

УДК: 577.152.4

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИЗОФОРМ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В КУКУРУЗЕ *ZEA MAYS* L.

© 2021 г. А. Т. Епринцев¹*, Г. Б. Анохина¹, П. С. Оя¹, Я. И. Дедов¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018 Россия

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 05.10.2020 г.

После доработки 30.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Исследована динамика активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.2) при прорастании в листьях и щитках кукурузы. Установлено, что изменения активности в листьях и щитках обусловлены как биохимическими, так и молекулярными аспектами функционирования фермента, что подтверждалось вариабельностью относительного уровня транскриптов генов *gdh-1* и *gdh-2*, кодирующих субъединицы ГДГ. Показано, что фермент в листьях преимущественно локализовался в митохондриях (86.54%), и в меньшей степени в цитозоле (9.53%) и хлоропластах (3.92%). Очистка, включающая 4 этапа позволила выделить 3 ферментных препарата ГДГ из листьев кукурузы с различной степенью очистки. Форма ГДГ1 была очищена в 98 раз с выходом 8%. Удельная активность полученного препарата – 195 Е/мг белка. Форма ГДГ2 со степенью очистки 83 раза и выходом 32% имела удельную активность 166 Е/мг белка. Препарат ГДГ3 характеризовался удельной активностью 122.2 Е/мг белка, степенью очистки 61 и выходом 21%. Определены значения рН-оптимумов по реакции аминирования: для ГДГ 1 он составил 7.5, для ГДГ2 и ГДГ3 – 7.0 и 8.5 соответственно. Полученные изоформы имели разные значения K_m по 2-оксоглутарату: 0.34 мМ для ГДГ1, а для ГДГ2 и ГДГ3 – 0.6 мМ и 0.22 мМ соответственно.

Ключевые слова: глутаматдегидрогеназа, кукуруза, прорастание, очистка, изоферменты, субклеточная локализация, экспрессия, праймер

DOI: 10.31857/S0555109921020021

Глутаматдегидрогеназа (ГДГ, КФ 1.4.1.2) – фермент, участвующий в регуляции углеводного и азотного метаболизма, обеспечивающего обратимый катализ восстановительного аминирования 2-оксоглутарата до L-глутамата. Структурно ГДГ представляет собой олигомер. Известно, что в организме функционируют как гексамерные, так тетрамерные и димерные формы фермента с массой одной субъединицы от 40 до 60 кДа [1–3]. В зависимости от молекулярного веса мономеров выделяют три группы ГДГ: первая – с молекулярной массой около 50 кДа, вторая – ~115 кДа и третья – ~180 кДа. ГДГ является олигомером и может состоять из субъединиц различного типа: α , β , γ [4]. Известно, что преобладание α -субъединиц в структуре обеспечивает более высокое сродство к глутамату, в то время как наличие β -субъединиц повышает сродство к 2-оксоглутарату [4].

Активаторами реакций обычно служат двухвалентные ионы металлов. По данным литературы в большинстве организмов в качестве активатора выступает кальций. Также реакция может регули-

роваться нуклеотидами, связывающимися с ферментом в аллостерическом центре, такими как АДФ и АМФ. В редких случаях активаторами могут выступать такие аминокислоты как аспарат, аспарагин, цистеин и лейцин [5–7]. Все перечисленные выше соединения в больших концентрациях могут являться также ингибиторами глутаматдегидрогеназной активности [8].

Значения оптимума рН для прямой и обратной реакции в различных организмах могут быть различными. Так для глутаматдегидрогеназы, выделенной из *Arabidopsis thaliana*, оптимум рН для прямой реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата – 8.3, в то время как для обратной реакции окислительного дезаминирования глутамата – 9.2 [9].

Исследования ГДГ в настоящее время показали, что в геноме *A. thaliana* обнаружены три гена, кодирующие различные типы субъединиц ГДГ, в геноме кукурузы *Zea mays* L. – два гена. Ген *gdh-1* кодирует полипептид β -субъединицы, а ген *gdh-2* ответствен за синтез α -субъединицы ГДГ. При

стрессе экспрессия данных генов изменяется, что свидетельствует о тесной связи данного фермента с адаптивными реакциями клеточного метаболизма растений [6, 10].

В клетках растений фермент локализован в митохондриях и хлоропластах, а у бактерий и архей может встречаться цитоплазматическая форма [2]. ГДГ распространена во всех органах и тканях растений, но в различных органах и тканях встречаются различные изоформы фермента. Экспрессия генов ГДГ имеет органоспецифический характер. Например, ген *gdh3* арабидопсиса локализован только в листьях, а ген *gdh2* имеет максимальную экспрессию в корнях [11].

ГДГ участвует в метаболизме азота, включая неорганический азот в углеродный скелет при превращении 2-оксоглутарата в глутамат [12]. Кроме того, ГДГ является незаменимым звеном гамма-аминомасляного шунта, необходимого для синтеза гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), участвующей в передаче стрессовых сигналов [3].

В растительных тканях физиологическая роль ГДГ заключается не только в ассимиляции азота, катаболизме глутамата и поставке 2-оксоглутарата для ЦТК, но также в регуляции осмотического баланса и устойчивости к высоким температурам [3]. Этот фермент выступает в качестве промежуточного звена между ЦТК и ГАМК-шунтом. Глутаматдегидрогеназа обеспечивает связь между катаболическим и анаболическим путями.

Цель работы – получение препаратов изоформ ГДГ в высокоочищенном состоянии и исследование их регуляторных и молекулярных аспектов функционирования в кукурузе *Zea mays* L.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали щитки семян, проростки и листья кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при 10-часовом световом дне с интенсивностью освещения 25 Вт/м². Температура выращивания – 25°C.

Активность ГДГ в щитках и листьях определяли в митохондриальной фракции. Для получения субклеточных фракций растения гомогенизировали (в объемном соотношении 1:10) в среде следующего состава: 0.15 М Трис-НСI буфер, рН 7.4, 0.4 М сахароза, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ КСI, 4 мМ MgCl, 0.05% Тритон X-100, после чего центрифугировали при 14000 g. Осадок, содержащий фракцию митохондрий, разрушали осмотическим шоком в среде, содержащей 0.15 М Трис-НСI буфер, рН 7.4. Все манипуляции проводили при температуре 4°C.

Скорость реакции аминирования измеряли по изменению оптической плотности раствора, содержащего 2.5 мМ 2-оксоглутарата, 0.25 мМ НАДН,

50 мМ хлорида аммония, 100 мМ Трис-НСI буфер, рН 8.0 [12]. Реакцию инициировали добавлением фермента.

Активность ГДГ в реакции дезаминирования определяли путём измерения оптической плотности раствора, содержащего 100 мМ Трис-НСI буфер рН 8.5, 3 мМ НАД, 1.0 мМ хлорид кальция, 50 мМ глутамат натрия [13]. Реакцию инициировали добавлением фермента.

Для определения субклеточной локализации ГДГ в листьях кукурузы мембранные фракции выделяли из клеточного гомогената методом изоплотностного центрифугирования на центрифуге Beckman (США) при 100000 g 90 мин при 0°C в градиенте плотности сахарозы: 2.5 М, 2.3 М, 1.8 М, 1.5 М, 1.3 М. Листья кукурузы (5 г) гомогенизировали в среде выделения (1:5), следующего состава: 0.15 М Трис-НСI буфер, рН 7.4, 0.4 М сахароза, 2.5 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорид калия, 4 мМ хлорид магния, 0.05% Тритон X-100, затем центрифугировали 3 мин при 1000 g. Супернатант центрифугировали при 11000 g. Осадок растворяли в 10 мл той же среды выделения и наносили для разделения на ступенчатый градиент сахарозы [14].

Фракции митохондрий, хлоропластов, пероксисом осторожно отбирали, разбавляли буфером до концентрации сахарозы 0.4 М, центрифугировали 30 мин при 11000 g для осаждения органелл. Мембранные органоиды разрушали осмотическим шоком в растворе 50 мМ Трис-НСI буфера, рН 7.5.

Перекрестное загрязнение митохондриальной фракции идентифицировали по величине активности маркерного фермента митохондрий – сукцинатдегидрогеназы [15]. Загрязнение цитоплазматической и пероксисомальной фракциями определяли, измеряя активности маркерных ферментов цитозоля – алкогольдегидрогеназы [16] и пероксисом – пероксидазы [17].

Выделение тотальной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенолхлороформной экстракции [18]. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV (“Евроген”, Россия), согласно инструкции производителя. Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе GeneBank, с помощью программы Primer-BLAST. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием специфичных праймеров на приборе LightCycler96 (“Roche”, Швеция), с использованием SybrGreen I в качестве красителя. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* с ген-специфичными праймерами [19]. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с применением 2^{-ΔΔCt}-метода как описано в работе [20].

Очистку ГДГ проводили в четыре стадии при постоянной температуре 4°C. Листья кукурузы гомогенизировали в среде выделения в соотношении 1:5. Фракционирование сульфатом аммония проводили в две стадии: от 0 до до 35% насыщения раствора и от 35 до 70%. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 7.8, в объеме 2 мл. Соли аммония удаляли гель-фильтрацией через колонку с сефадексом G-25. Элюцию белков проводили 50 мМ Трис-НСl буфером, рН 8.0. Последующую ионообменную хроматографию осуществляли на колонке с ДЭАЭ-Sephacel ("Sigma-Aldrich", США). Десорбцию белка проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0.15 до 0.35 М [21]. Десорбция фермента происходила при концентрации NaCl 115 мМ для ГДГ1, 220 мМ для ГДГ2 и 275 мМ для ГДГ3.

Электрофоретические исследования белков проводили в 7.5%-ном полиакриламидном геле [22]. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли с помощью AgNO₃ [23]. Специфическое проявление ГДГ осуществляли с помощью тетразолиевого метода [24].

Белок определяли по методу Лоури [25]. Содержание белка рассчитывали по формуле:

$$B = EK V_{\text{общ}} / V_{\text{проб}}$$

где, E — оптическая плотность; K — перерасчетный коэффициент; $V_{\text{общ}}$ — общий объем раствора, мл; $V_{\text{проб}}$ — объем взятой на белок пробы, мл.

Влияние величины рН на скорость ферментативной реакции полученных молекулярных форм ГДГ определяли путем проведения серии измерений скорости ферментативной реакции при различных значениях рН. Константы Михаэлиса полученных ферментных препаратов определяли с использованием в качестве субстрата 2-оксоглутарата. K_m определяли по графику Лайнуивера—Бэрка методом двойных обратных координат.

Опыты проводили в 3–4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Полученные значения позволили оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки на множественные сравнения (поправка Бонферрони) [26]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при $p < 0.05$).

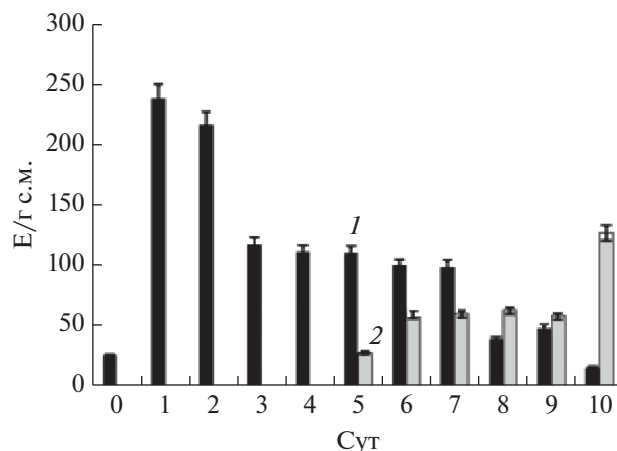


Рис. 1. Ферментативная активность ГДГ в листьях (2) и щитках (1) кукурузы при прорастании.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение активности ГДГ по реакции аминирования в щитках и листьях кукурузы показало, что активность фермента в щитках можно было определить в сухих семенах (рис. 1). В первый же день прорастания активность ГДГ достигала максимального значения в 236.3 Е/г сухой массы и в дальнейшем постепенно снижалась. Появление зеленых проростков кукурузы отмечалось на 5 день прорастания семени. Активность исследуемого фермента с ростом проростков увеличивалась, достигая на 10 сут прорастания максимального значения — 125.9 Е/г. Активность ГДГ в проростках кукурузы по сравнению с щитками несколько ниже, что, вероятно может быть связано с присутствием в зеленых листьях глутаминсинтетазной активности, доминирующей в световых условиях [3].

Из результатов исследования субклеточной локализации ГДГ в листьях кукурузы видно, что ее активность обнаруживалась в цитозоле (9.53%), хлоропластах (3.92%) и наибольшая часть в митохондриях 86.54%, что в целом согласовывалось с имеющимися литературными данными (табл. 1) [22]. В пероксисомальной фракции активности ис-

Таблица 1. Субклеточная локализация активности ГДГ в листьях кукурузы ($n = 3$; $p \leq 0.05$)

Фракция органоидов	Общая активность, Е/г сырой массы	Активность фермента, % от общего содержания
Пероксисомы	—	—
Цитоплазма	15.50	9.53
Хлоропласты	6.38	3.92
Митохондрии	140.70	86.54

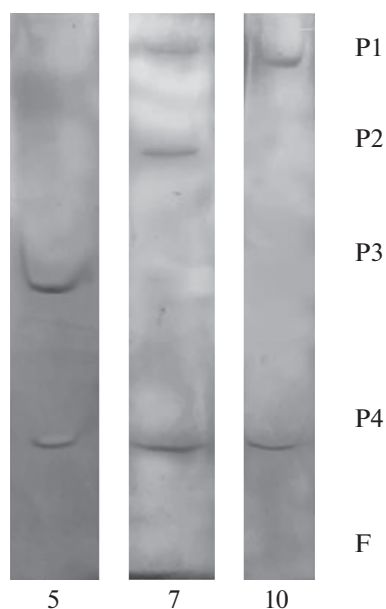


Рис. 2. Изоферментный состав глутаматдегидрогеназы в проростках кукурузы на 5, 6 и 10 сут прорастания: P1, P2, P3, P4 – белковые полосы, F – фронт красителя.

следующего фермента обнаружено не было. Как уже упоминалось, согласно данным, полученным Яковлевой с соавт. [27], ГДГ в корнях кукурузы большей частью локализована в митохондриях. Данные о субклеточной локализации фермента в листьях кукурузы в литературе не было найдено.

Степень перекрестного загрязнения для цитоплазматической фракции не превышала 4.5%, для хлоропластной и митохондриальной фрак-

ций – 10%, для пероксисомальной фракции – 1% (табл. 2).

В связи с тем, что в листьях кукурузы ГДГ в клетке имела различную локализацию, исследовали суммарную активность всех трех субклеточных фракций фермента. Исследование фракции хлоропластов не проводили, так как в них функционирует глутамин-синтетазный путь [28].

При исследовании изменения изоферментного спектра ГДГ при прорастании кукурузы установлено наличие до четырех изоформ ГДГ в разные периоды прорастания со значениями $R_f = 0.7, 0.4, 0.26, 0.13$ (рис. 2).

Исследование изоферментного состава ГДГ показало, что в щитках в течение 10 сут происходило изменение общей ферментативной активности, в том числе, и за счет появления дополнительных молекулярных форм исследуемого фермента. На 7 сут прорастания в щитках кукурузы наблюдали три молекулярные формы фермента, с различными значениями электрофоретической подвижности, в то время как на 5 и 10 было обнаружено только по две изоформы, обладающие ГДГ активностью.

Из зеленых листьев кукурузы были выделены в результате четырехстадийной очистки высокоочищенные препараты изоформ ГДГ (табл. 4).

Фракционирование сульфатом аммония (до 70% насыщения) и гель-фильтрация на сефадексе G-25 позволили получить препарат с удельной активностью 5.19 Е/мг белка. Проведение ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Sephacel позволило обнаружить 3 пика активно-

Таблица 2. Активность маркерных ферментов, используемых для определения чистоты фракций ($n = 3; p \leq 0.05$)*

Фракция	Активность СДГ		Активность АДГ		Активность каталазы		Содержание хлорофилла	
	Е/мл	%	Е/мл	%	Е/мл	%	мг/мл	%
Цитоплазма	0.03	4.05	5.20	86.52	н/о	н/о	2.08	2.49
Хлоропласты	0.07	9.50	0.40	6.65	0.01	7.69	80.70	96.54
Митохондрии	0.64	86.50	0.35	5.82	0.01	7.69	0.81	1.51
Пероксисомы	н/о	н/о	0.06	1.00	0.11	84.60	н/о	н/о

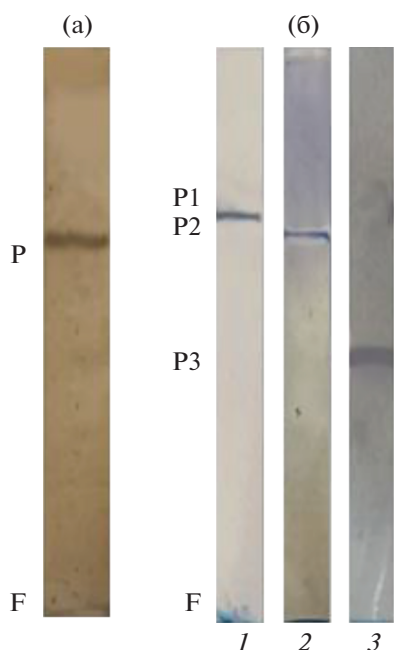
* н/о – не обнаружено.

Таблица 3. Праймеры к генам ГДГ

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Температура отжига, °С
<i>gdh-1</i>	Прямой	GCGGAGAACAAGGGGATCAA	58
	Обратный	ACAGGATCTCGTCTGCCTCT	
<i>gdh-2</i>	Прямой	TGATCCAGAGGCAGACGAGA	60
	Обратный	GTAATGCGCGGTCAATGGTC	

Таблица 4. Стадии очистки изоформ глутаматдегидрогеназы из листьев кукурузы

Стадия		Объем, мл	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат		110.0	241.0	478.0	1.9	100.0	1.0
Фракционирование сульфатом аммония, 70% насыщения		3.0	72.7	313.0	4.3	65.4	2.2
Гель-фильтрация через сефадекс G-25		6.0	57.5	298.6	5.2	62.0	2.6
ДЭАЭ- сефадекс	ГДГ1	2.5	0.2	38.6	195.0	8.0	98.0
	ГДГ2	2.5	0.9	156.2	166.0	32.0	83.0
	ГДГ3	2.0	0.8	101.3	122.2	21.0	61.0

**Рис. 3.** Электрофореграмма очищенного препарата ГДГ (а): Р – белковая полоса, окраска ГДГ1 с использованием нитрата серебра, б – специфическое проявление ГДГ. Р1, Р2, Р3 – белковые полосы для препаратов ГДГ1 (1), ГДГ2 (2) и ГДГ3 (3), F – фронт красителя.

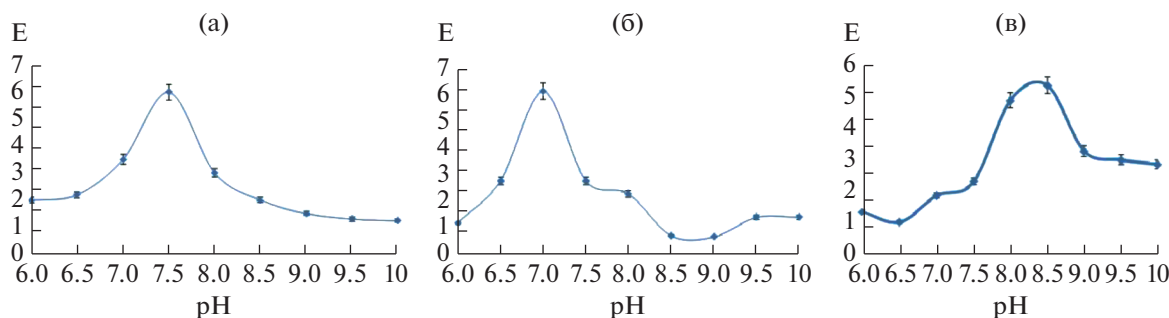
сти ГДГ, которые десорбировали хлористым натрием.

Очищенная ГДГ1 имела удельную активность 195 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 98 раз с выходом 8%. Вторая форма (ГДГ2) имела удельную активность 166 Е/мг белка, степень очистки – 83 и выход 32%. Ферментный препарат ГДГ3 имел удельную активность 122.2 Е/мг белка, степень очистки 61 и выход 21%.

Проведение электрофореза в ПААГ с универсальным окрашиванием белков нитратом серебра позволило установить, что ГДГ1 была получена в гомогенном состоянии, в то время как две других формы ГДГ2 и ГДГ3 являлись высокоочищенными, так как присутствовали сопровождающие белки (рис. 3а). Модифицированным тетразолиевым методом окрашивания была показана принадлежность полученного очищенного белка к ГДГ (рис. 3б). Значения R_f для трех форм фермента составили: для ГДГ1 – 0.26, для ГДГ2 – 0.3 и ГДГ3 – 0.7.

Для очищенных изоферментов были определены оптимумы pH: для ГДГ1 – 7.5, ГДГ2 – 7.0 и ГДГ3 – 8.5 (рис. 4).

Все три ферментных препарата имели различные значения K_m при использовании в качестве

**Рис. 4.** Зависимость активности полученного препарата глутаматдегидрогеназы от значения pH для реакции восстановительного аминирования 2-оксоглутарата: а – ГДГ1; б – ГДГ2; в – ГДГ3.

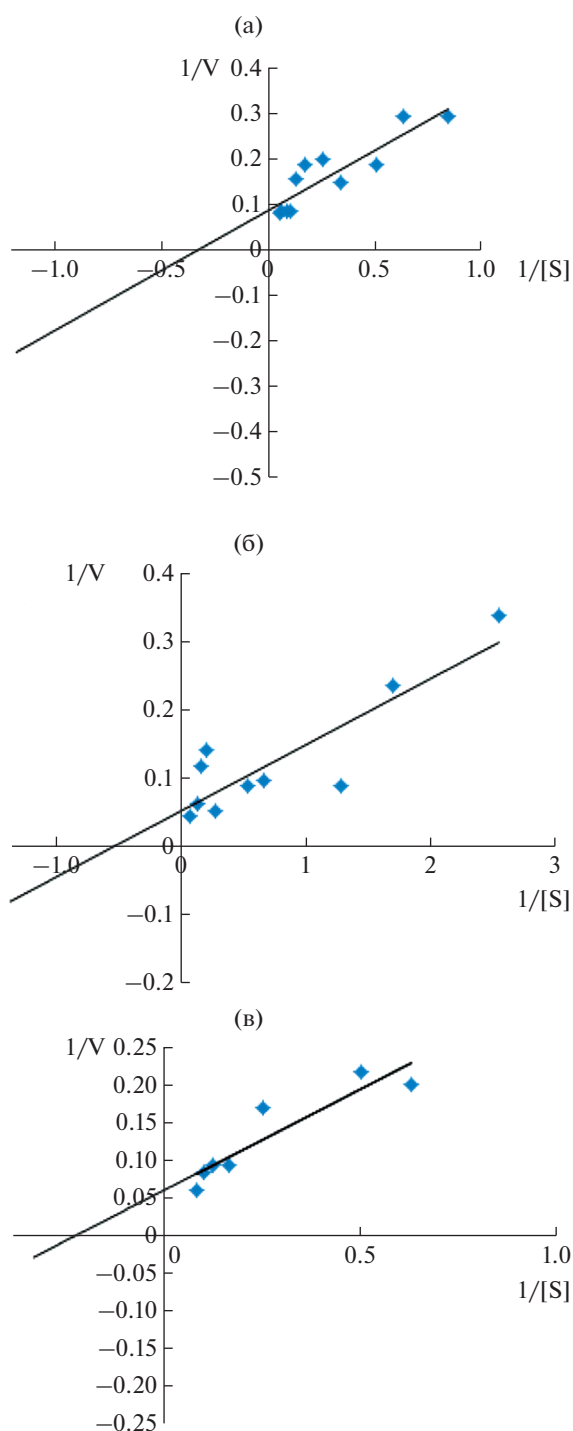


Рис. 5. Определение константы Михаэлиса полученного ферментного препарата: а – ГДГ1; б – ГДГ2; в – ГДГ3 по 2-оксоглутарату.

Таблица 5. Значения констант Михаэлиса и оптимальных значений рН для изоферментов глутаматдегидрогеназы ($n = 3, p \leq 0.05$)

Изоформа ГДГ	рН оптимум	K_m по 2-ОГ, мМ
ГДГ1	7.5	0.34 ± 0.01
ГДГ2	7.0	0.60 ± 0.01
ГДГ3	8.5	0.22 ± 0.01

субстрата 2-оксоглутарата (рис. 5, табл. 5), что указывало на различные скорости протекания реакции восстановительного аминирования, катализируемого различными изоформами ГДГ.

Можно предположить, что субъединичный состав полученных изоформ ГДГ также различен, поскольку полипептиды ГДГ кодируются различными генами – *gdh-1* и *gdh-2*.

Из литературных данных известно, что активация ферментов при набухании семени возможна двумя способами: путем пост-трансляционной модификации и синтезом *de novo* с помощью активации работы соответствующих генов [29–33]. В связи с этим, были исследованы молекулярные аспекты функционирования генов, кодирующих ГДГ в клетках кукурузы. Количественную оценку уровня транскриптов генов осуществляли путём проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием специфических праймеров (табл. 3). Изменение относительного уровня транскриптов гена *gdh-1* в щитках при прорастании семян кукурузы показало, что начиная с момента их набухания в щитках кукурузы наблюдалась значительная транскрипционная активность, которая постепенно снижалась вплоть до 3 сут прорастания, после чего на 6 сут восстанавливалась (рис. 6а). Максимум значений относительного уровня транскриптов гена *gdh-1* отмечался на 7 сут прорастания семян. В последующие дни транскрипционная активность гена снижалась более чем в 7 раз.

Транскрипция гена *gdh-1* приводит к синтезу β -субъединиц ГДГ, что в свою очередь способствует смещению равновесия ферментативной реакции в сторону аминирования, то есть образования глутамата. Исследование транскрипционной активности гена *gdh-1* показало, что в первые 5 сут прорастания семян активность этого гена минимальна. Начиная с шестого дня прорастания отмечается скачок относительного уровня транскриптов гена *gdh-1*, что, вероятно, связано с включением фотосинтезирующей системы, обеспечивающей приток глутамата через глутаминсинтетазную систему [28].

Известно, что ген *gdh-2* в геноме кукурузы кодирует α -субъединицу ГДГ, преобладание которой в структуре фермента приводит к смещению равновесия в сторону реакции дезаминирования глутамата [4]. Исследование относительного уровня транскриптов гена *gdh-2* в щитках показало, что в первые 5 сут прорастания транскрипционная активность гена минимальна (рис. 6б). Однако, начиная с седьмых суток прорастания концентрация мРНК гена *gdh-2* увеличивалась более чем в 13 раз относительно значений, зарегистрированных для семян через несколько часов после набухания.

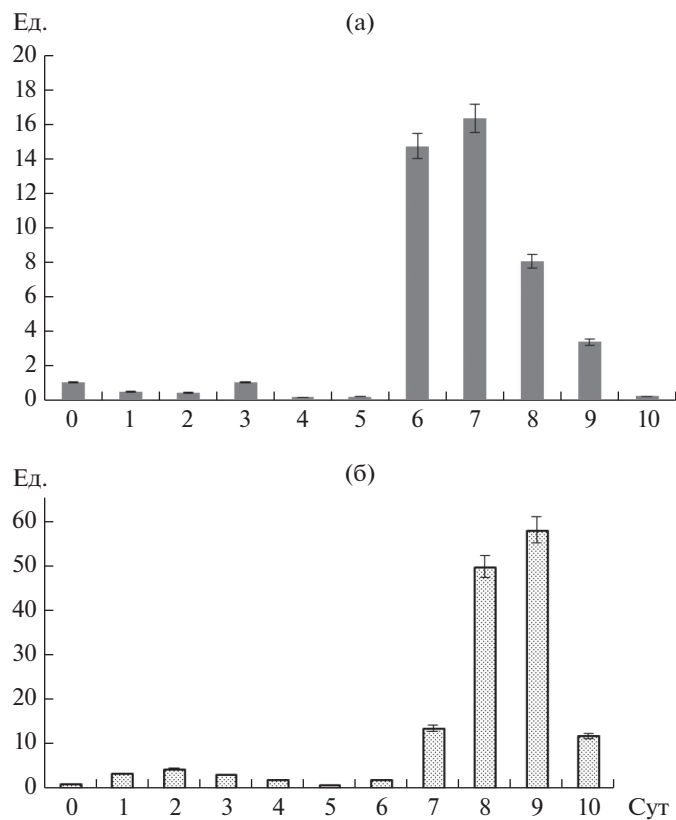


Рис. 6. Относительный уровень транскриптов гена *gdh-1* (а) и гена *gdh-2* (б) глутаматдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы.

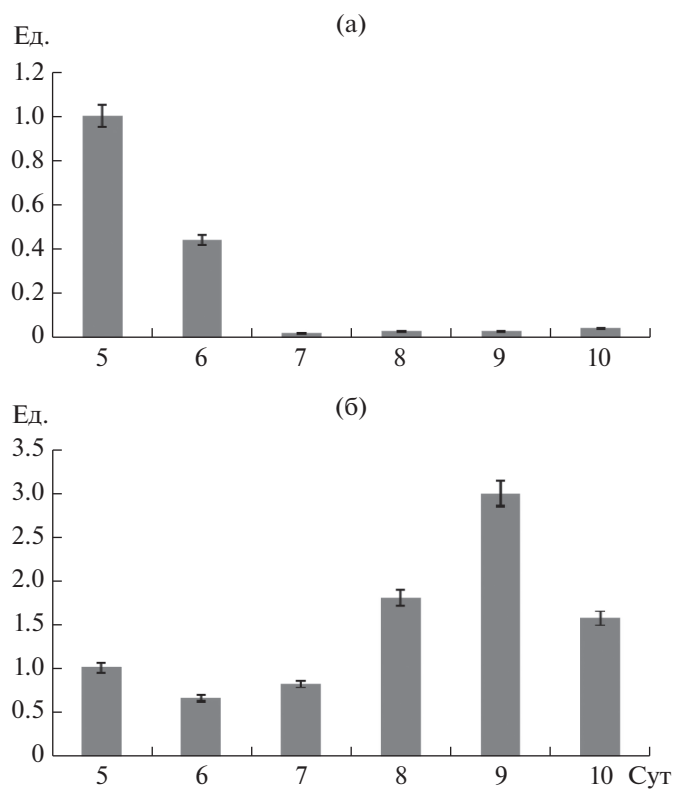


Рис. 7. Относительный уровень транскриптов *gdh-1* (а) и гена *gdh-2* (б) глутаматдегидрогеназы при прорастании в проростках кукурузы.

При набухании и прорастании семян активация метаболических процессов происходит по каскадному механизму. Еще до наступления момента набухания и последующего прорастания в семени содержится определенный набор ферментов, обеспечивающих в первое время нормальное развитие растения. Активация этого “минимального набора” в семени происходит в момент его набухания [33].

Исследование транскрипционной активности генов ГДГ в прорастающих растениях показало, что транскрипционная активность гена *gdh-1*, кодирующего β -субъединицу ГДГ, имела нисходящий характер (рис. 7а). Однако, следует отметить, что относительный уровень транскриптов другого гена *gdh-2*, кодирующего α -субъединицу, наоборот, возрастал, что свидетельствовало об увеличении роли ГДГ в листьях прорастающей кукурузы как поставщика 2-оксоглутарата (рис. 7б). Полученные результаты измерения относительного уровня транскриптов исследуемого гена полностью согласовывались с результатами измерения общей ферментативной активности (рис. 1).

Таким образом, исследование активности ГДГ в щитках и листьях кукурузы показало его важную роль в качестве первого фермента, участвующего в прорастании семени. Изменение относительного уровня транскриптов генов *gdh-1* и *gdh-2* показало, что активация ГДГ при прорастании семени происходит путем посттрансляционной модификации пре-ГДГ, находящейся в семени в состоянии покоя. Фермент менее активен в листьях, что связано, в первую очередь, с наличием в них доминирующего глутаминсинтетазного пути. Следует обратить внимание на изменение транскрипционной активности обоих генов в кукурузе в процессе прорастания. Клетки растений снижают синтез полипептидов β -субъединицы, пропорционально увеличивая синтез α -субъединиц, что обуславливает увеличение скорости дезаминирования, обеспечивающего синтез 2-оксоглутарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bown A.W., Shelp B. // Plant Science. 2016. V. 21. № 10. P. 811–813.
2. Hudson R.C., Daniel R.M. // Comp. Biochem. Physiol. 1993. V. 106. № 4. P. 767–792.
3. Santero E., Ana B. Hervás, Canosa I. and Govantes F. // INTECH. 2012. P. 289–318. <https://doi.org/10.5772/47767>
4. Purnell M.P., José R. Botella // Plant Physiol. 2007. V. 143. № 1. P. 530–539.
5. Consalvi V., Chiaraluce R., Millevoi S., Pasquo A., Politi L., De Rosa M., Scandurra R. // Comp. Biochem. Physiol. B. 1994. V. 109. P. 691–699.
6. Grabowska A., Zdunek-Zastocka E., Kutryn E., Kwinta J. // Acta Physiol Plant. 2017. V. 24. doi.org/ <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2322-4>
7. Hudson R.C., Daniel R.M. // Comp Biochem Physiol. 1993. V. 106. P. 767–792.
8. Dubois F., Tercé-Laforgue T., Gonzalez-Moro M.B., Estavillo J.M., Sangwan R., Gallais A., Hirel B. // Plant. Physiol. Biochem. 2003. V. 41. P. 565–576
9. Anderson B.M. // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 300. P. 483–488.
10. Fontaine Jean-Xavier, Tercé-Laforgue T., Bouton S., Pageau K., Lea P., Dubois F., Hirel B // Plant Signaling and Behavior. 2013. V. 8. № 10. P. 4161–4163.
11. Флоренская Т.Г., Космачевская О.В, Топунов А.Ф. // Изд-во Науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва Крыма. Симферополь. 2017. № 4(12). С. 18–30.
12. Sarasketa A., Gonzalez-Moro M.B., Gonzalez-Murua C., Marino D. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1–12.
13. Yamaya T., Oaks A., Matumoto H. // Plant Physiology. 1984. V. 76. P. 1009–1013.
14. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.
15. Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 3. С. 409–415.
16. Pathuri I.P., Reitberger I.E., Hückelhoven R., Proels R.K. // J. Exp. Bot. 2011. V. 10. P. 3449–3457.
17. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1972. С. 107–108.
18. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
19. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
20. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907–2914.
21. Hudson R.C., Daniel R.M. // Comp. Biochem. Physiol. 1993. V. 106. P. 767–792.
22. Davis B.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994. V. 121. P. 404–427.
23. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // Anal. Chem. 1996. V. 68. P. 850–858.
24. Magalhaes J.R., Ju G.C., Rich P.J., Rhodes D. // Plant Physiol. 1990. V. 94. P. 647–656.
25. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
26. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 351 с.
27. Яковлева В.И., Кретович В.Л., Гильманов М.К. // Биохимия. 1964. Т. 29. №3. С. 463–469.
28. Измайлов С.Ф. Азотный обмен в растениях. М.: Наука, 1986. 320 с
29. Kruger J.E., La Berge D.E. // Cereal Chem. 1974. V. 51. № 5. P. 578–585.
30. Anstine W., Jacobsen J.V., Scandalios J.G., Varner J.E. // Plant Physiol. Lancaster. 1970. V. 45. P. 148–152.
31. Tao K.L., Khan A.A. // Plant Physiology. 1975. V. 56. № 6. P. 797–800.
32. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U. // J. Plant Physiol. 2016. V. 205. P. 33–40.
33. Томас Г. Жизнеспособность семян. М.: Колос, 1978. С. 341–373.

Catalytic and Molecular Aspects of Functioning of Glutamate Dehydrogenase Isoform in Corn *Zea mays* L.

A. T. Eprintsev^{a,*}, G. B. Anokhina^a, P. S. Оуа^a, and Ya. I. Dedov^a

^aVoronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

The dynamics of the activity of glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) during germination in leaves and scutes of corn has been studied. It was found that changes in activity are due to both biochemical and molecular aspects of the enzyme functioning, which is confirmed by the results of a study of the relative level of transcripts of the *gdh-1* and *gdh-2* genes encoding GDH subunits. It was shown that this enzyme in leaves is mainly localized in mitochondria (86.54%), and to a lesser extent in the cytosol (9.53%) and chloroplasts (3.92%). Four-stage purification made it possible to isolate three GDH enzyme preparations from corn leaves with different purification levels. One form (GDH1) was purified to a specific activity of the enzyme preparation of 195 U/mg protein with a purification rate of 98 times and a yield of 8%. The second form (GDH2) was obtained with a specific activity of 166 U/mg protein, a purification rate of 83 times and a yield of 32%. The GDH3 preparation had a specific activity of 122.2 U/mg protein, a purification rate of 61 times, and a yield of 21%. The pH optimum was determined by the amination reaction. For GDH1, the optimum of the pH values is 7.5, for GDH2 and GDH3, 7.0 and 8.5, respectively. The obtained isoforms of GDH have different K_m values for 2-oxoglutarate: 0.34 mM for GDH1, and for GDH2 and GDH3, 0.6 mM and 0.22 mM, respectively.

Keywords: glutamate dehydrogenase, maize, germination, purification, isozymes, subcellular localization, expression