

УДК 577.218

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПОКСИИ

© 2024 г. Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев®

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018 Россия

®E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 06.10.2023 г.

После доработки 27.12.2023 г.

Принята к публикации 27.12.2023 г.

Установлено увеличение активности ГДГ при воздействии на растения гипоксических условий в первые 6 часов, что обеспечивает формирование адаптивной реакции клеточного метаболизма к недостатку кислорода в клетке. Показано различие в транскрипционной активности гомеологичных генов *GDH-1* в листьях пшеницы в стрессовых условиях. Увеличение содержания мРНК гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы при воздействии на растения гипоксических условий наблюдается в первые часы эксперимента, что соотносится с изменением каталитической активности глутаматдегидрогеназы. Регуляция данного гена осуществляется транскрипционным фактором HIF, специфический сайт посадки которого обнаружен в зоне инициации транскрипции промотора данного гена.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, пшеница, гипоксия, регуляция, ген, экспрессия, промотор

DOI: 10.31857/S1026347024050048, **EDN:** ulrckh

Растения способны переносить недостаток кислорода, который возможен, в том числе, и в естественных условиях, например, при затоплении почв, в горах и других специфических условиях (Vartapetian, Jackson, 1997; Войцековская и др., 2010). При этом разные виды организмов по-разному реагируют на неспецифические условия, и ответная реакция проявляется не только на уровне целого организма, но и отдельные органы в определенной зависимости реагируют на недостаток кислорода в окружающей среде.

Важное значение в реакции растительной клетки на гипоксический стресс играют биохимические и молекулярные механизмы, которым в последнее время уделяется особое внимание. Исследуются механизмы контроля транскрипционной активности генов энзимов, обеспеченной действием различных специализированных факторов транскрипции (Wenger *et al.*, 2005). Данный контроль актуален в отношении ферментов окислительного и конструктивного метаболизма растительной клетки.

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, L-глутамат: НАД(Ф)-оксидоредуктаза, КФ 1.4.1.2), катализируя реакцию восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до L-глутамата (или обратную реакцию окислительного дезаминирования глутамата до 2-оксоглутаровой кислоты) принимает участие

в углеродном и азотном обмене, что связано с тем, что обусловлено важным значением глутамата в метаболизме аминокислот в организмах разного уровня организации (Dubois, *et al.*, 2003). Аммонийная группа глутамата является источником при переаминировании с образованием других аминокислот, кроме того, глутамат представляет собой субстрат для биосинтеза γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), аргинина, пролина и хлорофиллов (Forde, Lea, 2007, Shelp *et al.*, 2012).

Помимо этого, ГДГ является первым этапом ответвления дыхательного метаболического пути в сторону ГАМК-шунта (Bown, Shelp., 1997). 2-оксоглутарат является непосредственным субстратом катализируемой ГДГ реакции, из которого формируется глутамат, направляемый в дальнейшем на синтез ГАМК с помощью глутаматдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.15) (Fait *et al.*, 2008).

Регуляция активности глутаматдегидрогеназы на уровне экспрессии ее генов представляет собой механизм координации метаболизма глутамата в стрессовых условиях. Нативный белок ГДГ состоит из субъединиц α и β , каждая из которых детерминирована своим геном, которые объединяются в разных соотношениях с образованием гексамера, и эти комбинации создают разные изоферменты (Grabowska *et al.*, 2012). Актуальным представляется исследование механизмов

регуляции экспрессии генов ГДГ в листьях пшеницы в ответ на стрессовое воздействие гипоксии.

Цель работы — изучение регуляции транскрипционной активности гомеологичных генов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при адаптивной реакции клеточного метаболизма к гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали листья пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенные гидропонным способом при 12-часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов света $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, при температурном оптимуме 25°C.

Выявление гомологии исследуемых нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью Clustal Omega (Sievers, Higgins, 2014).

Гипоксические условия создавали на основе ранее разработанной методики, позволяющей получить содержание кислорода менее $\leq 0.5\%$ (Igamberdiev, Hill, 2008).

Митохондриальную фракцию получали методом дифференциального центрифугирования со средой выделения следующего состава: 50 мМ Трис-HCl буфера, pH 7.5, содержащий 0.3 М сахарозу, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ KCl и 4 мМ MgCl_2 . Осадок, содержащий в основном митохондрии и микротельца, ресуспендировали в 1 мл среды выделения без сахарозы и использовали для определения активности ГДГ спектрофотометрическим методом при 340 нм в среде, содержащей 13 мМ 2-оксоглутарат, 0.25 мМ НАДН, 1 мМ CaCl_2 , 50 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 мМ HEPES буфер pH 8.0 (Sarasketa *et al.*, 2016). Реакцию инициировали добавлением фермента. Контролем при определении активности ГДГ являлась среда спектрофотометрирования без субстрата (2-оксоглутарата), но содержащая белковый экстракт митохондрий.

Оценку степени загрязнения митохондриальной фракции проводили на основе анализа активности лактатдегидрогеназы — цитоплазматического фермента при 340 нм. Среда спектрофотометрирования была следующего состава: 0.05 М калий-фосфатный буфер (pH 7.5), 3 мМ пирувата натрия, 9 мМ НАДН (Епринцев и др., 2022).

РНК выделяли при помощи фенол-хлороформной экстракции с добавлением гуанидинтиоционата (Chomczynski, Sacchi, 1987).

Комплементарную ДНК получали методом обратной транскрипции с помощью коммерческого набора MMLV-R (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе LightCycler 96 (Roche, США), применяя в качестве красителя SYBR Green I. В качестве матрицы использовали

кДНК, полученную из 100 нг суммарной клеточной РНК. Амплификация гена фактора элонгации *EF-1 α* осуществлялась для контроля матрицы (Nicot *et al.*, 2005).

Опыты проводили в трех биологических и четырех аналитических повторностях. Данные были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием программного обеспечения для анализа данных STATISTICA версии 9 (Statsoft Wipro, East Brunswick, NJ, USA). Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений (SD). Обсуждаются статистически значимые различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследований влияния гипоксии на активность митохондриальной формы глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы проводились с учетом загрязнения фракции митохондрий цитоплазматической фракцией. Величина каталитической активности лактатдегидрогеназы в цитоплазме клеток листьев контрольных растений составляла 0.41 ± 0.017 Е/г сырой массы, в то время как в митохондриальной фракции данный показатель равнялся 0.043 ± 0.005 Е/г сырой массы. Выявленная степень загрязнения митохондриальной фракции составила 10.4% соответственно, что учитывалось при определении активности глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при разных условиях эксперимента.

Проведенное исследование по влиянию низких концентраций кислорода на функционирование ГДГ показало, что в первые часы инкубации растений в среде с низким содержанием кислорода и азотом в качестве преобладающего газа наблюдалось увеличение скорости функционирования исследуемого фермента по реакции аминирования. В первый час экспозиции в условиях азотной

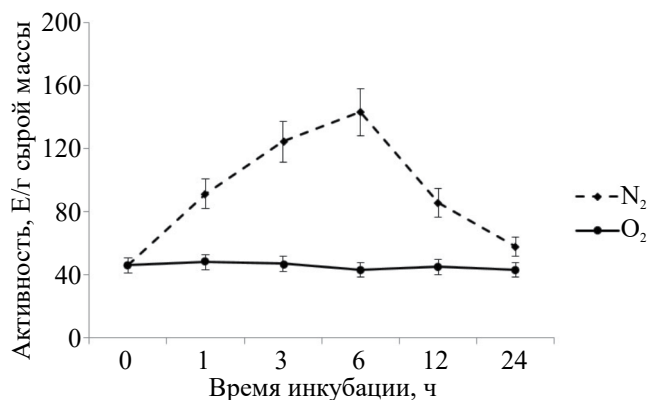


Рис. 1. Активность глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

Таблица 1. Субгеном-специфичные праймеры для глутаматдегидрогеназы *Triticum aestivum*

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность
<i>GDH-1(5A)</i>	Прямой	GTAATGTTGGCTCCTGGGCT
	Обратный	CGCAGCCTCGATGATGTACT
<i>GDH-1(5B)</i>	Прямой	CCCGTCGAAGTCACAACTCA
	Обратный	GTTTCACTCTCAGCCACGGA
<i>GDH-1(5D)</i>	Прямой	GAGTGGGTGCAGAACATCCA
	Обратный	CAGCATCTGTCAACGCACAC

среды увеличение каталитической активности ГДГ составило 1.89 раза относительно контрольных значений, характерных для растений, экспонируемых в нормальных условиях (рис. 1).

Дальнейшее пребывание растений в условиях среды азота также приводило к постепенному увеличению скорости функционирования глутаматдегидрогеназы вплоть до 6 часа, где анализируемый показатель достигал максимального значения 143.2 Е/г сырой массы. Однако стоит отметить, что после 6 часа пребывания растений пшеницы в среде азота происходило постепенное снижение величины активности ГДГ, и данный показатель в 24 часа составил 57.8 Е/г сырой массы.

Группа контрольных растений не демонстрировала значительных изменений общей ферментативной активности.

Для пшеницы установлено, что глутаматдегидрогеназа кодируется набором гомеологичных генов, расположенных на разных хромосомах. Ген *GDH-1* представлен аллелями в гомеологичных хромосомах: *GDH-1(5A)* (LOC123105375), расположен в 5A хромосоме и включает в свой состав 9 экзонов, *GDH-1(5B)* (LOC123113648), который локализован в 5B хромосоме и включает 9 экзонов, *GDH-1(5D)* (LOC123123357), который локализован в 5D хромосоме и включает 6 экзонов. Последовательности матричной РНК генов ГДГ *Triticum aestivum* были взяты из международной базы данных NCBI, на основании которых были разработаны специфические праймеры (табл. 1).

Относительный уровень транскриптов генов гомеологов глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы является неодинаковой. Наибольшая активность характерна для гена *GDH-1(5A)* (рис. 2). Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5B)* на 56% ниже такового показателя для гена *GDH-1(5A)*, но наименьший уровень экспрессии характерен для гена *GDH-1(5D)*.

Показано, что гипоксия влияет на регуляцию экспрессии генов исследуемой ферментной системы. После первого часа инкубации в среде азота не наблюдалось достоверно значимых изменений в содержании мРНК гена *GDH-1(5A)* в листьях

пшеницы (рис. 3). Однако в последующие часы экспозиции растений в среде азота было установлено увеличение анализируемого показателя относительно контроля и максимальное содержание транскриптов гена глутаматдегидрогеназы обнаружено на 6 час экспозиции. Исследуемый показатель составлял на 6 час эксперимента 1.78 ед., что свидетельствует об активации транскрипции исследуемого гена. После шестого часа эксперимента

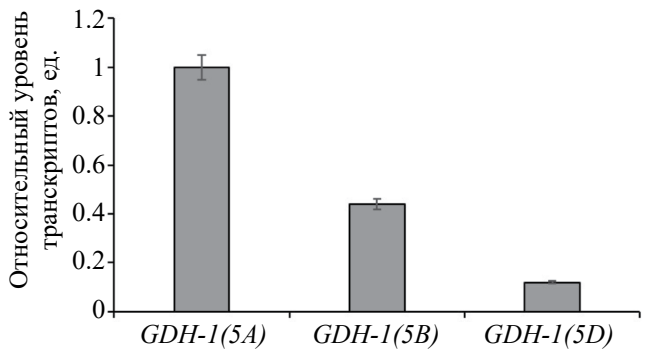


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов гомеологичных генов *GDH-1(5A)*, *GDH-1(5B)* и *GDH-1(5D)* глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы.

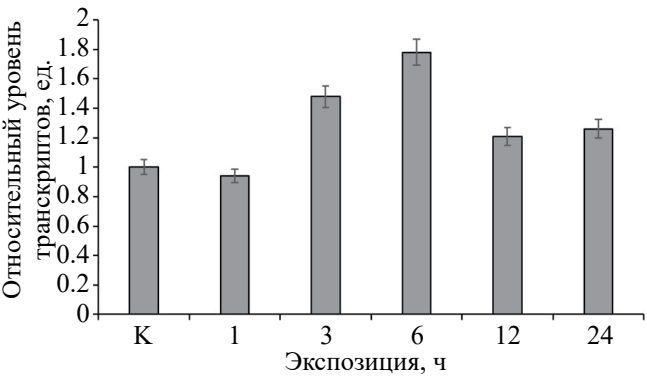


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

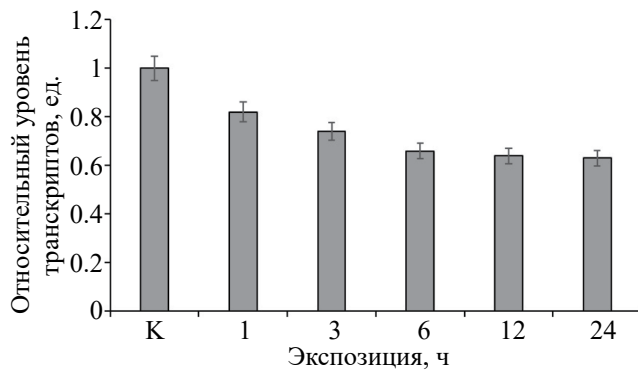


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5B)* в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

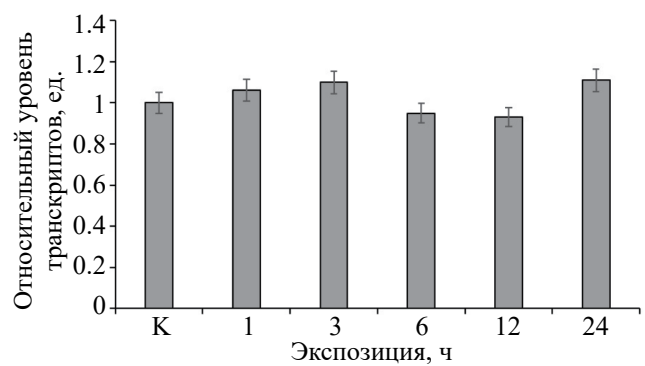


Рис. 5. Относительный уровень транскриптов гена *GDH-1(5D)* в листьях пшеницы в условиях гипоксии.

наблюдалось постепенное снижение относительного уровня транскриптов гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы.

Исследование относительного уровня транскриптов гена *GDH-1(5B)* глутаматдегидрогеназы в условиях недостатка кислорода показало уменьшение исследуемого показателя уже на первый час эксперимента. Снижение транскрипционной активности составило 18% относительно такового показателя в норме. Такое изменение экспрессии гена, кодирующего глутаматдегидрогеназу, подтверждает различие в ответной реакции транскрипционной активности генома пшеницы в ответ на действие гипоксического

стресса при регуляции гомеологичных генов. С 6 часа инкубации относительный уровень транскриптов исследуемого гена постепенно снижается, достигая минимальных значений (рис. 4). В условиях низкого содержания кислорода в среде снижение транскрипционной активности гена *GDH-1(5B)* к 24 часу эксперимента составило в 1.58 раз.

Незначительное уменьшение транскрипционной активности гена *GDH-1(5D)* наблюдалось на 6 и 12 часы эксперимента (рис. 5), когда уменьшение содержания его мРНК в листьях пшеницы при солевом стрессе на 6 и 12 час экспозиции составило 5–7% от контрольных значений.

ATACCGAGTAAAATGAGTGAATCTACGCTCTAAAACATGTCTATATAC
 ATTTATATGTAGTCTCTCTTAAAAACCAATATCTAAAAAGCCTTATATTT
 AGAAACGGAGGGAGCAGTACTTGACTGTTGACGGACATGTATTGTGAG
 CATGAAGTGTCAGGAATC**ACGTGTTACACGTG**CATGCATGCTCATCACC
 GTCAGCGTATCAGCAAATTGCCTGGCGCAAGCTGTGCAGCCGGTACAT
 CCACAGCTCAGTACATACATTGATACATACGTACATAGCACACCTAACC
 GATTTGAGCAGTAATCTGAAGTTGCCACATGCAGAGGCTTCCTTGAACA
 CTCACCTCCACTGACTTGTGGCTCAAATTCTGGGCATTTTCTCAGCAAA
 ACAAGCGCAGCTGTCGGCAGTCTGGATCTTCATTGATGTTGGCCCTA
 GAACAGTGATCATTTTGTAGTAGATGTTAGTAAGCTCCTAGCCCGGAAC
 TACTGAGCAGCGCTCCTCCTAGCCTAGCACCTCTTCTAAACTAAACAAA
 AGGGGAGGTGGTGCATTCTTGGCATAGATTGATGCTCTTCAATCTGGT
 ACTGGTAGGCTAGGAGTAGTAGTAAATTACGGTATTGAGTGAGTGCAGA
 CAGGGCTCGGGTCTCGAGGGAAATTAATTGCAGGCAGGGCGAGAATCA
 GATCTTGTCTTATCCTTGATAGAGACAAAAAAATTAATTTAAAG
 AAAAATCTCCTCTGCTTTTGAACGGAACCCAAATCCACCGAGGGGTTTC
 AGCCAGTGTCCTATATATGCATACGGCCTACCTGAAACTCCTCCATA
 GTCTTTGTGCCGCTGCTCGCCACTAACACTTCGCGGCTACTCCACTCGC
 CGGTAATATAAAGCAGATTATCCTTTGGTTCTCGCGCAGAGTTTAAT
 CTTTTTGTCTCGTGTGATTAGTGTTCTTGGATTGCTACCTATGATGTTGG
 GTTTCTGGATCCGTTTTTCAGGCGCGGGCGGCTCCGGAGGGGGGATTTTCG
 TCGGGCAGG**ATG**

Рис. 6. Последовательность промотора гена *GDH-1(5A)* с обозначением специфического сайта посадки транскрипционного фактора ответа HIF-1 (фактор ответа на гипоксию) (выделено серым). Стартовый кодон ATG выделен подчеркиванием.

Исследование нуклеотидных последовательностей промоторов гомеологичных генов глутаматдегидрогеназы пшеницы на предмет наличия в их составе специфических сайтов связывания с индуцируемым гипоксией фактором (HIF) (рис. 6), обуславливающим стресс-зависимый контроль активности генов-мишеней при недостатке кислорода, показало наличие таковых элементов в составе нуклеотидной последовательности промотора гена *GDH-1(5A)*.

Однако существует набор транскрипционных факторов, осуществляющих отрицательную регуляцию экспрессии генов-мишеней в условиях гипоксии при наличии в составе их промоторов специфического сайта – W-box (Turchi *et al.*, 2015).

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов гомеологов глутаматдегидрогеназы пшеницы позволил установить различие в содержании регуляторных *cis*-элементов, в частности W-box. Показано, что из трех гомеологичных генов *GDH-1(5A)*, *GDH-1(5B)* и *GDH-1(5D)* в составе нуклеотидной последовательности промотора W-box присутствует только в составе промотора гена *GDH-1(5B)* (рис. 7). Важно отметить, что располагается он от –103 до –96 положению, что играет ключевое значение его участия в отрицательной регуляции экспрессии данного гена-мишени, при гипоксическом стрессе (Seok *et al.*, 2022).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Глутаматдегидрогеназа катализирует обратимую реакцию аминирования/дезаминирования, которая может привести либо к синтезу, либо к катаболизму глутамата. Недавние исследования подтвердили, что как в молодых, так и в старых листьях табака глутамат синтезируется за счет комбинированного действия глутаминсинтазы и глутаматсинтазы, в то время как глутаматдегидрогеназа отвечает за деаминацию глутамата (Terce-Laforge, *et al.*, 2004, Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Альфа-аминогруппа

глутамата также может быть перенесена в пируват с образованием аланина под действием аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2). Было показано, что синтез аланина играет ключевую роль в ответе на гипоксию/аноксию (Ricoult *et al.*, 2006).

Ряд генов метаболизма азота сверхэкспрессируется при низком содержании кислорода, например, глутаматдегидрогеназа, глутаматдекарбоксилаза и глутаматсинтаза. Было показано, что они индуцируются на ранних стадиях стресса (0.5–6 ч) [1] и подавлялись, когда стресс длился более 20 часов (Klok *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2011).

Изменения ферментативной активности в стрессовых условиях может быть связано как с посттрансляционной конформацией белков, так и с изменением транскрипционной активности генов исследуемых ферментов.

Полиплоидия, и особенно аллополиплоидия, часто приводит к тому, что один субгеном становится доминирующим над другими, что проявляется в асимметрии экспрессии генов. В основе доминирования лежат различная степень метилирования субгеномов, модификации гистонов и плотность мобильных генетических элементов (Feldman *et al.*, 2012, Bird *et al.*, 2018). Около 30% триад генов-гомеологов пшеницы (включающих копии генов в А, В и D субгеномах) демонстрируют несбалансированные уровни экспрессии, с более высокой или более низкой экспрессией одного гомеолога по сравнению с двумя другими (Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2018).

Нами разработаны субгеном-специфичные праймеры для трех гомеологичных генов ГДГ у аллогексаплоидной пшеницы, позволяющие изучить экспрессию данных генов и провести оценку вклада каждого гомеолога фермента в организации метаболизма клетки пшеницы в условиях гипоксии. Полученные результаты анализа уровня транскриптов генов глутаматдегидрогеназы свидетельствуют, что наибольший вклад в формировании белкового компонента исследуемого фермента вносит ген *GDH-1(5A)*. Исследование уровня транскриптов

```
CCGCGCCACCGTCTCCGCGGCTGGGAGGCCTGATCGCTCGCCGGCCG
GCATCCTGCAATGCCCGTGCTCTCTCGCCGACTCCATGGGATCCCGTCTG
AAGTCACAACCTCAACAAAAAGTTCAATAATCGAGCCCGTGCGTTCTCTC
ATACATAAGCTCCGATCTCTTGGAGAGACCGGCAGAACAGTAGCGGCA
CCACCTTCTTCTTGTAATCCGTGGCTGAGAGTGAAACACAGCAATGATA
TTCGGTTTCTTTTCTTGGTAACATTTGATCGTGTTTATGATGCGTGAGTC
GCTTTTATTAGCATCGCATGGCAACAAGCCGGCCAACAAGGTCATG
```

Рис. 7. Последовательность промотора гена *Gdh-1(5B)* с обозначением специфического *cis*-элемента (выделено серым с зачеркиванием) отрицательной регуляции экспрессии при гипоксии. Стартовый кодон ATG выделен подчеркиванием.

гена глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы в среде с азотом показало определенную зависимость. Результаты исследования свидетельствуют о зависимости уровня транскриптов гена глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы от кислородного режима растений. Снижение содержания кислорода в среде инкубации растений приводит к увеличению содержания мРНК гена *GDH-1(5A)*, что коррелирует с активацией исследуемого фермента. Проведенное исследование динамики относительного уровня транскриптов гомеологического гена *GDH-1(5D)*, кодирующего глутаматдегидрогеназу пшеницы, показало минимальное отклонение величины его экспрессии относительно контрольных значений при гипоксии.

Индуклируемый гипоксией фактор (HIF) — фактор транскрипции имеет решающее значение для регуляции генов-мишеней в ответ на гипоксию. Индуцируемым гипоксией фактор 1 (HIF-1) представляет собой димер HIF-1 α и ARNT (HIF-1 β), который связывается с элементами ответа на гипоксию (HRE), расположенными в регуляторной области чувствительных генов, тем самым стимулируя их транскрипцию. Основная последовательность сайта связывания HIF-1 (5'-A/GCGTG-3') соотносится с последовательностью HRE (5'-CACG(T/C)-3'), обеспечивающих контроль экспрессии гипоксически-зависимых генов (Wenger *et al.*, 2005; Xia, Kungr 2009). Наличие двух специфических сайтов HIF-1 в составе промотора гена *GDH-1(5A)* способствует изменению экспрессии данного гена в условиях гипоксии, что проявляется в увеличении его мРНК в клетках листьев пшеницы. При этом отсутствие сайтов связывания HIF-1 в промоторах двух других гомеологических генов соотносится с отсутствием их активации при недостатке кислорода.

Кроме того, исследование нуклеотидных последовательностей промоторов генов ГДГ пшеницы показало наличие в составе *GDH-1(5B)* отрицательного цис-регуляторного элемента на гипоксию (5'-AATGATA-3', W-box) (Turchi *et al.*, 2015) в области инициации транскрипции. Важное значение в осуществлении данного типа регуляции играет именно положение W-box на нуклеотидной последовательности промотора, в частности, для осуществления регуляции он должен находиться в положении от -116 до -2 в промоторе (Seok *et al.*, 2022).

Исследование нуклеотидной последовательности промотора гена *GDH-1(5D)* на наличие в его составе *cis*-элементов отрицательной и положительной регуляции показало их отсутствие. Стабильный уровень его экспрессии в листьях пшеницы при гипоксическом стрессе обусловлен отсутствием взаимодействия с ним гипоксически-зависимых транскрипционных факторов с соответствующими регуляторными *cis*-элементами.

Проведенные исследования регуляции функционирования глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы при гипоксическом стрессе свидетельствуют о четкой реакции клеточного метаболизма на недостаток кислорода. Установлено, что в условиях гипоксического стресса активируется ГДГ, как компонент ГАМК-шунта, что подтверждают полученные данные по изменению каталитической активности данного фермента, так и изменение транскрипционной активности генов. Особое значение в активации ГДГ при гипоксии играет ген *GDH-1(5A)*, активация которого обеспечивает формирование необходимого количества белковых компонентов ГДГ. Активация ГАМК-шунта обеспечивает образование полуальдегида янтарной кислоты в митохондриальном матриксе, который превращается либо в сукцинат под действием дегидрогеназы полуальдегида янтарной кислоты и поступает в ЦТК для поддержания энергетических потребностей клеточных процессов (Greenway, Gibbs, 2003), либо же в γ -гидроксимасляную кислоту (ГМК) и направляется на биосинтетические процессы или выступает в качестве сигнальной молекулы (Miyashita, Good 2008). Индукция и координация экспрессии генов, реагирующих на гипоксию, находятся под контролем факторов транскрипции, принадлежащих к факторам ответа этилена группы VII (ERFs), RAP2.2, RAP2.3, RAP2.12, HRE1 и HRE2 (Bailey-Serres *et al.*, 2012, Limami *et al.*, 2014, Van Dongen, Licausi, 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы было выявлено влияние недостатка кислорода на функционирование глутаматдегидрогеназы в листьях пшеницы. Установлено изменение ферментативной активности исследуемой ферментной системы в листьях пшеницы в среде азота, что указывает на стресс-индуцированное изменение активности ГДГ.

Гипоксические условия также оказывают значительные изменения в функционировании ГДГ в среде, содержащей азот, и при этом наблюдается увеличение ферментативной активности в первые 6 часов экспозиции, что вызывает вовлечение в адаптивную реакцию клеточного метаболизма глутаматдегидрогеназы. При недостатке кислорода наблюдается значительная активация азотного метаболизма, что требует увеличения синтеза глутамата, как первичной аминокислоты. Данный синтез обеспечивает ГДГ, осуществляя отток 2-оксоглутарата из ЦТК. Альфа-аминогруппа глутамата также может быть перенесена в пируват с образованием аланина под действием аланинаминотрансферазы. Было показано, что синтез аланина играет ключевую роль в ответе на гипоксию. Кроме того, показано изменение содержания транскриптов

гена, кодирующего ГДГ в листьях пшеницы в условиях гипоксии. Увеличение содержания мРНК гена *GDH-1(5A)* в листьях пшеницы при воздействии на растения гипоксических условий наблюдается в первые часы эксперимента, что соотносится с изменением каталитической активности глутаматдегидрогеназы. Полученные результаты по анализу активности ГДГ и уровня экспрессии его гена свидетельствуют о регуляции его функционирования за счет изменения экспрессии генетического материала клетки.

Полученные результаты оценки наличия регуляторных элементов, обеспечивающих контроль гипоксического ответа, в составе нуклеотидных последовательностей промоторов генов гомеологов глутаматдегидрогеназы пшеницы, свидетельствуют о тонком механизме контроля их транскрипционной активности на уровне взаимодействия с соответствующими транскрипционными факторами. Установлено, что активация гена *GDH-1(5A)* в условиях гипоксии обусловлена наличием в составе его промотора положительного регуляторного *cis*-элемента HRE для фактора HIF-1. Данный элемент обнаружен только в составе промотора гена *GDH-1(5A)*, что соотносится с увеличением его транскрипционной активности в условиях гипоксии в листьях пшеницы уже с первого часа эксперимента.

Кроме того, в составе промотора гена *GDH-1(5B)* обнаружен отрицательно регулирующий *cis*-элемент – W-box, который не был обнаружен в составе промоторов других анализируемых в работе генов. Данный *cis*-элемент располагается в инициации транскрипции, что способствует угнетению экспрессии данного гена с первых часов экспозиции растений в условиях недостатка кислорода. Таким образом, установлено, что регуляция работы ГДГ при действии стрессового фактора, такого как гипоксия, осуществляется с помощью регуляции уровня транскриптов гомеологичных генов исследуемого фермента, осуществляемая при участии гипоксически индуцируемых факторов транскрипции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Войцекская С.А., Сотникова Н.В., Верхотурова Г.С., Зайцева Т.А., Боровикова Г.В., Астафурова Т.П. Особенности метаболической адаптации у растений амаранта в условиях гипобарической гипоксии // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 5. С. 106–111.
- Епринцев А.Т., Бондарева И.Р., Селиванова Н.В. Уровни экспрессии и активность изоферментов лактатдегидрогеназы печени крыс при аллоксановом диабете // Биомедицинская химия. 2022. Т. 68. С. 32–38.
DOI: 10.18097/PBMC20226801032
- Bailey-Serres J., Fukao T., Gibbs D.J., Holdsworth M.J., Lee S.C., Licausi F., Perata P., Voisenek L.A.C.J., van Dongen J.T. Making sense of low oxygen sensing // Trends Plant Sci. 2012. V. 17. P. 129–138.
DOI: 10.1016/j.tplants.2011.12.004.
- Bird K.A., VanBuren R., Puzey J.R., Edger P.P. The causes and consequences of subgenome dominance in hybrids and recent polyploids // New Phytologist. 2018. V. 220. P. 87–93.
DOI: 10.1111/nph.15256.
- Bown A.W., Shelp B.J. The metabolism and functions of g-aminobutyric acid // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 1–5.
DOI: 10.1016/s1360-1385(99)01486-7.
- Chomczynski P., Sacchi N. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Dubois F., Terce-Laforgue T., Begona G.-M. M., Estavillo J.-M. Glutamate dehydrogenase in plants; is there a new story for an old enzyme? // Plant Physiol. Biochem. 2003. V. 41. P. 565–576.
DOI: 10.1016/S0981-9428(03)00075-5
- Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A.R. High way or by way: the metabolic role of the GABA shunt in plants // Trends Plant Sci. 2008. V. 13. P. 14–19.
DOI: 10.1016/j.tplants.2007.10.005.
- Feldman M., Levy A.A., Fahima T., Korol A. Genomic asymmetry in allopolyploid plants: wheat as a model // Journal of experimental botany. 2012. V. 63. P. 5045–5059.
DOI: 10.1093/jxb/ers192.
- Forde B., Lea P. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling // Journal of Experimental Botany. 2007. V. 58. P. 2339–2358.
DOI: 10.1093/jxb/erm121.

- Grabowska A., Kwinta J., Bielawski W.* Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in triticale seeds: molecular cloning and genes expression // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2012. V. 34. P. 2393–2406.
DOI: 10.1007/s11738-012-1085-9
- Greenway H., Gibbs J.* Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintainance and energy distribution to essential processes // *Funct. Plant Biol.* 2003. V. 30. P. 999–1036.
DOI: 10.1071/PP98096
- Igamberdiev A. U., Hill R. D.* Plant mitochondrial function during anaerobiosis // *Annals of Botany*. 2008. V. 103. P. 259–268.
DOI: 10.1093/aob/mcn100
- Klok E. J., Wilson I. W., Wilson D., Chapman S. C., Ewing R. M., Somerville S. C., Peacock W. J., Dolferus R., Dennis E. S.* Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures // *Plant Cell*. 2002. V. 14. P. 2481–2494.
DOI: 10.1105/tpc.004747
- Limami A. M., Diab H., Lothier J.* Nitrogen metabolism in plants under low oxygen stress // *Planta*. 2014. V. 239. P. 531–541.
DOI: 10.3390/plants5020025
- Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J., Valadier M.-H., Feraud M., Joulet T., Suzuki A.* Glutamine synthetase–glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. P. 444–456.
DOI: 10.1104/pp.105.071910
- Miyashita Y., Good A.* NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of Arabidopsis thaliana during dark-induced carbon starvation // *Journal of Experimental Botany*. 2008. V. 59. P. 667–680.
DOI: 10.1093/jxb/erm340
- Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D.* House-keeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress // *J. of Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 2907–2914.
DOI: 10.1093/jxb/eri285
- Ramirez-Gonzalez R. H., Borrill P., Lang D., Harrington S. A., Brinton J., Venturini L., Davey M., Jacobs J., van Ex F., Pasha A., Khedikar Y., Robinson S. J., Cory A. T., Florio T., Concia L., Juery C., Schoonbeek H., Steuernagel B., Xiang D., Ridout C. J., Chalhou B., Mayer K. F. X., Benhamed M., Latrasse D., Bendahmane A., Wulff B. B. H., Appels R., Tiwari V., Datla R., Choulet F., Pozniak C. J., Provart N. J., Sharpe A. G., Paux E., Spannagl M., Bräutigam A., Uauy C.* The transcriptional landscape of polyploid wheat // *Science*. 2018. V. 361: eaar6089.
DOI: 10.1126/science.aar6089
- Sarasketa A., Gonzalez-Moro M. B., Gonzalez-Murua C., Marino D.* Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in Arabidopsis // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7:29.
DOI: 10.3389/fpls.2016.00029
- Seok H.-Y., Tran H. T., Lee S.-Y., Moon Y.-H.* AtERF71/HRE2, an Arabidopsis AP2/ERF transcription factor gene, contains both positive and negative cis-regulatory elements in its promoter region involved in hypoxia and salt stress responses // *Int J Mol Sci.* 2022. V. 23: 5310.
DOI: 10.3390/ijms23105310
- Shelp B. J., Mullen R. T., Waller J. C.* Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. P. 57–59.
DOI: 10.1016/j.tplants.2011.12.006
- Sievers F., Higgins D. G.* Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences // *Methods Mol Biol.* 2014. V. 1079. P. 105–116.
DOI: 10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Terce-Laforgue T., Mack G., Hirel B.* New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants grown under different nitrogen regimes // *Physiol. Plant.* 2004. V. 120. P. 220–228.
DOI: 10.1111/j.0031-9317.2004.0241.x
- Turchi L., Baima S., Morelli G., Ruberti I.* Interplay of HD-Zip II and III transcription factors in auxin-regulated plant development // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. P. 5043–5053.
DOI: 10.1093/jxb/erv174
- Van Dongen J. T., Licausi F.* Oxygen sensing and signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. V. 66. P. 345–367.
DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114813
- Vartapetian B., Jackson M.* Plant adaptations to anaerobic stress // *Annals of Botany*. 1997. V. 79. P. 3–20.
DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a010303
- Wenger R. H., Stiehl D. P., Camenisch G.* Integration of oxygen signaling at the consensus HRE // *Sci. STKE*. 2005. V. 306: re12.
DOI: 10.1126/stke.3062005re12
- Xia X., Kungr A. L.* Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia // *Genome Biol.* 2009. V. 10: R113.
DOI: 10.1186/gb-2009-10-10-r113
- Yang C. Y., Hsu F.-C., Li J.-P., Wang N.-N., Shih M.-C.* The AP2/ERF transcription factor AtERF73/HRE1 modulates ethylene responses during hypoxia in Arabidopsis // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 202–212.
DOI: 10.1104/pp.111.172486

Molecular aspects of regulation of expression of homeologic glutamate dehydrogenase genes in wheat leaves under hypoxia

© 2023 D. N. Fedorin, A. T. Eprintsev[@]

*Voronezh State University,
Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018 Russia
[@]E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

An increase in GDH activity has been established when plants are exposed to hypoxic conditions in the first 6 hours, which ensures the formation of an adaptive response of cellular metabolism to the lack of oxygen in the cell. A difference in the transcriptional activity of homeologous *GDH-1* genes in wheat leaves under stress conditions was shown. An increase in the mRNA content of the *GDH-1(5A)* gene in wheat leaves when plants are exposed to hypoxic conditions is observed in the first hours of the experiment, which correlates with a change in the catalytic activity of glutamate dehydrogenase. Regulation of this gene is carried out by the transcription factor HIF, the specific landing site of which is found in the transcription initiation site of the promoter of this gene.

Keywords: glutamate dehydrogenase, wheat, hypoxia, regulation, gene, expression, promoter