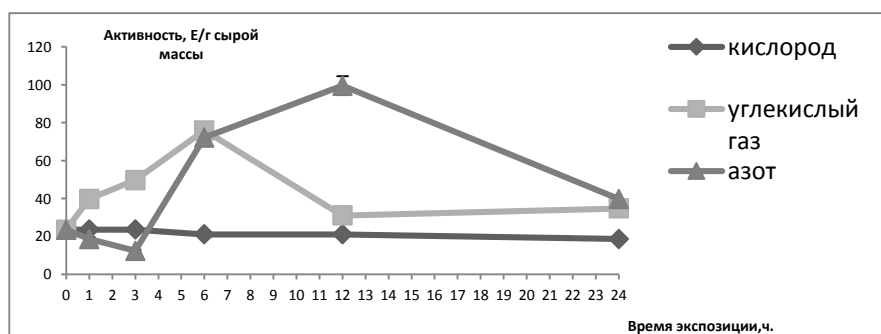


Рис. 14. Общая активность НАДФ-МЭ в листьях кукурузы в условиях гипоксии.

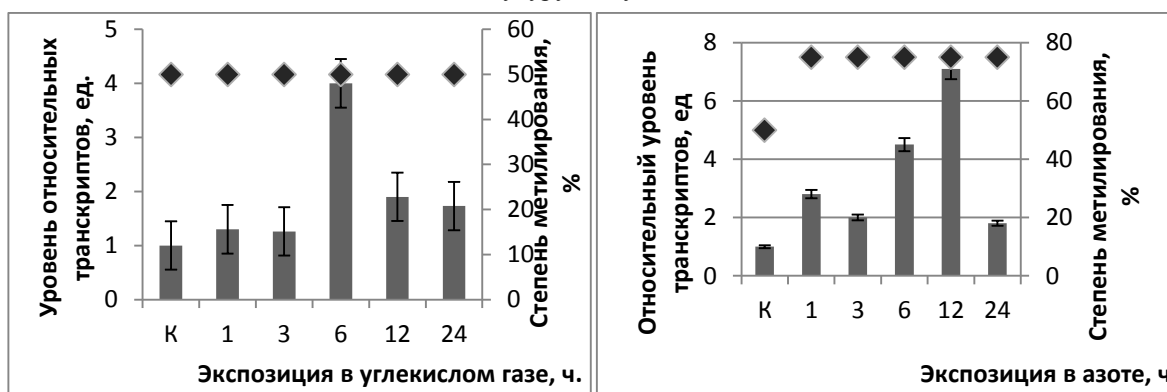


Рис. 15. Экспрессия *nadf-me* в листьях кукурузы в условиях гипоксии и степень метилирования CpG-островков

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение гомогенных препаратов позволило исследовать их физико-химические, регуляторные свойства и особенности структурной организации. Разработанная схема очистки с введением стадии изоплотностного центрифугирования позволила существенно повысить эффективность очистки фермента из пероксисомальной фракции. Ранее из-за низкой активности (7% от общей активности фермента) невозможно было получить данную форму МДГ. Все изученные ферменты являются относительно небольшими белками, имеющими гомодимерное или гомотетрамерное строение. Известно о сложной олигомерной структуре энзимов малатдегидрогеназной ферментной системы из других животных, растений и бактерий [4,9,15,17,26].

Использование методов геномики позволило установить 10 генов НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы, из них 4 цитоплазматических, 1 глиоксисомальная и 2 митохондриальных, а также псевдогены и гены с неизвестной локализацией. Кроме того, обнаружены гены для малик-энзимов и НАДФ⁺-МДГ. Это доказывает, что все ранее изученные изоформы энзимов являются изоферментами. Был проанализирован экзон-интронный состав генов и нуклеотидный состав их промоторов.

Впервые выявлено с помощью методов биоинформатики наличие CpG-островков в промоторах генов, кодирующих ферменты малатдегидрогеназного комплекса. Это позволило исследовать возможность регуляции их экспрессии в экстремальных условиях с помощью эпигенетических механизмов.

Была установлена зависимость величины экспрессии *nadf-me* и *cyt-mdh2* от статуса метилирования CG-нуклеотидов в промоторах этих генов при смене светового режима. Было показано, что в листьях кукурузы при освещении светом различных длин волн осуществляется регуляция с помощью эпигенетического механизма функционирования исследуемых ферментов НАДФ⁺-МЭ и цитоплазматической НАД⁺-МДГ.

Функционирование малатдегидрогеназного комплекса при различных световых режимах характеризуется значительными особенностями перестройки клеточного метаболизма. Так, НАДФ⁺-зависимые малатдегидрогеназы в основном необходимы на свету для участия в

интенсификации фотосинтетической ассимиляции углекислого газа [32]. С другой стороны, в темновых условиях более высокая активность характерна для НАД⁺-зависимых МДГ и МЭ, которые необходимы для функционирования цикла трикарбоновых кислот и образования макроэргических эквивалентов [17]. В то же время разнонаправленная динамика активности этих двух групп ферментов обуславливается работой фитохромной и криптохромной систем. На основе полученных данных можно представить гипотетическую схему регуляции функционирования малатдегидрогеназной системы в растениях кукурузы при смене светового режима (рис.45). Нами установлена разная степень действия светового режима на функционирование разных МДГ и малик-энзимов. Так, для НАД⁺-зависимых малатдегидрогеназ характерна более высокая интенсивность функционирования в темноте, что связано с интенсификацией работы цикла Кребса. Однако одна из цитоплазматических НАД⁺-МДГ (*cyt-mdh2*) и вторая изоформа НАД⁺-МЭ (*nad-me2*) показали нехарактерное изменение активности, сходное с динамикой функционирования НАДФ⁺-зависимых форм ферментов, а именно, высокую активность на свету.

При инкубации растений в неблагоприятных условиях, например гипоксии, МДГ-система активно участвует в перестройке клеточного метаболизма. Установлено, что в анаэробных условиях угнетается активность митохондриальных ферментов и при этом повышается функционирование изоформ МДГ, локализованных в других органоидах клетки.

Таким образом, функционирование малатдегидрогеназной системы имеет важное значение для осуществления адаптивных реакций клеточного метаболизма в листьях кукурузы в стрессовых условиях. Регуляция активности изоформ МДГ-системы в растительной клетке контролируется различной скоростью экспрессии их генов и в некоторых случаях с помощью эпигенетических механизмов статуса метилирования CpG-островков в промоторах генов. Выявленное многообразие изоферментов различных малатдегидрогеназ позволяет координировать непрерывную работу метаболических процессов, протекающих в живой клетке как в нормальных, так и в стрессовых условиях.

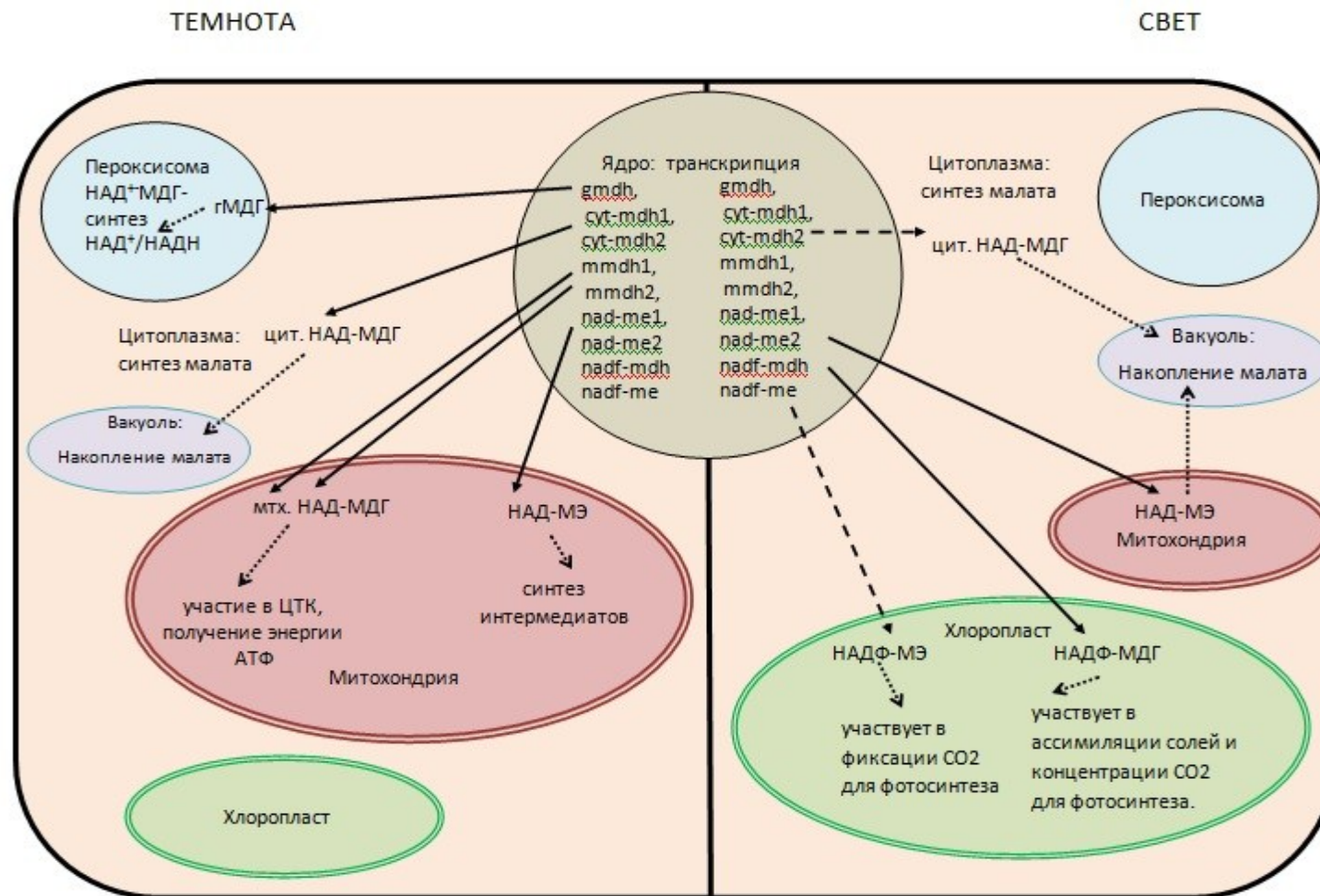


Рис. 17. Гипотетическая схема субклеточной локализации функционирования различных изоферментов МДГ в мезофилле листьев кукурузы и регуляция их активности при смене светового режима. Черными стрелками показано усиление экспрессии генов МДГ, пунктирной линией – влияние метилирования промотора на экспрессию гена; мелким пунктиром показана функция изофермента в компартменте.

ВЫВОДЫ

1. В мезофилле листьев кукурузы было обнаружено 7 изоферментов НАД⁺-зависимой МДГ, локализованных в цитоплазме, митохондриях и пероксисомах, один изофермент НАДФ⁺-МДГ, и три изоформы малик-энзимов, два из которых НАД⁺-зависимые и один - НАДФ⁺-зависимый. Такое многообразие ферментов малатдегидрогеназной системы свидетельствует, что она играет важную роль в регуляции многих метаболических путей.

2. Ферменты малатдегидрогеназного комплекса были очищены и получены в электрофоретически гомогенном состоянии с помощью многостадийной очистки. Удельная активность препаратов варьировалась от 65 до 990 Е/мг белка. При этом степень очистки составляла от 46 до 242 раз, выход - 3-15%.

3. Установлено, что малатдегидрогеназы из кукурузы имеют димерное или тетрамерное строение. Показано высокое сродство МДГ к субстратам обратной реакции (пирувату и оксалоацетату), найден рН-оптимум. Важное значение имело исследование влияния ионов двухвалентных металлов на активность малатдегидрогеназ. Так, ингибирующее действие ионов марганца на активность оксидоредуцирующей МДГ позволило использовать этот эффект для отделения ее от декарбоксилирующих форм.

4. Выявлены 10 генов НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы, из них 4 цитоплазматических, 1 глиоксисомальная и 2 митохондриальных, а также псевдогены и гены с неизвестной локализацией. Кроме того, обнаружены гены для малик-энзимов и НАДФ⁺-МДГ. Это доказывает, что все ранее изученные изоформы энзимов являются изоферментами. Был проанализирован экзон-интронный состав генов и нуклеотидный состав их промоторов.

5. Показана разная степень влияния светового режима на активность малатдегидрогеназ. Так, НАД⁺-зависимые малатдегидрогеназы характеризуются более высокой активностью в темноте, что связано с интенсификацией работы цикла Кребса или процессами, связанными с ним. Однако одна из цитоплазматических НАД⁺-МДГ (*cyt-mdh2*) и вторая изоформа

НАД⁺-МЭ (*nad-me2*) показали нехарактерное изменение активности, сходное с динамикой функционирования НАДФ⁺-зависимых форм энзимов, а именно, высокую активность на свету.

6. В условиях гипоксии малатдегидрогеназная система играет важную роль в адапционном ответе, что было показано на примерах пероксисомальной МДГ и НАДФ⁺-МЭ. Так, в условиях гипоксии функционирование ЦТК ингибируется, что обусловлено снижением экспрессии генов митохондриальных форм оксидоредуцирующей малатдегидрогеназы.

7. Была установлена зависимость величины экспрессии *nadf-me* и *cyt-mdh2* от статуса метилирования CG-нуклеотидов в промоторе этих генов. При освещении различными длинами волн выявлено регулирующее действие эпигенетических механизмов на функционирование исследуемых ферментов НАДФ⁺-МЭ и цитоплазматической НАД⁺-МДГ.

СПИСОК НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Епринцев Александр Трофимович. Получение гомогенных препаратов изоформ НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы из мезофила листьев кукурузы и изучение их физико-химических и каталитических свойств / А.Т. Епринцев, М.С. Лященко, М.О. Гатауллина // Прикладная биохимия и микробиология.— Москва, 2016.— Т. 52, № 4. - С. 365-369.
2. Селиванова Наталья Владимировна. Разработка олигонуклеотидных праймеров к генам НАД-зависимой малатдегидрогеназы кукурузы / Н.В. Селиванова, М.О. Гатауллина, А.Т. Епринцев // Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. — Воронеж, 2016 .— № 2. - С. 86-89.
3. Епринцев Александр Трофимович. Выделение и очистка пероксисомальной малатдегидрогеназы из мезофилла листьев кукурузы и ее характеристика / А. Т. Епринцев, М. О. Гатауллина // Прикладная биохимия и микробиология .— Москва, 2018.— Т. 54, № 3. - С. 299-303.
4. Гатауллина Марина Олеговна. Действие двухвалентных катионов металлов на функционирование пероксисомальной малатдегидрогеназы из листьев кукурузы / М.О. Гатауллина, А.Т. Епринцев // Сорбционные и хроматографические процессы.— Воронеж, 2018.— (Посвящается 100-летию Воронежского государственного университета) .— Т. 18, № 1.
5. Eprintsev Alexander Trofimovich. Two forms of NAD-malic enzyme in maize

leaves are regulated by light in opposite ways via promoter methylation / A. T. Eprintsev, D. N. Fedorin, M. O. Gataullina, A. U. Igamberdiev // *Journal of Plant Physiology*. – 2020. – С. 153193.

6. Гатауллина Марина Олеговна. Действие двухвалентных катионов металлов на функционирование НАДФ⁺-зависимой малатдегидрогеназы из листьев кукурузы / М. О. Гатауллина, А. Т. Епринцев // *Сорбционные и хроматографические процессы*. — Воронеж, 2020. — Т. 20, № 3. - С. 362-368.

7. Епринцев Александр Трофимович. Кинетические и регуляторные свойства НАДФ⁺-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы из листьев кукурузы / А.Т.Епринцев, М.О. Гатауллина // *Прикладная биохимия и микробиология* (в печати)

8. Особенности строения малатдегидрогеназной системы в мезофилле листьев кукурузы при солевом стрессе / О. С. Федорина, А.Т. Епринцев, М. О. Гатауллина, М. С. Лященко // *Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий: материалы 8 съезда физиологов России Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых*. — Петрозаводск. - 2015.- с. 552.

9. Очистка и каталитические свойства NAD-малатдегидрогеназы из мезофилла *Zea Mays* / М.О. Гатауллина, М.С. Лященко, О.С. Федорина, А.Т. Епринцев // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов*.— Воронеж, 2015.— Вып. 17. - С. 48-53.

10. Гатауллина Марина Олеговна. Хранение водных растворов препаратов изоформ малатдегидрогеназы, выделенных из мезофилла листьев кукурузы в присутствии различных криопротекторов / М.О. Гатауллина // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегиональный сборник научных работ*.— Воронеж, 2016.— Вып. 18. - С. 35-40.

11. Влияние солевого стресса на активность сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в проростках *Zea Mays* L. / М.О. Гатауллина, Л.А. Карабутова, Г.Б. Анохина, Н. В. Селиванова, А.В. Степанова // *Биология - наука 21 века : сборник тезисов 21 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (Пущино, 17 - 21 апреля 2017 г.)*.— Пущино, 2017.— С. 129.

12. Гатауллина Марина Олеговна. Динамика активности и изоферментный состав в NAD-малатдегидрогеназы листьев кукурузы в условиях гипоксии / М.О. Гатауллина, О.В. Быковская, А.Т. Епринцев // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегиональный сборник научных работ*.— Воронеж, 2017.— Вып. 19. - С. 41-46 .

13. Гатауллина Марина Олеговна. Влияние света на активность НАД⁺ и НАДФ⁺-зависимых малик энзимов из мезофилла листьев кукурузы / М. О. Гатауллина, А. Е. Грибанова, О. В. Быковская, А. Т. Епринцев // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов : межрегиональный сборник научных работ*. — Воронеж, 2018. — Вып. 20. - С. 44-47.

14. Влияние экстремальных температур на функционирование НАД⁺ зависимой МДГ и СДГ в зеленых листьях кукурузы / М. О. Гатауллина, Г. Б. Анохина, Л. А. Карабутова, Н. В. Селиванова // *Биология - наука 21 века : сборник тезисов 22-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (23-27 апреля 2018 г., Пущино)*.— Пущино, 2018.— С. 254.

15. Характеристика изоферментного состава NAD-зависимой малатдегидрогеназы в стрессовых условиях / М. О. Гатауллина, Н. В. Селиванова, А. Т. Епринцев // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты [Электронный ресурс] : годичное собрание Общества физиологов растений России, научная конференция и школа молодых ученых, 18-24 сентября 2017 г., Крым, Судак : сборник материалов докладов .— Москва, 2017 .— С. 138.
16. Особенности функционирования ферментов малатдегидрогеназной системы в мезофилле листьев кукурузы в стрессовых условиях / М. О. Гатауллина, Н. В. Селиванова, А. Т. Епринцев // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды : годичное собрание Общества физиологов растений России : сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.) : в 2-х т. — Иркутск, 2018 .— Ч. 1. - С. 211-215.
17. Роль транскрипционных факторов в трансдукции светового сигнала, регулирующего функционирование ферментов цикла Кребса в кукурузе / Д. Н. Федорин, М. О. Гатауллина, М. В. Черкасских, А. Т. Епринцев // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды : годичное собрание Общества физиологов растений России : сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.) : в 2-х т. — Иркутск, 2018.— Ч. 1. - С. 773-776.
18. Роль изоферментов декарбоксилирующей малатдегидрогеназы в адаптивной реакции клеточного метаболизма при гипоксии / М. О. Гатауллина, А. Е. Грибанова // Биология - наука XXI века : 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (15-19 апреля 2019 г., Пущино) : сборник тезисов .— Пущино, 2019 .— С. 167.