

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *GDH-1* И *GDH-2*
ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ПРОРАСТАНИИ
СЕМЯН КУКУРУЗЫ *ZEA MAYS L.*****Г. Б. Анохина, П. С. Оя, А. Т. Епринцев***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»*
Поступила в редакцию 17.04.2020 г.

Аннотация. Растения – удивительные организмы, имеющие уникальные характеристики, которые, прежде всего, связаны с особенностями жизненного цикла. Способность в разные периоды развития в качестве источника энергии использовать различные по природе субстраты делает растения невероятно интересными объектами для изучения. Современная наука довольно глубоко проникла в тайны метаболизма эукариотических организмов: множество работ посвящено энзимологии центральных метаболических путей, таких как, например, гликолиз и цикл трикарбоновых кислот. Однако, по нашему мнению, недостаточно полно исследованы пути, обеспечивающие адаптивные механизмы клетки, в том числе ферментные системы, стоящие на пересечении нескольких метаболических путей, осуществляющие четкую и скоординированную работу нескольких энергозависимых процессов. Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, НАД(Ф)-ГДГ, КФ 1.4.1.3) – фермент, осуществляющий обратимое дезаминирование глутамата в 2-оксоглутарат, играет большую роль как в азотном метаболизме, так и в углеводном обмене, за счёт, прежде всего, поставки 2-оксоглутарата в цикл трикарбоновых кислот. Более того, являясь переходным звеном от ЦТК к ГАМК-шунту, глутаматдегидрогеназа участвует в стресс-индуцируемом механизме адаптации растительной клетки к изменяющимся условиям среды.

В ходе работы нами исследована динамика активности глутаматдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы (*Zea mays L.*). Установлено, что исследуемый фермент достигает максимальной ферментативной активности на второй день прорастания семян. Изменения активности в течении десяти дней имеют флуктуирующий характер. На основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе данных NCBI, были разработаны специфические праймеры. С помощью метода ПЦР - Real time исследована транскрипционная активность генов, кодирующих глутаматдегидрогеназу кукурузы: *gdh-1* и *gdh-2*. Показано, что изменения относительного уровня транскриптов в первые дни прорастания семян минимальны. Скачкообразное увеличение экспрессионной активности генов *gdh-1* и *gdh-2* происходит на 6 и 7 день, соответственно.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, кукуруза, *Zea mays*, щитки, прорастание, ПЦР, гены, экспрессия

Исследования ферментных систем растений, как организмов в разные периоды онтогенеза осуществляющих и гетеротрофный, и автотрофный тип питания необычайно важны как для биохимии и физиологии растений, так и для биологии в целом. Переход от гетеротрофного существования к автотрофии сопровождается кардинальными изменениями в функционировании всех систем.

Глутаматдегидрогеназа (НАД(Ф)-ГДГ, КФ 1.4.1.3) – оксидоредуктаза, участник азотного метаболизма, который повсеместно распростра-

нен в живых организмах. Катализируя обратимое дезаминирование 2-оксоглутарата (2ОГ) в глутамат, фермент осуществляет участие и в углеводном обмене, являясь поставщиком 2ОГ для цикла трикарбоновых кислот. ГДГ кукурузы характеризуется тем, что в качестве кофактора может использовать как НАД⁺, так и НАДФ [1]. Филогенетический анализ показал, что растительная ГДГ кодируется небольшим семейством генов, имеющих высокий процент гомологии [2].

У кукурузы глутаматдегидрогеназа в геноме представлена двумя генами, каждый из которых кодирует отдельные типы субъединиц ГДГ: α

и β [3]. При этом, при сборке пептида возможно образование как гомогексамера, так и гетерогексамера [4]. Преобладание того или иного типа субъединиц приводит к смещению равновесия реакции в ту или иную сторону [5; 6]. Стоит отметить, что два гена, участвующие в образовании ГДГ, контролируют экспрессию ферментов с различными метаболическими функциями [7]. Сакакибара Х. (Sakakibara H) с со-авторами изолировали полно-размерную копию кДНК *gdh-1* (LOC542220), кодирующую β- субъединицу глутаматдегидрогеназы кукурузы. Ген *gdh-1* локализован в первой хромосоме. Исследования структуры гена показали, что открытая рамка считывания кодирует 411 аминокислотный остаток. Данный транскрипт был более распространен в корнях, чем в листьях, и локализован в клетках оболочки пучка в тканях листьев [6]. Ген *gdh-2* (LOC100193614) локализован в 10 хромосоме и кодирует α -субъединицу глутаматдегидрогеназы [8].

Глутаматдегидрогеназа растительных организмов в связи с выполняемыми функциями – обеспечение работы ГАМК-шунта, синтез аминокислот, транспортные системы клетки, поставщик субстрата в виде 2-оксоглутарата для ЦТК – является необычайно важным объектом для изучения в период перехода с одного типа питания к другому [8, 9]. Целью работы являлось исследование экспрессии генов *gdh-1* и *gdh-2* глутаматдегидрогеназы при прорастании семян кукурузы *Zea mays* L.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались семена кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при 10 часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/ м². Температура выращивания составляла 25°C.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выделение митохондриальной фракции.

Для выделения митохондриальной фракции навеску листьев кукурузы 5 г растирали в фарфоровой ступке со средой выделения: 0.15 М

Трис-НСl буфер (рН 7.4), 0.4 М сахароза, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорид калия, 4 мМ хлорид магния, 0.05% Тритон Х-100 в соотношении 1:10. Гомогенат фильтровали и центрифугировали 3 мин при 3000 g на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R («Eppendorf», Германия). Супернатант центрифугировали 10 минут при 18000 g. Выделенную фракцию митохондрий разрушали осмотическим шоком в среде, содержащей 0.15 М Трис-НСl буфер (рН 7.4). Степень разрушения митохондрий была более 90%, что контролировали методом микроскопии на Olympus CX41RF («Olympus», Япония). Полученную фракцию митохондрий использовали для определения активности ГДГ. Все манипуляции проводили при температуре +4°C.

Определение активности ГДГ. Активность ГДГ определяли по методу Furuhashi и Takahashi в модификации Tomoyuki по скорости образования НАДН в реакционной смеси, содержащей следующие компоненты: 100 мМ Трис-НСl буфер (рН 8.5); 50 мМ глутамата натрия, 1 мМ CaCl₂, 3 мМ НАД⁺; [10].

Выделение РНК. Выделение тотальной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [11]. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Подбор праймеров осуществлялся на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе GeneBank, с помощью программы Primer-BLAST (табл. 1). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием специфичных праймеров на приборе LightCycler96 (Roche, Швеция), используя SybrGreen I в качестве красителя. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации ef-1α с ген-специфичными праймерами [12]. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали с применением 2^{-ΔΔCt}-метода [13].

Опыты проводили в 3-4- кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Пред-

Таблица 1.

Праймеры к генам глутаматдегидрогеназы для проведения ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
<i>gdh-1</i>	прямой	GCGGAGAACAAGGGGATCAA	58
	обратный	ACAGGATCTCGTCTGCCTCT	
<i>gdh-2</i>	прямой	TGATCCAGAGGCAGACGAGA	60
	обратный	GTAATGCGCGGTCAATGGTC	

варительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения [14]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При прорастании общая ферментативная активность глутаматдегидрогеназы в щитках изменялась уже начиная с первого дня прорастания: активность исследуемого энзима в первый день увеличилась в 8.5 раз относительно значений отмеченных в первые часы после набухания семян. В дальнейшем, также отмечался ее рост, вплоть до шестого дня прорастания. Начиная с седьмого дня активность ГДГ в щитках начала снижаться. Эти результаты, свидетельствуют о том, что, вероятно, ГДГ относится к ферментам, активирующимся сразу после набухания семян. Следует отметить, что для некоторых систем характерна активация в результате пост-трансляционной модификации без дополнительного процесса транскрипции (например, пероксидаза при прорастании семян кукурузы, пшеницы и риса), в то время как другие энзимы нуждаются в активации работы соответствующих генов с последующим процессом транскрипции [15,16]. В последнем случае можно говорить о том, что белок синтезируется *de novo*, как, например, пероксидаза ячменя и пшеницы [17,18, 19]. В связи с этим, нами были исследованы гены, кодирующие ГДГ кукурузы.

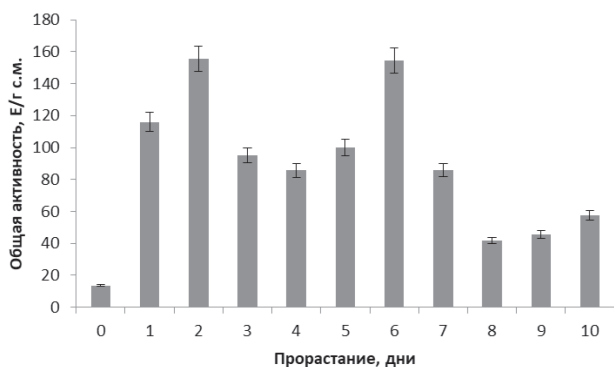


Рис. 1. Общая ферментативная активность глутаматдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы

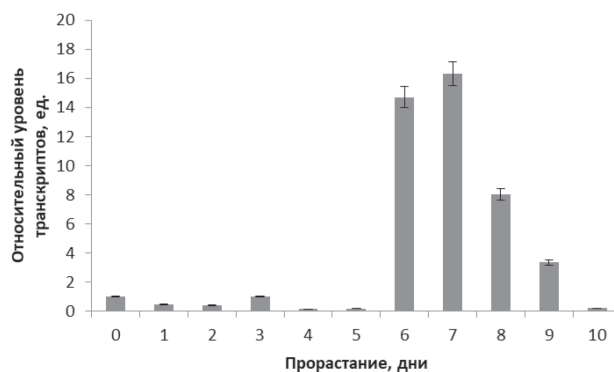


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов гена *gdh-1* глутаматдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы

Транскрипция гена *gdh-1* приводит к синтезу β -субъединиц глутаматдегидрогеназы, что в свою очередь способствует смещению равновесия реакции в сторону аминирования, то есть образования глутамата. Исследование транскрипционной активности гена *gdh-1* показало, что в первые пять дней прорастания семян активность исследуемого гена минимальна. Начиная с шестого дня прорастания отмечается скачок относительного уровня транскриптов гена *gdh-1*, что, вероятно, связано с появлением фотосинтезирующей системы.

Известно, что ген *gdh-2* в геноме кукурузы кодирует α -субъединицу глутаматдегидрогеназы, преобладание которой в структуре фермента приводит к смещению равновесия в работе в сторону реакции дезаминирования глутамата [5]. Исследование относительного уровня транскриптов гена *gdh-2* показало, что в первые пять дней прорастания транскрипционная активность гена минимальна. Однако, начиная с седьмого дня прорастания концентрация мРНК гена *gdh-2* увеличивается более чем в 13 раз относительно значений, зарегистрированных для семян спустя несколько часов после набухания.

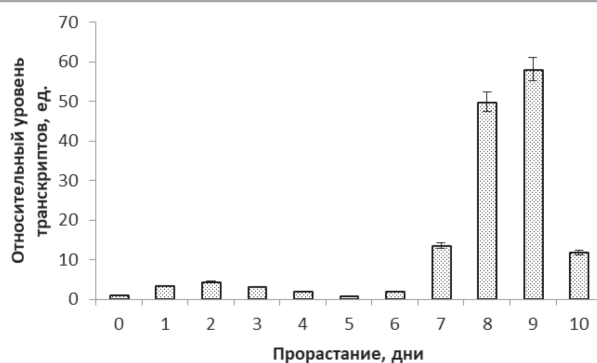


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов гена *gdh-2* глутаматдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы

При набухании и прорастании семян активация метаболических процессов происходит по каскадному механизму. Еще до наступления момента набухания и последующего прорастания семя уже содержит определенный набор ферментов, которые обеспечивают в первое время нормальное развитие растительного организма. Активация этого «минимального набора» происходит в момент набухания семени [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования экспрессии генов *gdh-1* и *gdh-2* глутаматдегидрогеназы при прорастании семян кукурузы *Zea mays* L. установлено, что глутаматдегидрогеназа относится к ферментам, которые активируются в семенах в момент их набухания, еще до активации генома. Активация генов *gdh-1* и *gdh-2*, кодирующих глутаматдегидрогеназу кукурузы происходит на 6 и 7 день, соответственно.

Таким образом, вероятно, высокая активность ГДГ спустя сутки после набухания семян обусловлена наличием в семени неактивных форм ферментов ГДГ, которые постепенно активизируются после набухания семени, что говорит о важной роли ГДГ в развитии растительного организма. На ранних этапах развития, в связи с отсутствием фотосинтетической системы ЦТК играет ключевую роль в обеспечении клетки энергией. Глутаматдегидрогеназа, вероятно в данной ситуации выступает, в том числе, как поставщик 2-оксоглутарата в ЦТК, для дополнительного притока энергии. В последующие дни прорастания семян, с появлением фотосинтезирующей системы, функционирование ГДГ обеспечивается работой геномного аппарата, т.е. синтезом мРНК, что подтверждается результатами исследования относительного уровня транскриптов гена *gdh-1* и *gdh-2*.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith E.L., Austen B.M., Blumenthal K.M., Nyc J.F. // *The Enzymes*. 1975. Vol.11. P. 293-367.
2. Анохина Г.Б., Картавец Л.С., Белоглазова А.А., Селиванова Н.В., Епринцев А.Т. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. Воронеж, 2018. С. 26-30.
3. Lehmann T., Ratajczak L. // *J. Plant. Physiol.* 2008. Vol.165, N.2. P. 149-58.
4. Santero E., Hervás A.B., Canosa I., Govantes F. // *Dehydrogenases*. 2012. P. 289-291.
5. Purnell M.P., Botella J.R. // *Plant physiology*. 2007. Vol. 143. P. 530-539.
6. Grabowska A., Zdunek-Zastocka E., Kutryn E., Kwinta J. // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2017. Vol. 39. P. 1-11.
7. Cammaerts D., Jacobs M. // *Planta*. 1985. Vol.163, P. 517-526.
8. Fontaine J.-X., Terce-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P.J., Dubois F., Hirel B. // *Plant Signalling and Behavior*. 2013. Vol. 8, No 3. P. 233.
9. Dubois F., Terce-Laforgue T., Gonzalez-Moro M., Estavillo J., Sangwan R., Gallais A., Hirel B. // *Plant. Physiol. Biochem*. 2003. Vol. 41. P. 565-576.
10. Yamaya T., Oaks A., Matumoto H. // *Plant Physiology*. 1984. Vol. 76. P. 1009-1013.
11. Chomczynski P., Sacchi N. // *Anal. Biochem*. 1987. Vol. 162. P. 156-159.
12. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. Vol. 25. P. 402-408.
13. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // *J. Exp. Bot*. 2005. Vol. 56. P. 2907-2914.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990, 351 с.
15. Майер А.И. Метаболическая регуляция прорастания. В кн.: Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. М.: Колос, 1982, С. 397-424.
16. Kruger J.E., La Berge D.E. // *Cereal Chem.*, 1974. Vol.51, N 5. P.578-585.
17. Anstine W., Jacobsen J.V., Scandalios J.G., Varner J.E. // *Plant Physiol.*, Lancaster. 1970. V. 45. P. 148-152.
18. Tao K.L., Khan A.A. // *Plant Physiology*. 1975. Vol.56, N 6, P.797-800.
19. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U. // *Journal of Plant Physiology*. 2016. Vol. 205. P. 33-40.
20. Томас Г. Биохимические механизмы регуляции покоя семян. В кн.: Жизнеспособность семян. М.: Колос, 1978, С. 341-373.

Воронежский Государственный Университет
Анохина Г. Б., аспирант кафедры биохимии и
физиологии клетки
E-mail: dowi2009@mail.ru

Voronezh State University
Anohina G. B., post-graduate student of
Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: dowi2009@mail.ru

Оя Полина Сергеевна,
Студент кафедры биохимии и физиологии
клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Oya P. S., Student of Biochemistry and Cell
Physiology Department
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Епринцев А. Т., профессор, доктор биологи-
ческих наук, заведующий кафедрой биохимии и
физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Eprintsev A. T., PhD., DSci., head of the
Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

EXPRESSION OF GDH-1 AND GDH-2 GENES IN GLUTAMATHYDROGENASES DURING GERMINATION OF CORN SEEDS OF ZEA MAYS L.

G. B. Anokhina, P. S. Oya, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. Plants are amazing organisms with unique characteristics that are primarily associated with the characteristics of the life cycle. The ability to use substrates of a different nature as an energy source at different periods of development makes plants incredibly interesting objects for study. Modern science has studied quite deeply into the secrets of the metabolism of eukaryotic organisms: many works are devoted to the enzymology of central metabolic pathways, such as glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. However, in our opinion, the pathways that provide the adaptive mechanisms of the cell, including enzyme systems at the intersection of several metabolic pathways that carry out a clear and coordinated work of several energy-dependent processes, have not been fully studied. Glutamate dehydrogenase (GDH, NAD (F)-GDG, KF 1.4.1.3) is an enzyme that reversibly deaminates glutamate to 2-oxoglutarate. It plays an important role both in nitrogen metabolism and in carbohydrate metabolism, due primarily to the supply of 2-oxoglutarate in the tricarboxylic acid cycle. Moreover, as a transitional link from the CCA to the GABA-shunt, glutamate dehydrogenase is involved in the stress-induced mechanism of adaptation of the plant cell to changing environmental conditions.

During the work, we studied the dynamics of glutamate dehydrogenase activity in the germination shields of maize seeds (*Zea mays* L.). It was found that the studied enzyme reaches maximum enzymatic activity on the second day of seed germination. Changes of activity over ten days are fluctuating nature. Based on the nucleotide sequences presented in the international NCBI database, specific primers have been developed. Using the Real-time PCR method, the transcriptional activity of genes *gdh-1* and *gdh-2* encoding maize glutamate dehydrogenase was studied. It was shown that changes of the relative level of transcripts in the first days of seed germination are minimal. A stepwise increase in the expression activity of the *gdh-1* and *gdh-2* genes occurs on days 6 and 7, respectively.

Keywords: glutamate dehydrogenase, corn, *Zea mays*, germination, PCR, genes, expression

REFERENCES

1. Smith E.L., Austen B.M., Blumenthal K.M., Nyc J.F., *The Enzymes*, 1975, Vol. 11, P. 293-367.
2. Anohina G.B., Kartavceva L.S., Beloglazova A.A., Selivanova N.V., Eprincev A.T., *Organizacija i reguljacija fiziologo-biohimicheskikh processov. Voronezh*, 2018, S. 26-30.
3. Lehmann T., Ratajczak L., *J. Plant. Physiol.*, 2008, Vol. 165, N. 2, P. 149-58.
4. Santero E., Hervás A.B., Canosa I., Govantes F., *Dehydrogenases*, 2012, P. 289-291.
5. Purnell M.P., Botella J.R., *Plant physiology*, 2007, Vol. 143, P. 530-539.
6. Grabowska A., Zdunek-Zastocka E., Kutryn

- E., Kwinta J., *Acta Physiologiae Plantarum*, 2017, Vol. 39, pp. 1-11.
7. Cammaerts D., Jacobs M., *Planta*, 1985, Vol. 163, P. 517-526.
 8. Fontaine J.-X., Terce-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P.J., Dubois F., Hirel B. *Plant Signalling and Behavior*, 2013, Vol. 8, No 3, pp. 233-243.
 9. Dubois F., Terce-Laforgue T., Gonzalez-Moro M., Estavillo J., Sangwan R., Gallais A., Hirel B., *Plant. Physiol. Biochem*, 2003, Vol. 41, pp. 565-576.
 10. Yamaya T., Oaks A., Matumoto H., *Plant Physiology*, 1984, Vol. 76, pp. 1009-1013.
 11. Chomczynski P., Sacchi N. *Anal. Biochem.*, 1987, Vol. 162, pp. 156-159.
 12. Livak K.J., Schmittgen T.D. *Methods*, 2001, Vol. 25, pp. 402-408.
 13. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D., *Journal of Experimental Botany*, 2005, Vol. 56, pp. 2907-2914.
 14. Lakin G.F. *Biometrija*. Moscow, Vyssh. shk., 1990, 351 p.
 15. Majer A.I. *Metabolicheskaja reguljacija prorastanija*. V kn.: *Fiziologija i biohimija pokoja i prorastanija semjan*. Moscow, Kolos, 1982, pp. 397-424.
 16. Kruger J.E., La Berge D.E., *Cereal Chem.*, 1974, Vol.51, No 5, pp. 578-585.
 17. Anstine W., Jacobsen J.V., Scandalios J.G., Varner J.E., *Plant Physiol.*, Lancaster, 1970, Vol.45, pp. 148-152.
 18. Tao K.L., Khan A.A., *Plant Physiology*, 1975, Vol.56, No 6, pp. 797-800.
 19. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U., *Journal of Plant Physiology*, 2016, Vol. 205, pp. 33-40.
 20. Tomas G. *Biohimicheskie mehanizmy reguljacji pokoja semjan*. V kn.: *Zhiznesposobnost' semjan*. Moscow, Kolos, 1978, pp. 341-373.