

ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО РЕЖИМА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ НАДФ-ЗАВИСИМОЙ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ ГОРОХА

© 2018 Д. Н. Федорин¹, Т. А. Гродецкая², Р. А. Шестаков³, А. Т. Епринцев⁴

¹докт. биол. наук, доцент кафедры биохимии и физиологии клетки
e-mail: rybolov@mail.ru

²аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки
e-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru

³студент 4 курса кафедры биохимии и физиологии клетки
e-mail: sofer82@mail.ru

⁴докт. биол. наук, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки
e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Воронежский государственный университет

Рассматриваются вопросы регуляции функционирования светом разной длины волны НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) в листьях гороха. Определили активность изоцитратдегидрогеназы в разных световых режимах. Было показано, что митохондриальная форма фермента ингибируется лучами красного света и активируется в темноте и при облучении дальним красным светом. Установлена светозависимость экспрессии генов *icdh-mt*, *icdh-cyt* в листьях гороха. Уровень транскриптов гена *icdh-cyt*, кодирующего цитоплазматическую изоформу изоцитратдегидрогеназы, увеличивался на свету. Экспрессия митохондриального гена *icdh-mt* уменьшалась при облучении красным светом 660 нм. Предполагается, что в трансдукции светового сигнала участвует фитохромная система.

Ключевые слова: метаболизм, фотосинтез, НАДФ-изоцитратдегидрогеназа, световая регуляция, активность фермента, экспрессия генов

Метаболизм высших растений, обладающих сложной системой взаимосвязанных биохимических процессов, представляет чрезвычайный интерес для изучения. В процессе развития растения претерпевают изменение основного метаболизма, переходя от гетеротрофного типа питания и использования запасных веществ семени к автотрофному, где центральную роль в получении питательных веществ выполняет фотосинтез.

Роль цикла Кребса, обеспечивающего клетку веществами и энергетическими эквивалентами в процессе прорастания семян, в условиях света состоит в регуляции окислительно-восстановительного баланса, а также в продуцировании метаболитов для анаболических реакций и АТФ в качестве источника энергии [Gamberdiev, Gardeström 2003]. Известно, что в фотосинтезирующих клетках цикл Кребса функционирует частично, поскольку основным продуктом, транспортируемым в цитозоль, является цитрат. Актуальным для изучения остается механизм перехода ЦТК от полного функционирования в темноте к частичному на свету. Ключом к пониманию данного процесса является изучение аспектов функционирования изоцитратдегидрогеназы (ИДГ). Существует две формы данного фермента – НАД-зависимая и НАДФ-зависимая. НАД-зависимая форма локализована исключительно в митохондриях и катализирует прямую реакцию превращения изоцитрата в 2-оксоглутарат. НАДФ-зависимая форма ИДГ работает как в прямом, так и в обратном направлении и обладает широким изоферментным составом. Так, изоформы данного фермента

обнаружены в цитозоле, митохондриях, хлоропластах и пероксисомах [Hodges et al 2003]. Поскольку продукт реакции ИДГ – 2-оксоглутарат является промежуточным звеном ряда биохимических процессов, его перераспределение между компартментами клетки является важным механизмом регуляции метаболизма растения, зависящего от различного светового режима произрастания. В связи с этим интересным представляется изучить влияние света разной длины волны на функционирование изоформ ИДГ в метаболизме высших растений.

В качестве объекта исследования использовали проростки гороха (*Pisum sativum* L.), сорт АМЗК. Растения выращивали гидропонным методом в течение 18 дней при 25°C, 14-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м².

Для облучения светом разной длины волны исследуемые растения разделили на группы. Каждая из групп была предварительно выдержана в темноте в течение 24 ч. Для облучения гороха красным и дальним красным светом использовали светодиоды с областью испускания 640–680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710–750 нм (ЗЛ127А-5, Россия) соответственно. Пробы для анализа отбирались через 3 часа с момента облучения.

Активность фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО, Россия). За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 мкМ продукта за 1 мин. при 25°C.

Суммарную РНК из листьев гороха выделяли методом фенол-хлороформной экстракции [Chomczynski, 1987]. В качестве осадителя использовался LiCl.

Нуклеиновые кислоты разделяли в 1%-м геле агарозы (Helicon, Россия), содержащем 0,1% интеркалирующего красителя – бромистого этидия. Электрофорез проводился в горизонтальной электрофоретической камере в буфере 1×TAE (pH 8.5) при напряжении 70 В в течение 40 минут.

Обратную транскрипцию мРНК проводили с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия).

Последовательности исследуемых генов были получены из генетической базы данных NCBI. Подбор специфических праймеров осуществляли с использованием программы Primer3.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе LightCycler96 (Roche, Швейцария), используя в качестве красителя SYBR Green I. Для проведения реакции брали кДНК, полученную с использованием 100 нг суммарной клеточной РНК. Нормализатором являлся ген фактора элонгации *ef-1 α* [Епринцев и др. 2010].

Параметры амплификации для генов ИДГ были следующие: предварительная денатурация: 95°C – 5 минут, цикл: 95°C – 30 сек., 59°C (цитозольная ИДГ) и 57°C (митохондриальная ИДГ) – 30 сек., 72°C – 30 сек. (детекция); финальная элонгация: 72°C – 10 минут.

Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением 2 $\Delta\Delta$ Ct-метода [Livak, Schmittgen 2001] с использованием программного обеспечения LightCycler96 (Roche, Швейцария).

Исследование влияния светового режима на активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы показало, что данный фермент является светозависимым, поскольку в условия облучения растений светом разного спектрального состава наблюдалось изменение скорости его функционирования (рис. 1). Ферментативная активность при облучении растений красным светом увеличивалась в 2 раза по сравнению с контрольными образцами (темнота). При облучении растений гороха

НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в листьях гороха дальним красным светом не наблюдалось существенных изменений в активности исследуемого фермента.

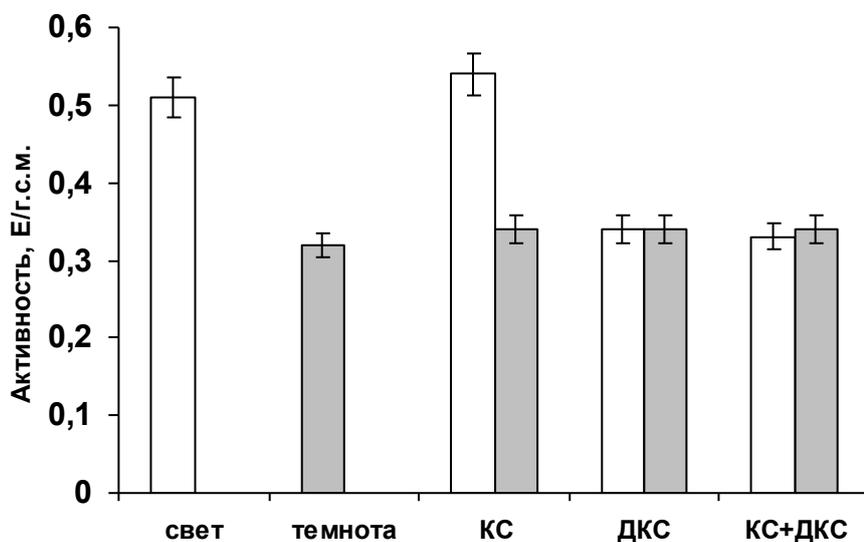


Рис. 1. Изменение активности НАДФ-ИДГ в листьях гороха в условиях освещения красным и дальним красным светом. Серыми столбцами обозначен темновой контроль. Свет – растения, освещенные белым светом; темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; ДКС – растения, освещенные светом с длиной волны 730 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм

Результаты по влиянию светового режима на активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы в листьях гороха позволили определить влияние внешних факторов на скорость его функционирования.

Эффекты импульсного облучения красным светом показали четкую корреляцию с ранее полученными результатами в изменении активности цитозольной и митохондриальной форм исследуемого фермента. Следовательно, полученные данные позволяют говорить о фитохром-зависимом механизме регуляции активности НАДФ-ИДГ, что ранее было показано для ряда других ферментов дыхательного метаболизма (Furuya, 1996). Можно предположить, что эффект света в этом случае может быть NIR-опосредованным [Casal et al. 1998], наиболее вероятно опосредуемым фитохромом В [Smith 1995]. Аналогичные результаты относительно возможного NIR-опосредованного фитохромного эффекта показаны для нитратредуктазы у мутанта *Lemna aequinoctialis* [Arpenroth et al. 2000]. На основании наших данных и данных, полученных другими исследователями, можно сделать вывод, что в условиях активного фотосинтеза увеличивается активность НАДФ-ИДГ. Значение фотосинтеза в регуляции НАДФ-изоцитратдегидрогеназы также было показано в зеленых листьях *S. Polyrhiza* [Popova, Arpenroth 2002].

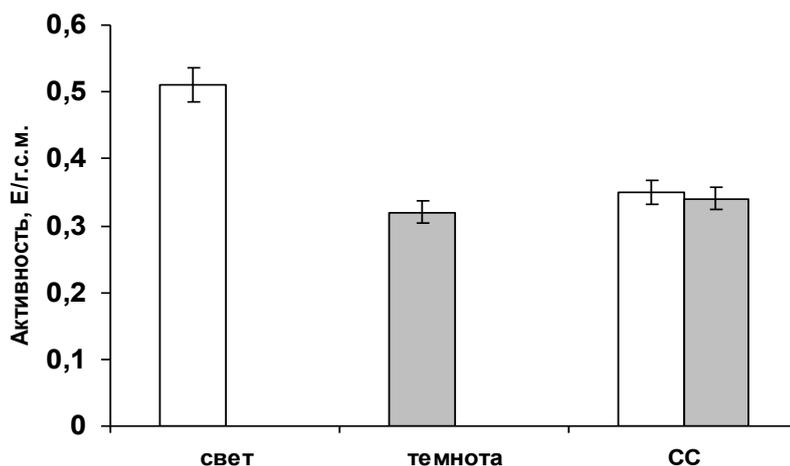


Рис. 2. Изменение активности НАДФ-ИДГ в листьях гороха в условиях освещения синим светом. Серыми столбцами обозначен темновой контроль. Свет – растения, освещенные белым светом; темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм

Исследование действия синего света на активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы в листьях гороха показало, что этот спектр света не оказывает влияния на данный показатель (рис. 2). Вероятно, криптохромная система не принимает участия в контроле функционирования изучаемой ферментной системы в зеленых листьях гороха.

Проведенный анализ образцов кДНК из гороха с праймерами к гену *icdh-cyt* в условиях разного освещения позволил установить, что в растениях на свету и после облучения красным светом с длиной волны 660 нм относительная концентрация мРНК исследуемого гена значительно выше, чем данный показатель в растениях, находящихся в темноте. Аналогичная ситуация наблюдается при облучении гороха дальним красным светом, в данном случае уровень транскриптов составил 0,53 ед. Содержание транскриптов гена *icdh-cyt* при последовательном действии красного и дальнего красного света в 2 раза ниже, чем в условиях света. Так, уровень относительной транскрипции для вариантов опыта «темнота» и «ДКС», «КС+ДКС» составила 0,75, 0,53, 0,532 относительных единиц, что отличается от такового показателя через 3 часа в темноте, темновой контроль (рис. 3).

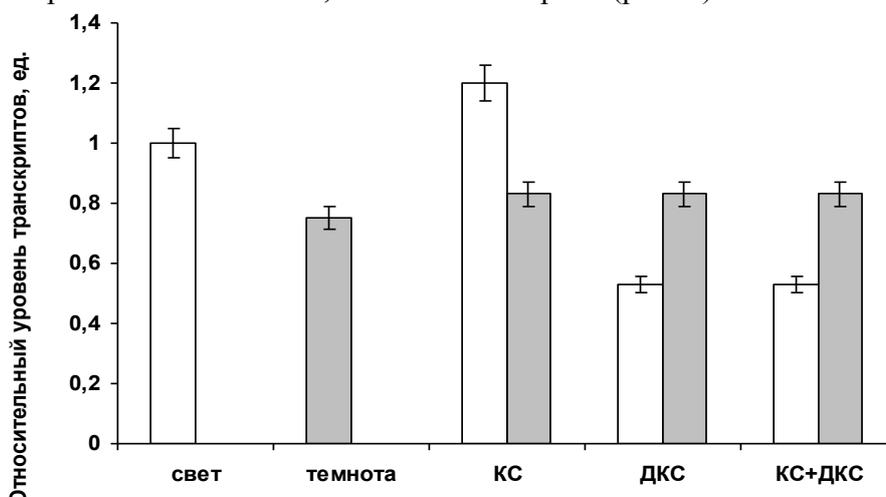


Рис. 3. Относительный уровень транскриптов гена *cyt-icdh* (белые столбцы) в листьях гороха при облучении красным и дальним красным светом. Серые столбцы – содержание транскриптов исследуемого гена в темноте по окончании эксперимента

Полученные результаты по влиянию светового режима на уровень транскрипции гена изоцитратдегидрогеназы в листьях гороха свидетельствуют, что красный свет вызывает изменения в работе генетического аппарата клетки, приводящие к увеличению количества мРНК исследуемого гена ИДГ в клетке растений. Противоположный эффект вызывает действие дальнего красного света и последовательное действие красного и дальнего красного света.

Ранее было показано, что НАД- и НАДФ-зависимые изоцитратдегидрогеназы регулируются содержанием восстановленных и окисленных пиримидиновых нуклеотидов в листьях гороха. Цитозольное соотношение НАДФН/НАДФ⁺ было около 1, и почти постоянным, как в темноте, так и на свету. В митохондриях соотношение НАДФН/НАДФ⁺ было низким в темноте (0.2) и увеличенным на свету. Высокий уровень НАДФ⁺ и НАД⁺ наблюдается при ограничении СО₂ на свету, то есть когда фотоокисление глицина является основным митохондриальным субстратом. При этом окисление изоцитрата в митохондриях снижено, и цитрат транспортируется в цитозоль, где цитозольная НАДФ-ИДГ поставляет 2-оксоглутарат для фотодыхательной рефиксации аммония [Igamberdiev, Gardeström 2003].

Следовательно, увеличение скорости образования транскриптов гена *icdh-cyt* в условиях света и при воздействии красного света является необходимым моментом в поддержании достаточного количества активной формы цитозольной НАДФ-изоцитратдегидрогеназы для регуляции необходимого энергетического баланса цитозоля, в частности соотношения НАДФН/НАДФ⁺.

Подобные результаты по регуляции активности цитозольной формы НАДФ-изоцитратдегидрогеназы были получены ранее Клаус с соавторами. Показано, что активность НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ (цитозольных и пластидных изоформ, ИДГ1 и ИДГ2, КФ 1.1.1.42) и ферредоксинзависимой глутаматсинтазы (Fd-ГОГАТ, КФ 1.4.7.1) в *Spirodela polyrhiza* возрастала на свету. Однократные или повторные импульсы красного света индуцировали активность ферментов, но при этом обратный эффект наблюдался при последующем воздействии импульсами красного света. Таким образом, показано, что данные ферменты регулируются совместно при помощи фитохромной системы. Для НАДФ-изоцитратдегидрогеназы это показано впервые. Облучение растений постоянным красным светом приводило к усилению активности ферментов и уровней их белковых молекул, что было показано на основе поликлональных антител. Эти дополнительные эффекты постоянного красного света (называемого «неиндукционным эффектом») могут проявлять ингибирующее действие на ИДГ1 и ИДГ2. Предположительно данный эффект может быть классифицирован как фитохром-опосредованный ответ на освещенность. То есть можно сделать вывод, что уровни НАДФ-изоцитратдегидрогеназы и ферредоксинзависимой глутаматсинтазы подвержены световой регуляции, но при этом не проявляют совместной регуляции одними и теми же фоторецепторами. Установлено, что для световой регуляции обоих ферментов необходим нитрат, что способствует скоординированной работе соответствующих генов [Arpenroth, Teller 2004].

Исследование действия синего света на уровень транскриптов гена цитозольной НАДФ-изоцитратдегидрогеназы свидетельствует о зависимости данного показателя от условий освещения (рис. 4).

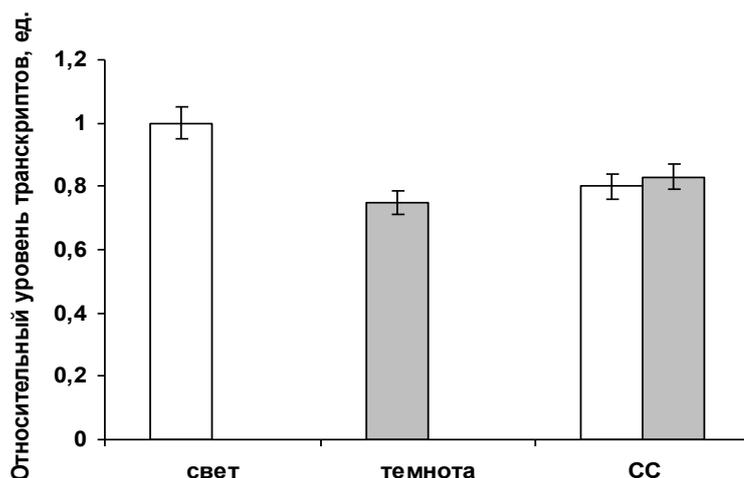


Рис. 4. Относительный уровень транскриптов гена *cyt-icdh* (белые столбцы) в листьях гороха при облучении синим светом. Серые столбцы – содержание транскриптов исследуемого гена в темноте по окончании эксперимента

Показано, что при облучении растений гороха синим светом с низкой интенсивностью не наблюдалось изменения мРНК НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы относительно контрольного варианта. Следовательно, синий свет не является регулирующим фактором световой регуляции исследуемого фермента. Отсутствие изменений в уровне транскриптов НАДФ-изоцитратдегидрогеназы в условиях облучения листьев гороха синим светом, вероятно, обусловлено пассивностью криптохромной системы в контроле данного фермента. Подобные результаты были получены ранее для *Spirodela polyrhiza*, для которой показано, что НАДФ-ИДГ не регулируется специфическим рецептором синего света [Appenroth, Teller, 2004].

Исследование влияния красного света на уровень транскриптов гена митохондриальной формы НАДФ-изоцитратдегидрогеназы показало, что данный ген в меньшей степени зависит от условий облучения, чем ген *icdh-cyt*. Анализ содержания транскриптов гена *icdh-mt* показал, что помещение растений гороха в условия темноты приводит к увеличению данного показателя в 3 раза. Однако поле облучения листьев гороха красным светом с длиной волны 660 нм происходит уменьшение количества его мРНК только в 1,72 раза (рис. 5).

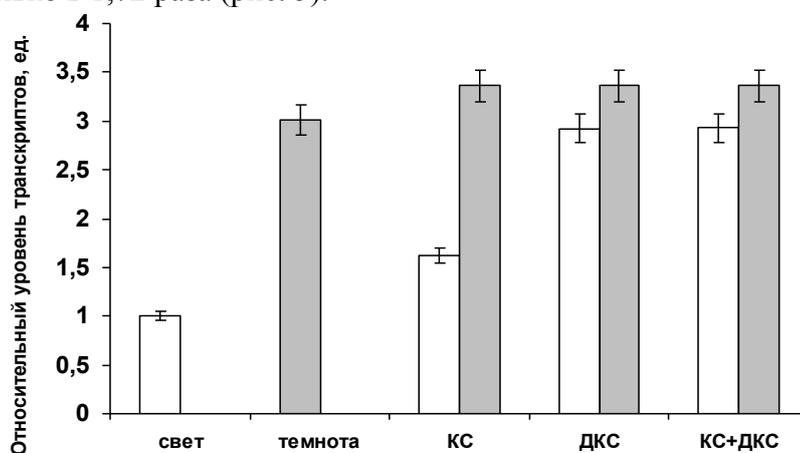


Рис. 5. Относительный уровень транскриптов гена *mt-icdh* (белые столбцы) в листьях гороха при облучении красным и дальним красным светом. Серые столбцы – содержание транскриптов исследуемого гена в темноте по окончании эксперимента

Кроме того, воздействие синего света на исследуемые растения не приводит к изменению содержания транскриптов гена *icdh-mt*, следовательно, криптохромная система не принимает участия в регуляции гена *icdh-mt*, так же как и гена *icdh-cyt* (рис. 6).

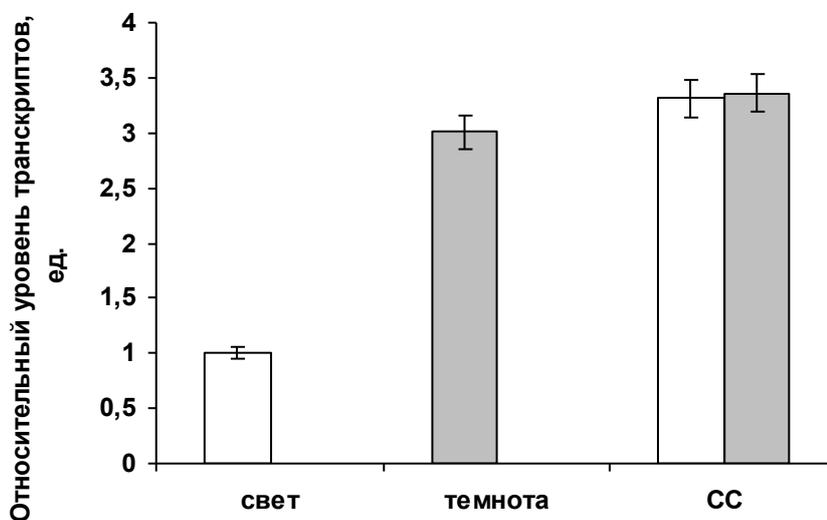


Рис. 6. Относительный уровень транскриптов гена *mt-icdh* (белые столбцы) в листьях гороха при облучении синим светом. Серые столбцы – содержание транскриптов исследуемого гена в темноте по окончании эксперимента

На основании полученных результатов по исследованию влияния светового режима на содержание транскриптов генов цитозольной и митохондриальной НАДФ-изоцитратдегидрогеназы можно заключить, что данный фермент является светозависимым, поскольку при облучении растений светом разной длины волны наблюдается изменение содержания транскриптов, что соотносится с изменением активности данного фермента в условиях разного светового режима. При этом показано, что цитозольная форма исследуемого фермента в большей степени подвержена влиянию фитохромной системы, чем митохондриальная.

Наличие двух форм изоцитратдегидрогеназы в зеленых листьях гороха необходимо для поддержания баланса 2-оксоглутарата, используемого в процессе синтеза глутамата [Mhamdi et al. 2010; Sadka et al. 2000] и процессе фиксации молекулярного азота, а также соотношения энергетических эквивалентов НАДФ/НАДФН, что является тонким механизмом регуляции метаболических реакций.

Установлено, что в регуляции функционирования ИДГ принимает участие активная форма фитохрома, которая вызывает увеличение содержания мРНК гена *icdh-cyt* при облучении растений красным светом. Подобный механизм регуляции является необходимым для нормального протекания фотосинтеза и оттока цитрата из митохондрии на конструктивный метаболизм [Igamberdiev, Gardeström 2003]. При этом установлено, что криптохромная система не принимает участия в регуляции активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, что обусловлено отсутствием в изменении уровня транскриптов генов ИДГ при облучении растений синим светом.

Библиографический список

Appenroth K., Meço R., Jourdan V.V., Lillo C. Phytochrome and post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants // Plant Sci. 2000. P. 51–56.

Appenroth K., Teller S. Are NADP-dependent isocitrate dehydrogenases and ferredoxin-dependent glutamate synthase co-regulated by the same photoreceptors? // *Planta*. 2004. V. 218. No. 5. P. 775–783.

Casal J.J., Sanchez R.A., Botto J.F. Modes of action of phytochromes // *J Exp Bot*. 1998. P. 127–138.

Chomczynski P. Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem*. 1987. V. 162. P. 156–159.

Furuya M., Schäfer E. Photoperception and signalling of induction reactions by different phytochromes // *Trends Plant Sci*. 1961. P. 301–307.

Hodges M., Flesch V., Gálvez S., Bismuth E. Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003. T. 41. №. 6. C. 577–585.

Igamberdiev A.U., Gardeström P. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2003. T. 1606. №. 1. C. 117–125.

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

Mhamdi A., Mauve C., Gouia H., Saindrenan P., Hodges M., Noctor G. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves // *Plant, cell & environment*. 2010. T. 33. №. 7. C. 1112–1123.

Popova T.N., Appenroth K. Cytosolic and chloroplastic NADP-dependent isocitrate dehydrogenases in *Spirodela polyrhiza* // *J Plant Physiol*. 2002. P. 239–244.

Sadka A., Dahan E., Or E., Cohen L. NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development // *Plant Science*. 2000. T. 158. №. 1. C. 173–181.

Smith H. Physiological and ecological function within the phytochrome family // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1998. P. 289–315.

Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ахмад Дж. А., Попов В.Н. Роль дифференциальной экспрессии генов *sdh1-1* и *sdh1-2* в изменении изоферментного состава сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы // *Физиология растений*. 2010. № 3. С. 1–9.