

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ
 γ -ГИДРОКСИБУТИРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.*)
В ГИПОКСИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ****Е.В. Плотникова, Г.Б. Анохина, А.Т. Епринцев, Д.Ю. Вандышев**

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 30.01.2023 г.

Аннотация. Растения – организмы чрезвычайно подверженные влиянию действия различных стрессовых факторов. Невозможность смены местообитания накладывает свой отпечаток на их способность к адаптации и границам изменчивости. Более 30% почв нашей страны подвержены переувлажнению, индуцирующему дефицит кислорода. Механизм реакции на дефицит кислорода представляет собой очень сложный процесс, в котором у растений участвуют различные компоненты клетки.

В результате воздействия стрессов абиотической природы в растительной клетке нарушается функционирование главного источника энергии – цикла Кребса. В данном случае начинает функционировать обходной путь возобновления получения энергии – ГАМК-шунт. Однако в результате недостаточного количества кислорода нарушается работа одного из ферментов обходного пути янтарной полуальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.16), что способно вызвать гибель клетки. В этом случае в качестве адаптивного механизма клетка активирует компенсаторный, «резервный» путь ГАМК-шунта за счет функционирования фермента γ -гидроксибутиратдегидрогеназы (ГБДГ, КФ 1.1.1.61). Данный фермент играет роль в предотвращении накопления активных форм кислорода, обеспечивая источник восстановительных эквивалентов для поддержания запасов антиоксидантов.

ГБДГ является ранее неисследованным ферментом энергетического метаболизма растений. Роль данного энзима в адаптации растительного организма к абиотическим стрессам еще предстоит изучить.

Актуальность исследования молекулярных механизмов влияния γ -гидроксибутиратдегидрогеназы на устойчивость кукурузы в условиях действия различных стрессовых факторов заключается в обнаружении перспективных методов выращивания данной культуры. Недавние достижения в области геномики, молекулярной биологии, метаболомики и протеомики позволили по-новому взглянуть на геном растений, состоящий в основном из регуляторных элементов, индуцируемых генов, различных сигнальных факторов. Секвенирование всего генома кукурузы послужило основой для функциональной характеристики и идентификации генетических сетей и генов улучшения кукурузы. Современные технологии позволяют понять паттерны транскрипции в области роста и развития растений.

Ключевые слова: γ -гидроксибутиратдегидрогеназа, кукуруза, γ -гидроксибутират, ЦТК, гипоксия, ферментативная активность.

Сельскохозяйственные культуры часто сталкиваются с гипоксическими условиями. Они возникают при переувлажнении или образовании ледяной корки на поверхности почвы. Адаптация растений к дефициту кислорода осуществляется на различных уровнях: морфологическом, клеточном, биохимическом и генетическом. При ги-

поксии наблюдается качественная перестройка дыхания, которая заключается в трансформации обмена веществ и дыхательных путей. Данные компенсаторные изменения еще недостаточно изучены для растительных организмов, в частности остаются неизвестны механизмы адаптации в фотосинтезирующих органах [1].

Важнейшим звеном дыхательного метаболизма растений является цикл трикарбоновых

кислот (ЦТК), который в условиях дефицита кислорода не способен функционировать. В ответ на абиотический стресс в клетке начинает функционировать обходной путь цикла Кребса - шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-шунт) [2].

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, КФ 1.4.1.3) – основное связующее звено между ЦТК и ГАМК-шунтом [3]. Увеличение уровня глутамата приводит к образованию ГАМК, который служит первичным субстратом для ГАМК-шунта. Янтарная полуальдегиддегидрогеназа (сукцинатсемальдегиддегидрогеназа, ССАДГ) является ключевым ферментом ГАМК-шунта. Однако в условиях долгого дефицита кислорода ССАДГ перестает функционировать, что приводит к возникновению ряда метаболических реакций [4].

В условиях стресса альдегиды могут накапливаться в растениях и вступать в реакцию с ДНК, окислять липиды мембран, модифицировать белки или влиять на транскрипцию генов, связанных со стрессом, вызывая тем самым клеточные аномалии [5].

Янтарный полуальдегид (ССА) представляет собой промежуточный продукт метаболизма ГАМК, который накапливается в ответ на различные биотические и абиотические стрессы [6]. ССА обычно окисляется до сукцината [7], но также имеются данные о восстановлении ССА до γ -гидроксипутирата (ГОМК) при дефиците кислорода [8].

Для детоксикации янтарного полуальдегида и обеспечения функционирования растительной клетки существует альтернативный путь, включающий фермент γ -гидроксипутиратдегидрогеназу – энзим класса оксидоредуктаз (ГБДГ, КФ 1.1.1.61), катализирующий реакцию превращения γ -гидроксипутирата до сукцинилового полуальдегида, при этом НАД⁺ восстанавливается до НАДН [9].

Недавнее исследование с использованием нокаутующих мутантов ССАДГ в дрожжах [10] и растениях [11] установили, что ГАМК-шунт играет роль в предотвращении накопления активных форм кислорода, вероятно, обеспечивая источник восстановительных эквивалентов для поддержания запасов антиоксидантов или путем удаления ССА. Более ранние исследования на млекопитающих показали, что ГОМК также участвует в детоксикации активных форм кислорода, вероятно, обеспечивая НАДФН [12]. Интересно, что дефицит кислорода увеличивает выработку НАДФН [13] и активных форм кислорода, таких как супероксид и перекись водорода в растениях; однако окисление НАДФН, а также НАДН через дыхательную цепь митохондрий ограничено [14].

Сравнительный анализ показывает, что регуляция активности ГБДГ и ССАДГ в растениях взаимно дополняется окислительно-восстановительным балансом, при этом ГОМК выступает в качестве сигнальной молекулы длительного окислительного стресса.

В связи с этим, целью работы было исследование изменения ферментативной активности γ -гидроксипутиратдегидрогеназы в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) в гипоксических условиях.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследований использовались 10 - 12-дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская-76, выращивание которых осуществлялось гидропонно при десятичасовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м² (климатическая камера «LabTech», Корея) при 25°C.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Постановка эксперимента по действию гипоксии на растительный организм. Растения предварительно помещали в вакуум-эксикаторы на 24 часа без доступа света, после чего в эксикатор с опытной группой растений в течение суток подавался N₂ из баллона 10150У (ГОСТ 94973, Россия, УЗГПО) со средней скоростью 18 см³/сек. Контрольная группа находилась в среде, куда непрерывно осуществлялся приток кислорода воздуха. Согласно сертификату соответствия содержание кислорода в баллоне с азотом составляло ≤ 0.5 %. Температура окружающей среды во время эксперимента поддерживалась на уровне 25 °С. Первые образцы для исследования изымались до начала эксперимента.

Определение активности γ -гидроксипутиратдегидрогеназы. Активность γ -гидроксипутиратдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы определяли при 25°C на спектрофотометре Evolution 260 Bio (Thermo Fisher Scientific, США) по скорости образования НАДН при 340 нм при длине волны 340 нм в реакционной среде, содержащей: 16 мМ гидроксипутирата натрия, 1 мМ НАД⁺, 100 мМ Tris-HCl буфер (pH 9.0). Запуск реакции осуществляли путём добавления ферментного препарата. В качестве контроля использовали среду спектрофотометрирования без добавления фермента [15].

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, которое превращает 1 мкмоль субстрата за 1 минуту при 25 °С при оптимальном значении pH.

Определение содержания малонового диальдегида. Концентрацию МДА определяли спектрофотометрически по реакции взаимодействия с 2-тиобарбитуровой кислотой, приводящей к образованию хромогена с максимумом поглощения в красной области видимого спектра при длине волны 532 нм [16].

Опыты проводили в 3-4-кратных биологических повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0. Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. Результаты на графиках выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) [17, 18].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в условиях действия различных стрессовых факторов происходит накопление малонового диальдегида. В ходе метаболизма МДА может окисляться до CO_2 , а также вступать в реакции с нуклеиновыми кислотами, аминокислотами и фосфолипидами. МДА является одним из маркеров оксидативного стресса. Поглотители антиоксидантов могут повысить прочность мембран и могут защитить виды растений от атаки АФК, уровень которых возрастает в условиях стресса [19]. Активность поглощения АФК можно оценить по выработке МДА, который является продуктом распада липидов в стрессовых ситуациях [19]. Содержание МДА отражает выработку АФК в тканях растений во время стресса и отвечает за нестабильность клеточной мембраны. Из результатов мы наблюдали низкие уровни содержания МДА в привитых грибом растениях пшеницы, что могло повысить термостабильность мембраны при индуцированном засолении [20].

Для подтверждения наличия стрессового воздействия был проанализирован уровень МДА в листьях кукурузы в экспериментальных гипоксических условиях (Рис. 1). Установлено, что уровень МДА в листьях кукурузы начал увеличиваться уже в первые часы инкубации растений в гипоксических условиях, хотя и незначительно. В дальнейшие часы эксперимента отмечался дальнейший рост исследуемого показателя. Максимальные значения уровня

МДА в листьях кукурузы в экспериментальных условиях были зарегистрированы на 24 час гипоксического воздействия и превышали первоначальные показатели в 1.7 раза. Стоит отметить, что увеличение уровня МДА в контрольной группе растений на 24 час инкубации растений, вероятно, связано с развитием стрессового ответа в виду длительного нахождения проростков в темноте (48 часов).

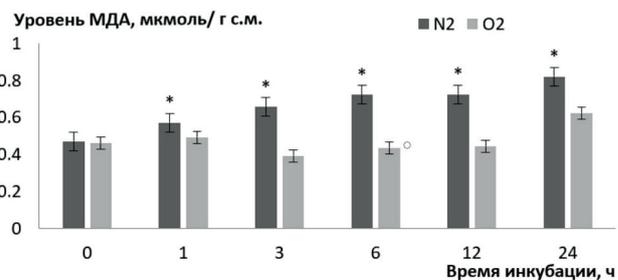


Рис. 1. Динамика изменения уровня малонового диальдегида в листьях кукурузы в гипоксических условиях. Обозначения: * – отличия от контроля статистически достоверны при $P = 0.01$

Таким образом, полученные данные по исследованию динамики изменения уровня МДА в листьях кукурузы демонстрируют развитие стрессового ответа клеточного метаболизма в ответ на гипоксическое воздействие. Максимальное стрессовое воздействие отмечалось на 24 час эксперимента.

Анализ динамики ферментативной активности ГБДГ в листьях кукурузы в гипоксических условиях позволил выявить существенные изменения в функционировании данного энзима (Рис.2). Было показано, что в первые часы инкубации проростков кукурузы активность исследуемого фермента снижалась, однако к третьему часу достигала своего максимума, превышая первоначальные значения в 2.7 раза. В последующие часы эксперимента отмечалось постепенное значение показателей общей ферментативной активности исследуемого энзима, что указывает на снижение скорости функционирования данного фермента.

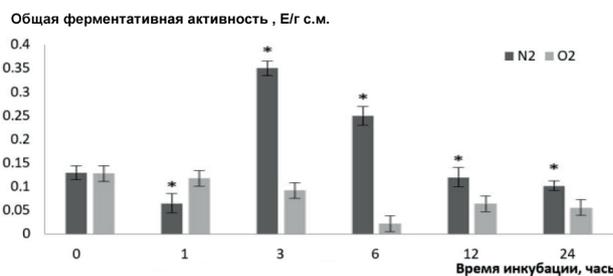


Рис. 2. Динамика изменения общей ферментативной активности ГБДГ в листьях кукурузы в гипоксических условиях. * – разница по сравнению с контролем достоверна при $P = 0.01$

Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе данными о накоплении уровня ГОМК в растениях *A. Thaliana* при гипоксии, вызванной затоплением [9]. Вероятно, значительная часть сукцинилового альдегида, полученного из ГАМК в условиях дефицита кислорода, была преобразована в ГОМК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования динамики каталитической активности γ -гидроксibuтиратдегидрогеназы в условиях гипоксии было установлено, что в листьях кукурузы наблюдается увеличение ГБДГ-активности, начиная с 3 часа гипоксического воздействия. Развитие стрессового ответа клеточного метаболизма сопровождается увеличением уровня малонового диальдегида. Полученные данные демонстрируют компенсаторную активацию ответвления пути ГАМК посредством увеличения скорости функционирования ГБДГ, что способствует образованию ГОМК из сукцинилового полуальдегида.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 г., проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Войцековская С. А., Астафурова Т. П., Агеев Б. Г., Сапожникова, В. А. // Вестник Томского государственного педагогического университета. 2003. №. 4. P. 112-114.
2. Renault H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., Deleu, C. // BMC plant biology. 2010. V. 10. №. 1. P. 1-16.
3. Lea P. J., Mifflin B. J. // Annu. Plant Rev. 2011. V. 42. P. 1-40.
4. Fait A., Yellin A., Fromm H. // FEBS letters. 2005. V. 579. №. 2. P. 415-420.
5. Weber H., Chételat, A., Reymond, P., Farmer, E. E. // The Plant Journal. 2004. V. 37. №. 6. P. 877-888.
6. Bown A. W., Shelp B. J. // Plant Physiology. – 1997. – V. 115. – №. 1. – P. 1.
7. Tuin L. G., Shelp B. J. // Journal of plant physiology. 1994. V. 143. №. 1. P. 1-7.
8. L Allan W., Peiris C., Bown A. W., Shelp B. J. // Canadian Journal of Plant Science. 2003. V. 83. №. 4. P. 951-953.
9. Breitzkreuz K. E., Allan W. L., Van Cauwenberghe, O. R., Jakobs C., Talibi D., André B., Shelp B. J. // Journal of Biological Chemistry. 2003. V. 278. №. 42. P. 41552-41556.
10. Coleman S. T., Fang T. K., Rovinsky S. A., Turano F. J., Moye-Rowley W. S. // Journal of Biological Chemistry. 2001. V. 276. №. 1. P. 244-250.
11. Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S. G., Fromm H. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. V. 100. №. 11. P. 6843-6848
12. Mamelak M. // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 1989. V. 13. №. 4. P. 187-198.
13. Harding S. A., Oh S. H., Roberts D. M. // The EMBO Journal. 1997. V. 16. №. 6. P. 1137-1144.
14. Møller I. M. // Annual review of plant biology. 2001. V. 52. №. 1. P. 561-591.
15. Taxon E. S., Halbers L. P., Parsons S. M. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. 2020. V. 1868. №. 5. P. 140376.
16. Рогожин В. В., Курилюк Т. Т., Кершенгольц Б. М. Способ определения концентрации малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. 1998, 5 с.
17. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990, 351с.
18. Zar J. H. Biostatistical analysis. Pearson Education India, 1999.
19. Hamayun M., Hussain A., Iqbal A., Khan S. A., Khan M. A., Lee I. J. // Polish Journal of Environmental Studies. 2021. V. 30. №. 2. P. 1631-1640.
20. Khan M. I., Ali N., Jan G., Hamayun M., Jan F. G., Iqbal A., Lee I. J. // Frontiers in Plant Science. 2022. V. 13, p. 167

*Воронежский государственный университет
Плотникова Е. В., студент кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: kate_plotnikova36@mail.ru*

*Анохина Г. Б., ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: dowi2009@mail.ru*

*Voronezh state university
Plotnikova E. V., Student of Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: kate_plotnikova36@mail.ru*

*Anokhina G. B., assistant of Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: dowi2009@mail.ru*

Епринцев А. Т., доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки

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

Вандышев Дмитрий Юрьевич, к.х.н., доцент кафедры органической химии
E-mail: francy_2007@mail.ru

Vandyshv D. Y., PhD, associate professor, Dept. of organic chemistry
E-mail: francy_2007@mail.ru

REGULATION OF THE ACTIVITY OF γ -HYDROXYBUTYRATE DEHYDROGENASE IN GREEN MAIZE LEAVES (*ZEA MAYS* L.) IN HYPOXIC CONDITIONS

E.V. Plotnikova, G.B. Anokhina, A.T. Eprintsev, D.Y. Vandyshev

Voronezh State University

Abstract. Plants are extremely sensitive to various stress factors organisms. The inability to change their habitat affects their ability to adapt and their limits of variability. More than 30% of soils in our country are exposed to overwatering inducing oxygen deficiency. The reaction mechanism to oxygen deficiency is a complicated process where various plant cell components are involved.

Subsequently, because of abiotic stresses in the plant cell, the main source of energy, the Krebs cycle, is disrupted. In this case, the GABA shunt begins to function as a bypass for renewed energy production. However, as a result of oxygen shortage, one of the bypass enzymes, succinate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.16), is disrupted, which can cause cell death. In this context, the cell activates a compensatory, 'reserve' the GABA shunt pathway, as an adaptive mechanism, through the functioning of the enzyme γ -hydroxybutyrate dehydrogenase (GBDH, EC 1.1.1.61). This enzyme plays a part in preventing the accumulation of reactive oxygen species by providing a source of reducing equivalents to maintain antioxidant reserves.

GBDH is a previously unresearched enzyme of plant energy metabolism. The role of this enzyme in plant adaptation to abiotic stresses remains to be researched.

The relevance of the research of the molecular mechanisms of the influence of γ -hydroxybutyrate dehydrogenase on the stability of maize under the action of various stress factors lies in the discovery of promising methods of growing this crop. Recent advances in genomics, molecular biology, metabolomics and proteomics have allowed a new look at the plant genome, consisting mainly of regulatory elements, induced genes, and various signaling factors. The sequencing of the entire maize genome served as the basis for the functional characterization and identification of genetic networks and maize improvement genes. Modern technologies allow us to understand transcription patterns in the field of plant growth and development.

Keywords: γ -hydroxybutyrate dehydrogenase, *Zea mays* L., γ -hydroxybutyrate, TCA, hypoxia, enzyme activity.

REFERENCES

1. Vojcekovskaja S. A., Astafurova T. P., Ageev B. G., Sapozhnikova, V. A., Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta, 2003, № 4, pp. 112-114.
2. Renault H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., Deleu, C., 2010, V. 10, №. 1, pp. 1-16.
3. Lea P. J., Mifflin B. J., Annu. Plant Rev, 2011, V. 42, pp. 1-40.
4. Fait A., Yellin A., Fromm H., FEBS letters, 2005, V. 579, № 2, pp. 415-420.
5. Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E. E., The Plant Journal, 2004, V. 37, № 6, pp. 877-888.
6. Bown A. W., Shelp B. J., Plant Physiology, 1997, V. 115, №. 1, pp. 1.

7. Tuin L. G., Shelp B. J., Journal of plant physiology, 1994, V. 143, № 1, pp. 1-7.
8. L Allan W., Peiris C., Bown A. W., Shelp B. J., Canadian Journal of Plant Science, 2003, V. 83, № 4, pp. 951-953.
9. Breitzkreuz K. E., Allan W. L., Van Cauwenberghe, O. R., Jakobs C., Talibi D., André B., Shelp B. J., Journal of Biological Chemistry, 2003, V. 278, № 42, pp. 41552-41556.
10. Coleman S. T., Fang T. K., Rovinsky S. A., Turano F. J., Moye-Rowley W. S., Journal of Biological Chemistry, 2001, V. 276, № 1, pp. 244-250.
11. Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S. G., Fromm H., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, V. 100, № 11, pp. 6843-6848
12. Mamelak M. Gammahydroxybutyrate: an endogenous regulator of energy metabolism, Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 1989, V. 13, 4, pp. 187-198.
13. Harding S. A., Oh S. H., Roberts D. M., The EMBO Journal, 1997, V. 16, № 6, pp. 1137-1144.
14. Møller I. M., Annual review of plant biology, 2001, V. 52, № 1, pp. 561-591.
15. Taxon E. S., Halbers L. P., Parsons S. M., Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2020, V. 1868, № 5, pp. 140376.
16. Rogozhin V. V., Kuriljuk T. T., Kershengol'c B. M. Sposob opredelenija koncentracii malonovogo dial'degida s pomoshh'ju tiobarbiturovoj kisloty, 1998, p. 5.
17. Lakin G.F. Biometrija, M.: Vyssh. shk., 1990, p 351.
18. Zar J. H. Biostatistical analysis, Pearson Education India, 1999.
19. Hamayun M., Hussain A., Iqbal A., Khan S. A., Khan M. A., Lee I. J., Polish Journal of Environmental Studies, 2021, V. 30, № 2, pp. 1631-1640.
20. Khan M. I., Ali N., Jan G., Hamayun M., Jan F. G., Iqbal A., Lee I. J., Frontiers in Plant Science, 2022, V. 13, 167p.