

УДК 577.152.111

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГОМОГЕННЫХ ИЗОФОРМ γ -ГИДРОКСИБУТИРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.)

© 2025 г. Г. Б. Анохина¹, Е. В. Плотникова¹, А. Т. Епринцев^{1, *}

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018 Россия

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

Поступила в редакцию 19.10.2024 г.

После доработки 20.10.2024 г.

Принята к публикации 10.11.2024 г.

γ -Гидроксibuтиратдегидрогеназа (ГБДГ) — фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий обратимое превращение сукцинилового полуальдегида (ССА) в γ -гидроксимасляную кислоту (ГОМК). Установлено, что в проростках кукурузы ГБДГ имеет митохондриальную (73.7%) и цитоплазматическую локализацию (26.3%). Получены два гомогенных препарата изоформ ГБДГ из 7-дневных проростков кукурузы. Очищенный препарат ГБДГ1 имел молекулярную массу нативной молекулы 60.3 кДа (M_r отдельных субъединиц ~15 кДа). ГБДГ2 — гетеромер с молекулярной массой ~ 286 кДа состоял из субъединиц с M_r в диапазоне от 52 до 66 кДа. Оптимальные значения pH полученных ферментов различались: для ГБДГ1 по реакции окисления γ -гидроксibuтирата — 9.0, для ГБДГ2 оптимум pH — 7.0. Кинетика ферментативной реакции превращения ГОМК в сукциниловый семиальдегид подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Значение K_m для ГБДГ1 по γ -гидроксимасляной кислоте составило 0.31 ± 0.01 мМ, а по НАД⁺ — $0.47 \text{ мМ} \pm 0.02$. Для ГБДГ2 величина K_m с субстратом ГОМК составляла 0.7 ± 0.03 мМ, K_m по НАД⁺ 0.19 ± 0.01 мМ. Показано, что CaCl₂ и KCl увеличивали активность ГБДГ1, в то время как MgCl₂ оказывал незначительное ингибирующее действие. Каталитическая активность ГБДГ2 увеличивалась как в присутствии CaCl₂, KCl, так и MgCl₂. Проведенное исследование имеет как фундаментальное значение, расширяя знания о свойствах ГБДГ и ее роли в метаболизме растительной клетки, так и прикладное — данные о механизмах регуляции работы ГБДГ могут быть использованы для разработки методов увеличения продуктивности и устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды.

Ключевые слова: γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа, кукуруза, ГАМК-шунт, очистка, ферментативная активность

DOI: 10.31857/S0555109925030038 EDN: FNLUFH

γ -Оксимасляная кислота (ГОМК, гидроксibuтират — ГБ) — органическое соединение, производное γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), которое в клетках растений образуется из сукцинилового полуальдегида (сукциниловый семиальдегид, ССА) в результате функционирования ГАМК-шунта в ходе ферментативной реакции. Данная реакция (рис. 1), как правило, протекает в условиях действия стрессовых факторов [1].

Одной из стратегий адаптации к изменяющимся условиям среды является изменение метаболических потоков для поддержания энергетического

баланса клетки и нейтрализации негативного действия стрессора. В условиях, когда клетке необходим дополнительный приток энергии, усиливается функционирование ЦТК, однако в некоторых случаях, происходит нарушение его работы, чаще всего связанное с инактивацией ферментных систем, обеспечивающих катализ реакций окисления трикарбоновых кислот [2]. Одним из “уязвимых” участков ЦТК является процесс окисления 2-оксоглутарата до сукцинил-СоА посредством функционирования 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (2ОГДК, КФ 1.2.1.105). Данная

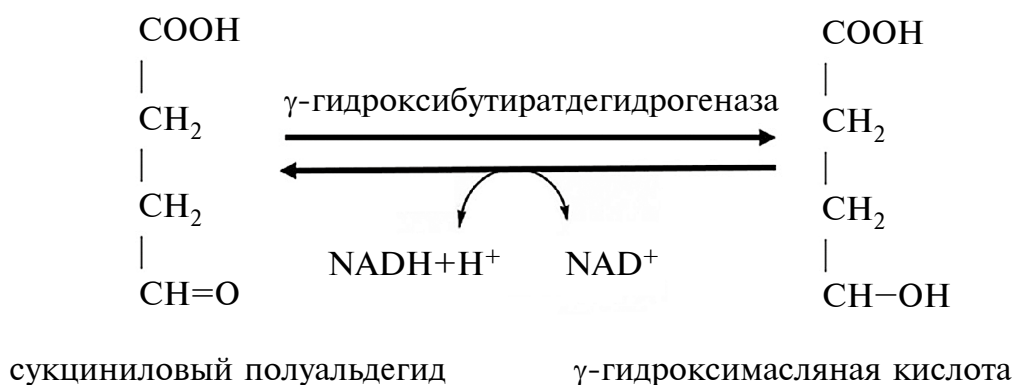


Рис. 1. Схема превращения сукцинилового полуальдегида в γ -гидроксимасляную кислоту.

мультиферментная система представляет собой мембран-связанный белковый комплекс, состоящий из трех компонентов. Взаимозависимость и каскадный принцип катализа окисления 2-оксоглутарата (**2-ОГ**) до сукцинил Co-A, обусловленная скоординированной работой 2ОГДК, делает эту стадию не только лимитирующей, но и самой чувствительной к изменениям в окружающей среде [2]. Длительное стрессовое воздействие приводит к снижению активности 2ОГДК, и перенаправлению потока 2ОГ через образование глутамата на ГАМК-шунт. Глутамат, образующийся посредством аминирования 2ОГ глутаматдегидрогеназой (ГДГ, КФ 1.4.1.3), декарбоксилируется глутаматдекарбоксилазой (ГДК, КФ 4.1.1.15) с образованием γ -аминомасляной кислоты (**ГАМК**). ГАМК транспортируется обратно в митохондрии, где посредством переаминирования, которое осуществляется ГАМК-трансаминазой, превращается в ССА. Янтарный полуальдегид служит субстратом для сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы (**ССАДГ**, КФ 1.2.1.24), которая поставляется образовавшийся сукцинат в ЦТК, минуя тем самым критический участок цикла лимонной кислоты. Однако активность янтарной полуальдегиддегидрогеназы ограничена увеличением восстановительного потенциала и уровня АТФ [3]. В случае увеличения уровня НАДН происходит инактивация ССАДГ по принципу обратной связи, что приводит к накоплению ССА. Накопление альдегидов в клетке приводит к нарушению целостности мембран, изменению пространственной структуры белковых молекул и активации транскрипции генов, экспрессирующихся при окислительном стрессе [4]. Известно, что продолжительный дефицит кислорода в растительных клетках вызывает увеличение содержания янтарного полуальдегида, обусловленное ингибированием (полным или частичным) функционирования ССАДГ [5]. Исследования на системах животного происхождения указывают на существование альтернативного пути катаболизма янтарного полуальдегида в ГОМК [6, 7]. Возможный

путь детоксикации ССА в растительных клетках также подтверждается рядом авторов [1, 6, 9, 10]. В клетках растений возможным путем катаболизма ССА может быть его превращение в ГОМК [1]. Эта теория подтверждается данными о том, что дефицит кислорода, засуха, засоление вызывают увеличение уровня ГОМК в растительных клетках [11]. Гидроксibuтират в живой природе является универсальной сигнальной молекулой, принимая участие в нейронной сигнализации у животных и насекомых [12, 13]. У растений ГБ участвует в процессе симбиотических взаимоотношений с клубеньковыми бактериями, полимеризуясь в поли- β -гидроксibuтират (**ПГБ**) на ранних стадиях симбиоза [14].

Одной из возможных ферментных систем, осуществляющих катаболизм ССА выступает НАД-зависимая γ -гидроксibuтиратдегидрогеназа (**ГБДГ**, КФ 1.1.1.61), которая катализирует обратимое превращение ССА в ГОМК [1]. Таким образом, можно предположить, что ГБДГ играет важную роль в защите растительной клетки от токсического действия ССА [3]. Физиологическая роль ГБДГ заключается в переключении потока ССА на образование ГОМК и обеспечение поддержания клеточного гомеостаза в условиях действия абиотического стресса. Ранее было показано, что активность ГБДГ существенно увеличивается в ответ на действие засоления и дефицит кислорода, что демонстрирует интенсификацию функционирования ответвления пути ГАМК-шунта за счет γ -ГБДГ [15].

В настоящее время данных о физико-химических характеристиках и физиологической роли ГБДГ недостаточно. Более того, для растительных организмов существует ряд противоречивых данных о катаболизме ССА и ГОМК. По одним представлениям, утилизацию ССА, помимо пути с участием ГБДГ, может осуществлять глиоксилатредуктаза (НАДФ-ГР, КФ 1.1.1.79, НАД-ГР, КФ 1.1.1.26). ГР имеет сродство к ГОМК, но реакция протекает с меньшей эффективностью [6]. ГР

имеет хлоропластную и цитоплазматическую локализацию [9]. По сообщениям ряда авторов, одна из изоформ ГР обладает сродством к НАДФ [9], в то время как ГБДГ в качестве кофактора при утилизации ССА использует НАДН, высокий уровень которого ингибирует ССАДГ [3]. Значительное накопление ГОМК в растениях в условиях стресса поднимает вопросы об эффективности его катаболизма. Окисление γ -гидроксимасляной кислоты до янтарного полуальдегида является процессом, протекающим примерно в 1000 раз медленнее скорости, с которой ССА окисляется до сукцината [16]. По некоторым предположениям, возможна как транспортировка ССА из митохондрии в цитоплазму с последующим восстановлением до ГОМК, так и непосредственное восстановление ССА до ГОМК в митохондриях. ГОМК же, в свою очередь уже может быть транспортирован в цитоплазму [12]. Возможность использования митохондриального ССА без транспорта его в цитоплазму или в хлоропласты, была рассмотрена недостаточно полно. Кроме того, имеются данные о том, что катаболизм ССА в растительной клетке осуществляется ССА-редуктаза (ССА-Р, КФ 1.1.1.В47).

Растительная ГБДГ практически не изучена. Исследования, проведенные на арабидопсисе, позволили выявить ген (Gene ID: 822139), который кодирует полипептид из 289 аминокислотных остатков с предполагаемой молекулярной массой 30.3 кДа, обладающий ферментативной активностью ГБДГ [1]. Однако последующие исследования привели к тому, что последовательность была аннотирована как ген, кодирующий в геноме *A. thaliana* ГР — *GLYRI*. В настоящее время генов ГБДГ у растений не аннотировано.

Кинетические свойства ГБДГ бактерий хорошо изучены. Для белка, выделенного из *Cupriavidus necator*, характерно значение оптимума pH 9.0. Проведен анализ активаторов и ингибиторов, а также создана предполагаемая математическая модель строения мономера ГБДГ [17].

К сожалению, недостаток данных о катаболизме ССА и ГОМК в растениях требует более детального изучения процесса регуляции функционирования ГБДГ, чтобы расширить представления не только о катаболизме ГАМК и ГОМК в растениях и понимать метаболизм растительной клетки в процессе адаптации к изменяющимся условиям среды.

Цель работы — выделение изоформ ГБДГ из кукурузы *Zea mays* L. и исследование их физико-химических и каталитических свойств.

МЕТОДИКА

Для получения очищенных препаратов ГБДГ были использованы семидневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская — 76. Семена выращивали гидропонным способом при 10-часовом световом дне при интенсивности света

25 Вт/м² при температуре 25°C в климатической камере LabTech LCC-250 MP (“LabTech”, Корея).

Для получения ферментативной вытяжки листьев проростков растирали в буферном растворе 1 : 10, следующего состава: 50 мМ Tris-HCl буфер (pH 9.0), 3 мМ ЭДТА, 0.1 мМ CaCl₂ и 0.05% Tween 80 [17]. Полученный гомогенат ткани центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R (“Eppendorf”, Германия) при температуре +4°C. Надосадок переносили в новый эппендорф и использовали для определения количества изоферментов ГБДГ в 7-дневных проростках кукурузы методом электрофореза белков в ПААГ.

Активность фермента ГБДГ определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм и температуре 25°C в реакционной смеси, которая содержала 16 мМ γ -оксимасляную кислоту (“Sigma Aldrich”, США), 1 мМ НАД⁺, 100 мМ Tris-HCl буфер, pH 9.0. В качестве контроля использовали среду без добавления фермента и с добавлением ферментного препарата без субстрата реакции [17].

Для исследования субклеточной локализации проводили центрифугирование гомогената, полученного из листьев 7-дневных проростков кукурузы в градиенте плотности сахарозы [18]. Градиент создавался путем последовательного наложения растворов сахарозы в концентрациях: 2.5, 2.3, 1.8, 1.5 и 1.3 М. Навеску растительного материала гомогенизировали в растворе (1 : 5), который содержал 0.1 М Tris-HCl буфер pH 8.0, 0.4 М C₁₂H₂₂O₁₁, 2 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА. Далее гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 3–4 мин при 3000 g, отбирали надосадочную жидкость и центрифугировали еще 3–4 мин с той же скоростью. Супернатант центрифугировали при 18000 g. Осадок растворяли в 10 мл среды и наслаивали на охлажденную до 0°C сахарозу, ступенчатый градиент которой состоял из следующих ступеней: 2.5 (2 мл); 2.3 (5 мл); 1.8 (6 мл); 1.5 (5 мл); 1.3 (5 мл). Разделение органелл достигали путем центрифугирования на центрифуге Beckman (“Beckman”, США) при 100000 g 90 мин при 0°C. Полученные фракции отбирали шприцом в чистые пробирки и разбавляли буфером до концентрации сахарозы 0.4–0.5 М, затем центрифугировали 30 мин при 13000 g для осаждения органелл. Полученные осадки разрушали осмотическим шоком в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7.5.

Для определения чистоты полученных фракций был произведен анализ степени перекрестного загрязнения путем определения активности маркерных ферментов, в цитоплазме — алкогольдегидрогеназы, в митохондриях — сукцинатдегидрогеназы, в пероксисомах — каталазы [19, 20, 21]. В качестве показателя загрязнения хлоропластной фракцией исследовали содержание хлорофилла [22].

Очистка ГБДГ состояла из пяти этапов. Растительный материал растирали в буфере 1 : 5, затем полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 3000 g при 4°C. Полученный супернатант в два этапа фракционировали сульфатом аммония до 85% насыщения и центрифугировали в течение 30 мин при 15000 g при 4°C. Полученный осадок растворяли в 2 мл буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl, pH 9.0. Раствор наносили на колонку с сефадексом G-25 для удаления солей аммония. Собранные активные фракции наносили на колонку с ДЭАЭ-Sephacel ("GE Healthcare", Швеция), хроматографию проводили в линейном градиенте хлорида натрия от 0.05 до 0.3 М.

Для определения молекулярной массы (M_r) нативной молекулы ГБДГ использовали колонку (1.5 × 45 см) заполненную сверхтонким сефадексом G-200. Молекулярную массу определяли по объему выхода фермента ($V_{\text{вых}}$). Расчет M_r белковой молекулы проводили по формуле Детермана [23]:

$$\text{Lg } M_r = 6.698 - 0.987 \cdot \frac{V_{\text{вых}}}{V_{\text{св}}}, \quad (1)$$

где $V_{\text{вых}}$ — объем выхода фермента, мл; $V_{\text{св}}$ — свободный объем колонки, мл, который определяли с использованием голубого декстрана.

Общее количество белка определяли по методу Лоури.

Нативный электрофорез полученных белковых препаратов в полиакриламидном геле осуществляли при температуре 4°C по методу Дэвиса [24]. Белок концентрировали в крупнопористом концентрирующем полиакриламидном геле (4% полиакриламида), разделение проводили в мелкопористом разделяющем геле (6.5% полиакриламида). Для приготовления гелей использовали методику Маурера [25, 26]. Контроль за движением проб осуществляли путем добавления 0.1%-ного раствора бромфенолового синего [26, 27].

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия по методу Лэммли использовали для определения молекулярной массы отдельных субъединиц ГБДГ [28]. В качестве концентрирующего геля использовали 6%-ный полиакриламид с 10%-ным додецилсульфатом натрия, 0.025%-ным N,N,N',N' — тетраметилэтилен-диамином, 10%-ным персульфата аммония в 0.4 М Tris-HCl буфере, pH 6.8. Разделяющий гель имел следующий состав: 2.5%-ный полиакриламид, 10%-ный додецилсульфат натрия; 10%-ный персульфат аммония, 0.025%-ный N,N,N',N' — тетраметилэтилен-диамина в 0.4 М Tris-HCl буфер, pH 8.8.

Электрофорез проводили в буфере, содержащем 0.01 М Tris-HCl, 1%-ный додецилсульфат натрия; 192 мМ глицин, pH 8.3. Пробы денатурировали

на водяной бане в течение 20 мин при температуре 80°C в растворе, содержащем 62.5 мМ Tris-HCl буфер, (pH 6.8), 2% додецилсульфата натрия, 10% глицерина, 5% β-меркаптоэтанола и 0.001% бромфенолового синего.

Специфическое проявление фермента осуществляли тетразолиевым методом путем инкубации геля в растворе, содержащем 1 мМ фенозинметасульфата, 1.8 мМ нитросинего тетразолия, 2 мМ НАД⁺, 10 мМ гидроксibuтирата натрия, 0.1 М Tris-HCl буфер, pH 9.0.

Гомогенность полученных препаратов ГБДГ определяли с помощью окрашивания нитратом серебра [29]. Проявление белков после денатурирующего электрофореза осуществляли с помощью зеленого кумасси G-250 ("Serva", Германия) согласно инструкции производителя в присутствии белкового маркера RAV-10 (ООО "Биолабмикс", Россия).

Константу Михаэлиса-Ментен ГБДГ определяли в реакции образования янтарного полуальдегида методом Лайнуивера-Берка. Скорость реакции определяли путем добавления различных концентраций НАД⁺ и гидроксibuтирата натрия, гликолата натрия.

Определение значения оптимума pH проводили путем серии измерений скорости ферментативной реакции в 100 мМ Tris-HCl буфере с различным значением pH 6.0–9.5.

Активность ГБДГ в присутствии ионов металлов определяли в реакционной среде с добавлением растворов CaCl₂, MgCl₂, KCl различной концентрации. Концентрация ферментного препарата при этом составляла: для ГБДГ1 — 0.06 Е, для ГБДГ2 — 0.05 Е.

Опыты проводили в 3-кратных биологических повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 12.0.

Результаты на графиках выражали как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM). Различия анализировали на статистическую значимость с использованием критерия Стьюдента. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что растительная ГБДГ очень слабо изучена в растениях. Для установления субклеточной локализации ГБДГ в 7-дневных проростках кукурузы было проведено изоплотностное разделение центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Были исследованы четыре фракции кле-

точных органелл на присутствие в них активности ГБДГ: в цитоплазме, хлоропластах, митохондриях и пероксисомах (табл. 1).

Было выявлено, что большая часть активности ГБДГ обнаруживается в митохондриальной фракции — 73.7% и в цитоплазме — 26.3%. Следует отметить, что ГР, которая осуществляет катаболизм ССА и ГОМК имеет хлоропластную и цитоплазматическую локализацию, поэтому образуемый в митохондриях ССА должен быть транспортирован в цитоплазму и/или хлоропласты. Следовательно, митохондриальная форма ГБДГ является первым возможным участником катаболизма митохондриального ССА в растениях.

Для полученных фракций органоидов была определена степень перекрестного загрязнения путем измерения активности маркерных ферментов: алкогольдегидрогеназы — для цитоплазмы, сукцинатдегидрогеназы — для митохондрий и пероксидазы — для пероксисом (табл. 2). Показателем загрязнения полученных фракций хлоропластами служило содержание хлорофилла. Было установлено, что уровень перекрестного загрязнения маркерными ферментами не превышал 8%.

Установлено также, что в 7-дневных проростках обнаруживаются две изоформы исследуемого фермента. Митохондриальная форма ГБДГ имела значение электрофоретической подвижности равное 0.13, а цитоплазматическая форма — $R_f = 0.44$ (рис. 2).

Для анализа физико-химических и каталитических свойств ГБДГ кукурузы была проведена

пятистадийная очистка исследуемого фермента из 7-дневных проростков кукурузы. Из гомогената проростков были получены высокоочищенные препараты двух изоформ фермента ГБДГ1 и ГБДГ2. В результате первых двух стадий фракционирования сульфатом аммония и гель-фильтрации на сефадексе G-25 были получены фракции общей активностью 60.2 Е и удельной активностью 3.7 Е/мг белка. При проведении ионообменной хроматографии с использованием ДЭАЭ—Sephacel были обнаружены два пика активности ГБДГ, которые были элюированы хлористым натрием. Элюция ГБДГ1 осуществлялась 80 мМ NaCl, ГБДГ2 — 135 мМ NaCl. ГБДГ1 была очищена до удельной активности 173.3 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 128.4 раза, выход составлял 5.89%. Вторая изоформа фермента имела удельную активность 195 Е/мг белка со степенью очистки 144.4 раза и выходом 4.4% (табл. 3).

Стадия гель-хроматографии с использованием сефадекса G-200 позволила определить молекулярную массу изоформ ГБДГ1 и ГБДГ2, которая составила 60.3 кДа и 286 кДа соответственно.

С помощью универсального окрашивания нитратом серебра было установлено, что полученные ферментные препараты были очищены до электрофоретически гомогенного состояния (рис. 3).

Использование тетразолиевого метода окрашивания позволило подтвердить, что полученные препараты белка относятся к ГБДГ (рис. 3). Значение R_f для ГБДГ1 составило 0.44 (рис. 3а), для ГБДГ2 значение R_f равняется 0.13 (рис. 3б). Дена-

Таблица 1. Субклеточная локализация активности ГБДГ — в листьях кукурузы ($n = 3, p \leq 0.05$)

Фракция органоидов	Общая активность, Е/г сырой массы	Активность фермента от общего содержания в клетке, %
Цитоплазма	9.33	26.3
Хлоропласты	—	—
Митохондрии	26.124	73.7
Пероксисомы	—	—

Таблица 2. Активность маркерных ферментов, используемых для определения чистоты фракций ($n = 4, p \leq 0.03$)

Фракция органоидов	Активность СДГ, Е/мл		Активность АДГ, Е/мл		Активность каталазы, Е/мл		Содержание хлорофилла, мг/мл	
	Е/мл	%	Е/мл	%	Е/мл	%	мг/мл	%
Цитоплазма	0.042	6.7	5.6	100	н/о	н/о	1.98	2.4
Хлоропласты	0.048	7.7	н/о	н/о	0.012	4.0	78.3	94.0
Митохондрии	0.53	85.5	н/о	н/о	0.018	6.0	2.2	2.6
Пероксисомы	н/о	н/о	н/о	н/о	0.27	90.0	н/о	н/о

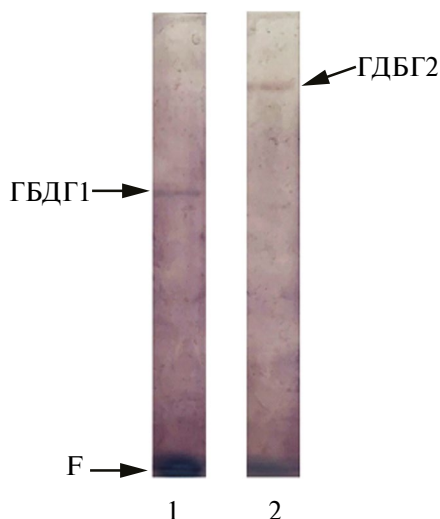


Рис. 2. Электрофореграммы цитоплазматической (1) и митохондриальной (2) фракций из листьев кукурузы. Окрашивание гелей проводилось с помощью тетразолиевого метода. ГБДГ_{цит} — ГБДГ в цитоплазматической фракции, ГБДГ_{мтх} — митохондриальная фракция, F — фронт красителя.

турирующий электрофорез в ПААГ и последующее окрашивание коллоидным зеленым кумасси G-250 позволили установить, что масса отдельных субъединиц ГБДГ1 составляла примерно 15 кДа (рис. 4а). Анализ результатов SDS-электрофореза выявил, что изоформа ГБДГ2 состояла из нескольких типов субъединиц с молекулярной массой 52 кДа, 59 кДа и 66 кДа (рис. 4б).

Для полученных изоформ ГБДГ из листьев кукурузы был определен оптимум pH в реакции окисления ГОМК (рис. 5). Оптимальное значение концентрации ионов водорода для препарата ГБДГ1 в реакции окисления ГОМК до ССА составило 9.0, а для препарата ГБДГ2 оптимум pH равен 7.0.

Анализ сродства ферментных препаратов ГБДГ к субстратам выявил значения константы Михаэлиса для ГОМК и НАД⁺ (рис. 6 а–г). Для ГБДГ1 величина K_m по ГОМК составила 0.31 ± 0.01 мМ, K_m по НАД⁺ 0.47 ± 0.02 мМ соответственно. Для ГБДГ2 K_m по ГОМК составила 0.7 ± 0.03 мМ, K_m по НАД⁺ 0.19 ± 0.01 мМ соответственно. Изоформа ГБДГ1 имела большее сродство к ГОМК, в то время как ГБДГ2 имела большее сродство к НАД⁺. Следовательно, можно утверждать, что полученные препараты обладали различным сродством к ГОМК и НАД, а также имели разные pH-оптимумы действия.

Известно, что нередко реакции катализа в клетках протекают в присутствии ионов металлов, которые могут оказывать активирующий эффект на ферментативную активность, в то время как другие способны ингибировать катализ. К сожалению, до сих пор влияние ионов металлов на ферментативную активность ГБДГ не было изучено. В работе было проанализировано влияние наиболее распространенных в клетке ионов металлов (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) на каталитическую активность очищенных изоформ ГБДГ.

В ходе исследования влияния различных металлов на активность изоформ ГБДГ1 было обнаружено, что добавление хлорида кальция в концентрации 14.6 мМ увеличивало активность этой изоформы в 7.5 раз (рис. 7а). При этом, хлорид магния оказывал незначительное ингибирующее действие, на активность (рис. 7б), хлорид калия в концентрации 6.6 мМ увеличивал активность ГБДГ1 в 3.7 раза (рис. 7в) [17].

Изучение влияния ионов металлов на активность ГБДГ2 показало, что ионы кальция в концентрации 2 мМ увеличивали активность данной изоформы в 4.2 раза (рис. 7г). Хлорид магния активировал каталитическую активность ГБДГ2

Таблица 3. Стадии очистки изоформ ГБДГ из листьев кукурузы ($n = 3, p \leq 0.05$)

Стадия		V, мл	Количество белка, мг	E	E/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат		20	65.3	88.2	1.35	100	1
Фракционирование сульфатом аммония до 80% насыщения		2	16.3	60.2	3.7	68.3	2.7
Гель-фильтрация наSephadex G-25		4	15.6	59.4	3.8	67.3	2.8
ДЭАЭ- Sephacel	1	4	0.03	5.2	173.3	5.89	128.4
ДЭАЭ- Sephacel	2	2	0.020	3.9	195	4.4	144.4
Sephadex G-200	1	2	0.025	4.9	196	5.6	134.2
Sephadex G-200	2	2	0.015	3.6	240	4.1	177.8

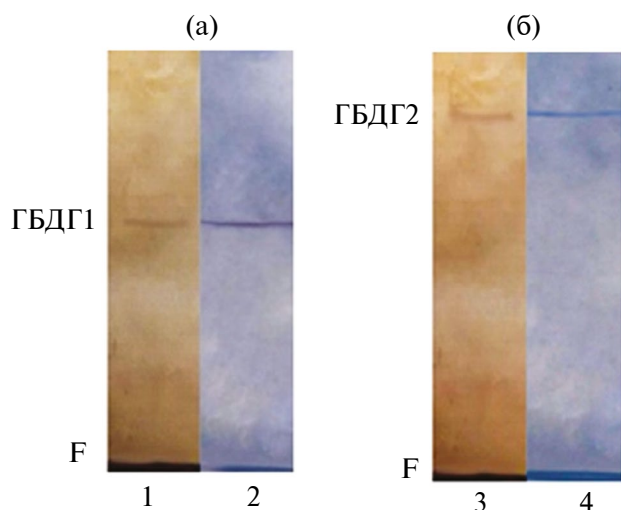


Рис. 3. Электрофореграммы очищенных препаратов ГБДГ1 (а) и ГБДГ2 (б) из проростков кукурузы: 1, 3 — окрашивание ГБДГ с использованием AgNO_3 , 2, 4 — специфическое проявление ГБДГ, белковая полоса ГБДГ1 и ГБДГ2, F — фронт красителя.

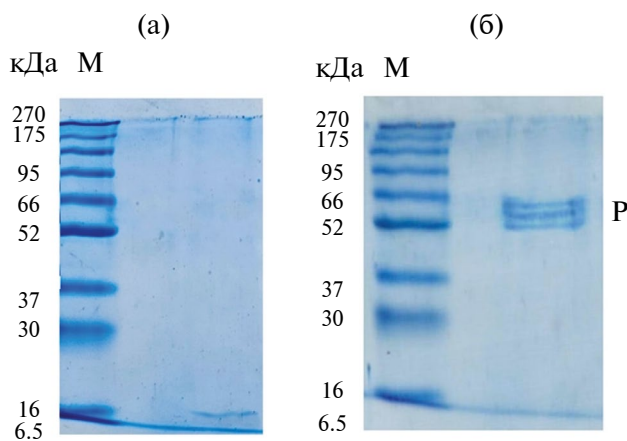


Рис. 4. Электрофореграмма препаратов ГБДГ1 (а) и ГБДГ2 (б), полученные в результате проведения SDS-электрофореза: окрашивание с использованием коллоидного зеленого кумасси G-250, М — метки, Р — белковая полоса.

более чем в 6 раз при внесении 0.47 мМ соли в реакционную смесь (рис. 7д). Ионы калия также увеличивают ферментативную активность ГБДГ2 в 3.3 раза в концентрации 1.3 мМ (рис. 7е).

Таким образом, исследование кинетических особенностей функционирования изоформ ГБДГ, полученных из зеленых проростков кукурузы, позволило установить основные характеристики исследуемого фермента. Активность ГБДГ обнаруживается в митохондриях — 73.7% и в цитоплазме — 26.3%. Из полученных результатов следует, что ГБДГ1 — гомотетрамер с молекулярной массой нативной молекулы около 60.3 кДа и массой отдельных субъединиц ~ 15 кДа, ГБДГ2 — гетеро-

мер с молекулярной массой нативной молекулы 286 кДа и состоит из субъединиц с различной молекулярной массой в диапазоне от 52 до 66 кДа. Полученные изоформы ГБДГ обладали разными кинетическими свойствами. Значение константы Михаэлиса для ГБДГ1 по реакции превращения ГОМК в ССА составило 0.31 ± 0.01 мМ, K_m по НАД^+ 0.47 ± 0.02 мМ соответственно. Для ГБДГ2 K_m по ГОМК составила 0.7 ± 0.03 мМ, K_m по НАД^+ 0.19 ± 0.01 мМ соответственно. pH-оптимум действия ГБДГ1 для протекания реакции окисления ГОМК до ССА составлял 9.0, для препарата ГБДГ2 оптимум pH равен 7.0. Установлено, что изоформа ГБДГ1 имела большее сродство к ГОМК, в то время как ГБДГ2 имела большее сродство к НАД^+ . Наибольшее активирующее действие на данную изоформу оказывает внесение в среду реакции ионов магния.

Получение двух изоформ ГБДГ из зеленых проростков кукурузы, обладающих отличными между собой физико-химическими и кинетическими характеристиками, позволило предположить важную роль каждой изоформы в разных метаболических процессах. Различная субклеточная локализация двух изоформ фермента указывала на каталитическое превращения сукцинилового полуальдегида в γ -гидроксимасляную кислоту в митохондриях, которая в последующем может быть транспортирована из митохондрий в цитоплазму для утилизации. Установлено, что митохондриальная ГБДГ обладала свойствами отличными от цитоплазматической изоформы. Для нее характерно большее сродство к ГОМК, а pH-оптимум действия — 7.0. Более того, активаторами каталитической активности митохондриальной ГБДГ служили ионы Mg, Ca, K. Предполагается, что митохондриальная изоформа ГБДГ играет важную роль в поддержании функционирования ГАМК-шунта за счет активации резервного пути утилизации сукцинилового полуальдегида, накапливающегося при длительном стрессовом воздействии, в ГОМК. Янтарный полуальдегид, являющийся интермедиатом ГАМК-шунта, накапливаясь в митохондриях, способен повреждать липиды, белки, ДНК, а также существенно изменять транскрипционную активность некоторых генов [30, 31]. ГБДГ восстанавливает ССА до ГОМК, используя в качестве кофермента НАДН, высокий уровень которого может ингибировать ССАДГ, являясь тем самым одним из возможных источников накопления ССА [3]. Дальнейший путь катаболизма ГОМК в листьях растений не известен. Однако имеются данные о том, что в корнях некоторых растений, находящихся в симбиотических отношениях с *Agrobacterium*, ГОМК участвует в поддержании этих взаимоотношений [32]. В настоящее время нет никаких доказательств наличия у растений рецепторов γ -гидроксимасляной кислоты, как и доказательств их отсутствия, хотя известно, что уровень сигнала чувства кворума в *Agrobacterium* модулируется ГБ.

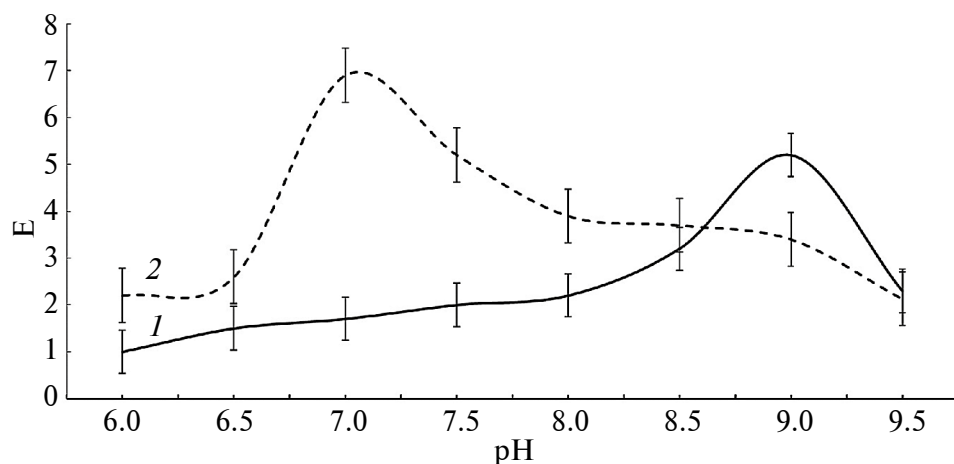


Рис. 5. Зависимость активности полученного препарата ГБДГ1 (1) и ГБДГ2 (2) из листьев кукурузы от pH.

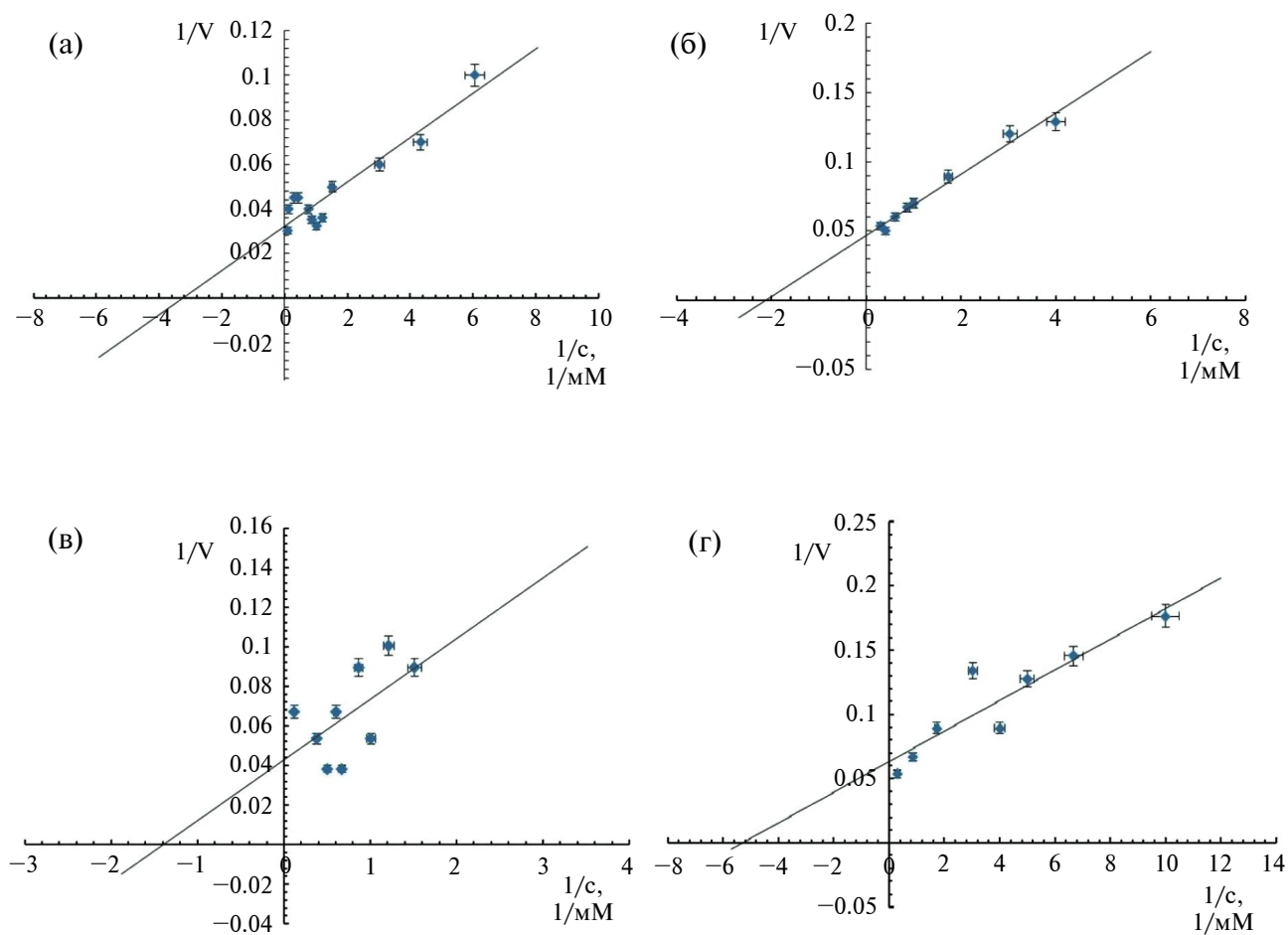


Рис. 6. Определение константы Михаэлиса препаратов ГБДГ1 (а, б) и ГБДГ2 (в, г), полученных из листьев кукурузы: а, в — по γ -гидроксибутирату, б, г — по НАД⁺.

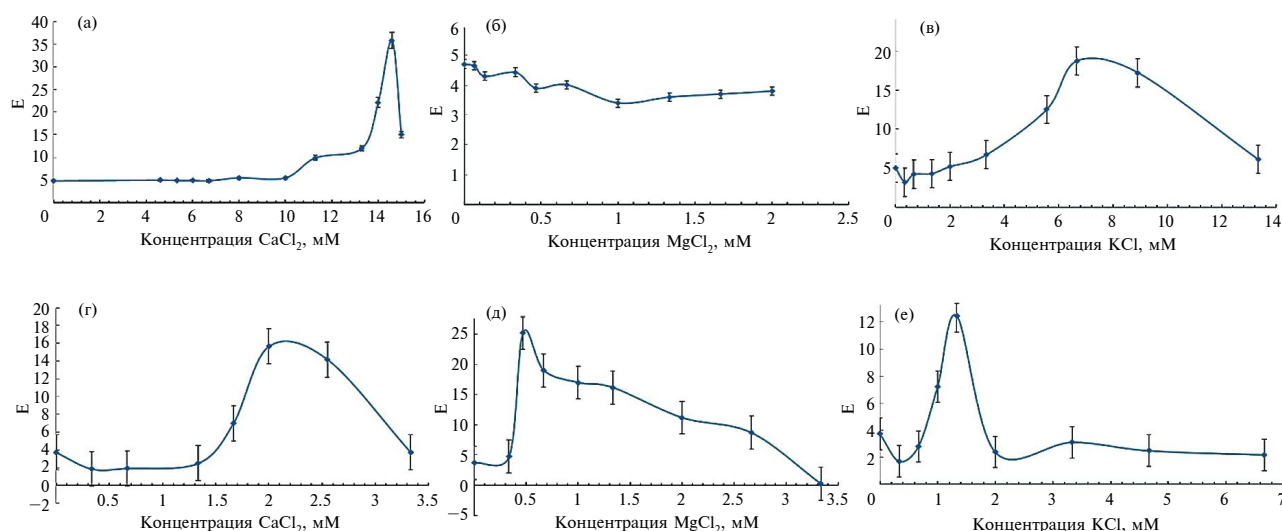


Рис. 7. Влияние CaCl_2 (а, г), MgCl_2 (б, д), KCl (в, е) на активность ГБДГ1 (а, б, в) и ГБДГ2 (г, д, е).

Полученные изоформы ГБДГ различаются по кинетическим свойствам. Значение константы Михаэлиса для цитоплазматической формы — ГБДГ1 по реакции превращения ГОМК в ССА составило 0.31 ± 0.01 мМ, K_m по НАД^+ 0.47 ± 0.02 мМ соответственно, для ГБДГ2 K_m по ГОМК — 0.7 ± 0.03 мМ, K_m по НАД^+ 0.19 ± 0.01 мМ соответственно. Выявлено, что рН-оптимум действия цитоплазматической ГБДГ в реакции окисления ГОМК до ССА составлял 9.0. Следует отметить, что цитоплазматическая форма ГБДГ активируется ионами кальция и калия, в то время как магний оказывал слабый ингибирующий эффект на каталитическую активность этой формы фермента.

Различные свойства цитоплазматической ГБДГ сильно отличаются от таковых для митохондриальной изоформы, что, по всей вероятности, указывает на особую роль ССА и ГБ в клеточном метаболизме. По-видимому, эта форма обеспечивает защиту клетки от негативного влияния сукцинилового полуальдегида. Кроме того, не исключается ее участие в поставке субстратов в метаболические процессы.

На данный момент ген, кодирующий ГБДГ в геноме кукурузы, не аннотирован. Более того, для растительных объектов отсутствуют данные о нуклеотидных последовательностях, кодирующих ГБДГ. В то же время, достаточно хорошо изучены ГБДГ у бактериальных организмов, в том числе и на генетическом уровне [17, 33]. В будущем планируется провести сравнительный анализ генов ГБДГ бактерий и грибов, и на основании установленных консервативных участков разработать вырожденные праймеры для анализа функциональной активности ферментов.

Полученные результаты имеют практическую значимость. Установленные каталитические и физико-химические характеристики, показывающие роль ГБДГ в адаптивной реакции растительной клетки на абиотические стрессы, позволяют использовать их при получении новых селекционных линий толерантных сельскохозяйственных растений к засолению и другим факторам. Разработанная нами схема очистки позволит получать гомогенные препараты ГБДГ из других растительных объектов для решения различных научных проблем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Breitkreuz K.E., Allan W.L., Van Cauwenberghe O.R., Jakobs C., Talibi D., Andre B., Shelp B.J. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 42. P. 41552–41556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305717200>
2. Eprintsev A.T., Anokhina G.B., Selivanova P.S., Moskvina P.P., Igamberdiev A.U. // Plants. 2024. V.13. № 18. P. 2651. <https://doi.org/10.3390/plants13182651>

3. Busch K. B., Fromm H. // Plant Physiol. 1999. V. 121. № 2. P. 589–598.
<https://doi.org/10.1104/pp.121.2.589>
4. Weber H., Chételat A., Reymond P., Farmer E.E. // Plant J. 2004. V. 37. № 6. P. 877–888.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.02013.x>
5. Ji J., Yue J., Xie T., Chen W., Du C., Chang E. et al. // Planta. 2018. V. 248. P. 675–690.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2915-9>
6. Andriamampandry C., Siffert J.C., Schmitt M., Garnier J.M., Staub A., Muller C. et al. // Biochem. J. 1998. V. 334. № 1. P. 43–50.
<https://doi.org/doi:10.1042/bj3340043>
7. Schaller, M., Schaffhauser, M., Sans, N. and Wermuth, B. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 265. № 3. P. 1056–1060.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00826.x>
8. Hoover G.J., Prentice G.A., Merrill A.R., Shelp B.J. // Botany. 2007. V. 85. № 9. P. 896–902.
<https://doi.org/10.1139/B07-082>
9. Simpson J.P., Di Leo R., Dhanoa P.K., Allan W.L., Makhmoudova A., Clark S.M., et al. // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. № 9. P. 2545–2554.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern123>
10. Allan W.L., Simpson J.P., Clark S.M., Shelp B.J. // J. Exp. Bot. 2008. V. 59. № 9. P. 2555–2564.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern122>
11. Allan L.W., Peiris C., Bown A.W., Shelp B.J. // Canadian Journal of Plant Science. 2003. V. 83. № 4. P. 951–953.
<https://doi.org/10.4141/P03-085>
12. Fait A., Yellin A., Fromm H. // Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life. 2006. P. 171–185.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-28516-8_12
13. Tay E., Lo W. K. W., Murnion B. // Subst. Abuse Rehabil. 2022. V. 13. P. 13–23.
<https://doi.org/10.2147/SAR.S315720>
14. Trainer M.A., Charles T.C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. № 4. P. 377–386.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0354-1>
15. Плотникова Е.В., Анохина Г.Б., Епринцев А.Т., Вандышев Д.Ю. // Вестник Воронежского государственного университета Серия: Химия. Биология. Фармация. 2023. № 3 С. 25–30.
16. Kaufman E.E., Nelson T. // Neurochem. Res. 1991. V. 16. P. 965–974.
<https://doi.org/10.1007/BF00965839>
17. Taxon E.S., Halbers L.P., Parsons S.M. // BBA-Proteins and Proteomics. 2020. V. 1868. № 5. P. 140376.
<https://doi.org/10.1016/j.bbaap.2020.140376>
18. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование, М.: Наука, 1981. 288 с.
19. Pathuri I.P., Reitberger I.E., Hückelhoven R., Proels R.K. // J. Exp. Bot. 2011. V. 10. P. 3449–3457.
<https://doi.org/10.1093/jxb/err017>
20. Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 3. С. 409–415.
21. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Бу Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 332–340.
22. Jelski W., Laniewska-Dunaj M., Orywal K., Kochanowicz J., Rutkowski R., Szmitkowski M. // Neurochem Res. 2014. V. 39. P. 2313–2318.
23. Демтерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир, 1970. С. 252.
24. Tulchin N., Ornstein L., Davis B.J. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 485–490.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90558-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90558-3)
25. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Эл. Издание. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. С. 487
26. Маурер Г. Диск-электрофорез: Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. Пер. с нем. М.: Мир, 1971. С. 248.
27. Гааль Э., Медьешу Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. С. 446.
28. Laemmly U.K. // Nature. 1970. V. 77. № 4. P. 680–683.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
29. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // Anal. Chem. 1996. V. 68. № 5. P. 850–858.
<https://doi.org/10.1021/ac950914h>
30. Zarei A., Brikis C.J., Bajwa V.S., Chiu G.Z., Simpson J.P. et al. // Frontiers in Plant Science. 2017. V. 8. P. 1399.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01399>
31. Bouché N., Fait A., Bouchez D., Moller S.G., Fromm H. // PNAS. 2003. V. 100. № 11. P. 6843–6848.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1037532100>
32. Shelp B.J., Allan W.L., Faure D. // Plant-Environment Interactions From Sensory Plant Biology to Active Plant Behavior. / Ed. F. Baluska. Springer, 2009. P. 73–84.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-89230-4_4
33. Bravo D.T., Harris D.O., Parsons S.M. // Journal of Forensic Sciences. 2004. V. 49. № 2. P. 379–387.

Physicochemical and Catalytic Properties of Homogeneous Isoforms of γ -Hydroxybutyrate Dehydrogenase from Maize (*Zea mays* L.)

G. B. Anokhina^a, E. V. Plotnikova^a, and A. T. Eprintsev^{a, *}

^a*Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia*

^{*}*e-mail: bc366@bio.vsu.ru*

γ -Hydroxybutyrate dehydrogenase (**GBDH**) is an enzyme belonging to the oxidoreductase class, catalyzing the reversible conversion of succinic semialdehyde (**SSA**) to γ -hydroxybutyric acid (**GHB**). It has been established that in maize seedlings, GBDH has mitochondrial (73.7%) and cytoplasmic localization (26.3%). Two homogeneous preparations of GBDH isoforms were obtained from 7-day-old maize seedlings. The purified GBDH1 preparation had a native molecular mass of 60.3 kDa (Mr of individual subunits ~15 kDa). GBDH2, a heteromer with a molecular mass of ~286 kDa, consisted of subunits with Mr ranging from 52 to 66 kDa. The optimal pH values for the obtained enzymes differed: for GBDH1, the optimum pH for the oxidation reaction of γ -hydroxybutyrate was 9.0, while for GBDH2, the optimum pH was 7.0. The kinetics of the enzymatic reaction of GHB conversion to succinic semialdehyde follows the Michaelis-Menten equation. The Km value for GBDH1 with γ -hydroxybutyric acid was 0.31 ± 0.01 mM, and for NAD⁺ it was $0.47 \text{ mM} \pm 0.02$. For GBDH2, the Km value with the substrate GHB was 0.7 ± 0.03 mM, and the Km for NAD⁺ was 0.19 ± 0.01 mM. It was shown that CaCl₂ and KCl increased the activity of GBDH1, while MgCl₂ had a minor inhibitory effect. The catalytic activity of GBDH2 increased in the presence of CaCl₂, KCl, and MgCl₂. The study has both fundamental significance, expanding knowledge about the properties of GBDH and its role in plant cell metabolism, and applied significance — data on the mechanisms of regulation of GBDH work can be used to develop methods for increasing the productivity and resistance of plants to unfavorable environmental factors.

Keywords: γ -hydroxybutyrate dehydrogenase, maize, GABA shunt, purification, enzymatic activity