

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ 2-ОКСОГЛУТАРАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

Г.Б. Анохина, Т.Х.Т. Киеу, Л.С. Картавцева, Н.В. Селиванова, А.Т. Епринцев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия, *dowi2009@mail.ru*

Аннотация. В естественной среде растения подвергаются воздействию различных абиотических факторов, одним из которых является солевой стресс. В ходе работы исследовано влияние солевого стресса на работу 2-ОГДК, как участника одного из важных этапов ЦТК. С помощью методов молекулярной биологии проведен анализ транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты 2-ОГДК при солевом стрессе. Выявлено, что солевой стресс в первые часы стимулирует работу 2-ОГДК в листьях кукурузы.

Ключевые слова: *2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, оксоглутаратдегидрогеназа, липоамидсукцинилтрансфераза, липоамиддегидрогеназа, солевой стресс*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-93-97

Повышение концентрации солей в почве оказывает сильное влияние на различные физиологические и биохимические процессы, протекающие в растительном организме: нарушается водный обмен и транспорт ионов кальция, снижается скорость роста растений в длину, а также накопление биомассы, снижается интенсивность фотосинтеза, увеличивается концентрация углекислоты в междуклеточном пространстве листьев [Будаговской, 2010; Веселов и др., 2010; Калайи, Рутковска, 2010]. Солевой стресс оказывает влияние и на ферментативную активность. ЦТК, являясь важной точкой пересечения метаболических путей в организме, играет доминирующую роль в энергизации клетки, а также в синтезе важных клеточных интермедиатов.

Нам представляется интересным изучить влияние солевого стресса на функционирование 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (α -кетоглутарат дегидрогеназный комплекс, 2-ОГДК, КФ - 1.2.4.2), который, располагаясь на важном этапе ЦТК, катализирует реакцию окисления 2-оксоглутарата в сукцинил-СоА. Продуктами реакции являются CO_2 и сукцинил СоА. Окислительное декарбоксилирование 2-оксоглутарата протекает в несколько стадий с участием трёх независимых ферментов: E_1 – 2-оксоглутаратдегидрогеназа (ОГДГ); E_2 – дигидролипоамидсукцинилтрансфераза (ДЛСТ); E_3 – липоамиддегидрогеназа (ЛАДГ).

Целью данной работы являлось исследование регуляция активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного ферментного комплекса в листьях кукурузы при солевом стрессе.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовались 10-12 дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при 10 часовом световом дне с интенсивностью света 25 Ватт/ м². Температура выращивания составляла 25 °С.

Постановка эксперимента по действию солевого стресса осуществлялась путём помещения растений из опытной группы, с предварительно удаленной корневой системой, в солевой раствор на сутки (24 часа). Солевой раствор представлял собой 150 мМ водный раствор хлорида натрия (NaCl). В качестве контрольной группы использовались растения, помещённые в воду на сутки (24 часа). У данной группы корневая система также предварительно удалялась. Первые образцы для исследования

отбирались ещё до начала инкубации (нулевой образец) и из контрольной, и из опытной группы растений. Далее, образцы изымались из инкубационной среды через 1, 2, 3, 4 часа, 6, 8, 12, 18 часов, 22 и 24 часа от начала эксперимента.

Выделение митохондриальной фракции. Навеску растительного материала растирали в керамической ступке со средой выделения (0,15 М калий-фосфатный буфер (рН 7.4); 0,4 М сахароза; 2,5 мМ ЭДТА; 1 мМ хлорид калия; 4 мМ хлорид магния) в соотношении 1:10. Гомогенат фильтровали и центрифугировали 3 минуты при 3000 об/мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R при температуре +4 °С. Супернатант центрифугировали 10 минут при 20000 об/мин ($t = +4$ °С). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в 0,15 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4) с растворенной в нем сахарозой (0,25 М), $MgCl_2$, ТДФ. Полученную суспензию митохондрий использовали для определения активности 2-ОГДГ спектрофотометрическим методом.

Определение активности 2-ОГДГ. Активность 2-ОГДГ определяли по методу Гублера [Gubler, 1961]. Для определения активности суспензию митохондрий добавляли к среде фотометрирования (150 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4); 6 мМ $MnSO_4$; 0,6 мМ ЭДТА-динатриевая соль; 1,9 мМ АТФ – динатриевая соль; 0,12 М сахароза; 0,05М малоната калия (для исключения участия СДГ); 6,7 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$). Реакцию запускали добавлением 0,4 М 2-оксоглутарата натрия (рН 7.4). Измерение оптической плотности проводили в течение 5 минут при длине волны 417 нм.

Результаты и их обсуждение

Анализ ферментативной активности 2-ОГДК показал, что общая активность исследуемого ферментного комплекса увеличивается уже спустя час после инкубации в солевом растворе почти в три раза в сравнении с контрольной группой растений, где общая ферментативная активность оставалась на постоянном уровне (рис.1). Максимум активности 2-ОГДК отмечен на 2 час инкубации. В дальнейшем наблюдалось постепенное снижение общей активности фермента. По истечении 12 часов активность 2-ОГДК имела значения, характерные для контрольной группы растений.

В связи с тем, что 2-ОГДК обеспечивает образование сукцинил-СоА путём слаженной работы трёх ферментов, которые кодируются разными генами, важным является исследование роли каждого гена в синтезе белков при действии различных стрессовых факторов. По нашему мнению, интересным является исследование уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты 2-ОГДК, как способа регуляции активности всего комплекса.

Первый компонент 2-ОГДК – оксоглутаратдегидрогеназа кодируется тремя генами: *ogdh1*, *ogdh2*, *ogdh3*; дегидролипоамидсукцинилтрансфераза (второй компонент), также, кодируется тремя генами: *dlst1*, *dlst2*, *dlst3*; третий компонент – липоамиддегидрогеназа кодируется генами: *dld1* и *dld 2*.

Исследование уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты 2-ОГДК, показало, что солевой стресс действует, стимулируя экспрессию генов ОГДГ в первые часы инкубации: начиная с первого часа воздействия хлорида натрия отмечается рост уровня транскриптов генов *ogdh1*, *ogdh2* и *ogdh3* по сравнению с контрольными образцами (рис. 2). Для гена *ogdh1* максимальная концентрация мРНК отмечена на 2 час проведения эксперимента. Для генов *ogdh2* и *ogdh3* - на третий час инкубации. В дальнейшем отмечалось снижение транскрипционной активности для всех исследуемых генов, что в целом коррелирует с результатами, полученными в ходе исследования ферментативной активности 2-ОГДК.

Анализ транскрипционной активности генов, кодирующих второй компонент 2-ОГДК, показал, что для гена *dlst1* также наблюдалось увеличение уровня транскриптов в первые часы (максимум на второй час инкубации). Однако для гена *dlst2*, несмотря на

незначительное увеличение концентрации мРНК в первый час действия солевого стресса, было характерно падение уровня транскриптов ниже контрольных значений (рис. 3), как и для гена *dlst3*, для которого увеличение транскрипционной активности не было отмечено в течение всего времени эксперимента – относительный уровень транскриптов был ниже контроля. В то же время, следует отметить, что гены *dlst2* и *dlst3* всё-таки демонстрировали изменения концентрации мРНК.

Для гена *dld1* липоамиддегидрогеназы установлено увеличение уровня транскриптов в первые часы солевого стресса. Максимум отмечен на восьмой час инкубации. Ген *dld2* также демонстрировал рост концентрации мРНК в начале эксперимента, однако максимум зарегистрирован в первый час действия хлорида натрия (рис. 4). Далее экспрессионная активность исследуемого гена начала снижаться.

Таким образом, в ходе исследования регуляции активности 2-ОГДК в листьях кукурузы при действии солевого стресса установлено стимулирующее действие хлорида натрия в первые часы эксперимента, что говорит о попытке растительного организма компенсировать негативное влияние соли за счет интенсификации ЦТК. Анализ уровня транскриптов генов, кодирующих ферменты 2-ОГДК, выявил корреляцию с полученными данными изменения ферментативной активности, что говорит о генетической регуляции адаптивного механизма к данному стрессовому фактору.

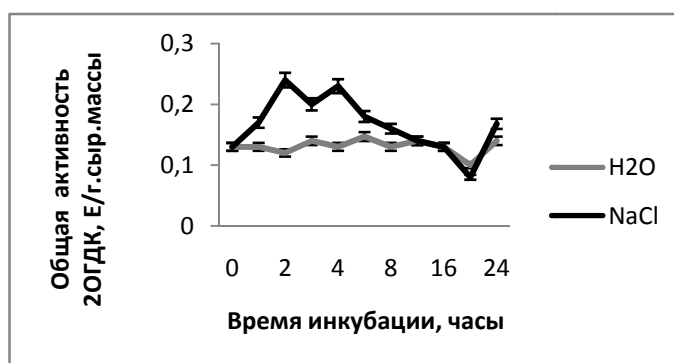


Рис. 1. Общая ферментативная активность 2-ОГДК (Е/г сырой массы) при действии солевого стресса. Черная линия – инкубация в NaCl; серая линия – инкубация в H₂O.

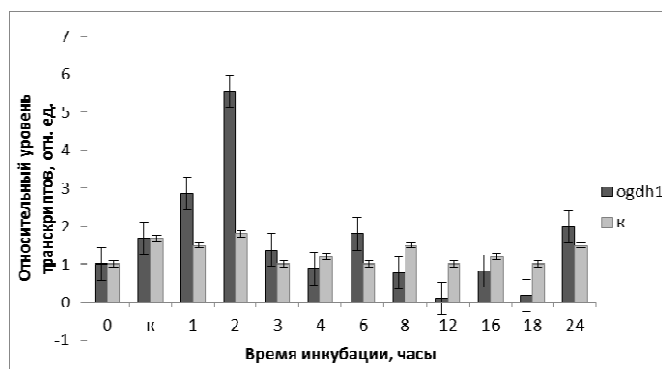


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов (отн. ед.) гена *ogdh1* при действии солевого стресса.

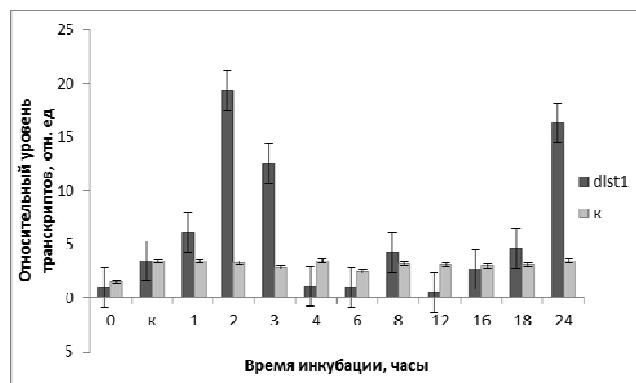


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов (отн. ед.) гена *dlst1* при действии солевого стресса.

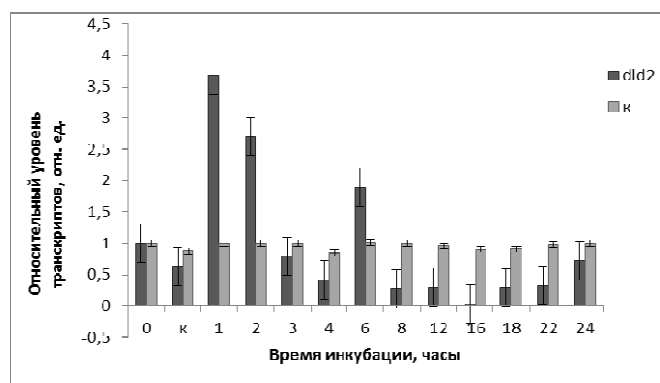


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов (отн. ед.) гена *dld2* при действии солевого стресса.

Литература

Будаговская Н.В. Нарушения процессов роста и транспорта воды в растениях при засолении и блокировании кальциевых каналов // Всероссийский симпозиум «Растение и стресс», Москва, 2010: тез. докл. – 2010. – С. 70–71.

Веселов Д.С., Шарипова Г.В., Фрике В. Накопление АБК и устойчивость ростовых процессов на фоне засоления у разных сортов ячмен // Всероссийский симпозиум «Растение и стресс» (Plants under Environmental Stress) 09-12 ноября 2010: тез. докл. – 2010. – С.85–86.

Калайи Х., Рутковска А. Стресс от соли. Как определить эту проблему с помощью флуориметра // Зерно. – 2010. – Т.1. – С.76–83.

Gubler C.J. Studies on the physiological functions of thiamine. The effect of thiamine deficiency and thiamine antagonists on the oxidation of α -keto acids by rat tissues // J. Biol. Chem. – 1961. – V. 236. – № 12. – P. 3112–3120.

REGULATION OF 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE ENZYME COMPLEX ACTIVITY IN CORN LEAVES IN SALT STRESS

G.B. Anokhina, T.H.T. Kieu, L.S. Kartavtseva, N.V. Selivanova, A.T. Eprintsev

Voronezh State University, Voronezh, Russia, *dowi2009@mail.ru*

Abstract. In a nature, plants are exposed to various abiotic factors, one of which is salt stress. In the course of the work, influence of salt stress on the work of 2OGDC, as a participant of one of the important stages of the TCA, was investigated. An analysis of the transcriptional activity of genes encoding the 2GODK enzymes in salt stress was carried out using methods of molecular biology. It was found that salt stress in the first hours stimulates the work of 2OGDC in the leaves of maize.

Keywords: *2-oxoglutarate dehydrogenase complex, oxoglutarate dehydrogenase, lipoamide succinyltransferase, lipoamide dehydrogenase, salt stress*