

## ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ И ВЫСОКИХ ТЕМПЕРАТУР НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ 2-ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА В ЛИСТЬЯХ *ZEA MAYS* L.

Г. Б. Анохина, Н. В. Селиванова, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 18.01.2018 г.

**Аннотация.** Одним из важнейших этапов цикла трикарбоновых кислот является окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетоглутарата. Данный процесс, катализируемый 2-оксоглутаратдегидрогеназным комплексом (2-ОГДК, К.Ф. 1.2.4.2) находится на пересечении нескольких метаболических путей, что делает его необычайно интересным для изучения, в связи с тем, что  $\alpha$ -кетоглутарат, является общим интермедиатом обмена как углеводов, так и белков. Следует отметить, что данный процесс является единственным механизмом биodeградации  $\alpha$ -кетоглутарата. Помимо этого, 2-ОГДК катализирует единственную реакцию в цикле трикарбоновых кислот, которая связана с образованием связи, обогащенной энергией. Полученные данные по динамике активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса из проростков кукурузы в условиях действия различных температур позволили оценить изменение скорости функционирования исследуемого фермента в стрессовых условиях. При анализе транскрипционной активности генов, кодирующих данный ферментный комплекс, установлено изменение уровня транскриптов исследуемых генов в условиях действия различных температурных значений, что может говорить о генетической регуляции работы исследуемых ферментов при стресс-индуцируемом воздействии. Исследование экспрессии позволило выявить неоднородность в работе генов при ответе растительного организма на действие стрессора. Выявлено, что эффект действия низких температур различается в зависимости от продолжительности воздействия. Тогда как скорость ферментативной реакции растений, экспонируемых при температуре 37°C, возросла на протяжении всего времени эксперимента. Температура оказывает прямое влияние на скорость химических реакций, соответственно, изменяется и активность ферментных систем и проницаемость мембран, что в совокупности, приводит к нарушениям липидных взаимодействий, комплементарности цепей нуклеиновых кислот, взаимодействий белок-нуклеиновая кислота, гормон-рецептор. Показано, что экстремальные температуры стимулируют экспрессионную работу генов, кодирующих компоненты 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, который помимо ЦТК участвует в процессе дыхания. Таким образом, стресс-индуцированные изменения функционирования исследуемой ферментной системы в листьях кукурузы под действием высоких и низких температур заключаются в значительном увеличении активности данного энзима, что свидетельствует об интенсификации функционирования цикла трикарбоновых кислот, обуславливая энергизацию клетки, что необходимо для адаптации растений к абиотическому стрессу.

**Ключевые слова:** 2-Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, 2-оксоглутаратдегидрогеназа, дигидролипоамидсукцинилтрансфераза, липоамиддегидрогеназа, температурный стресс, ПЦР, экспрессия, гены, ферменты, ферментативная активность.

На протяжении уже долгого времени в биохимии большой интерес вызывает изучение механизмов регуляции процессов метаболизма, которые протекают в организмах различных уровней организации [1]. Следует отметить, что особое место занимают проблемы исследования ферментативных систем [2, 3]. Цикл трикарбоновых кислот является одним из ключевых метаболических путей растений. Исследование ферментов ЦТК,

их роли в жизнедеятельности растений, способов функционирования и регуляции, а также изучение структуры имеет практическое и фундаментальное значение как для биохимии и молекулярной биологии, так и для физиологии растений [1, 4].

Одним из важнейших этапов цикла трикарбоновых кислот является окислительное декарбоксилирование 2-оксоглутарата. Данный процесс, катализируемый 2-оксоглутаратдегидрогеназным комплексом (2-ОГДК, К.Ф. 1.2.4.2) находится на

пересечении нескольких метаболических путей, что делает его необычайно интересным для изучения, в связи с тем, что  $\alpha$ -кетоглутарат, является общим интермедиатом обмена как углеводов, так и белков [5, 6]. Однако публикаций, посвященных изучению функционирования 2-ОГДК в растительных организмах, нами практически не было найдено. Растения – пойкилотермные организмы [7]. Повреждения начинаются на молекулярном уровне с нарушений функций белков и нуклеиновых кислот [8]. Температура – это фактор, серьезно влияющий на морфологию и физиологию растений, требующий изменений в самом растении, которые могли бы приспособить его [9]. Адаптации растений к разным температурным условиям даже в пределах одного вида различны. В связи с этим, целью нашей работы явилось изучение влияния низких и высоких температур на функционирование ферментов 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса в листьях кукурузы.

## ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве модельного объекта исследований использовались листья 10-12 дневной кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, которые выращивались гидропонно. Световой режим составлял десять часов светового дня с интенсивностью света – 25 Вт/м<sup>2</sup>. Температура выращивания составляла 25°C, что является температурным оптимумом для данного растения.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для моделирования условий действия температурного стресса растения инкубировались на свету при температуре +4°C и +37°C. Контрольная группа растений на протяжении всего времени экспозиции находилась в нормальных условиях при температуре окружающей среды 25°C.

Активность 2-ОГДГ определяли по методу Гублера (Gubler), основанном на использовании в качестве искусственного акцептора электронов гексацианоферрата (III) калия [10].

Для выделения суммарной РНК применяли реагент ExtractRNA («Евроген», Россия).

Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MULV («СибЭнзим», Россия) для синтеза первой цепи кДНК, согласно инструкции производителя.

Специфические праймеры подбирали с использованием нуклеотидных последовательностей *ogdh-1* и *dlst-1* кукурузы, взятых из

международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genes/>), с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Праймеры к гену *ogdh-1*: прямой – 5'-attccaatgaccgtgacagg-3'; обратный – 5'-aaaaatcggcgcatccaatg-3'; к гену *dlst-1*: прямой – 5'-tctgagctgaggataccgag-3'; обратный – 5'-agcagctctattgctcttgc-3'.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили на приборе Bio-RadDNAEngineThermalCyclerChromo 4 («Bio-Rad», США), используя в качестве красителя SYBRGreenI. Задавали следующие параметры амплификации: предварительная денатурация – 95°C 5 мин; детекция, 1 цикл: 95°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 30 с; финальная элонгация – 72°C, 10 мин. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации EF-1 $\alpha$  с ген-специфичными праймерами. В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции [11].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования влияния высоких и низких температур на ферментативную активность 2-оксоглутаратдегидрогеназы показали, что растения, экспонируемые при температуре 4°C, демонстрировали постепенное увеличение общей ферментативной активности, достигая максимума на 6 час инкубации (рис. 1). Через 24 часа от начала эксперимента наблюдалось резкое падение значений ферментативной активности ниже уровня, отмеченного в контрольной группе растений. Известно, что протоплазма вначале отвечает на холодовой стресс резким усилением метаболизма [12]. Повышение интенсивности дыхания, которое наблюдается в качестве стрессовой реакции, отражает попытку исправить уже появившиеся дефекты и создать ультраструктурные предпосылки для приспособления к новой ситуации [13]. Однако в дальнейшем про-

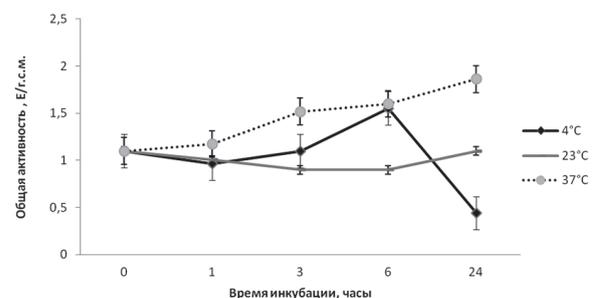


Рис. 1. Изменение общей активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы в листьях кукурузы под действием температурного стресса.

исходит нарушение функциональной активности мембран из-за перехода насыщенных жирных кислот из жидкокристаллического состояния в гель. В результате, с одной стороны, повышается проницаемость мембран для ионов, а с другой — увеличивается энергия активации ферментов, связанных с мембраной [14, 15], что подтверждается снижением скорости функционирования 2-ОГДК через сутки после начала эксперимента.

При нахождении кукурузы в условиях с температурой окружающей среды +37 °С наблюдалось повышение общей активности 2-ОГДК на протяжении всего времени эксперимента. Максимальное значение отмечено спустя сутки после начала инкубации и превышало контрольные значения почти в два раза. Данный факт может быть объяснен тем, что кукуруза является теплолюбивым растением [16], и данное значение температуры не является для нее критическим. Известно, что длительное действие высоких температур оказывает ингибирующее действие на процесс фотосинтеза [17, 18]. Однако процесс дыхания в этих условиях не только продолжается, но и интенсифицируется. Данное явление объясняется тем, что в качестве альтернативного источника энергии для репарации скарифицированных органелл и клеточных функций может выступать процесс дыхания [19].

Уровень транскриптов гена *ogdh-1* в условиях действия экстремальных температур также изменялся. Из гистограммы видно, что высокие температуры способствуют увеличению уровня транскрипции гена *ogdh-1* (рис.2). Максимальное количество транскриптов отмечалось на 3 час проведения эксперимента (9.31 отн. ед.) и было более чем в 9 раз выше контрольных значений. Для растений, инкубация которых осуществлялась при низких температурах, также наблюдалось увеличение концентрации мРНК, хотя оно было и не столь велико. К 6 часу эксперимента отмечалось макси-

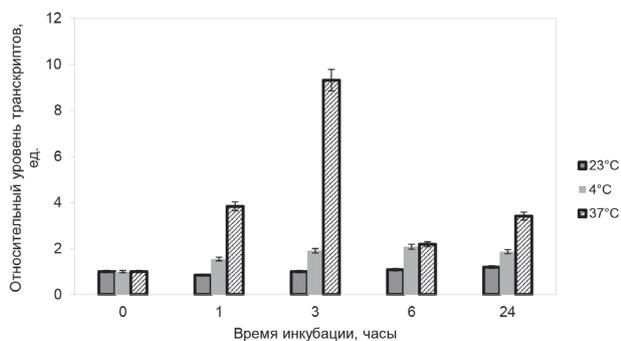


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов генов *ogdh-1* в листьях кукурузы в условиях температурного стресса.

мальное значение относительного уровня транскриптов (2.08 отн. ед.), что в два раза больше значений отмечаемых у контрольной группы растений.

Аналогичное действие температурный стресс оказывает на работу гена *d1st-1*, кодирующего второй компонент 2-ОГДК (Рис.3). Из полученных данных видно, что и высокие, и низкие температуры способствуют увеличению скорости транскрипции. Максимальная концентрация мРНК зафиксирована спустя сутки от начала эксперимента. Контрольная группа растений (инкубация при температуре 25°С) характеризовалась отсутствием изменений в уровне транскрипции гена *d1st-1*.

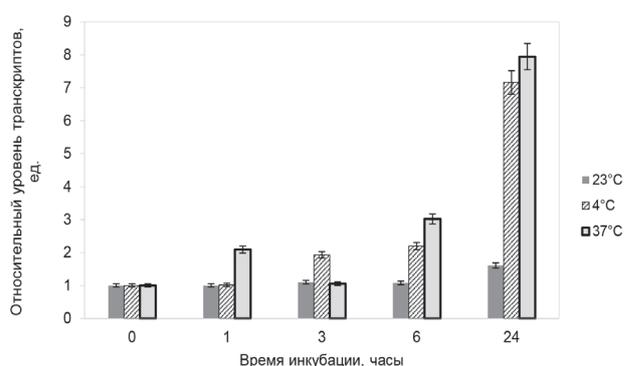


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов генов *d1st-1* в листьях кукурузы в условиях температурного стресса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные коррелируют со значениями общей активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы, что может свидетельствовать об увеличении скорости функционирования данной ферментной системы, а, соответственно, и ЦТК, при воздействии на растения кукурузы экстремальных температур. В связи с этим, можно предположить, что экстремальные температуры оказывают стимулирующее действие на работу 2-ОГДК, который помимо ЦТК участвует в процессе дыхания [20]. Таким образом, стресс-индуцированные изменения функционирования исследуемой ферментной системы в листьях кукурузы под действием высоких и низких температур заключаются в значительном увеличении активности данного фермента, что свидетельствует об интенсификации функционирования цикла трикарбоновых кислот, обуславливая энергизацию клетки, что необходимо для адаптации растений к абиотическому стрессу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФ (грант № 14-14-00721).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А.Т., Попов В.Н. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях. Воронеж, Из-во Воронеж.ун-та, 1999, 192 с.
2. Селиванова Н. В., Ахмед А. Х. А., Орлова М. В., Климова С. Е., Епринцева А. Т. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017. №2. С. 88-92.
3. Ипатова В.И. Адаптация водных растений к стрессовым факторам среды. Москва, Изд-во «Графикон-принт», 2005, 224 с.
4. Кузнецов В. В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. Москва, Высшая школа, 2006, 742 с.
5. Araujo W. L. , Nunes-Nesi A., Trencamp S. // Plant Physiology. 2008. Vol. 148, №. 4. pp. 1782–1796.
6. Graf A., Trofimova L., Loshinskaja A., Mkrtchyan G., Strokina A., Lovat M., Tylicky A., Strumilo S., Bettendorff L., Bunik VI // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2013. Vol. 45, No. 1. pp. 175–189.
7. Медведев С. С. Физиология растений. Москва, Высшая школа, 2004, 336 с.
8. Колесниченко А.В., Войников В.К. Белки низкотемпературного стресса у растений. Иркутск, Арт-пресс, 2003, 196 с.
9. Полевой В.В., Саламатова Т.С. Физиология роста и развития растений. Ленинград, Изд-во Ленингр. Ун-та, 1991, 240 с.
10. Gubler C.J. // J. Biol. Chem. 1961. Vol. 236, №12. pp. 3112 – 3120.
11. Епринцев А. Т., Попов В. Н., Федорин Д. Н. Идентификация и исследование экспрессии генов. Воронеж, Изд-во Воронеж.ун-та, 2008, 63 с.
12. Селиванов А.А., Астахова Н.В., Мошков И.Е. // В сборнике материалов X Межд. симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», 17-21 июня 2013, Пущино, 2013, Т. I, с 144-148.
13. Титов А.Ф. Акимова Т.В., Таланова В.В., Топчиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. Москва, Наука, 2006, 143 с.
14. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. Физиология растений. Москва, Издательский центр «Академия», 2005, 640 с.
15. Плешков Б.П. Биохимия сельскохозяйственных растений. Москва, Агропромиздат, 2007, 494 с.
16. Блинова К.Ф., Борисова Н.А., Гортинский Г.Б. Ботанико-фармакогностический словарь: Справ.пособие. Москва, Высшая школа, 1990, 201 с.
17. Якушкина Н.И., Бахтенко Е.Ю. Физиология растений. Москва, Гуманитар. изд. центр ВЛАДОС, 2005, 463 с.
18. Либберт, Э. Физиология растений. Москва, Мир, 2006, 580 с.
19. Ю. В. Батова, Н. М. Казнина, Г. Ф. Лайдинен // сборник материалов VIII съезда общества физиологов растений России растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий, 21-26 сентября 2015 г., Петрозаводск, 2015, с. 56
20. McLain A.L., Szweda P.A., Szweda L.I. // Free Radical Research. 2011. vol. 45, № 1, pp. 29–36.

*Воронежский государственный университет  
Анохина Г. Б., аспирант кафедры биохимии и  
физиологии клетки  
Тел. +7 (473) 220-88-77  
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Селиванова Н. В., кандидат биологических  
наук, ассистент кафедры биохимии и физиологии  
клетки  
E-mail: kir2202@yandex.ru*

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

*Voronezh State University  
Anohina G. B., post-graduate student of  
Biochemistry and Cell Physiology Department  
Ph.: +7 (473) 220-88-77,  
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Selivanova N. V., PhD, Assistant Professor,  
Department Biochemistry and Cell Physiology  
E-mail: kir2202@yandex.ru*

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

## INFLUENCE OF LOW AND HIGH TEMPERATURES ON THE FUNCTIONING OF 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE COMPLEX ENZYMES IN LEAVES OF *ZEAMAYS* L.

G. B. Anohina, N. V. Selivanova, A. T. Eprintsev

*Voronezh State University*

**Abstract.** One of the most important stages of the tricarboxylic acid cycle is the oxidative decarboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate. This process catalyzed by 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (2-OGDC, EC 1.2.4.2), It is at the intersection of several metabolic pathways, which makes it very interesting to study, because  $\alpha$ -ketoglutarate is a common intermediate of both carbohydrates metabolism and proteins metabolism. This process is the only mechanism of biodegradation of  $\alpha$ -ketoglutarate. Also, 2-OGDC catalyzes a single reaction in the tricarboxylic acid cycle, which is associated with the formation of an energy-enriched bond. The obtained data on the dynamics of the activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from maize seedlings under influence of different temperatures allowed to assess the change in the speed of the enzyme functions under stress conditions. When the analysis of transcriptional activity of genes which encoding this enzyme complex it was found a change in the level of transcripts of the genes under conditions of different temperature values, which may indicate the genetic regulation of the enzymes under stress-induced exposure. The study of expression revealed heterogeneity in the work of genes when a plant responds to an effect of the stressor. It was found that the effect of low temperatures is varies depending on the duration of exposure. While the speed of the enzymatic reaction of plants exhibited at a temperature 37°C increased during the whole time of the experiment. The temperature has a direct impact on the rate of chemical reactions, respectively, changes both the activity of enzyme systems and membrane permeability, which together leads to violations of lipid interactions, complementarity of nucleic acid chains, protein-nucleic acid interactions, hormone receptor. It is shown that extreme temperatures stimulate the expression work of genes encoding the components of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, which in addition to the tricarboxylic acid cycle is involved in the breathing process. Thus, stress-induced changes in the functioning of the studied enzyme systems in maize leaves under the influence of salinization, high and low temperatures, lack of oxygen are a significant increase in the activity of this enzyme system, which indicates the intensification of the tricarboxylic acid cycle, causing cell energization, which is necessary for the adaptation of plants to abiotic stress.

**Keywords:** 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, 2-oxoglutarate dehydrogenase,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase, dihydrolipoamide dehydrogenase, temperature stress, PCR, expression, genes, activity of enzymes, enzymes.

### REFERENCES

1. Eprintsev A. T., Popov V. N. Enzymatic regulation of metabolism di- and tricarboxylic acids in plants, Voronezh, Voronezh. UN-TA, 1999, 192 p.
2. Selivanova N.V, Ahmed A. Kh. A., Orlova MV, Klimova S. Ye., Eprincev A.T. The Bulletin of the VSU. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. 2017. №2. Pp. 88-92.
3. Ipatova V.I. Adaptatsiya vodnykh rasteniy k stressovym faktoram sredy. Moscow, Izd-vo "Graphicon-print", 2005, 224 p.
4. Kuznetsov V.V., Dmitrieva G.A. Plant physiology. Moscow, Higher School, 2006, 742 p.
5. Araujo W. L., Nunes-Nesi A., Trenkamp S. et al. Plant Physiology. 2008. Vol. 148, no. 4. pp. 1782-1796.
6. Graf A., Trofimova L., Loshinskaja A., Mkrtychyan G., Strokina A., Lovat M., Tylicky A., Strumilo S., Bettendorff L., Bunik V.I. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2013. Vol. 45, No. 1. pp. 175-189.
7. Medvedev S.S, Plant Physiology. Moscow, Higher School, 2004, 336 p.
8. Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. Belki nizkotemperaturnogo stressa u rasteniy. Irkutsk, Artpress, 2003, 196 with.
9. Polevoy VV, Salamatova T.S. Fiziologiya rosta i razvitiyarasteniy. Leningrad, Izd-vo Leningr. Un-ta, 1991, 240 p.
10. Gubler C.J. J. Biol. Chem. 1961. Vol.236, No. 12. pp. 3112 - 3120.
11. Eprintsev A. T., Popov V. N., Fedorin D. N. Identifikatsiya i issledovaniye ekspressii genov. Voronezh, Izd-vo Voronezh. un-ta, 2008, 63 p.
12. Selivanov AA, Astakhova NV, Moshkov I.E. // In the collection of materials X Int. simp. "New and non-traditional plants and prospects for their use", June 17-21, 2013, Pushchino, 2013, T. I, from 144-148.

13. Titov A.F. Akimova TV, Talanova VV, Topchieva L.B. Ustoychivost' rasteniy v nachal'nyy period deystviya neblagopriyatnykh temperatur. Moscow, Science, 2006, 143p.
14. Alekhina ND, Balnokin Yu.V., Gavrilenko V.F. Plant physiology. Moscow, Publishing Center "Academy", 2005, 640 p.
15. Pleshkov B.P. Biokhimiya sel'skokhozyaystvennykh rasteniy. Moscow, Agropromizdat, 2007, 494 p.
16. Blinova KF, Borisova NA, Gortinsky G.B. Botanico-pharmacognostic dictionary: Ref. allowance. Moscow, High School, 1990, 201 p.
17. Yakushkina NI, Bakhtenko E.Yu. Fiziologiya rasteniy. Moscow, The Humanities. ed. center VLADOS, 2005, 463 p.
18. Libbert, E. Fiziologiyarasteniy. Moscow, World, 2006, 580 p.
19. Yu. V. Batova, NM Kaznina, GF Laidinen // a collection of materials of the VIII Congress of the Society of Plant Physiologists of Russia in the conditions of global and local climatic and anthropogenic influences, September 21-26, 2015, Petrozavodsk, 2015, p. 56
20. McLain A.L., Szweda P.A., Szweda L.I. // Free Radical Research. 2011. vol. 45, No. 1, pp. 29-36.