

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО СВЕТОВОГО РЕЖИМА

О.С. Федорина, Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 08.11.2023 г.

Аннотация. Анализ литературных данных по исследованию ключевого фермента азотного обмена глутаматдегидрогеназы показал, что митохондриальная форма глутаматдегидрогеназы является светозависимым ферментом. В условиях темноты наблюдается увеличение скорости его функционирования, что связано с интенсификацией окислительных процессов в митохондриях растений. Изучение действия света разных длин волн показало зависимость активности глутаматдегидрогеназы от этого фактора. Установлено, что снижение активности ГДГ происходит под действием красного света, длина волны которого 660 нм, что связано с образованием активной формы фитохрома в данных условиях. Однако, ингибирование фермента светом неполное, что, вероятно, связано с его функционированием в биосинтетических процессах. Показано, что в клетках листьев пшеницы функционируют две формы глутаматдегидрогеназы с электрофоретической подвижностью 0,27 и 0,38. Облучение растений пшеницы светом различной длины волны не вызывает изменения в количестве молекулярных форм исследуемого фермента. Обнаружено значительное изменение уровня относительной транскрипции генов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы в условиях различного освещения. Показано, что активная форма фитохрома участвует в регуляции экспрессии генов *GDH-1* и *GDH-2*, вызывая уменьшение количества мРНК данного гена в листьях при облучении растений красным светом. Показано, что в условиях облучения растений красным светом в присутствии комплексона ЭГТА не наблюдалось достоверного изменения уровня экспрессии генов *GDH-1* и *GDH-2*, относительно варианта «темнота». Следовательно, полученные данные свидетельствуют об участии свободных катионов кальция в регуляции транскрипционной активности исследуемых генов, осуществляемой фитохромной системой. Фитохром-зависимое перераспределение кальция в ядро клетки способствует активации кальмодулинов, которые играют важную роль в реализации кальциевой сигнализации в клетках листьев пшеницы в ответ активацию фитохрома и обеспечивают регуляцию транскрипционной активности генов глутаматдегидрогеназы.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, активность, субъединица, ГАМК-шунт, регуляция, экспрессия, изоферменты

Изучение свойств ферментов дает возможность наиболее подробно исследовать процессы обмена веществ, текущих в организме и соответствующих определенным физиологическим функциям. Анализ биологических характеристик ферментов лежит в основе понимания основных взаимосвязанных химических процессов, составляющих базис жизнедеятельности организмов. На основании этого факта одна из главных ветвей современной энзимологии базируется на исследовании биологической роли ферментных структур, а также их физиологических функций в организме. В качестве объекта исследования был взят

фермент, носящий название глутаматдегидрогеназа и присутствующий в живых тканях в качестве регуляторного фермента аминокислотного и энергетического обмена [1,2]. В растительных клетках ГДГ участвует в реакциях окислительного дезаминирования аминокислот, происходящих с высвобождением аммиака и локализованных в стареющих клетках или отделенных от растений частях [3]. Свет оказывает на растение огромное влияние, регулируя процессы роста и формирования растительных органов, что осуществляется через активацию определенных генов [4,5]. Светозависимая регуляция экспрессии генов глутаматдегидрогеназы необходима для использования клеткой L-глутамата, субстрата данного фер-

мента. Кроме того, L-глутамат является донором аминокислот для того, чтобы переносить их на различные аминокислоты [6], что необходимо для адаптации клетки к меняющимся условиям среды, так как это соединение участвует в углеродном и азотном обмене [7].

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлись 14 дневные проростки пшеницы (*Triticumaestivum* L., сорт Московская 40). Растения методом гидропоники 25°C, 12-часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов света • м⁻² • с⁻¹. Растения экспонировались в разном световом режиме, для чего применяли светодиоды, испускающие свет с максимумом: 640-680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710-750нм (ЗЛ1127А-5, Россия) и интенсивностью 4 мкмоль квантов света • м⁻² • с⁻¹.

Активность митохондриальной ГДГ определяли спектрофотометрически по реакции аминирования при 340 нм по окислению НАД⁺ [8]. Фракции органоидов получали на центрифуге Eppendorf 5804 (Eppendorf, Германия) и по активности алкогольдегидрогеназы судили о перекрестном загрязнении[9].

Суммарную РНК выделяли фенол-хлороформной экстракцией с использованием в качестве основного компонента лизирующего буфера - гуанидинтиоцианата [10].кДНК получали набором MMLV-ревертазы (“Евроген”, Россия) согласно инструкции производителя.ПЦР-РВ проводили на приборе LightCycler 96 «Roche» с SYBR Green I. Количество матрицы контролировали параллельной амплификацией фактора элонгации *EF-1A*[11]. Относительный уровень экспрессии генов проводили с применением 2^{-ΔΔCt}-метода [12].

Из 3-4 повторностей, для которых проводили 3-х кратные аналитические определения высчитывали средние значения и статистически обрабатывали их с помощью стандартных методик. Использовали для обсуждения статистически достоверные результаты, $p < 0,05$ [13].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение действия света разной длины волны на каталитическую активность ГДГ было осуществлено на митохондриальном изоферменте, обеспечивающем регуляцию потоков углеводов и аминокислот в общем митохондриальном метаболизме. Получение митохондриальной фракции для исследования осуществляли дифференциальным центрифугированием.

При интерпретации результатов проведенного исследования учитывали степень загрязнения полученных фракций, в частности, на основе маркерного фермента цитоплазматической фракции – алкогольдегидрогеназы (табл.1). Показано, что доля цитоплазматической фракции в митохондриальной в наших исследованиях составляла 9,06 %, что учитывалось при дальнейшей интерпретации результатов исследования каталитической активности глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при облучении растений КС и ДКС в разных вариантах.

Таблица 1
Определение перекрестного загрязнения фракций митохондрий по маркерному ферменту цитоплазмы

Фермент	Цитоплазма	Митохондрии
алкогольдегидрогеназа	0,32 ± 0,021	0,029 ± 0,007

Изучение работы глутаматдегидрогеназ в листьях пшеницы при освещении разным спектром, показало, что в растениях освещенных дневным и красным светом функционирование данных ферментов ингибируется (рис. 1). Активность на свету составила 40 Е/г сырой массы. При облучении кукурузы дальним красным светом показатели работы ГДГ были сходны с растениями, экспонированными в темноте. Величина общей активности составила 55 Е/г сырой массы. Идентичные данные были получены для растений варианта «КС+ДКС» где количественный показатель активности был равен 53 /г сырой массы. При этом активность растений «ДКС» и «КС+ДКС» превышала таковую у растений на свету в 1,38 и 1,33 раза соответственно (рис. 1).

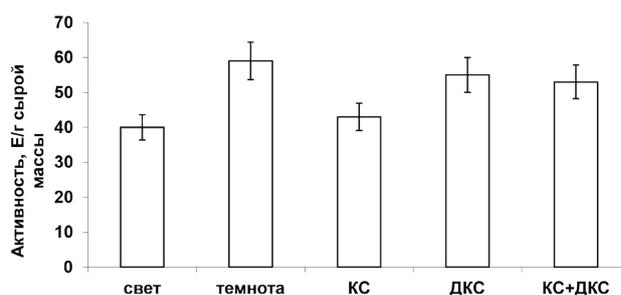


Рис. 1. Активность глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при различном световом режиме. Свет – растения, освещенные белым светом; темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

Анализ действия света на глутаматдегидрогеназу в листьях пшеницы показал наличие фитохром-зависимого механизма регуляции его

функционирования. Активная форма фитохрома воздействует на активность ГДГ пшеницы, ингибируя ее действие. Подобные механизмы фитохром-зависимой регуляции были ранее показаны для других митохондриальных ферментов [14,15]. Для них показано, что регуляцию осуществляет активная форма фитохрома А, которая осуществляет контроль на уровне экспрессии соответствующих генов. Свое фоторегуляторное действие фитохром может реализовывать различными способами, как непосредственной регуляцией функции белковой молекулы [16], так и через вторичную систему клеточной сигнализации. В случае регуляции на уровне экспрессии генов фитохром трансдуцирует свой сигнал в ядро и контроль уровня транскрипции генов осуществляют специализированные факторы транскрипции [17].

Анализ базы данных GenBank показал, что в геноме пшеницы содержится набор гомеологичных генов, кодирующий глутаматдегидрогеназу. При этом, отмечено высокое сходство генов *GDH-1*, кодирующих глутаматдегидрогеназу в растительных организмах: *Amborellatrichopoda* (75%), *Prunuspersica* (78%), *Jatropha curcas* (83%). Полученные данные свидетельствуют о эволюционно-сходном пути происхождения генов данного фермента у разных растительных организмов. Ген *GDH-1* (хромосома 5А) пшеницы содержит 9 экзонов, кодирует один транскрипт размером 1480 нуклеотидов. На основе нуклеотидной последовательности мРНК гена глутаматдегидрогеназы были подобраны специфические праймеры к гену *GDH-1* глутаматдегидрогеназы пшеницы (табл. 2). Ген *GDH-2* (хромосома 2А) пшеницы содержит 9 экзонов, кодирует один транскрипт размером 1475 нуклеотидов. На основе нуклеотидной последовательности мРНК гена глутаматдегидрогеназы были подобраны специфические праймеры к гену *GDH-2* глутаматдегидрогеназы пшеницы (табл. 2).

Исследование изоферментного состава ГДГ в листьях пшеницы при облучении растений светом с различной длины волны показало, что во всех экспериментальных условиях не наблюдается изменения в наборе изоферментов в клетке (рис. 2). В клетках листьев пшеницы обнаружено наличие двух изоферментов с электрофоретиче-

ской подвижностью 0,27 и 0,38, соответственно. Необходимо выделить, что интенсивность полос специфического проявления изоферментов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы в условиях различного светового режима характеризует изменение скорости функционирования исследуемого фермента в данных экспериментальных условиях. Поскольку при проведении электрофореза использовали одинаковое содержание белка в наносимых пробах, то интенсивность полос при специфическом окрашивании характеризует интенсивность общей активности ГДГ в соответствующих условиях, в частности, в темноте количество образованного диформаза значительно больше, что указывает на большее количество фермента в данном образце. Противоположный характер интенсивности работы исследуемого фермента был определен на электрофореграмме в образцах «свет» и «КС». Ранее было установлено, что световой режим, в растениях арабидопсиса, влияет на активность сукцинатдегидрогеназы [18], при этом в условиях освещения белым светом не наблюдается ее полного ингибирования, что характеризует увеличение роли данного фермента в биосинтетических процессах клетки в условиях фотосинтеза.

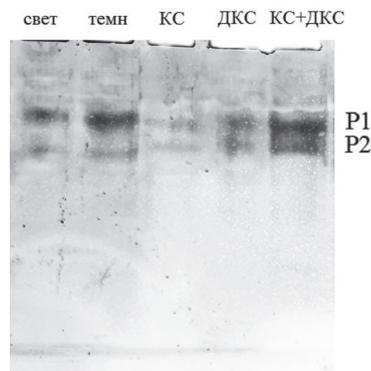


Рис. 2. Специфическое проявление изоферментов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы в условиях различного освещения. Свет – растения, освещенные белым светом; Темн – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм. P1 и P2 – белковые полосы с глутаматдегидрогеназной активностью.

Таблица 2

Праймеры к гену глутаматдегидрогеназы для определения экспрессии методом ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
<i>GDH-1</i>	прямой	GTAATGTTGGCTCCTGGGCT	59
	обратный	CGCAGCCTCGATGATGTA CT	
<i>GDH-2</i>	прямой	TGATCCAGAGGCAGACGAGA	58

Важным механизмом регуляции активности ряда ферментов при осуществлении светового контроля, может быть участие фоторецепторов растительной клетки, специфически рецептирующих определенные кванты света. Особая роль в данном процессе отводится фитохромной системе, обеспечивающей регуляцию различных ферментных систем. Данные фоторецепторы реализуют свой потенциал посредством различных мессенджеров или при непосредственном взаимодействии генами-мишенями. Фитохром А может самостоятельно проникать в ядро, запускать процессы изменения функционального состояния хроматина, находящего отражение в контроле экспрессии ряда генов, в том числе опосредуя свое действие через мессенджеры [16].

Для оценки содержания мРНК гена *GDH-1* в образцах растений в разных условиях светового режима применяли методколичественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Данный метод позволил выявить соотношение количества транскриптов в клетках листьев пшеницы при их облучении светом разной длины волны. Количественное содержание транскриптов исследуемого гена при выращивании растений на свету соотносится с таковым показателем в растениях варианта «КС». В этих экспериментальных условиях транскрипционная активность *GDH-1* выше, чем в варианте «темнота». При этом, показана четкая зависимость увеличения содержания транскриптов в клетках растений, увеличению составило 3,77 раза, а в варианте «КС+ДКС» данный показатель превышал показатель светового опыта в 3,27 раза (рис.3). Сходный характер изменения транскрипционной активности данного гена был обнаружен в варианте «темнота», где изменение составило 3,25 раза относительно варианта «свет» в меньшую сторону. Импульсное облучение растений красным светом привело к снижению изучаемого показателя в 1,77 раза по отношению к растениям, экспонируемым в темноте, и в 2,05 раз меньше, по отношению к растениям, облученным дальним красным светом.

Установлено, что скорость функционирования митохондриальной глутаматдегидрогеназы имеет фитохром-зависимый характер, где основным действующим фактором выступает активная форма фитохрома. Полученные результаты свидетельствуют о регуляции активности ГДГ при изменении светового режима растений и при переходе к фотосинтетической активности посредством исследуемого фоторецептора. Рядом авторов

установлено, что внутриклеточное перераспределение катионов кальция между цитоплазмой и ядром в зеленых листьях кукурузы регулируется фитохромной системой [19].

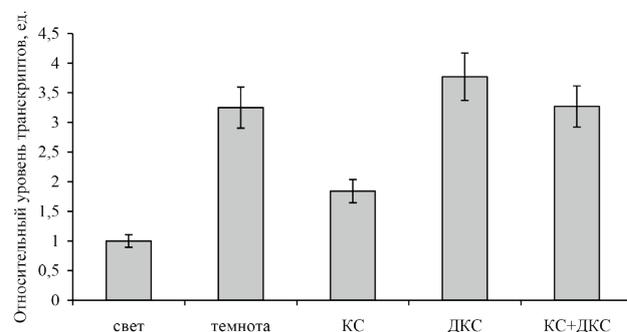


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии гена *GDH-1* в листьях пшеницы при разных световых режимах. Свет – растения, освещенные белым светом; темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

Изучение величины содержания транскриптов гена *GDH-2* глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при их облучении светом разной длины волны показало определенную зависимость (рис. 4). В растениях на свету в 1,71 раза количество мРНК гена *GDH-2* ниже, чем в варианте «темнота». При облучении растений КС также установлено снижение величины данного показателя исследуемого гена, снижение составило 1,31 раза. Противоположный характер ответной реакции клетки характерен для вариантов «ДКС» и «КС+ДКС». Наличие в клетках исследуемых растений активной формы фитохрома способствует уменьшению анализируемой величины экспрессии данных генов, что находит свое отражение в механизме генетического контроля активности исследуемой ферментативной системы. Свет выступает в качестве главного регулятора метаболизма растений. На модельном объекте растений *A. thaliana* установлено, что КС значительно меняет уровень работы генетического материала клетки, ответственного за кодирование ферментов окислительного метаболизма. Освещение растений кукурузы КС приводило к снижению исследуемого показателя гена субъединицы А сукцинатдегидрогеназы, при этом важно отметить противоположную ответную реакцию растительной клетки на действие дальнего красного света [20].

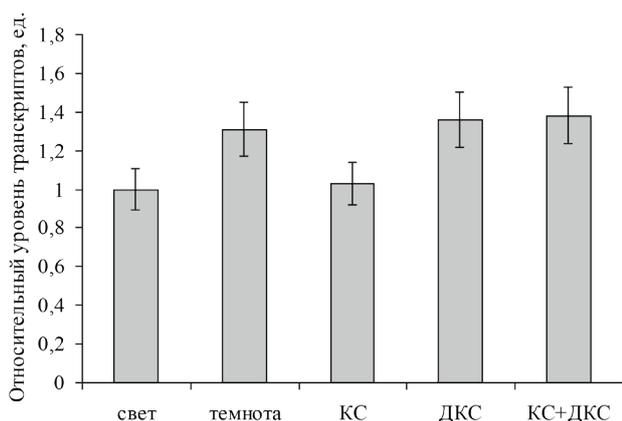


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии гена *GDH-2* в листьях пшеницы при разных световых режимах.

Исследования с применением ЭГТА позволяет выявить закономерности перераспределения свободных катионов кальция между компартментами клетки в зависимости от условий освещения. Результаты наших исследований свидетельствуют о зависимости уровня транскриптов исследуемого гена глутаматдегидрогеназы, от варианта облучения растений светом разной длины волны. Комплексон ЭГТА контролирует содержание свободных катионов двухвалентных металлов, в том числе и кальция. Изменения концентрации катионов кальция в ядрах листьев пшеницы в присутствии ЭГТА представлены на рисунке 5.

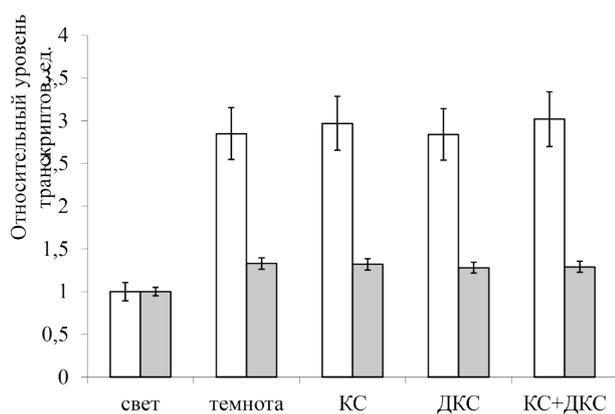


Рис. 5. Уровень экспрессии генов *GDH-1* и *GDH-2* в норме и в присутствии ЭГТА при облучении растений пшеницы светом разной длины волны. Свет – растения, освещенные белым светом; темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

Установлено, что содержание Ca^{2+} в ядрах листьев на свету значительно ниже такового показателя, чем в варианте «темнота». Анализ результатов говорит о том, что после 24 часов инкубации в темноте концентрация мРНК генов *GDH-1* и *GDH-2* увеличивается в 2,85 и 1,34 раза, соответственно, по сравнению с вариантом «свет». Когда не работает фотосинтез, основная доля энергии генерируется в митохондриях, что требует активации всего митохондриального метаболизма, в том числе и глутаматдегидрогеназы.

Воздействие на растения КС не приводило к изменению транскрипционной активности обоих генов глутаматдегидрогеназы при применении в качестве комплексона, связывающего свободные катионы кальция. Следовательно, данный элемент вызывает нарушение фитохромной кальциевой сигнализации в растительной клетке. Аналогичные данные получены и для растений, инкубированных в присутствии дальнего красного света, где уровень экспрессии гена субъединицы альфа глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы находился на близком уровне к темновому варианту эксперимента, в пределах статистической погрешности. При этом, следует отметить, что воздействие на листья пшеницы света разной длины волны в присутствии ЭГТА, также не вызвало значимых изменений транскрипционной активности *GDH-1* и *GDH-2*, в различных вариантах сочетания света.

Определяющую роль в данном процессе играет механизм кальциевой сигнализации, передающий фитохромный эффект клеточное ядро. При этом, в самом ядре, также существует внутриядерная система восприятия и реализации кальциевого сигнала. Оно реализуется посредством кальмодулинов и ССаМ-пептидов, реагирующих с различными белками и проявляющими киназную активность по отношению к ним. В качестве примера можно привести САМ7 арабидопсиса, который выступает регулятором экспрессии генов, обеспечивающих фотоморфогенные изменения растительного организма. При этом, мутантные формы модельных растительных организмов проявляют данный эффект в значительно меньшей степени [21].

Таким образом, кальмодулины играют важную роль в реализации кальциевой сигнализации в клетках листьев пшеницы в ответ на активацию фитохрома и обеспечивают регуляцию транскрипционной активности генов глутаматдегидрогеназы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют, что изменение светового режима растений находит отражение в дифференциальном уровне активности глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы. При наличии в клетках исследуемых растений активной формы фитохрома было показано снижение скорости функционирования данного фермента. Низкое значение величины каталитической активности глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы на свету, вероятно, обусловлено снижением общего митохондриального метаболизма при активном фотосинтезе, достаточным для осуществления биосинтетических процессов – синтеза глутамата. Подобный механизм регуляции был установлен для сукцинатдегидрогеназы [18].

Выявлено наличие в листьях пшеницы двухмолекулярных форм исследуемого фермента с различным значением электрофоретической подвижности. Первая изоформа имеет величину Rf 0.27, а вторая – 0.38. При этом, при облучении пшеницы светом различной длины волны не наблюдается изменения в изоформном составе глутаматдегидрогеназы. Показано, что интенсивность специфически окрашенных полос на специфичность ГДГ соотносится с изменением ферментативной активности. Интенсивность полос на геле возрастает в темноте и при непосредственном облучении дальним красным светом.

Показано, что для растений, подвергнутых облучению светом разной длины волны, характерен механизм фитохром-зависимого регулирования уровня транскриптов генов ГДГ. Исследования показали, что при действии КС наблюдается подавление экспрессии обоих генов глутаматдегидрогеназы, что соответствует изменению активности исследуемого фермента в этих условиях эксперимента. Рядом авторов показано, что фитохромная система регулирует внутриклеточное перераспределение катионов кальция между цитоплазмой и ядром в зеленых листьях кукурузы [19, 22, 23]. В ходе наших исследований показано, что перераспределение свободных катионов кальция между компартментами клетки играет важную роль в регуляции глутаматдегидрогеназы. Применение комплекса ЭГТА привело к отсутствию изменения в активности данного фермента в листьях пшеницы в условиях различного освещения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loulakis K.A. The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities / K.A. Loulakis K.A. Roubelakis-Angelakis // *Physiologia Plantarum*. – 1996. – V. 96. – P. 29-35.
2. Masclaux-Daubresse C. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco / Céline Masclaux-Daubresse 1, Michèle Reisdorf-Cren, Karine Pageau, Maud Lelandais, Olivier Grandjean, Joceline Kronenberger, Marie-Hélène Valadier, Magali Feraud, Tiphaine Jouglet, Akira Suzuki // *Plant Physiol*. – 2006. – V. 140. – P. 444–456.
3. Labboun S. Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase. I. in vivo Real Time Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Experiments / S. Labboun // *Plant Cell Physiol*. – 2009. – V. 50. – P. 1761–1773.
4. Miyashita Y. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation / Y. Miyashita, A. Good // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – V. 59. – P. 667-680
5. Федорин Д.Н. Светорегуляция изоферментов цикла трикарбоновых кислот в растениях/ Д.Н. Федорин, А.Т. Епринцев, А.У. Игамбердиев // *Физиология растений*. 2022. Т. 69. № 6. С. 589-596.
6. Епринцев А.Т. Регуляция активности глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при изменении светового режима/ А.Т. Епринцев, Г.Б. Анохина, Д.Н. Федорин // *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2022. № 1. С. 37-45.
7. Fontaine J.X. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism / J.X. Fontaine // *The Plant Cell*. – 2012. – V. 24, No 10. – P. 4044-4065.
8. Sarasketa A. Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *Arabidopsis*/ A. Sarasketa, M.B.Gonzalez-Moro, C.Gonzalez-Murua, D. Marino // *Front. Plant Sci*. 2016. V. 7. P. 1–12.
9. Pathuri I.P. Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeriagraminis* f. sp. hordei / I.P. Pathuri // *J. Exp. Bot*. – 2011. – V. 10. – P. 3449–3457.
10. Chomczynski P. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem*. – 1987. – V. 162. – P. 156–159.
11. Nicot N. House keeping genes election for real-time RT-PCR normalization in potato during bioti

candabiotic stress / N. Nicot, J.-F. Hausman, L. Hoffmann, D. Evers // *J. of Exp. Bot.* - 2005. - V.56. - P. 2907–2914.

12. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods.* - 2001. - V. 25. - P. 402–408.

13. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. –М.: Высшая школа, 1990.–352 с.

14. Eprintsev A.T. Regulation of expression of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize leaves via phytochrome / A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin, M. V. Cherkasskikh, A. U. Igamberdiev // *Plant Physiol Biochem.* – 2020. – V. 146. – P. 157-162.

15. Eprintsev A.T. Light inhibition of fumarase in Arabidopsis leaves is phytochrome A-dependent and mediated by calcium / A.T. Eprintsev, D. N. Fedorin, O. V. Sazonova, A.U. Igamberdiev // *Plant Physiology and Biochemistry.* - 2016. - V. 102. - P. 161-166.

16. Li J. Phytochrome Signaling Mechanisms / J. Li, G. Li, H. Wang, X.Wang Deng // *Arabidopsis Book.* – 2011. – V. 9: P. 148.

17. Li X. Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in Arabidopsis thaliana / X. Li, Huimin Zhang, Qin Ai, Gang Liang, Diqiu Yu // *Plant Physiol.* – 2016. – V. 170. – P. 2478–2493.

18. Eprintsev A.T. Ca²⁺ is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate

dehydrogenase gene *sdh1-2* in Arabidopsis / A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin, A.U. Igamberdiev // *J Plant Physiol.* - 2013. - V. 170, No 15. – P. 1349-1352.

19. Епринцев А.Т. Роль катионов кальция в механизме фитохром-зависимой регуляции экспрессии гена *SDH1-2* и активности сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы / А.Т. Епринцев, Н.В.Селиванова, Д.Н. Федорин, С.С. Башкин, Е.А. Селезнёва, И.В. Дадакана, А.С. Махмуд // *Биологические мембраны.* - 2012. – Т. 29, № 3. - С. 165-168.

20. Popov V.N. Succinate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana is regulated by light via phytochrome A / V.N. Popov, A.T. Eprintsev, D. N. Fedorin, A.U. Igamberdiev // *FEBS Letters.* – 2010. - V. 584. - P. 199-202.

21. Kushwaha R. Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in Arabidopsis seedling development / R. Kushwaha, A. Singh, S. Chattopadhyay // *Plant Cell.* – 2008. – V. 20. – P. 1747-1759.

22. Kim M.C. Calcium and Calmodulin-Mediated Regulation of Gene Expression in Plants / M.C. Kim, W.S. Chung, D.-J. Yun, M.J. Cho // *Molecular Plant.* - 2009. - V.1. - P. 13–21,

23. Popov V.N. Light influence on succinate dehydrogenase activity in maize leaves / V.N. Popov, A.T. Eprintsev, D. N. Fedorin, Yu.A. Leonova // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.* - 2005. – V. 1. - P. 30-36.

*Воронежский государственный университет
Федорина Ольга Сергеевна, доцент кафедры
биохимии и физиологии клетки
E-mail: solka_81@mail.ru*

*Федорин Дмитрий Николаевич, доцент кафе-
дры биохимии и физиологии клетки
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Епринцев Александр Трофимович, заведующий
кафедрой биохимии и физиологии клетки,
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Voronezh State University
Fedorina Olga Sergeevna., PhD., assistant
professor of biochemistry and cell physiology
E-mail: solka_81@mail.ru*

*Fedorin Dmitry Nikolaevich., PhD., assistant
professor of biochemistry and cell physiology,
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Eprintsev Alexander Trofimovich, head of the
department of biochemistry and cell physiology,
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

REGULATION OF GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN WHEAT LEAVES UNDER DIFFERENT LIGHT CONDITIONS

O. S. Fedorina, D.N. Fedorin, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

ABSTRACT. An analysis of the literature data on the study of the key enzyme of nitrogen metabolism, glutamate dehydrogenase, showed that mitochondrial glutamate dehydrogenase is a light-dependent

enzyme. In dark conditions, an increase in the speed of its functioning is observed, which is associated with the intensification of oxidative processes in plant mitochondria. A study of the influence of light of different spectral composition showed the dependence of glutamate dehydrogenase activity on this factor. It has been established that a decrease in GDH activity occurs under the influence of red light with a wavelength of 660 nm, which is associated with the formation of the active form of phytochrome under these conditions. However, the inhibition of the enzyme by light is incomplete, which is probably due to its functioning in biosynthetic processes. It has been shown that two forms of glutamate dehydrogenase with electrophoretic mobility of 0.27 and 0.38 function in wheat leaf cells. Irradiation of wheat plants with light of different wavelengths does not cause a change in the number of molecular forms of the enzyme under study. A significant change in the level of relative transcription of glutamate dehydrogenase genes in wheat leaves was detected under different lighting conditions. It has been shown that the active form of phytochrome is involved in the regulation of the expression of the *GDH-1* and *GDH-2* genes, causing a decrease in the amount of mRNA of this gene in leaves when plants are irradiated with red light. It was shown that when plants were irradiated with red light in the presence of the EGTA complexon, no significant changes in the level of expression of the *GDH-1* and *GDH-2* genes were observed, relative to the “dark” option. Consequently, the data obtained indicate the participation of free calcium cations in the regulation of the transcriptional activity of the studied genes, carried out by the phytochrome system. Phytochrome-dependent redistribution of calcium into the cell nucleus promotes the activation of calmodulins, which play an important role in the implementation of calcium signaling in wheat leaf cells in response to phytochrome activation and provide regulation of the transcriptional activity of glutamate dehydrogenase genes.

Keywords: glutamate dehydrogenase, activity, subunit, GABA-shunt, regulation, expression, isoenzymes

REFERENCES

1. Loulakakis K.A. The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities / K.A. Loulakakis K.A. Roubelakis-Angelakis // *Physiologia Plantarum*. – 1996. – V. 96. – P. 29-35.
2. Masclaux-Daubresse C. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco / Céline Masclaux-Daubresse 1, Michèle Reisdorf-Cren, Karine Pageau, Maud Lelandais, Olivier Grandjean, Joceline Kronenberger, Marie-Hélène Valadier, Magali Feraud, Tiphaine Jouglet, Akira Suzuki // *Plant Physiol*. – 2006. – V. 140. – P. 444–456.
3. Labboun S. Resolving the Role of Plant Glutamate Dehydrogenase. I. in vivo Real Time Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Experiments / S. Labboun // *Plant Cell Physiol*. – 2009. – V. 50. – P. 1761–1773.
4. Miyashita Y. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation / Y. Miyashita, A. Good // *Journal of Experimental Botany*. – 2008. – V. 59. – P. 667-680
5. Fedorin D.N. Svetoregulyatsiya izofermentov tsiklat rikarbonovy khkislot v rasteniyakh/ D.N. Fedorin, A.T. Eprintsev, A.U. Igamberdiev // *Fiziologiyarastenii*. 2022. - V. 69. - № 6. - P. 589-596.
6. Eprintsev A.T. Regulyatsiya aktivnosti glutamatdehidrogenazy v list'yakhkukuruzy (*Zea mays* L.) pri izmeneniisvetovogo rezhima / A.T. Eprintsev, G.B. Anokhina, D.N. Fedorin // *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk. Seriya biologicheskaya*. - 2022. - No 1. - P. 37-45.
7. Fontaine J.X. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism / J.X. Fontaine // *The Plant Cell*. – 2012. – V. 24, No 10. – P. 4044-4065.
8. Sarasketa A. Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *Arabidopsis*/ A. Sarasketa, M.B. Gonzalez-Moro, C. Gonzalez-Murua, D. Marino // *Front. Plant Sci*. 2016. V. 7. P. 1–12.
9. Pathuri I.P. Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeriagraminis* f. sp. *hordei* / I.P. Pathuri // *J. Exp. Bot*. – 2011. – V. 10. – P. 3449–3457.
10. Chomczynski P. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem*. – 1987. – V. 162. – P. 156–159.
11. Nicot N. House keeping genes election for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress / N. Nicot, J.-F. Hausman, L. Hoffmann, D. Evers // *J. of Exp. Bot*. - 2005. - V. 56. - P. 2907–2914.
12. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. - 2001. - V. 25. - P. 402–408.

13. Lakin G.F. Biometriya / G.F. Lakin. –М. : Vysshayashkola, 1990. – 352 s.
14. Eprintsev A.T. Regulation of expression of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize leaves via phytochrome / A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin, M. V. Cherkasskikh, A. U. Igamberdiev // Plant Physiol Biochem. – 2020. – V. 146. – P. 157-162.
15. Eprintsev A.T. Light inhibition of fumarase in Arabidopsis leaves is phytochrome A-dependent and mediated by calcium / A.T. Eprintsev, D. N. Fedorin, O. V. Sazonova, A.U. Igamberdiev // Plant Physiology and Biochemistry. - 2016. - V. 102. - P. 161-166.
16. Li J. Phytochrome Signaling Mechanisms / J. Li, G. Li, H. Wang, X.Wang Deng // Arabidopsis Book. – 2011. – V. 9: P. 148.
17. Li X. Two bHLH transcription factors, bHLH34 and bHLH104, regulate iron homeostasis in Arabidopsis thaliana / X. Li, Huimin Zhang, Qin Ai , Gang Liang, Diqiu Yu // Plant Physiol. – 2016. – V. 170. – P. 2478–2493.
18. Eprintsev A.T. Ca²⁺ is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate dehydrogenase gene *sdh1-2* in Arabidopsis / A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin, A.U. Igamberdiev // J Plant Physiol. - 2013. - V. 170, N. 15. – P. 1349-1352.
19. Eprintsev A.T. Rol' kationov kal'tsiya v mekhanizme fitokhrom-zavisimoi regulyatsii ekspressii gena *SDH1-2* iaktivnosti suksinatdehidrogenazy v list'yakh kukuruzy /A.T. Eprintsev [i dr.] // Biologicheskie membrany. - 2012. – T. 29, № 3. - S. 165-168.
20. Popov V.N. Succinate dehydrogenase in Arabidopsis thaliana is regulated by light via phytochrome A / V.N. Popov, A.T. Eprintsev, D. N. Fedorin, A.U. Igamberdiev // FEBS Letters. – 2010. - V. 584. - P. 199-202.
21. Kushwaha R. Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in Arabidopsis seedling development / R. Kushwaha, A. Singh, S. Chattopadhyay // Plant Cell. – 2008. – V. 20. – P. 1747-1759.
22. Kim M.C. Calcium and Calmodulin-Mediated Regulation of Gene Expression in Plants / M.C. Kim, W.S. Chung, D.-J. Yun, M.J. Cho // MolecularPlant. - 2009. - V.1. - P. 13–21,
23. Popov V.N. Light influence on succinate dehydrogenase activity in maize leaves / V.N. Popov, A.T. Eprintsev, D. N. Fedorin, Yu.A. Leonova // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. - 2005. – V. 1. - P. 30-36.