

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ГАМК-ШУНТА ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЗЕЛЕННЫЕ ЛИСТЬЯ КУКУРУЗЫ (*ZEAMAYS*L.)

П.П.Москвина,З.Н.Шахов, Г.Б. Анохина, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Аннотация. ГАМК-шунт – это анаплеротический путь цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), который играет важную роль в адаптации растений к абиотическим стрессам, включая гипоксию. Он состоит из нескольких ферментов: глутаматдекарбоксилазы (ГДК, КФ 4.1.1.15), ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т, КФ 2.6.1.19) и сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы (ССАДГ, КФ 1.2.1.24). Глутаматдегидрогеназа (ГАД, КФ 1.4.1.2) обеспечивает сопряжение между работой ГАМК-шунта и ЦТК. ГАМК-шунт позволяет обходить 2 реакции ЦТК в связи со снижением активности 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (КФ 1.2.1.105), обеспечивая альтернативный путь утилизации углерода и поддержания энергетического баланса клетки в условиях недостатка кислорода. При гипоксии активация ГАМК-шунта способствует стабилизации уровня восстановленных эквивалентов и поддержанию окислительного фосфорилирования. Нами было изучено влияние гипоксии на активность и экспрессию генов ферментов ГАМК-шунта (глутаматдегидрогеназы, глутаматдекарбоксилазы, ГАМК-трансаминазы и сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы) в листьях кукурузы. Показано, что гипоксия вызывает изменения в активности и экспрессии генов ферментов ГАМК-шунта, а также влияет на метилирование генов глутаматдегидрогеназы. Было выяснено, что растительная клетка адаптируется к недостатку кислорода на транскрипционном и эпигенетическом уровнях.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, глутаматдекарбоксилаза, ГАМК-трансаминаза, сукцинатсемиальдегиддегидрогеназа, ГАМК-шунт, гипоксия, экспрессия, метилирование

FUNCTIONING OF GABA SHUNT ENZYMES UNDER HYPOXIC STRESS IN MAIZE GREEN LEAVES (*ZEAMAYS* L.)

Moskvina P.P., Shakhov Z.N., Anokhina G.B., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh, Russia

Abstract: The GABA shunt is an anaplerotic pathway of the tricarboxylic acid cycle (TCA) that plays a critical role in plant adaptation to abiotic stresses, including hypoxia. It comprises several key enzymes: glutamate decarboxylase (GAD, EC 4.1.1.15), GABA transaminase (GABA-T, EC 2.6.1.19), and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH, EC 1.2.1.24). Glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) facilitates the coupling between the GABA shunt and the TCA

cycle. The GABA shunt bypasses two reactions of the TCA cycle due to reduced activity of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (EC 1.2.1.105), providing an alternative route for carbon utilization and maintaining cellular energy balance under oxygen-deficient conditions. Under hypoxia, activation of the GABA shunt promotes the stabilization of the redox state and supports oxidative phosphorylation. We investigated the effect of hypoxia on the activity and gene expression of GABA shunt enzymes (glutamate dehydrogenase, glutamate decarboxylase, GABA transaminase, and succinic semialdehyde dehydrogenase) in maize leaves. Our results demonstrate that hypoxia induces alterations in the activity and gene expression of GABA shunt enzymes, and also influences the methylation patterns of glutamate dehydrogenase genes. It was elucidated that plant cells adapt to oxygen deficiency at the transcriptional and epigenetic levels.

Keywords: glutamate dehydrogenase, glutamate decarboxylase, GABA transaminase, succinic semialdehyde dehydrogenase, GABA shunt, hypoxia, expression, methylation

Введение.

Гипоксия является серьезной проблемой для сельскохозяйственных культур[4]. Затопление и прочие факторы, ограничивающие доступ кислорода к корням растений, приводят к нарушению энергетического метаболизма, снижению роста и, как следствие, к существенным потерям урожая [6]. Изучение механизмов адаптации растений к гипоксии является крайне важной задачей для обеспечения населения продовольствием в местах, где особенности ландшафта и почвы предрасполагают к произрастанию сельскохозяйственных культур в условиях недостатка кислорода.

Одним из ключевых метаболических путей, позволяющих растениям выживать в условиях недостатка кислорода, является ГАМК-шунт. Этот альтернативный путь метаболизма углерода позволяет обходить 2 реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), тем самым стабилизируя энергизацию клетки в период нехватки терминального акцептора электронов в электрон-транспортной цепи[8]. ГАМК-шунт также играет важную роль в нейтрализации токсичных метаболитов, накапливающихся при анаэробном метаболизме[2].

Особое значение имеет глутаматдегидрогеназа – фермент, катализирующий превращение 2-оксоглутарата в глутамат[9]. Благодаря обратимости реакции ГДГ, возможно переключение метаболизма с ЦТК на ГАМК-шунт и наоборот. Изучение регуляции активности и экспрессии генов ферментов ГАМК-шунта, а также их роли в адаптации растений к гипоксии, является перспективным направлением для разработки методов повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к дефициту кислорода. В частности, исследование эпигенетических механизмов экспрессии 2 генов глутаматдегидрогеназы *GDH-1*, *GDH-2* интересно для углубления понимания того, как клетка перестраивает метаболические пути при первичном ответе на стресс.

Цель исследования. Целью исследования являлось определение каталитической активности и паттернов экспрессии генов ферментов ГАМК-шунта: глутаматдегидрогеназы (*GDH-1*, *GDH-2*), глутаматдекарбоксилазы (*GAD-1*), ГАМК-трансаминазы (*GTA-1*, *GTA-2*) и сукцинатсемиаальдегиддегидрогеназы (*SSADH-1*, *SSADH-2*), а также изучение эпигенетической регуляции генов *GDH-1*, *GDH-2* глутаматдегидрогеназы.

Материалы и методы исследования.

Для постановки эксперимента по созданию гипоксических условий 14-дневные проростки кукурузы (*Zeamays* L.) помещались в вакуумные эксикаторы, в которые осуществляли подачу газовых сред: в контрольную группу проростков поступал кислород (группа №1), к опытным образцам - азот (группа №2) из коммерческого баллона. Концентрация кислорода в коммерческом баллоне, содержащем азот, согласно сертификату соответствия, составила $\leq 0,5\%$. Отбор нулевых проб производили до начала эксперимента, после начала инкубации пробы отбирались спустя 1, 3, 6, 12, 24 часа от начала эксперимента [1].

Выделение суммарной РНК проводилось путем фенол-хлороформной экстракции[5]. Экстракция ДНК осуществлялась с применением ЦТАБбуфера для лизиса [10]. Конверсия ДНК в присутствии бисульфита натрия проводилась по методике Zhang Y. с соавторами [12]. Метил-специфичная ПЦР с метил-специфичными праймерами проводили с помощью набора реактивов qPCRmix (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР с обратной транскрипцией осуществляли с реактивами коммерческого набора MMLV RT kit (ЗАО «Евроген») согласно прилагаемой производителем инструкции. Полученную комплиментарную ДНК использовали для проведения ПЦР в реальном времени на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) с применением Taq-полимеразы (ЗАО «Евроген») согласно рекомендациям производителя. Для исследования активности глутаматдегидрогеназы проводили спектрофотометрический анализ по прямой реакции. Измеряли оптическую плотность при длине волны 340 нм [7]. Измерение активности глутаматдекарбоксилазы осуществляли спектрофотометрически путем при длине волны 620 нм в течение 3 минут [11]. Активность ГАМК-трансаминазы определяли по измерению оптической плотности спектрофотометрическим методом при 340 нм [3]. Оптическую плотность определяли против контроля, содержащего все компоненты смеси за исключением субстрата – ГАМК.

Результаты исследования и их обсуждение.

В ходе исследования по влиянию низких концентраций кислорода на функционирование глутаматдегидрогеназы было установлено, что начиная с первого часа гипоксического воздействия наблюдалось увеличение каталитической активности фермента (Рис. 1).

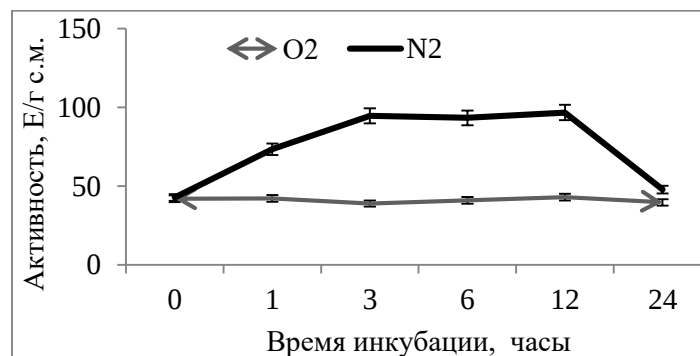


Рис. 1. Изменение общей ферментативной активности ГДГ в проростках кукурузы при гипоксии

В ходе анализа промоторов генов *GDH-1* и *GDH-2* на присутствие CpG-островков было установлено, что в промоторе гена *GDH-1* нет ни одного островка, а в составе промотора гена *GDH-2* найдено два островка. Гипоксия вызывает первоначальную

инактивацию гена *GDH-1* в два раза, однако к третьему часу транскрипция гена сменяется активацией. На 6 час инкубации отмечается максимальный уровень транскриптов исследуемого гена, что обусловлено снижением метилирования CpG-динуклеотидов в составе промотора до 25% (Рис. 3). Исследование динамики экспрессии гена *GDH-2* показало, что уже в первые часы инкубации проростков кукурузы в среде с низким содержанием кислорода ген инактивируется, что обусловлено изменением метильного статуса CpG-динуклеотидов в составе промотора гена (Рис. 4).

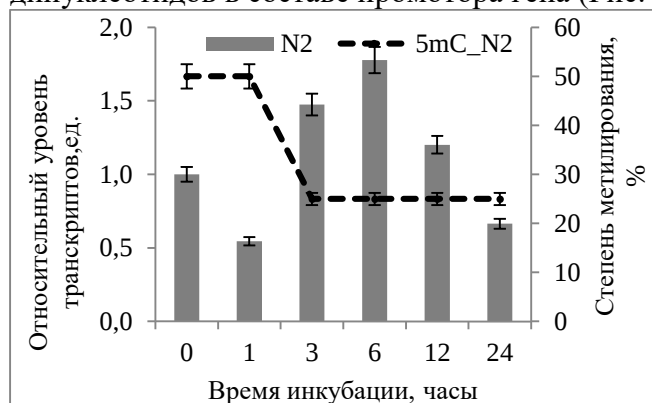


Рис. 3. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH-1* в проростках кукурузы в условиях гипоксии

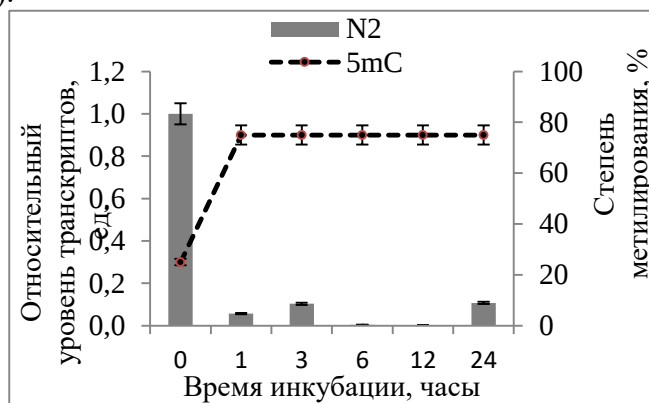


Рис. 4. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *GDH-2* в проростках кукурузы в условиях гипоксии

Анализ динамики активности глутаматдекарбоксилазы позволил выявить активацию ферментативной системы с первого часа инкубации проростков кукурузы в условиях низкой концентрации кислорода (Рис. 5). Анализ относительного уровня транскриптов гена *GAD-1* в листьях кукурузы показал увеличение уровня мРНК исследуемого гена начиная с первого часа стрессового воздействия (Рис. 6). Максимум зарегистрирован на 3 час эксперимента.

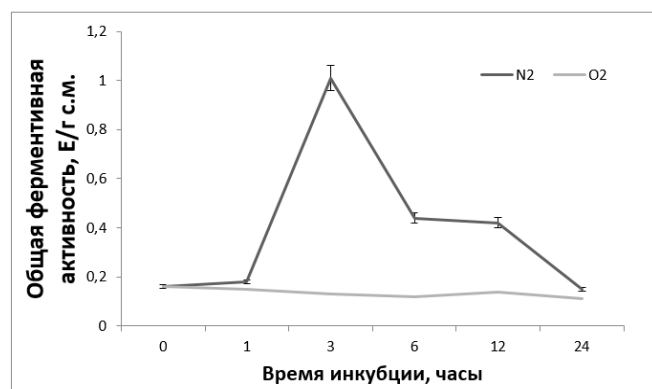


Рис. 5. Изменение общей ферментативной активности ГДК в проростках кукурузы при гипоксии

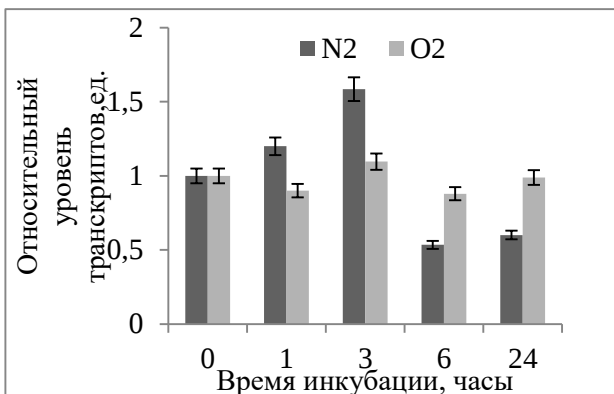


Рис. 6. Изменение относительного уровня транскриптов гена *GAD-1* в листьях кукурузы при гипоксии

Анализ влияния низких концентраций кислорода на ферментативную активность ГАМК-Т показал, что начиная с 3 часа инкубации происходит увеличение каталитической активности фермента, которая сохраняется до окончания эксперимента (Рис. 7).

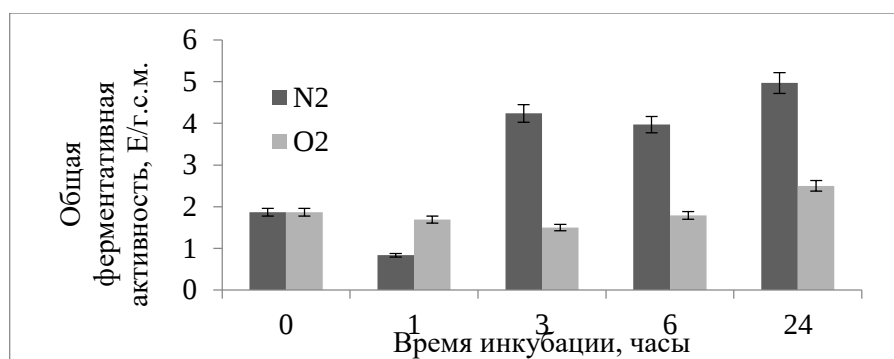
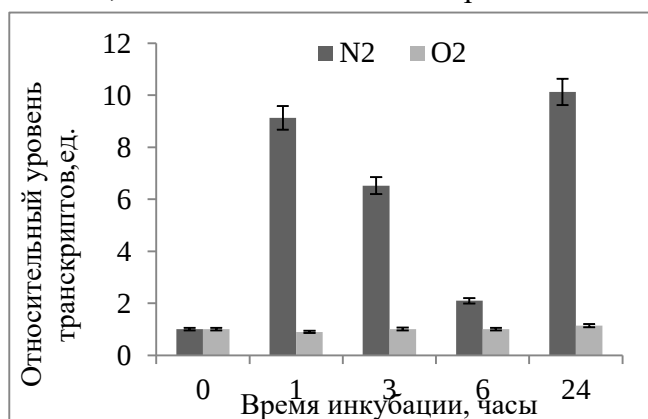


Рис. 7. Изменение общей ферментативной активности ГАМК-Т при гипоксии

Гипоксическое воздействие приводит к увеличению экспрессии гена *GTA-1* ГАМК-трансаминазы с первого часа эксперимента, превышая контрольные значения более чем в 9 раз, пик активности гена приходится на 24 час инкубации (Рис. 8). Недостаток кислорода также повышает экспрессию гена *GTA-2* ГАМК-Т с первых часов воздействия гипоксии, однако, пик активности *GTA-2* приходится на



6 час инкубации (Рис.9).

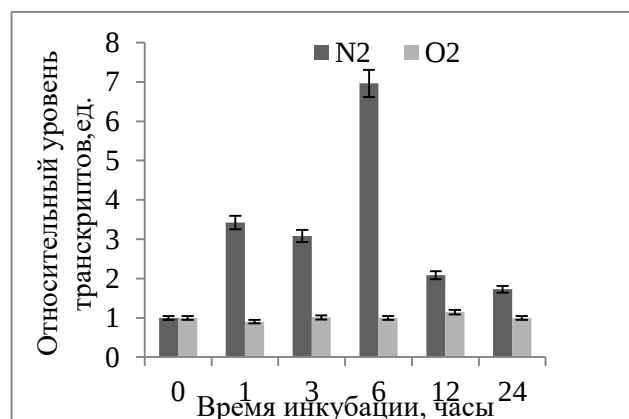
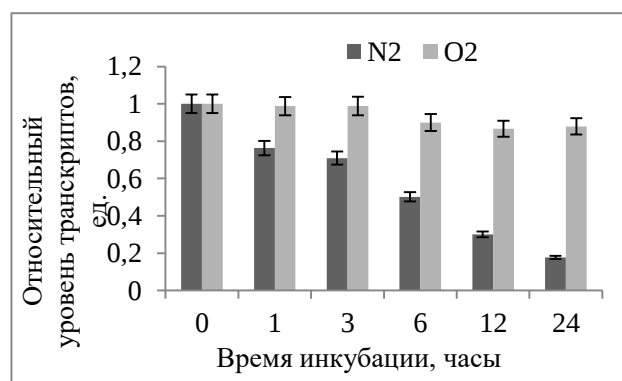
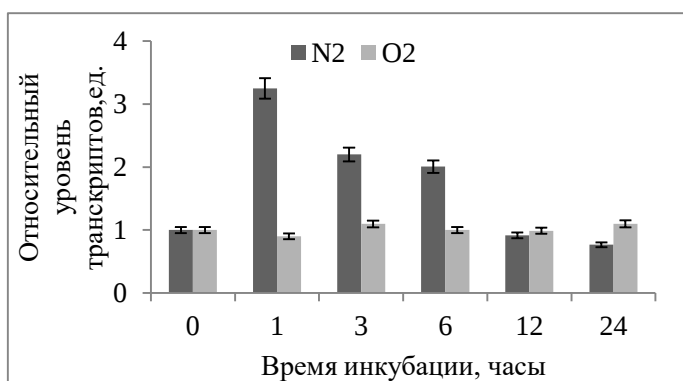


Рис. 8. Динамика экспрессии гена *GTA-1* ГАМК-трансаминазы при гипоксии

Рис. 9. Динамика экспрессии гена *GTA-2* ГАМК-трансаминазы при гипоксии

Гипоксическое воздействие оказывает противоположное влияние на экспрессию генов ССАДГ. Уровень транскриптов гена *SSADH-1* увеличивается с первого часа эксперимента в 3,2 раза, превышая контрольные значения вплоть до 6 часа эксперимента (Рис. 10). Ген *SSADH-2* снижает свою активность на протяжении всего периода инкубации (Рис. 11).



Заключение.

Представленные результаты показывают, что гипоксия вызывает существенные изменения в активности и экспрессии генов ферментов ГАМК-шунта в листьях кукурузы.

Контроль ферментативной активности глутаматдегидрогеназы осуществляется на эпигенетическом уровне за счет изменения метильного статуса промоторов генов. Экспрессия гена GAD-1 глутаматдекарбоксилазы повышается уже с первого часа инкубации в условиях пониженного содержания кислорода, что указывает на участие ГДК в адаптации растений к гипоксии, обеспечивая накопление ГАМК в цитоплазме. Каталитическая активность ГАМК-трансаминазы достигает максимума на 24 час инкубации в гипоксических условиях, однако повышение транскриптов гена GAD-1 наблюдается с первого часа эксперимента. Ген ССАДГ SSADH-1 начинает активно экспрессироваться с первого часа эксперимента, что, предположительно, ассоциировано с накоплением в клетке цитотоксичного полуальдегида янтарной кислоты, который нейтрализуется преобразованием в сукцинат посредством ССАДГ. Ген SSADH-2 не принимает участия в ответе на гипоксию.

Дальнейшие исследования необходимы для полного понимания молекулярных механизмов регуляции ГАМК-шунта и его роли в адаптации растений к гипоксии.

Список литературы

1. Москвина П. П., Анохина Г. Б., Епринцев А. Т. Влияние низких концентраций кислорода на изменение уровня экспрессии гена GAD1 глутаматдекарбоксилазы в листьях кукурузы // Вестник ВГУ, серия: химия. биология. фармация, – 2024. – С. 38-44.
2. Ansari M. I. et al. GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress // Plant Growth Regulation. – 2021. – Т. 94. – С. 131-149.
3. Jalil S. U., Khan M. I. R., Ansari M. I. Role of GABA transaminase in the regulation of development and senescence in Arabidopsis thaliana // Current Plant Biology. – 2019. – Т. 19. – С. 100119.
4. Loreti E., Striker G. G. Plant responses to hypoxia: signaling and adaptation // Plants. – 2020. – Т. 9. – №. 12. – С. 1704.
5. Matz M. V. Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes // Green Fluorescent Protein. – Humana Press. – 2002. – P. 3-18.
6. Salvatierra A. et al. Keep calm and survive: Adaptation strategies to energy crisis in fruit trees under root hypoxia // Plants. – 2020. – Т. 9. – №. 9. – С. 1108.
7. Sarasqueta Gómez A. et al. Nitrogen Source and External Medium pH Interaction Differentially Affects Root and Shoot Metabolism in Arabidopsis // Front. Plant Sci.. 2016. – V. 7. – P. 1–12.
8. Shelp B. J. et al. GABA shunt in developing soybean seeds is associated with hypoxia // Physiologia Plantarum. – 1995. – Т. 94. – №. 2. – С. 219-228.
9. Srivastava H. S., Singh R. P. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants // Phytochemistry. – 1987. – Т. 26. – №. 3. – С. 597-610.

10. Štorchová H. et al. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution //Taxon. – 2000. – T. 49. – №. 1. – C. 79-84.
11. Yu K. et al. A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase //Enzyme and microbial technology. – 2011. – T. 49. – №. 3. – C. 272-276.
12. Zhang Y. et al. DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones //DNA Methylation: Methods and Protocols. – 2009. – C. 177-187.

References

1. Moskvina P., Anokhina G. B., Eprintsev A. Vliyanie nizkikh koncentratsiy kisloroda na izmenenie urovnya ekspressii gena GAD1 glutamatdekarboksilazy v list'yakh kukuruzy // Vestnik VGU, seriya: khimiya. biologiya. farmatsiya, – 2024. – P. 38-44.
2. Ansari M. I. et al. GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress //Plant Growth Regulation. – 2021. – Vol. 94. – P. 131-149.
3. Jalil S. U., Khan M. I. R., Ansari M. I. Role of GABA transaminase in the regulation of development and senescence in Arabidopsis thaliana //Current Plant Biology. – 2019. – Vol. 19. – P. 100119.
4. Loreti E., Striker G. G. Plant responses to hypoxia: signaling and adaptation //Plants. – 2020. – Vol. 9. – №. 12. – P. 1704.
5. Matz M. V. Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes //Green Fluorescent Protein. – Humana Press. – 2002. – P. 3-18.
6. Salvatierra A. et al. Keep calm and survive: Adaptation strategies to energy crisis in fruit trees under root hypoxia //Plants. – 2020. – Vol. 9. – №. 9. – P. 1108.
7. Sarasqueta Gómez A. et al. Nitrogen Source and External Medium pH Interaction Differentially Affects Root and Shoot Metabolism in Arabidopsis //Frontiers in Plant Science. 2016. – Vol. 7. – P. 1–12.
8. Shelp B. J. et al. GABA shunt in developing soybean seeds is associated with hypoxia //Physiologia Plantarum. – 1995. – Vol. 94. – №. 2. – P. 219-228.
9. Srivastava H. S., Singh R. P. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants //Phytochemistry. – 1987. – Vol. 26. – №. 3. – P. 597-610.
10. Štorchová H. et al. An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution //Taxon. – 2000. – Vol. 49. – №. 1. – P. 79-84.
11. Yu K. et al. A high-throughput colorimetric assay to measure the activity of glutamate decarboxylase //Enzyme and microbial technology. – 2011. – Vol. 49. – №. 3. – P. 272-276.
12. Zhang Y. et al. DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones //DNA Methylation: Methods and Protocols. – 2009. – P. 177-187.