

На правах рукописи

ФЕДОРИН ДМИТРИЙ НИКОЛАЕВИЧ

**Биохимические и молекулярные механизмы фитохром-зависимой
световой регуляции функционирования ферментов
метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях**

1.5.21 – Физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Воронеж – 2023

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии клетки ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Научный консультант: **Епринцев Александр Трофимович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Официальные оппоненты: **Креславский Владимир Данилович**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии РАН ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Боровский Геннадий Борисович, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Гинс Валентина Карловна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии, интродукции и технологии функциональных продуктов ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»

Ведущая организация: Институт биологии – обособленное подразделение ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «02» февраля 2024 года в 12:00 час. на заседании диссертационного совета 35.2.030.09, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте www.timacad.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 35.2.030.09,
кандидат биологических наук, доцент

Р.Н. Киракосян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Анализ литературы свидетельствует о противоречивости данных о функционировании окислительного метаболизма в растениях в условиях освещения (Мамушина, Зубкова, 1995). Влияние света на скорость дыхательного метаболизма растений является установленным фактом, что показано для некоторых ферментативных систем, таких как сукцинатдегидрогеназа, НАДН-дегидрогеназа, НАД-фосфолицеральдегид дегидрогеназа (Escobar *et al.*, 2004; Любимов, Креславский, 2017; Igamberdiev *et al.*, 2014; Любимов *и др.*, 2020). При этом, работ, посвященных выяснению биохимических и молекулярных механизмов регуляторного действия света на активность дыхательных ферментов, практически нет.

Светозависимый характер функционирования ЦТК и ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот может быть обусловлен наличием фоторецепторных систем клетки, в частности фитохромов и криптохромов, осуществляющих регуляцию на уровне контроля экспрессии генов-мишеней (Galon *et al.*, 2010). Ранее было установлено, что фитохромная система обеспечивает регуляцию активности ферментов дыхания растений, таких как НАДН-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы (Escobar *et al.*, 2004; Eprintsev *et al.*, 2013; Igamberdiev *et al.*, 2014). В реализации механизма фитохром-зависимой регуляции ферментов могут принимать участие различные вторичные мессенджеры, такие как ионы Ca^{2+} , диацилглицерол, цАМФ (Волотовский, 1998; Wu *et al.*, 1996; Kreslavski *et al.*, 2012; Войцеховская, 2019). Свое действие фитохром может проявлять путем изменения состояния клеточных мембран, в том числе и митохондриальной, или воздействием на генетический аппарат клетки посредством различных транскрипционных факторов регулируя интенсивность экспрессии генов (Galvao and Fankhauser, 2015; Oh, 2017; Ushijima *et al.*, 2017; Legris *et al.*, 2019). Важную роль в регуляции экспрессии генов также играет криптохромная система (Wang *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2011). Свое действие криптохром, также, как и фитохром, реализует за счет специализированных семейств факторов транскрипции типа COP1 и HY5 (Zhang *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2001). В связи с этим значительный интерес вызывают исследования трансдукции фоторецепторного сигнала транскрипционными факторами семейства PIF, локализованными в ядре, и COP1, который на свету выходит в цитоплазму. Значительную роль в данном процессе могут играть специфические сайты связывания транскрипционного фактора с промоторной областью гена-мишени, в частности с G- и E-

участками, обуславливающие уровень их транскрипции (Ezer *et al.*, 2017; Seitz *et al.*, 2010).

В последнее время большое внимание уделяется молекулярным механизмам регуляции экспрессии генов, в частности это относится к эпигенетическому механизму, обусловленному изменением метильного статуса ДНК. Особую роль в эпигенетическом контроле работы генов ферментов, в том числе энзимов окислительного метаболизма, играет изменение метильного статуса промоторных областей генов (Bartels *et al.*, 2018; Suzuki, Bird, 2008).

Исследования модельного растительного объекта *Arabidopsis thaliana* показали, что большинство генов метилированы или в своих промоторах, или в транскрибируемых областях, и что степень метилирования генов значительно коррелирует с их уровнем транскрипции (Shawn *et al.*, 2011).

Распределение CG-динуклеотидов в геноме не однородно, особенно в регуляторных участках генов, и важно для нормального функционирования клетки. В рамках промоторных областей генов возможно формирование CpG-островков, изменение метильного статуса которых является регулирующим фактором (Antequera, Bird, 1993). Роль метилирования, как модулятора экспрессии генов, лежит в основе наблюдающейся активации генов, имеющих CpG-островков в промоторе. В промоторах, не содержащих CpG-островков, структура метилирования носит тканеспецифический характер и отражает состояние транскрипционной активности генов. Как правило, в такой ситуации CG-динуклеотиды не метилированы в промоторах активно экспрессирующихся генов и метилированы в промоторах неэкспрессирующихся генов (Comb, Goodman, 1990).

На сегодняшний день известно незначительное количество исследований эпигенетической регуляции генов у растений при изменении светового режима. Например, в регуляции фотопериода *Arabidopsis* используется гистоновая деметилаза JMJD5 для деметилирования H3K36, а изменение транскрипции генов *Arabidopsis*, ответственных за фотопериод, регулируется модификацией гистонов (Malapeira *et al.*, 2012; Song, Noh, 2012). Исследование гибрида *Arabidopsis* показало, что повышенное метилирование ДНК по всему геному может привести к подавлению двух генов, ответственных за фотопериод (CCA1 и LHY), тем самым изменяя циркадный ритм (Shen *et al.*, 2012). Это открытие предполагает, что метилирование ДНК может также регулировать процессы фотопериодичности растений, однако до настоящего времени участие метилирования ДНК в ежедневной регуляции

экспрессии генов и циркадных часах растений требует дополнительного изучения (Liang *et al.*, 2019).

Целью данной работы являлось исследование биохимических и молекулярных механизмов фитохром-зависимой световой регуляции активности ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот и уровня экспрессии их генов в растениях.

В соответствии с заданной целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить в высокоочищенном состоянии препараты изоферментов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы из листьев кукурузы и определить их физико-химические, кинетические и регуляторные характеристики.

2. Выявить зависимость величины ферментативной активности изоферментов исследуемых энзимов и уровня транскриптов их генов в листьях от светового режима растений.

3. Определить роль внутриклеточного перераспределения свободных катионов кальция в ядрах листьев кукурузы в различных световых режимах.

4. Установить роль отдельных кальмодулинов во внутриядерной трансдукции фоторецепторного сигнала в растительной клетке.

5. Определить зависимость уровня транскриптов генов фитохром-зависимых факторов семейства PIF от наличия активной и неактивной формы фитохрома A в клетке.

6. Исследовать особенности структурной организации промоторных областей генов изучаемых ферментов, обеспечивающих их взаимодействие с транскрипционными факторами.

7. Изучить характер распределения CG-динуклеотидов в нуклеотидной последовательности промоторов генов исследуемых изоферментов и установить наличие CpG-островков, как элементов, необходимых для эпигенетической регуляции транскрипции генов.

8. Определить изменение метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов промоторов генов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы у растений в условиях различного сочетания КС и ДКС.

9. Разработать модель трансдукции фитохромного сигнала в растительной клетке, объясняющую регуляцию функционирования изоферментов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы.

Научная новизна.

Результаты проведенного исследования расширяют и углубляют современные представления о механизмах регуляции функционирования

ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растительной клетке при адаптации к стрессовым факторам.

Изучен механизм световой регуляции активности изоферментов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы и экспрессии их генов посредством фитохромной системы. Показано ингибирующее действие активной формы фитохрома А на митохондриальные изоферменты исследуемых энзимов. Установлены изменения в работе генов цитоплазматических изоферментов аконитатгидратазы и цитратсинтазы в зависимости от воздействия красного и дальнего красного света в различном сочетании на растения кукурузы. Установлено, что ключевую роль в механизме регуляции принимает фитохром А, который активирует транскрипцию генов *ACO2* и *CSY2* в листьях растений, что приводит к увеличению активности исследуемых изоферментов. При этом фитохром В также принимает участие в данном процессе в качестве вспомогательного фактора, что особенно характерно для гена *SDH2-3*. Применение специфических ингибиторов кальциевого транспорта позволило установить способ внутриклеточной трансдукции фитохромного сигнала, обеспечивающего регуляцию генов-мишеней. Трансдукция светового сигнала от фоторецептора в ядро происходит благодаря концентрационным колебаниям двухвалентного кальция (вторичный внутриклеточный мессенджер), а также посредством кальмодулинов 7 и 3. Важную роль во внутриядерной трансдукции фоторецепторного сигнала играет фитохром-зависимый (PIF3) транскрипционный фактор, что указывает на опосредованный свето-зависимый механизм регуляции генов исследуемых изоферментов.

Показано, что величины уровней транскрипции генов исследуемых изоферментов СДГ, ЦС и АГ зависят от метильного статуса отдельных СG-динуклеотидов их промоторов. При этом, для всех генов свето-зависимых изоферментов установлено наличие CpG-островка в составе промотора. Выявлено, что высокий метильный статус промоторов исследуемых генов в условиях облучения растений КС приводит к подавлению их транскрипции.

Практическая значимость.

Выявленные особенности регуляции энергетического метаболизма растений, обусловленного функционированием дыхания и фотосинтеза в растительной клетке, позволяют разработать способы контроля данных процессов, обеспечивающих увеличение урожайности и устойчивость растений при воздействии стрессовых факторов на растение.

Механизмы фитохром-зависимой регуляции скорости функционирования изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот позволяют оптимизировать условия культивирования растений и повысить их урожайность за счет оптимизации спектральных характеристик освещения.

Гомогенные препараты сукцинатдегидрогеназы могут быть использованы для регенерации ФАД или ФАДН₂ при исследовании других ферментных систем, в аналитических измерениях сукцината в биологических образцах. Изоферменты сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы могут применяться в качестве источников антител для оценки качества пищевой продукции методом иммуноферментного анализа на предмет наличия органических кислот.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе на медико-биологическом факультете Воронежского государственного университета при чтении лекций по «Физиологии растений», «Биохимии», в спецкурсах «Дыхание растений», «Фотосинтез», «Метаболизм органических кислот», а также при проведении практикумов и выполнении курсовых и дипломных работ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Изоферменты СДГ, ЦС и АГ имеют значительные отличия в физико-химических и некоторых кинетических и регуляторных характеристиках. Установленные различия в свойствах исследуемых изоферментов отражают их функциональную роль в организации метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в листьях растений при изменении соотношения КС к ДКС.

2. Светорегуляция каталитической активности СДГ, ЦС и АГ в зеленых листьях кукурузы при воздействии на растения КС и ДКС в различном сочетании осуществляется активными формами фитохрома А и фитохрома В, которые проявляют ингибирующее действие по отношению к митохондриальным изоферментам. Противоположный эффект наблюдается по отношению к внемитохондриальным изоферментам.

3. Трансдукция фитохромного сигнала в ядро клетки осуществляется путем перераспределения свободных катионов кальция между компартментами клетки, что приводит к активации кальмодулинов 7 и 3. Взаимодействуя с Ca²⁺-САМ зависимой киназой кальмодулины 7 и 3 обеспечивают контроль за функционированием транскрипционного фактора PIF3, регулирующего экспрессию генов изоферментов СДГ, АГ и ЦС в зеленых листьях кукурузы.

4. Изменение метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в составе CpG-островков промоторов генов, обеспечивает регуляцию их функционирования в листьях растений в условиях различного освещения. Высокий метильный статус промоторов генов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы приводит к подавлению их транскрипции, что предполагает эпигенетический механизм регуляции экспрессии ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот. Наличие CpG-островков в составе промоторов генов является необходимым условием эпигенетической регуляции за счет изменения метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в их составе.

5. Разработана модель трансдукции фитохромного сигнала в клетке растений и механизм регуляции экспрессии генов изоферментов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы при их облучении красным и дальним красным светом. Предполагается, что внутриклеточная сигнализация осуществляется посредством свободных катионов кальция, накопление которых в ядре активирует кальмодулины 7 и 3, модулирующие работу транскрипционного фактора PIF3. Кроме того, кальмодулины регулируют активность ДНК-метилтрансфераз, определяющих статус метилирования CpG-островков, что обеспечивает эпигенетический механизм регуляции функционирования изоферментов СДГ, ЦС и АГ.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на Международных, региональных и университетских конференциях. Они были представлены на межрегиональных конференциях, посвященных памяти Землянухина А.А., «Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов» (Воронеж, 2011, 2013, 2014, 2015, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022), на Международной конференции Plant Biotech 2016 (Kingston, 2016), на XVI Всероссийской конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2014), на 8-м Съезде Общества физиологов растений России (Петрозаводск, 2015), на XXV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2016), на 21-й Международной школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2017), на Научной конференции и школе для молодых ученых "Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты" (Судак, 2017), Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018), Всероссийской научной

конференции с международным участием «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019), Всероссийской научной конференции с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий» (Нижний Новгород, 2022), ежегодных научных сессиях, отчетных конференциях преподавателей и сотрудников Воронежского госуниверситета (2013-2022).

Публикации. Основные результаты настоящей диссертационной работы изложены в 159 публикациях и тезисах, из них 21 - журналах, рекомендованных ВАК РФ, 32 - рецензируемых журналах систем Web of Science и Scopus.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 220 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей 75 рисунков, 22 таблицы, заключения, принятых сокращений, списка литературы, включающей 411 наименований, в том числе 382 – на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектами исследования служили растения кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные гидропонным способом при температуре 22°C в течение 14 дней. Также использовали 24-дневные растения *Arabidopsis thaliana* L., выращенные при 12-часовом световом дне с интенсивностью света 90 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹. В работе использовали семена двух линий растений *A. thaliana*: растения дикого типа (*Col-0*), мутанты по гену апобелка фитохрома А (*phyA-201*), мутанты по гену апобелка фитохрома В (*phyB-1*), полученные из Института Макса Планка (Гольм, Германия).

Создание разных условий светового режима. В качестве источников белого света применяли лампы дневного света в климатической камере LabTech LCC-2-MP. После прорастания растения помещали в темную камеру на 24 часа (вариант «темнота») и облучали красным (вариант «КС») и/или дальним красным (вариант «КС» и «КС+ДКС») светом в течение 15 минут. Для этого использовали светодиоды с областью излучения 640-680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710-750 нм (ЗЛ127А-5, Россия). Интенсивность света составляла 4 мкмоль квантов · м⁻²·с⁻¹. Пробы для дальнейшего анализа отбирали через 3 часа с момента облучения.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы в листьях растений. Активность СДГ измеряли в зеленых листьях кукурузы на спектрофотометре T70+ UV-VIS Spectrophotometer (PG Instruments limited, Англия) при длине волны 600 нм. За единицу ферментативной активности

принимали количество фермента, образующего 1 мкМ продукта за 1 мин при 25°C (Cooper, Beevers, 1969).

Измерение активности цитратсинтазы. Активность ЦС определяли спектрофотометрически путем образования аниона тионитробензоата из DTNB и SH-KoA при 412 нм (Kim et. al., 2013).

Определение активности аконитатгидратазы. Аконитазную активность измеряли спектрофотометрически с использованием цитрата или d,l-изоцитрата в качестве субстрата путем регистрации увеличения оптической плотности при 240 нм при 25°C из-за образования двойной связи в молекуле цис-аконитата (Wacon et. al., 1961).

Определение содержания белка. Общее количество белка определяли по методу Лоури с совт. (Lowry et. al., 1951). Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре при 750 нм.

Выделение ядер. Выделение фракции ядер из растительного материала производилось по методике, предложенной Lee и Lin (Lee, Lin, 2005).

Определение концентрации катионов Ca²⁺. Измерение свободного кальция проводилось спектрофотометрическим методом по цветной реакции с мурексидом в присутствии глицерина. Мурексид образует с кальцием окрашенный комплекс, устойчивость которого повышается путем добавления в раствор глицерина (Scarpa, 1972). Расчет концентрации кальция проводили по калибровочному графику.

Определение перекрестного загрязнения фракций ядер. Перекрестное загрязнение определяли по активности цитоплазматических маркерных ферментов. Активность алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы измеряли спектрофотометрически по скорости восстановления NAD⁺ при 340 нм в присутствии 150 мМ этанола и 1 мМ пирувата натрия в качестве субстрата, соответственно (Yang et. al., 2010, Pathuri et. al., 2011).

Электрофоретическое исследование ферментов. Электрофоретический анализ проводили по Davis (Davis, 1994). Использовали 7,5% разделяющий и 2% концентрирующий гели. Электродный буфер представлял собой смесь 0,05М Трис-глицинового буфера, pH 8,3 с 2 мл. 1%-ного бромфенолового синего. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли с помощью AgNO₃ (Shevchenko et. al., 1996). Специфическое проявление геля проводили тетразолиевым методом в среде с соответствующим субстратом для исследуемого фермента (Епринцев и др., 2018).

Очистка ферментов. Для получения высокоочищенных препаратов исследуемых изоферментов использовали 5-стадийную схему очистки, включающую гомогенизацию, получение клеточной фракции, фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию через Сефадекс G-25, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-Sepharcel или ДЭАЭ-целлюлозе. Все операции проводили при температуре 0-4°C.

Исследование регуляции активности ферментов. Регуляторные свойства изоферментов исследовали на электрофоретически гомогенных препаратах. Определение констант ингибирования проводили с помощью графика зависимости $1/V$ от (S) (по Диксону) (Остерман, 1981).

Выделение РНК. Суммарную РНК из листьев кукурузы выделяли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. В качестве осадителя использовали LiCl.

Обратная транскрипция. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (СибЭнзим, Россия) согласно инструкции производителя, на приборе Biometra Personal Cycler (Biometra, Германия).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (Bio-Rad, США), 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* (Nicot *et. al.*, 2005). Параметры амплификации были следующие: предварительная денатурация - 95°C 5 минут, цикл - 95°C - 30 сек., 56-62°C - 40 сек., 72°C - 30 сек. (детекция), финальная элонгация - 72°C - 10 минут. В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции. Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода (Livak, Schmittgen, 2001) с использованием программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (Biorad, США).

Выделение ДНК и обработка бисульфитом. ДНК выделяли из щитков кукурузы с помощью набора ДНК-сорб-С (ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) согласно рекомендациям производителя. Модификацию ДНК бисульфитом натрия проводили согласно ранее опубликованному протоколу (Warnecke *et. al.*, 2002) с некоторыми изменениями.

Анализ промоторов генов исследуемых изоферментов и подбор праймеров для метилспецифичной ПЦР. Для анализа нуклеотидного

состава промоторов генов исследуемых ферментов использовали известные последовательности, аннотированные в международной базе данных GenBank. В качестве праймеров использовали следующие нуклеотидные последовательности в направлении 5'→3', разработанные в программе MethPrimer.

Метилспецифическая полимеразная цепная реакция. Полимеразную цепную реакцию с метилспецифичными праймерами осуществляли с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Реакцию ПЦР проводили на приборе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) со следующими параметрами амплификации: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 35 циклов: 95°C – 20 с, 54-58°C – 20 с, 72°C – 30 с, и, наконец, 72°C – 4 мин.

Расчет степени метилирования промоторов генов исследуемых изоферментов. Расчет численных значений МС-ПЦР проводили на основании результатов электрофореграмм ПЦР-продуктов. Значения степени метилирования промотора являются суммарным показателем результатов ПЦР анализа исследуемых CG-динуклеотидов в промоторе конкретного гена (Епринцев и др., 2012).

Статистическая обработка данных. Эксперименты были выполнены в трех биологических и четырех аналитических повторах, и данные были подвергнуты двустороннему дисперсионному анализу (ANOVA) с использованием общей линейной модели с применением программного обеспечения для анализа данных STATISTICA версии 9 (Statsoft Wipro, East Brunswick, Нью-Джерси, США). Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Обсуждаются статистически значимые различия при $p < 0,05$. Изображения электрофореграмм представляют собой данные типичного эксперимента, повторенного три-четыре раза.

ОЧИСТКА ИЗОФЕРМЕНТОВ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, ЦИТРАТСИНТАЗЫ И АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Очистка фермента из листьев кукурузы.

Изучение изоферментного состава исследуемых энзимов показало, что в клетках кукурузы обнаружено наличие как митохондриальных, так и немитохондриальных форм. Применение 5-ти стадийной очистки позволило получить в электрофоретически гомогенном состоянии изоферменты СДГ, ЦС и АГ. Результаты очистки изоферментов приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Таблица основных показателей очистки сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы из кукурузы (n=4, P ≤ 0,05)

Изофермент		Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Сукцинатдегидрогеназа	СДГ1	0.768	0.91	64
	СДГ2	0.492	0.94	41
Цитратсинтаза	ЦС1	46.2	8	152.4
	ЦС2	40	7	113.8
Аконитатгидратаза	АГ1	3.95	3	64.4
	АГ2	5.09	3	104.6

В качестве определяющей стадии очистки осуществляли ионообменную хроматографию, позволившую получить две формы исследуемых ферментов в гомогенном состоянии, что подтверждается результатами электрофоретического исследования с универсальным окрашиванием на белок. Показано, что все формы СДГ, ЦС и АГ десорбируются с ДЭАЭ-целлюлозы при разных концентрациях хлорида калия, что может указывать на различие в структурной организации полипептидных компонентов исследуемых изоферментов.

Таблица 2.

Кинетические характеристики изоферментов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы из кукурузы (n=4, P ≤ 0,05)

Изофермент		pH оптимум	Величина К _м , мкМ	Константа ингибирования, мМ
Сукцинатдегидрогеназа	СДГ1	8,0	0,38 (по сукцинату)	0,5 (малонат)
	СДГ2	7,0	0,14 (по сукцинату)	0,95 (малонат)
Цитратсинтаза	ЦС1	7,7	71 (по оксалоацетату) 26 (по ацетил-СоА)	
	ЦС2	8,2	25 (по оксалоацетату) 6 (по ацетил-СоА)	
Аконитатгидратаза	АГ1	7,5	9,6 (по цитрату)	1,75 (сукцинат) 2,14 (малат) 2,6 (транс-аконитат)
	АГ2	8,0	22,1 (по цитрату)	2,06 (сукцинат) 2,86 (малат) 3,5 (транс-аконитат)

Полученные в гомогенном состоянии препараты СДГ, ЦС и АГ позволили изучить их строение и регуляторные свойства. Показано различие

в их четвертичной структуре, большинстве кинетических и регуляторных характеристик, что может быть одним из механизмов регуляции интенсивности окислительного и конструктивного метаболизма растительной клетки.

РОЛЬ ФИТОХРОМНОЙ СИСТЕМЫ В СВЕТОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И ЦИТРАТСИНТАЗЫ В РАСТЕНИЯХ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО СВЕТОВОГО РЕЖИМА

Влияние КС и ДКС на активность сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы в листьях кукурузы.

Свет играет важную регуляторную роль в организации метаболизма растительной клетки, в том числе обеспечивая регуляцию центральных метаболических процессов, включая дыхание и фотосинтез. Цикл Кребса изменяет свое функциональное значение на свету, преобразуясь из основного источника энергии в клетке в механизм образования углеродных скелетов и участия в окислительно-восстановительном гомеостазе (Igamberdiev, Gardeström 2003; Igamberdiev *et al*, 2014). Дыхание растений на свету контролируется как на уровне метаболитов клетки, так и на уровне экспрессии генов ферментов, регуляция которых может быть опосредована несколькими механизмами, наиболее важными из которых являются фитохромы (Popov *et al*, 2010; Eprintsev *et al*, 2016). Важное значение в экспрессионной регуляции ЦТК и дыхания в целом играют ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, таких как сукцинатдегидрогеназа, аконитатгидратаза и цитратсинтаза. Особое значение отводится сукцинатдегидрогеназной системе, поскольку она, являясь интегральным элементом ЦТК и ЭТЦ митохондрий, обеспечивает контроль дыхательного метаболизма, как за счет метаболитной регуляции, так и на уровне окислительно-восстановительного гомеостаза.

Изучение влияния светового режима на скорость функционирования СДГ, ЦС и АГ в зеленых листьях кукурузы выявило изменение величины исследуемого показателя в 3-4 раза в условиях темноты и на свету (рис. 1). Величина активности СДГ и митохондриальных изоферментов АГ и ЦС уменьшается при экспонировании растений на свету и меняется за довольно короткий промежуток времени (менее 3 часов), что дает возможность растению быстро осуществлять переход от одного типа энергетического метаболизма к другому в зависимости от условий освещения. В условиях отсутствия света наблюдается высокая скорость функционирования исследуемых энзимов, что свидетельствует об активации СДГ и цикла Кребса.

Увеличение каталитической активности внемитохондриальных изоферментов цитратсинтазы и аконитатгидратазы на свету, вероятно, необходимо для активации работы фотосинтетического метаболизма, что обусловлено необходимостью увеличения скорости работы цикла Кальвина (Igamberdiev *et al.*, 2014) за счет мобилизации пула запасных органических кислот клетки (в первую очередь цитрата, так как малат может мобилизовываться при помощи системы малик-энзимов), обеспечивая субстратами анаболические процессы.

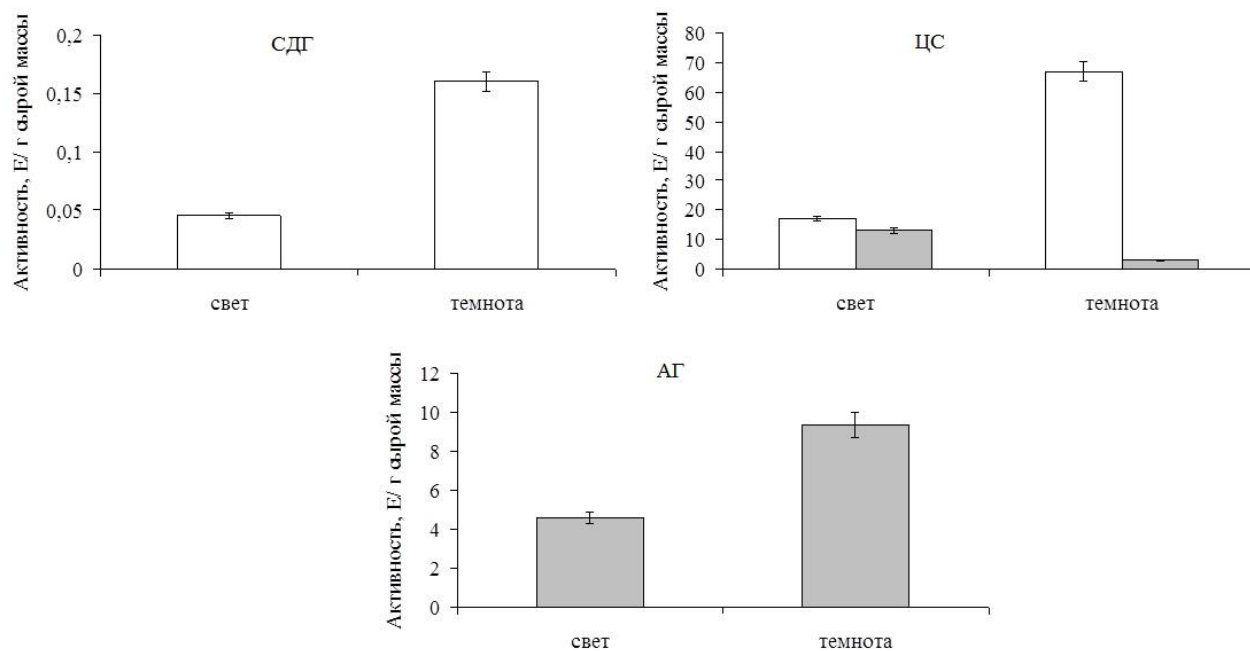


Рис. 1. Активность сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы (белые столбцы – митохондриальная форма, серые столбцы – пероксисомальная форма) и аконитатгидратазы в листьях кукурузы при смене светового режима растений.

Полученные результаты по активности изоферментов СДГ, ЦС и АГ в листьях кукурузы при изменении светового режима растений свидетельствуют об их светозависимости. Вероятно, в регуляции изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот принимают участие фоторецепторные системы. Одним из способов такой регуляции является контроль уровня транскриптов генов в клетке (Quail, 2007, Galvao and Fankhauser, 2015).

В опытах по влиянию красного и дальнего красного света на уровень экспрессии генов *SDH1-2* и *SDH2-3* сукцинатдегидрогеназы, *ACO1* и *CSY1*, кодирующих митохондриальные изоферменты аконитатазы и цитратсинтазы, было показано, что красный свет вызывает изменения в работе генетического аппарата клетки, уменьшая количество их мРНК. Облучение растений ДКС

вызывает противоположный эффект для анализируемого показателя по отношению к КС, что проявляется в увеличении транскриптов генов митохондриальных изоферментов. Результаты свидетельствуют об участии фитохрома А в регуляции экспрессии генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *ACO1* и *CSY1*. В то же время последовательное облучение растений КС и ДКС также приводит к увеличению количества мРНК исследуемых генов и, в ряде случаев к частичному снятию эффекта КС, что указывает на участие фитохрома В в их регуляции. Полученные данные по воздействию КС и ДКС на растения кукурузы позволяют заключить, что регуляции экспрессии генов СДГ, митохондриальных изоферментов АГ и ЦС осуществляется совместно фитохромом А и фитохромом В (рис. 2).

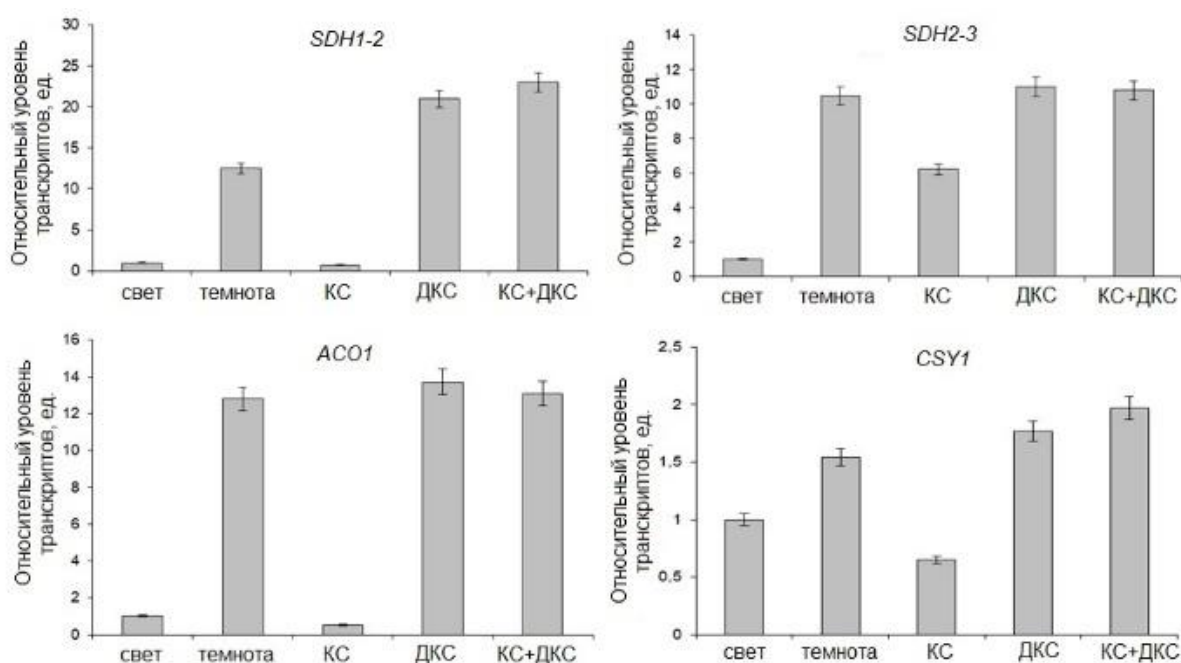


Рис. 2. Роль фитохрома А и В растений в регуляции уровня транскриптов генов *SDH1-2* и *SDH2-3* сукцинатдегидрогеназы и генов *ACO1* и *CSY1* митохондриальных изоферментов аконитатгидратазы и цитратсинтазы в листьях кукурузы. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

Однако, при исследовании мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы показано, что фитохромная система не принимает участия в регуляции транскрипции генов *SDH3-1* и *SDH4* сукцинатдегидрогеназы. Увеличение скорости функционирования генов субъединиц С и Д при перемещении растений в темноту связано с интенсификацией дыхательного метаболизма. Механизм данной регуляции не

связан с фитохромной системой, а, вероятно, может обеспечиваться иными способами. В частности, криптохромной системой или энергетическим статусом клетки. При этом, важно отметить, что противоположный эффект наблюдается для генов внемитохондриальных изоферментов. Активация фитохромной системы красным светом приводит к увеличению уровня транскриптов генов *ACO2* и *CSY2* в клетках растений, обратный эффект наблюдается при воздействии дальнего красного света (рис. 3).

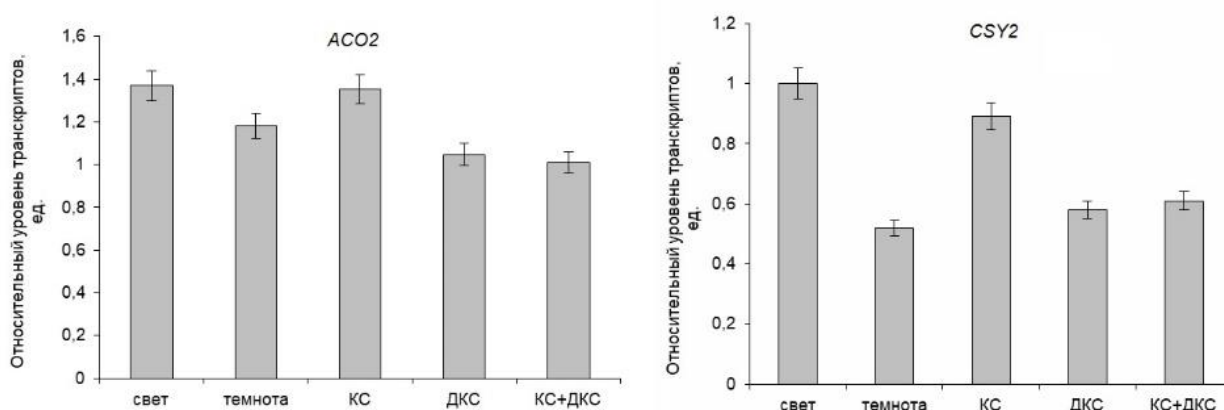


Рис. 3. Роль фитохромов А и В в регуляции уровня транскриптов генов *ACO2* и *CSY2* внемитохондриальных изоферментов аконитатгидратазы и цитратсинтазы в листьях кукурузы.

Результаты исследования влияния низкоэнергетического КС и ДКС на функционирование СДГ, АГ и ЦС, свидетельствуют об участии фитохромной системы в регуляции их функционирования на уровне содержания транскриптов генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *ACO1*, *ACO2*, *CSY1* и *CSY2* в клетке. Облучение растений красным светом вызывает конформационные перестройки в структуре фитохрома (Mas, Yanovsky, 2009, Alabadı, Blazquez, 2009), активная форма которого проявляет ингибирующее действие на митохондриальные формы СДГ, АГ и ЦС.

Поскольку фитохромная система представлена в клетке несколькими типами, важным является изучение роли каждого из них в регуляции исследуемых изоферментов. Для решения этой задачи использовали в качестве объектов исследования генно-модифицированные организмы, в генетическом аппарате которых отсутствует ген, кодирующий апопротеин фитохрома А или фитохрома В.

Влияние КС и ДКС на функционирование сукцинатдегидрогеназной системы в листьях мутантных форм арабидопсиса.

В опытах по влиянию красного и дальнего красного света на уровень экспрессии генов *SDH1-2* и *SDH2-3*, было показано, что красный свет

вызывает уменьшение содержания мРНК СДГ в растениях арабидопсиса дикого типа. Противоположный эффект вызывает действие дальнего красного света, воздействие которого приводит к накоплению транскриптов исследуемых генов в образце суммарной РНК клетки. Изменения уровня транскрипции генов *SDH1-2* и *SDH2-3* в растениях, мутантных по гену фитохрома В, аналогичны картине в растениях дикого типа. Однако, воздействие красного света на растения арабидопсиса, нокаутного по гену фитохрома А, не вызывало изменений в уровне транскриптов генов сукцинатдегидрогеназы (рис. 4). Полученные результаты позволяют заключить, что в световой регуляции экспрессии сукцинатдегидрогеназы принимает участие только фитохром А.

Таким образом, анализ данных по влиянию красного и дальнего красного света на мутантные растения арабидопсиса по генам апобелков фитохрома А и В свидетельствует, что только активная форма фитохрома А принимает участие в регуляции экспрессии СДГ. Ранее в растениях *Arabidopsis thaliana* показана зависимость работы генов ротеноннечувствительных НАДН-дегидрогеназ и нитратредуктазы от состояния фитохромной системы. Активная форма стимулировала активность промоторной области гена *Nda1*, что приводило к увеличению скорости его экспрессии (Escobar *et al.*, 2004).

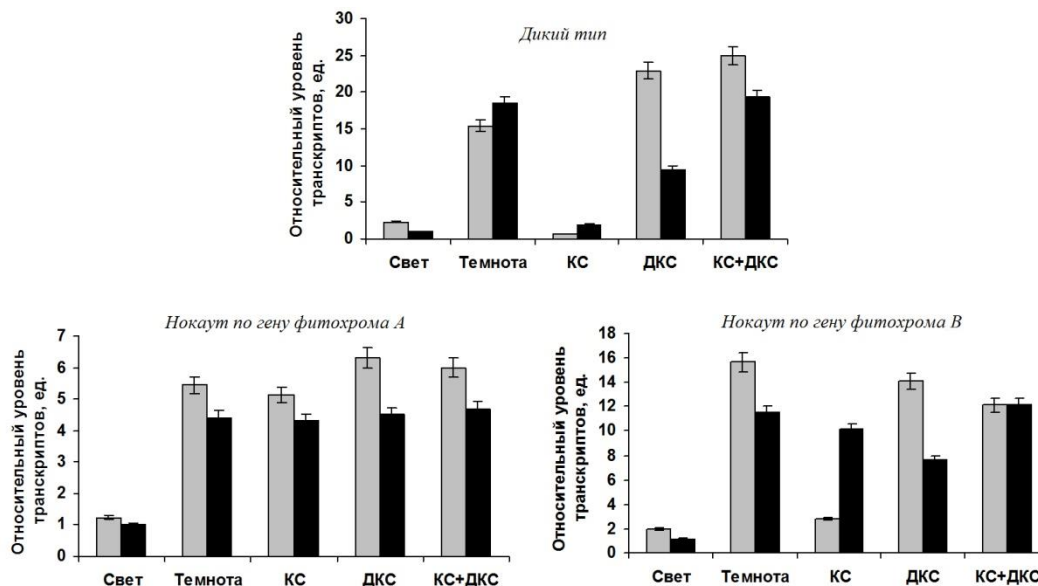


Рис. 4. Относительная концентрация транскриптов генов субъединицы А (серые столбцы) и В (черные столбцы) сукцинатдегидрогеназы в листьях мутантных растений арабидопсиса при разных световых режимах

Полученные данные позволяют представить механизм световой регуляции СДГ в растениях *A. thaliana* следующим образом. Активная форма фитохрома А угнетает работу генов *SDH1-2* и *SDH2-3*, что проявляется в

уменьшении количества их матричных РНК в клетке. Вероятно, вспомогательную роль в регуляции экспрессии генов СДГ выполняет фитохром В, поскольку при воздействии на растения последовательно КС и ДКС наблюдается обратимость ответной реакции исследуемого показателя. Кроме того, фитохром В является регулятором гена *SDH2-3*. Подобный фитохром-зависимый эффект четко коррелирует с уменьшением каталитической активности данного фермента, установленным нами ранее с использованием трансгенных растений *A. thaliana* (Popov *et al.*, 2010).

Внутриклеточный механизм трансдукции фитохромного сигнала в клетках кукурузы.

В реализации фитохромного сигнала чаще всего задействованы внутриклеточные и внутриядерные трансдукторы (Klose *et al.*, 2015, Oh, Montgomery, 2014). Поскольку фитохром А имеет в большей степени цитозольную локализацию, а сигнал передается в ядро на молекулу ДНК, то возникает необходимость использования клеточных интермедиатов в реализации фитохромного сигнала в пределах клетки. Один короткий импульс красного света индуцирует импорт фитохрома А в ядро, который происходит очень быстро (в течение нескольких минут), тогда как перенос фитохрома В в ядро относительно медленный и занимает часы (Kircher *et al.*, 2002). При этом, в клетке имеется специализированный механизм передачи фитохромного сигнала, где внутриклеточными посредниками являются катионы Ca^{2+} , кальмодулин, цАМФ, G-белки и др. (Bowler *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2011).

Для выяснения механизмов внутриклеточной реализации фитохромного сигнала в растительной клетке было проанализировано изменение содержания свободных катионов кальция в ядрах клеток кукурузы. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что активная форма фитохрома приводит к увеличению содержания свободных катионов кальция в ядрах клеток, что наблюдается при облучении растений красным светом с длиной волны 660 нм.

Применение специфического ингибитора кальциевых каналов (рутений красный) и комплексона ЭГТА позволило выяснить роль внутриклеточного перераспределения свободных катионов кальция в реализации фитохромного сигнала при облучении растений кукурузы светом разной длины волны. Полученные результаты указывают на важную роль свободных катионов кальция во внутриклеточной трансдукции фитохромного сигнала. Данный эффект связан с перераспределением кальция между компартментами клетки,

в частности, между цитоплазмой и ядром. Вероятно, увеличение содержания кальция в ядре при воздействии красного света происходит путем его транспортировки из цитоплазмы посредством кальциевых каналов.

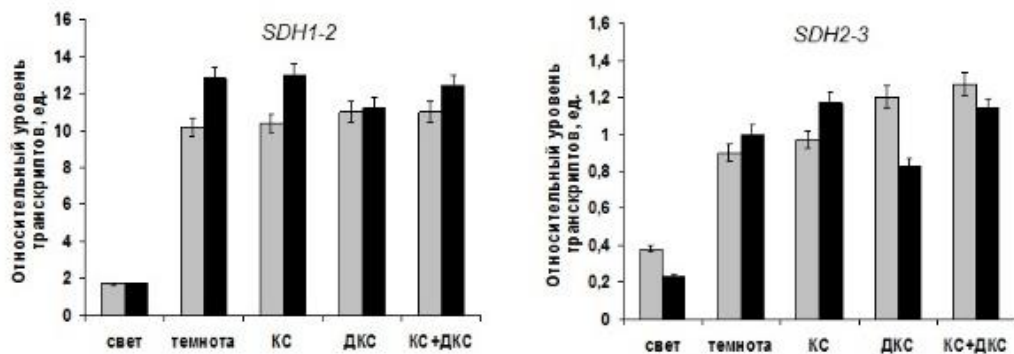


Рис. 5. Уровень транскриптов генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы в присутствии рутения красного (серые столбцы) и ЭГТА (черные столбцы) в листьях кукурузы при различных световых режимах.

Проведенные ранее исследования показали, что изменение уровня транскриптов генов *SDH1-2* и *SDH2-3* каталитического димера сукцинатдегидрогеназы и колебания концентрации катионов кальция в ядрах растений в условиях освещения светом разного спектрального состава находятся в определенной корреляционной зависимости. Импульсное облучение растений КС и ДКС в присутствии ЭГТА и рутения красного не вызывало изменений количества транскриптов генов *SDH1-2* и *SDH2-3* (рис. 5). Вероятно, катионы кальция играют значительную роль в трансдукции фитохромного сигнала, модулируя различные механизмы регуляции экспрессии генетического материала клетки (Galon, 2010).

В данных условиях концентрационные колебания Ca^{2+} в ядрах растительных клеток способствуют активации или подавлению активности Ca^{2+} -зависимых белков (например, протеинкиназы и фосфатазы), регулирующих скорость присоединения транскрипционных факторов, обеспечивающих регуляцию экспрессии генов-мишеней (Galon *et al.*, 2010; Eprintsev *et al.*, 2013). Ядро содержит различные регуляторные элементы, обеспечивающие контроль реализации генетического материала. Определяющую роль в данном процессе играют кальмодулины и кальмодулин-подобные белки, связывающиеся с белками-мишенями, включая протеинкиназы, ионные каналы и факторы транскрипции. Например, кальмодулин CAM7 у *Arabidopsis* регулирует факторы транскрипции генов,

необходимых для фотоморфогенеза, а у мутанта по этому гену экспрессия светоиндуцируемых генов значительно снижается (Kushwaha *et al.*, 2008).

Внутриядерный механизм трансдукции фитохромного сигнала в клетках кукурузы.

Для выяснения роли отдельных кальмодулинов в трансдукции фитохромного сигнала было проведено изучение уровня транскрипции их генов в листьях кукурузы в зависимости от условий освещения растений. Было установлено, что транскрипционная активность генов *CALM7-1*, *CALM7-4* (кодирующие кальмодулин 7) и *CALM3* (кодирующий кальмодулин 3) зависит от условий освещения растений, при этом, выявлено увеличение уровня их транскриптов в присутствии активной формы фитохрома в клетке (рис. 6).

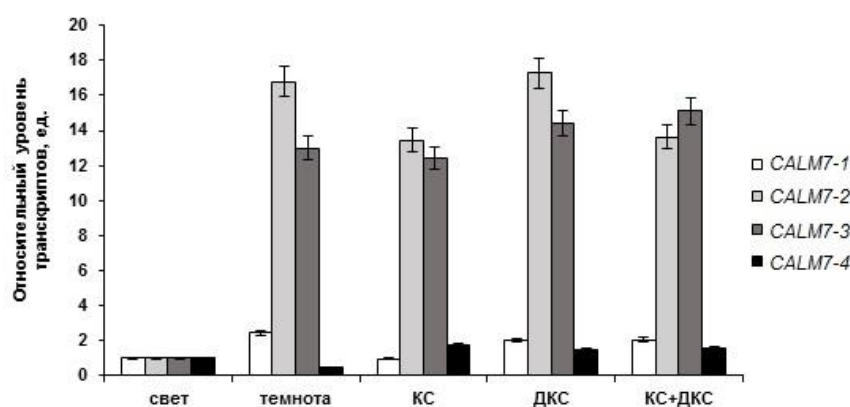


Рис. 6. Относительный уровень транскриптов генов кальмодулина 7 в листьях при облучении растений кукурузы красным и дальним красным светом.

Таким образом, показано, что ряд кальмодулинов принимает участие в световой регуляции клеточного метаболизма, обеспечивая реализацию фитохромного сигнала. Важное значение в данном процессе играет кальмодулин 7 поскольку для генов *CALM7-1* и *CALM7-4*, кодирующих его в геноме кукурузы, характерно высокое содержание транскриптов при облучении растений красным светом. При этом, для гена *CALM2* не выявлено изменений в содержании мРНК при всех вариантах облучения растений красным и дальним красным светом. Для гена *CALM2* характерно стабильное содержание транскриптов во всех вариантах светового режима растений, указывающее, что кальмодулин 2 не участвует в передаче сигнала от фитохромной системы.

Фитохромы, как белки семейства киназ, в естественных условиях осуществляют взаимодействие с фитохром-зависимыми факторами семейства PIF. Все PIF быстро фосфорилируются, а затем убиквитинируются до их деградации в ответ на свет в естественных условиях фитохром-зависимым способом (Al-Sady *et al.*, 2006).

С целью выявления участия транскрипционных факторов семейства PIF в регуляции скорости экспрессии генов СДГ была проведена количественная

оценка уровня транскриптов их генов в листьях кукурузы в условиях различного светового режима методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Полученные данные позволяют заключить, что основную роль во внутриядерной реализации фитохромного сигнала в листьях кукурузы играет транскрипционный фактор PIF3. Активная форма фитохрома В вызывает увеличение транскриптов гена *PIF3*, при облучении растений дальним красным светом (рис. 7) нет такого эффекта.

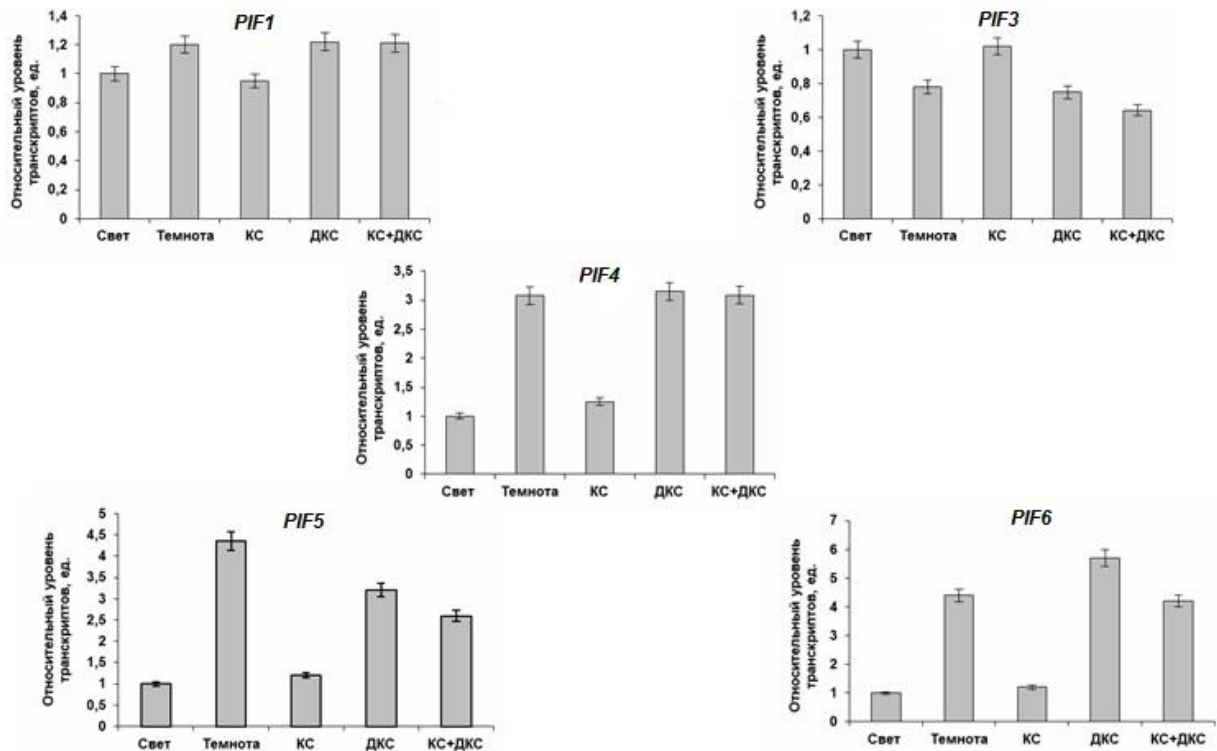


Рис. 7. Относительный уровень транскриптов генов транскрипционных факторов семейства PIF в листьях кукурузы при облучении растений красным и дальним красным светом.

Выявлено, что каскадный механизм фитохром-зависимой регуляции генов сукцинатдегидрогеназы обеспечивает транскрипционный фактор PIF3, поскольку увеличение его мРНК вызвано образованием активной формы фитохрома А в растительной клетке в ответ на ее облучение красным светом. Возможность данного механизма регуляции генов СДГ обусловлена наличием в составе их промоторов специфических участков, рецептируемых PIF3.

В структуре факторов PIF имеется специфический элемент, обеспечивающий его связывание с геном-мишенью. Фитохром-индуцирующие факторы связываются с отдельными элементами E- и G-участков промоторов регулируемых генов и контролируют уровень их транскрипции, обеспечивая реализацию фитохромного сигнала (Carretero-Paulet *et al.*, 2010). Наличие данного участка в составе промоторов

исследуемых генов указывает на возможность их регуляции на уровне изменения сродства РНК-полимеразы к промотору. Каскадный механизм внутриклеточной трансдукции фитохромного сигнала приводит к инактивации фактора PIF3, который является посредником фитохромного сигнала в ядре растительной клетки, обеспечивая регуляцию генов *SDH1-2* и *SDH2-3*. Фосфорилированная форма транскрипционного фактора PIF3 отсоединяется от E-участков промоторов генов *SDH1-2* и *SDH2-3* и снижается их экспрессия. Важно отметить, что в промоторах генов мембраносвязанных субъединиц СДГ (С и D субъединицы) обнаружены специфические E-участки, но отсутствие фитохром-зависимого эффекта на содержание транскриптов данных генов в различных световых режимах, вероятно, обусловлено реализацией иных механизмов контроля их экспрессии.

Результаты исследования анализируемых последовательностей, специфичных к факторам семейства PIF, свидетельствуют, что в составе промоторов генов *CSY1*, *CSY2*, *ACO1* и *ACO2* данные элементы также были обнаружены. Наличие G- и E-участков в составе исследуемых промоторов подтверждают полученные данные об их фитохром-зависимой регуляции.

Фитохромная система регулирует содержание катионов кальция в ядрах клеток растений путем его перераспределения между компартментами клетки. Увеличение концентрации катионов кальция в ядерной фракции приводит к активации кальмодулина 7, проявляющего киназную реакцию и способного модулировать работу транскрипционных факторов. Выявлено, что посредником во внутриядерной передаче фитохромного сигнала является транскрипционный фактор PIF3, инактивация которого наблюдается в ответ на накопление активной формы фитохрома А в клетке.

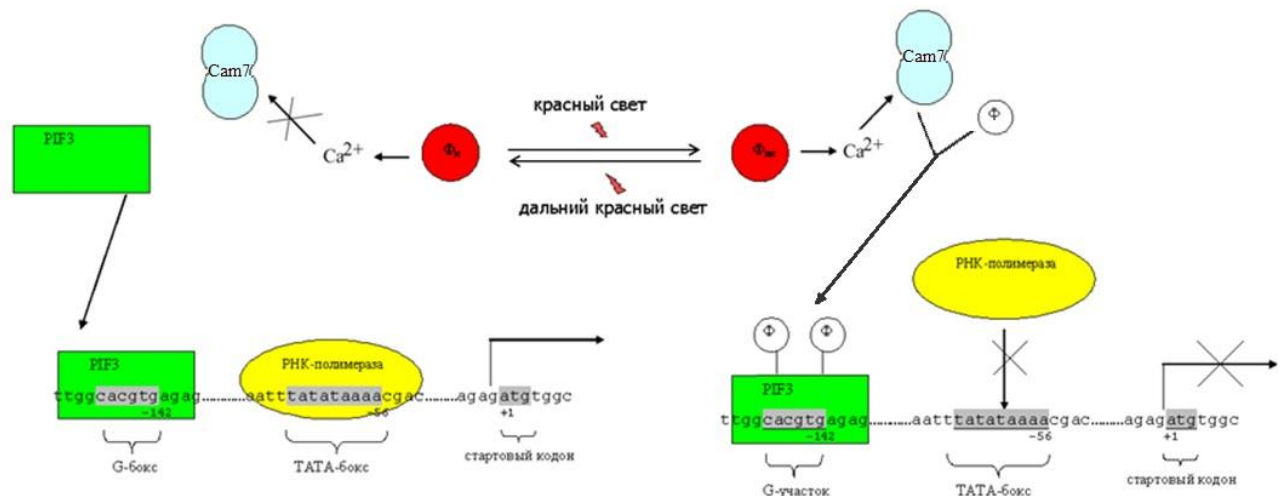


Рис. 8. Гипотетическая схема трансдукции фитохромного сигнала и механизма регуляции экспрессии генов в листьях растений.

Анализ нуклеотидной последовательности промоторов генов исследуемых изоферментов показал, что в их составе обнаруживаются специфические участки связывания (G- и E-участки) для транскрипционного фактора семейства PIF. Наличие данного участка в составе промотора исследуемых генов указывает на возможность регуляции их транскрипции на уровне изменения сродства РНК-полимеразы к промоторам генов (рис. 8).

Эпигенетический механизм регуляции активности изоферментов СДГ, АГ и ЦС в листьях кукурузы при изменении светового режима.

Механизм регуляции изоферментов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы в листьях кукурузы при изменении светового режима растений связан с регуляцией экспрессии генов, кодирующих их субъединицы. Метилирование ДНК – один из факторов, влияющих на экспрессию генов. Метилирование цитозина у растений наблюдается в составе CpG-островков, обнаруживающихся в 5'-регуляторных участках генов (Antequera, Bird, 1993). В подобной ситуации метилирование цитозина в области инициации транскрипции, приводящее к нарушению связывания транскрипционного фактора, играет значительную роль.

Недавние исследования выявили возникающую связь между функцией фитогормонов и эпигенетическими модификациями. Показано, что некоторые фитогормоны влияют на эпигенетические модификации ДНК (Yamamoto *et al.*, 2016). Метилирование ДНК обеспечивает механизм временных изменений в растении в реакции на фотопериод (Thanananta *et al.*, 2006). Исследования, проведенные на хлопке (*Gossypium hirsutum*), показали, что в зависимости от условий освещения изменяется частота метилирования как отдельных цитозинов, так и общий статус метилирования ДНК. Как кодирующие, так и некодирующие области ДНК подвергаются метилированию или деметилированию в ответ на световой режим, что свидетельствует об эпигенетической реакции растений на свет (Tingchun *et al.*, 2011).

Актуальным представляется исследование нуклеотидного состава промоторов генов, кодирующих изоферменты СДГ, АГ и ЦС на наличие CpG-островков в их составе. Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов исследуемых генов показал дифференциальный уровень распределения CG-динуклеотидов в их составе. Установлено, что для генов *SDH1-2*, *SDH2-1*, *SDH2-2*, *SDH3-2* и *SDH4* сукцинатдегидрогеназы, генов *ACO1* и *ACO2* аконитатгидратазы, генов *CSY1* и *CSY2* цитратсинтазы в составе их промоторов обнаружены CpG-островки, что может обуславливать их регуляцию за счет изменения степени метилирования (рис. 9).

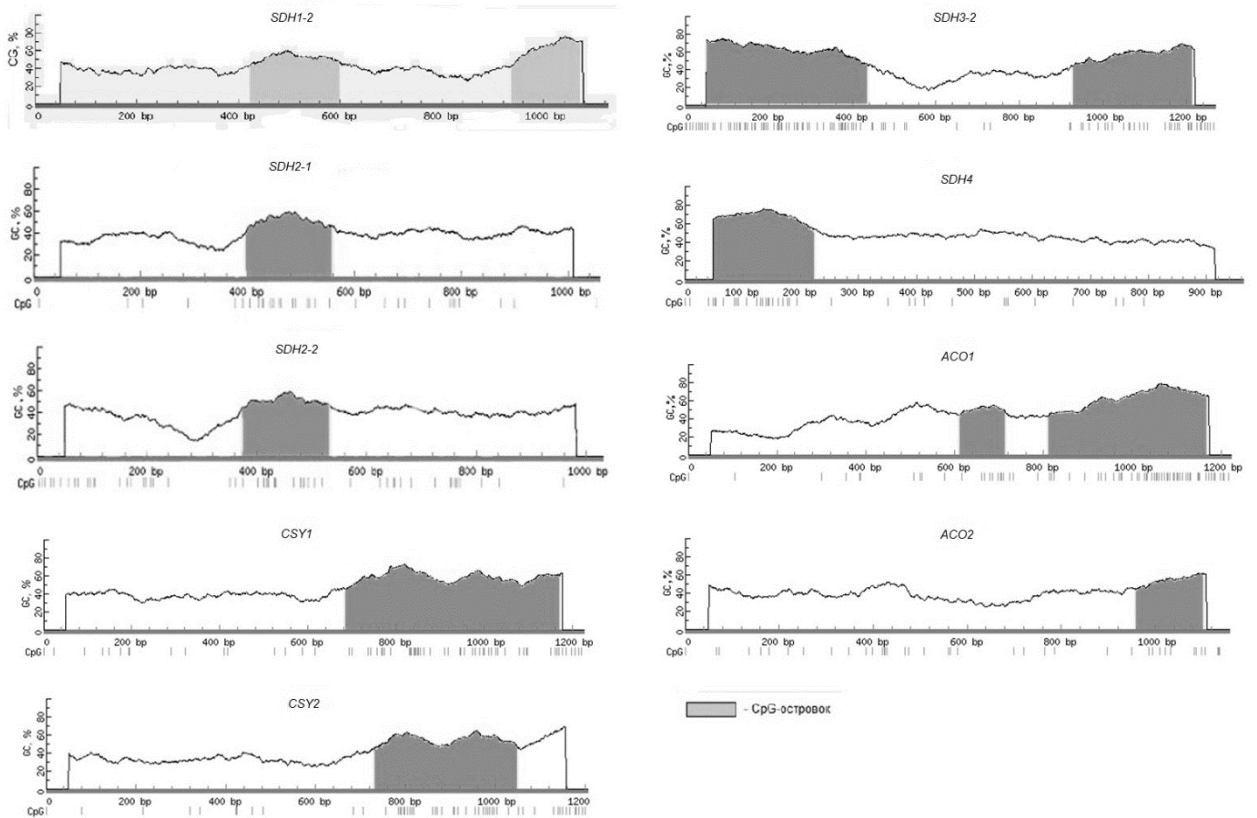


Рис. 9. Анализ CG-динуклеотидов в составе промоторов генов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы *Z. mays*.

В составе промоторов генов *SDH1-1*, *SDH2-3* и *SDH3-1* не обнаружено наличия CpG-островков (рис. 10). В промоторах, не содержащих CpG-островки, структура метилирования носит тканеспецифический характер и отражает состояние транскрипционной активности генов. Как правило, в такой ситуации CG-динуклеотиды не метилированы в промоторах активно экспрессирующихся генов и метилированы в промоторах неэкспрессирующихся генов (Comb, Goodman, 1990).

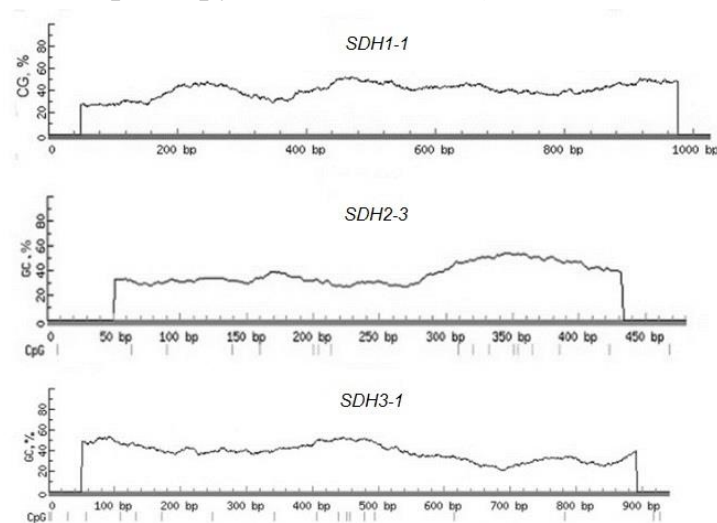


Рис. 10. Анализ CG-динуклеотидов в составе промоторов генов *SDH1-1*, *SDH2-3*, *SDH3-1* сукцинатдегидрогеназы *Z. mays*.

На основе нуклеотидных последовательностей промоторов генов исследуемых изоферментов разработаны праймеры для определения метильного статуса методом метил-специфичной ПЦР. Праймеры подбирались таким образом, чтобы анализируемый СG-динуклеотид располагался в области CpG-островка при его наличии.

Для определения эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы была определена степень метилирования их промоторов в различных световых режимах растений. Исследование уровня метилирования промотора гена, кодирующего субъединицу А сукцинатдегидрогеназы, показало, что эпигенетические механизмы играют важную роль в регуляции его экспрессии. Для гена *SDH1-2* установлена четкая зависимость между уровнем его транскриптов и статусом метилирования отдельных СG-динуклеотидов. Выявлено, что на свету и при воздействии красного света наблюдается высокий метильный статус промотора гена *SDH1-2*. Уровень метилирования достигает 75%, что соотносится с низким содержанием транскриптов гена субъединицы А сукцинатдегидрогеназы (рис. 11). В растениях, находящихся в темноте и после облучения дальним красным светом, наблюдалась противоположная картина. Уровень метилирования исследуемых СG-динуклеотидов составлял 25% для обоих вариантов. При этом, в данных экспериментальных условиях был установлен высокий уровень транскриптов гена *SDH1-2* сукцинатдегидрогеназы. Следует отметить, что полученные результаты показывают определенную зависимость высокого содержания транскриптов исследуемого гена, обусловленного низким уровнем метилирования его промотора.

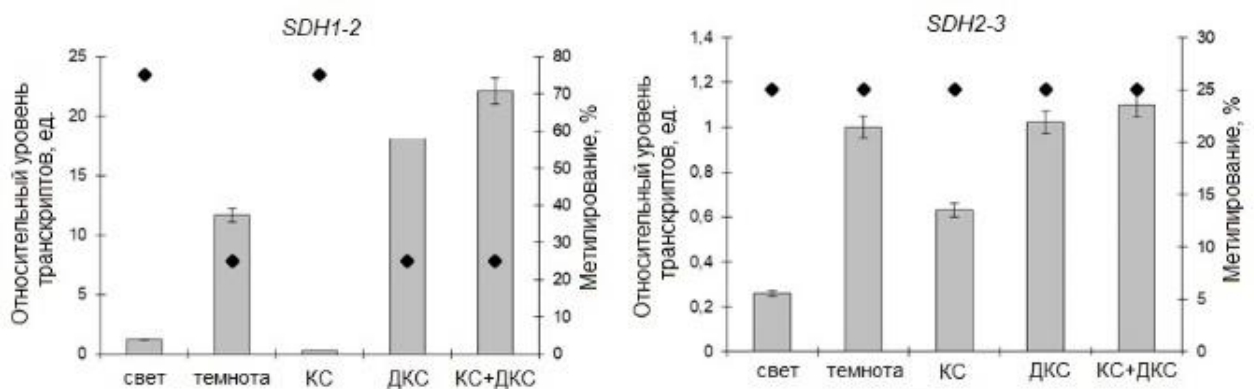


Рис. 11. Влияние статуса метилирования промоторов (черные точки) генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы на уровень их экспрессии (серые столбцы) в кукурузе в разных режимах освещения.

Для гена *SDH2-3* субъединицы В сукцинатдегидрогеназы не установлено зависимости между статусом метилирования его промотора и содержанием мРНК в клетке. Метильный статус промотора гена *SDH2-3* составлял 25% во всех вариантах светового режима растений. При этом, наблюдалось изменение содержания транскриптов исследуемого гена в зависимости от света, воздействующего на растения. Полученные данные указывают на пассивную роль эпигенетического механизма в регуляции функционирования данного гена.

Следовательно, полученные результаты по исследованию метильного статуса промоторов генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы при освещении растений светом разной длины волны позволили выявить, что экспрессия гена *SDH1-2* субъединицы А СДГ находится под эпигенетическим контролем.

Результаты исследования эпигенетического механизма регуляции ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот свидетельствуют об их важной роли в координации метаболических потоков клетки. Данные по облучению растений красным и дальним красным светом показывают, что регуляция содержания транскриптов генов ЦС, по-видимому, осуществляется с помощью изменения метильного статуса промоторов генов, кодирующих данный фермент. Изменение метильного статуса промоторов генов цитратсинтазы при воздействии на растения света разной длины волны хорошо согласуется с изменением уровня их транскриптов (рис. 12). Выявлены колебания количества транскриптов генов исследуемого энзима в растениях, экспонированных на свету, а также при облучении красным светом.

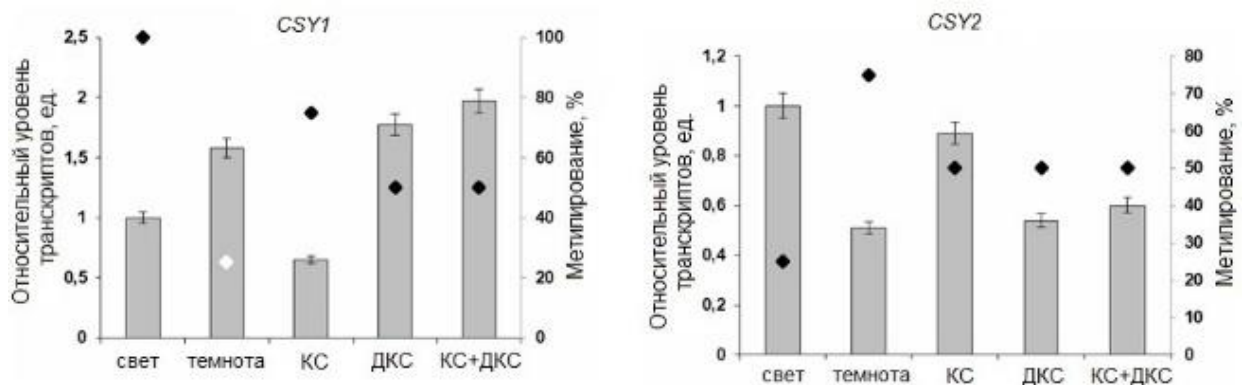


Рис. 12. Влияние статуса метилирования промоторов (черные точки) генов изоферментов цитратсинтазы на уровень их экспрессии (серые столбцы) в кукурузе при разных режимах освещения.

В данных условиях наблюдается низкое значение относительного уровня транскриптов гена *CSY1*, кодирующего митохондриальный

изофермент цитратсинтазы, причем в данных условиях обнаружена достаточно высокая степень метилирования (75-100%) его промотора (рис. 12). Противоположная картина характерна для гена, кодирующего пероксисомальную форму этого энзима. Концентрация транскриптов гена *CSY2* в темноте, а также при облучении ДКС резко возрастала, что коррелировало с уменьшением степени метилирования исследуемых СG-динуклеотидов до 25%. Таким образом, можно заключить, что эпигенетические факторы регулируют скорость работы генов *CSY1* и *CSY2* кукурузы при смене светового режима.

Проведены исследования эпигенетических способов регуляции функционирования генов изоферментов АГ в листьях кукурузы при облучении растений светом разных длин волн. Выявлена разница в статусах метилирования промоторов исследуемых генов в растениях при различных световых режимах. Показано, что промотор гена *ACO1* был практически полностью метилирован в растениях, экспонированных на свету и в варианте «КС». В растениях, помещенных в условия темноты и при освещении ДКС и КС+ДКС, уровень метилирования исследуемых СG-динуклеотидов был значительно ниже (рис. 13).

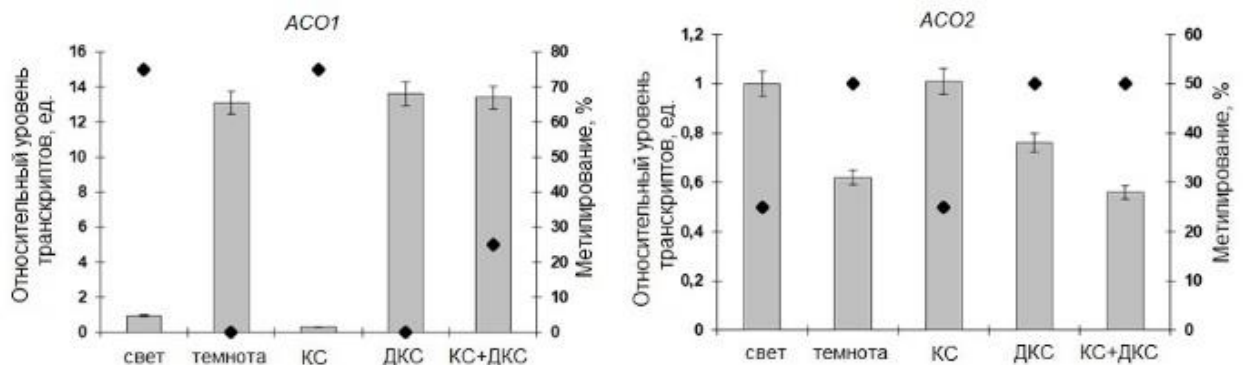


Рис. 13. Влияние статуса метилирования промоторов (черные точки) генов изоферментов аконитатгидратазы на уровень их экспрессии (серые столбцы) в кукурузе в разных режимах освещения.

Выявленная зависимость соотносится с данными оценки содержания транскриптов гена *ACO1*. Высокая концентрация мРНК гена *ACO1* обнаружена в варианте «темнота», поскольку в этих условиях митохондриальная форма АГ обеспечивает работу цикла Кребса. По-видимому, метилирование принимает непосредственное участие в его регуляции. Также выявлена зависимость метильного статуса промотора с относительной экспрессией гена *ACO2* в растениях в условиях различного светового режима. Увеличение степени метилирования исследуемых СG-

динуклеотидов промотора гена цитоплазматической формы АГ приводит к снижению уровня транскриптов гена *ACO2*.

Применение метода метил-специфичной ПЦР позволило установить метильный статус промоторов генов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы, аконитатгидратазы. Изменение экспрессии генов, кодирующих СДГ, АГ и ЦС, и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в листьях кукурузы в условиях различного светового режима выявило определенные закономерности. Гены изоферментов, имеющих митохондриальную локализацию, подвергаются отрицательной эпигенетической регуляции поскольку для них обнаружена четкая зависимость степени метилирования их промотора с величиной экспрессии генов. В частности, увеличение метильного статуса промоторов соотносится с низким содержанием транскриптов исследуемых генов. Влияние степени метилирования промоторов на уровень транскриптов генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *ACO1*, *ACO2*, *CSY1* и *CSY2*, при воздействии на растения света различной длины волны, может являться важным фактором фитохромной регуляции, обеспечивающим трансформацию метаболизма ди- и трикарбоновых кислот. Высокий метильный статус промоторов генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *ACO1* и *CSY1* в растениях на свету и после облучения красным светом соотносится со значительным уровнем транскриптов данных генов. Это находит свое проявление в высокой каталитической активности соответствующих ферментов. Противоположный эффект наблюдается у растений, находящихся в темноте или при облучении их дальним красным светом или последовательным облучением красным и дальним красным светом. В этих условиях обнаружен низкий уровень метилирования промоторов генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *ACO1* и *CSY1*, что приводит к снижению скорости их функционирования. Полученные результаты свидетельствуют, что высокий метильный статус промоторов вызывает подавление транскрипции генов, что обеспечивает эпигенетический механизм регуляции активности ферментов ЦТК, играющий важную роль в листьях растений в условиях различного светового режима.

Сходная картина регуляции обнаруживается и для промоторов генов немитохондриальных изоферментов аконитатгидратазы и цитратсинтазы. Изменение статуса метилирования CG-динуклеотидов в их составе приводит к коррекции уровня транскриптов соответствующих генов. Однако, установлено, что низкий метильный статус промоторов генов *ACO2* и *CSY2* обнаружен на свету и при воздействии на растения красного света. При этом, методом ПЦР в реальном времени установлен высокий уровень их мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение в нашем исследовании пятистадийной схемы очистки позволило получить в гомогенном или высокоочищенном состоянии препараты ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, таких как сукцинатдегидрогеназа, аконитатгидратаза и цитратсинтаза из листьев кукурузы. Этапы очистки чередовались таким образом, что обеспечивали постепенное снижение количества сопутствующих белков и увеличение удельной активности исследуемых энзимов. Исследование их физико-химических и кинетических характеристик позволило установить существенные отличия в анализируемых показателях. Различия в свойствах изоферментов, вероятно, обеспечивают возможность их участия в различных метаболических процессах клетки. Кроме того, не одинаковые регуляторные характеристики изоферментов предоставляют возможность контроля метаболизма ди- и трикарбоновых кислот на уровне регуляции активности соответствующих энзимов.

Важным регуляторным фактором для растений является свет. Изучение влияния темноты и света на скорость функционирования ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в зеленых листьях растений выявило изменение величины исследуемого показателя в несколько раз (2-4 раза) в условиях темноты и на свету. Величина каталитической активности сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы изменяется в течение 2-3 часов, что может указывать на участие фоторецепторных систем клетки в их регуляции и дает возможность растению быстро осуществлять перестройку энергетического метаболизма клетки в зависимости от условий освещения. Важное значение в данном процессе играют изоферменты СДГ, АГ и ЦС, обеспечивающие перераспределение потоков органических кислот и других интермедиатов в условиях трансформации катаболизма и фотосинтеза в разных компартментах клетки.

Была установлена зависимость уровня транскриптов генов исследуемых изоферментов от светового режима. Так, было показано, что красный свет является ингибитором транскрипции генов СДГ и митохондриальных изоферментов АГ и ЦС. Применение нокаутных растений арабидопсиса по генам апопротеинов фитохромов А и В позволило выявить негативную регуляцию экспрессии генов митохондриальных форм исследуемых ферментов, осуществляемую активной формой фитохрома А. Для цитоплазматических изоферментов характерен противоположный механизм световой регуляции, свидетельствующий об активации соответствующих

генов активной формой фитохромов В и А. Полученные данные свидетельствуют о тонкой регуляции фитохромной системой метаболических процессов, протекающих в митохондриях и цитоплазме, фитохромной системой в условиях фотосинтетической активности растительной клетки. Активные формы фитохромов А и В проявляют ингибирующее действие на концентрацию мРНК генов каталитического димера. При этом, основным регулятором экспрессии генов *SDH1-2* и *SDH2-3* выступает фитохром А, в то время как фитохром В выполняет вспомогательную роль. Эти данные указывают на причастность фитохромной системы к контролю активности СДГ на уровне транскрипции генов. Для мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы не было выявлено зависимости уровня их транскриптов от состояния фитохромной системы, и, вероятно, их регуляция осуществляется без участия данного фоторецептора и может быть обусловлена иными механизмами.

Выявленное изменение интенсивности экспрессии генов изоферментов АГ и ЦС при влиянии света на зелёные листья кукурузы также указывает на генетический механизм их регулирования. Результаты по изучению уровней транскриптов генов АГ и ЦС в различных световых режимах коррелируют с данными, полученными при измерении активности этих ферментов, что свидетельствует о влиянии фитохромной системы на уровне генетического аппарата клетки. Установлено, что активная форма фитохрома А ингибирует скорость экспрессии генов *ACO1* и *CSY1*, ответственных за синтез митохондриальных изоферментов, о чем свидетельствуют данные при облучении растений кукурузы красным светом. Однако, в случае генов *ACO2* и *CSY2*, кодирующих немитохондриальные формы исследуемых ферментов, наблюдалась иная зависимость, в частности, увеличение уровня их транскриптов на свету и КС и снижение данного показателя в остальных вариантах опыта. Полученные нами данные по влиянию светового режима на уровень транскриптов генов АГ и ЦС могут свидетельствовать о различных физиологических ролях немитохондриальной и митохондриальной форм исследуемых ферментов в клетке. Митохондриальные изоферменты участвуют в ЦТК и дыхательном метаболизме, осуществляемом в темноте, а немитохондриальные - функционируют в метаболизации потока ассимилятов на свету.

Важное значение в фитохром-зависимой регуляции ферментов играет контроль уровня транскрипции генов-мишеней. При этом, в клетке существует ряд трансдукторов фитохромного сигнала, в том числе катионы кальция. В

ходе исследований была показана зависимость содержания катионов кальция в ядрах клеток от состояния фитохромной системы. Применение специфического ингибитора кальциевых каналов позволило установить, что изменение содержания свободных катионов кальция в ядрах листьев кукурузы не происходит во всех вариантах светового режима растений. Следовательно, полученные результаты позволяют заключить, что механизмом регуляции концентрации кальция в ядрах является его перераспределение между компартментами клетки. Увеличение Ca^{2+} в ядерной фракции связано с его закачиванием через ядерную мембрану, где важную роль играют кальциевые каналы и помпы (Lau, Deng, 2010). Следовательно, свободные катионы Ca^{2+} выполняют роль внутриклеточной трансдукции фитохромного сигнала, обеспечивая его реализацию в ядре клетки.

Результаты наших исследований показывают, что ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот подвергаются фоторецепторной регуляции посредством фитохромов на уровне экспрессии их генов, где важную роль играют кальмодулины. Показано, что относительный уровень транскриптов генов *CALM7-1*, *CALM7-4* и *CALM3* зависит от условий освещения растений, и кальмодулины (кальмодулин 7 и кальмодулин 3), кодируемые данными генами, принимают участие в световой регуляции клеточного метаболизма, обеспечивая внутриядерную реализацию фоторецепторного сигнала. При этом для генов других кальмодулинов нехарактерно высокое содержание транскриптов на свету, указывающее, что данные кальмодулины не принимают участия в передаче сигнала от фитохромной системы.

Поскольку кальмодулины не имеют возможности взаимодействия с молекулой ДНК, а могут выступать в качестве регуляторов белковой активности за счет их ковалентной модификации путем фосфорилирования (Enslin *et al.*, 1995), непосредственную регуляцию активности генов обеспечивают транскрипционные факторы. Полученные данные позволяют сделать заключение о роли транскрипционных факторов семейства PIF в механизме трансдукции светового сигнала фитохромной системой в листьях кукурузы. Результаты исследований свидетельствуют, что ряд проанализированных в нашей работе факторов семейства PIF являются посредниками во внутриядерной передаче фитохромного сигнала. Особая роль в данном процессе отводится транскрипционному фактору PIF3, на что указывает увеличение уровня его транскриптов на свету.

Анализ нуклеотидной последовательности промоторов генов СДГ, АГ и ЦС кукурузы показал, что в их составе обнаруживается специфический участок связывания (Е- или G-участок) для транскрипционных факторов семейства PIF. Наличие данного участка в составе промотора исследуемых генов указывает на возможность регуляции их транскрипции на уровне изменения сродства РНК-полимеразы к промоторам генов соответствующих изоферментов. Следовательно, под действием активной формы фитохрома происходит внутриклеточное перераспределение свободных катионов кальция, увеличение которого в ядре приводит к индуцированию определенных механизмов активации внутриядерных транскрипционных факторов путем их фосфорилирования киназами, в том числе и кальмодулинами 7 и 3 (Park *et al.*, 2004, Eprintsev *et al.*, 2013). Из анализа литературных данных вытекает, что кальмодулины могут являться связующим звеном между кальциевым и фосфатным путём передачи сигнала, а также участвуют в фосфорилировании белков (Enslin *et al.*, 1995, Crivici, Ikura, 1995). Фосфорилированная форма транскрипционного фактора PIF3 теряет связь с Е-участком промоторов генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *ACO1* и *CSY1*, и снижается их транскрипционная активность (рис. 8). Активная форма фитохрома А вызывает увеличение скорости транскрипции гена *PIF3*, что в свою очередь необходимо для возобновления пула свободного фактора PIF3. Облучение растений кукурузы КС и ДКС в различном сочетании, а также применение нокаутных растений арабидопсиса по генам фитохрома А и фитохрома В, позволило установить, что основную роль в регуляции экспрессии генов изоферментов СДГ, АГ и ЦС играет фитохром А. Однако, фитохром В также участвует в регуляции экспрессии генов исследуемых изоферментов в качестве дополнительного фактора, что особенно характерно для генов *ACO2* и *CSY2* немитохондриальных изоферментов аконитатгидратазы и цитратсинтазы и в меньшей степени для гена *SDH2-3*.

В клетке важное значение в регуляции экспрессии генов отводится изменению метильного статуса ДНК за счет функционирования ДНК-метилтрансфераз. Активация кальмодулинов фитохромом А может способствовать увеличению активности ДНК-метилтрансфераз при их фосфорилировании, что напрямую отражается на величине метильного статуса ДНК (рис. 14).

Применение метода метил-специфичной ПЦР позволило установить роль метильного статуса промоторов генов СДГ, ЦС и АГ в их регуляции. Показано, что изменение экспрессии генов, кодирующих

сукцинатдегидрогеназу, аконитатгидратазу и цитратсинтазу, и степени метилирования CG-динуклеотидов промотора в листьях кукурузы в условиях различного светового режима проявляет определенные закономерности.

Для генов флавопротеина СДГ, а также генов митохондриальных изоферментов аконитатгидратазы и цитратсинтазы показано, что увеличение метильного статуса их промоторов соотносится с низким содержанием транскриптов. Высокая степень метилирования CG-динуклеотидов промоторов генов *SDH1-2*, *ACO1* и *CSY1* в растениях, экспонируемых на свету и после облучения красным светом, совпадала с невысокой транскрипционной активностью исследуемых генов и, как следствие, низкой каталитической активностью ферментов. Обратная ситуация наблюдается в темноте, при облучении растений дальним красным светом и последовательным облучением красным и дальним красным светом. В данных вариантах опыта наблюдается уменьшение величины метильного статуса CG-динуклеотидов промоторов генов исследуемых ферментов, что приводит к увеличению скорости их функционирования.

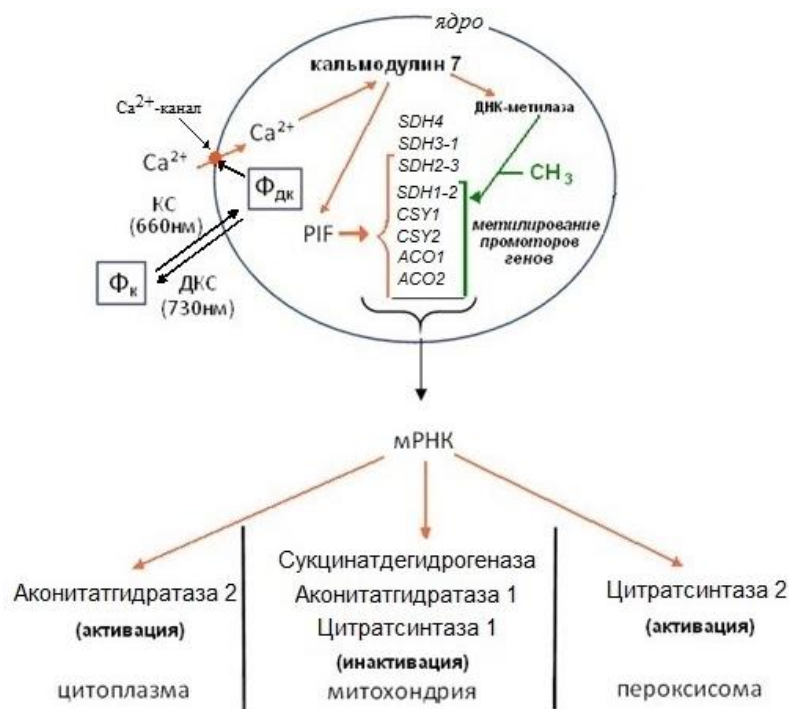


Рис. 14. Гипотетическая схема трансдукции фитохромного сигнала и механизма регуляции экспрессии генов СДГ, ЦС и АГ в зеленых листьях кукурузы. Условные обозначения: Φ_k – неактивная форма фитохрома, Φ_{dk} – активная форма фитохрома, КС – красный свет, ДКС – дальний красный свет, РИФ – фитохром-индуцируемые транскрипционные факторы, мРНК – суммарная матричная РНК клетки, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, АГ – аконитатгидратаза, ЦС – цитратсинтаза.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что в растительной клетке регуляция метаболизма органических кислот обеспечивается функционированием специфических изоферментов. Изоферменты СДГ, ЦС и АГ, представленные в клетке, имеют существенные различия в физико-химических и кинетических характеристиках, что дает возможность регуляции метаболизма отдельных ди- и трикарбоновых кислот на уровне контроля соответствующих изозимов. Действующим фактором выступает свет, осуществляющий свою регуляцию через фитохромную систему. Активная форма фитохрома А тормозит работу митохондриальных изоферментов, в то время как для цитозольных наблюдается противоположный эффект. В реализации фитохромного сигнала задействованы как внутриклеточные трансдукторы, так и внутриядерные компоненты сигнального пути.

Кальмодулины, являясь протеинкиназами, координируют уровень транскрипции генов изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот за счет регуляции транскрипционного фактора PIF3. Последний обеспечивает контроль экспрессии генов за счет взаимодействия со специфическим E- или G-участком промоторов светозависимых генов.

Кроме того, кальмодулины координируют активность ДНК-метилтрансфераз, обеспечивают реализацию эпигенетического механизма регуляции генов, в составе промоторов которых обнаружены CpG-островки. Вероятно, фитохромная система задействует несколько механизмов контроля экспрессии генов, как за счет транскрипционного фактора PIF3, так и за счет изменения метильного статуса промоторов генов.

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов исследуемых изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот указывает на отличие в характере распределения CG-динуклеотидов в данной регуляторной области гена. Для большинства генов изоферментов СДГ, ЦС и АГ показано наличие в составе их промоторов CpG-островков, что является необходимым условием их регуляции посредством изменения метильного статуса ДНК. Отсутствие CpG-островков в промоторах генов *SDH2-3* и *SDH3-1* свидетельствует об ином механизме контроля их скорости функционирования, не связанном с изменением метильного статуса регуляторной области соответствующих генов.

Исследование уровня метилирования промоторов генов, кодирующих ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, показало, что эпигенетические механизмы играют важную роль в регуляции экспрессии

данных генов. Для генов СДГ, ЦС и АГ, содержащих в своем составе CpG-островки, установлена четкая зависимость между уровнем транскриптов и статусом метилирования отдельных CG-динуклеотидов. Высокий метильный уровень промоторов генов митохондриальных форм исследуемых ферментов приводит к снижению содержания их транскриптов в растениях на свету и при облучении красным светом. При этом, для промоторов генов немитохондриальных изоферментов аконитазы и цитратсинтазы показана обратная зависимость.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные и в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Епринцев А.Т. Физико-химические и кинетические характеристики изоформ изоцитратлиазы из кукурузы / А.Т. Епринцев, Е.В. Маслова, **Д.Н. Федорин**, В.Н. Попов // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – №. 5. – С. 651-656.
2. Епринцев А.Т. Особенности структурной организации и экспрессионной регуляции изоформ малатдегидрогеназы из *Rhodobacter sphaeroides* штамма 2R / А.Т. Епринцев, М.А. Климова, К.Д. Шихалиева, **Д.Н. Федорин**, М.Т. Джабер, Е.И. Компанцева // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – №. 7. – С. 977-984.
3. Епринцев А.Т. Роль дифференциальной экспрессии генов *sdh1-1* и *sdh1-2* в изменении изоферментного состава сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, Н.В. Селиванова, Дж.А. Ахмад, В.Н. Попов // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2010. – №. 3. – С. 324-332.
4. Епринцев А.Т. Роль метилирования промоторов в регуляции генов сукцинатдегидрогеназы в проростках кукурузы / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, Н.В. Селиванова, Т.Л. Ву, А.С. Махмуд, В.Н. Попов // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – №. 3. – С. 332-332.
5. Епринцев А.Т. Роль катионов кальция в механизме фитохром-зависимой регуляции экспрессии гена *sdh1-2* и активности сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, С.С. Башкин, Н.В. Селиванова, И.В. Дадакина, А.С. Махмуд // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29. – №. 3. – С. 165-165.
6. Горбачева Т.М. Роль пероксида водорода в регуляции активности сукцинатдегидрогеназы у представителей разных таксономических групп / Т.М. Горбачева, М.Ю. Сыромятников, В.Н. Попов, А.В. Лопатин, А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин** // Биологические мембраны. – 2013. – Т. 30. – № 4. – С. 322-328.
7. Горбачева Т.М., Сыромятников М.Ю., Попов В.Н., Лопатин А.В., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т. Особенности функционирования сукцинатдегидрогеназы из летательных мышц *Bombus terrestris* (L.) // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2013. № 5. С. 529-536.

8. Епринцев А.Т. Фитохром-зависимая регуляция активности фумаратгидратазы в зеленых листьях кукурузы / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, О.В. Сазонова // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – №. 4. – С. 474-474.

9. **Федорин Д.Н.** Роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии фумаратгидратазной активности в кукурузе / **Д.Н. Федорин**, О.В. Сазонова, А.Т. Епринцев, М.В. Черкасских // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. – № 4. – С. 80-84.

10. Епринцев А.Т. Регуляция активности сукцинатдегидрогеназного комплекса *Arabidopsis thaliana* L. синим светом / А.Т. Епринцев, Н.В. Селиванова, **Д.Н. Федорин** // Биологические мембраны. – 2015. – Т. 32. – № 4. – С. 287-292.

11. **Федорин Д.Н.** Зависимость экспрессии генов мембранно-связанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы от степени метилирования отдельных CG-динуклеотидов их промоторов / **Д.Н. Федорин**, М.А. Добычина, Г.Б. Лопырева, М.В.Черкасских, А.Т.Епринцев // Auditorium. Электронный научный журнал Курского государственного университета – 2017. – №. 2 (14). – С. 65-70.

12. **Федорин Д.Н.** Выделение изоферментов сукцинатдегидрогеназы из щитков семян кукурузы методом ионообменной хроматографии / **Д.Н. Федорин**, Л.А. Карабутова, К.О.Х. Флорес, А.Т. Епринцев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2017. – Т. 17. – Вып. 5. – С. 818-823.

13. **Федорин Д.Н.** Анализ структуры промоторной области гена *fum2* фумаратгидратазы кукурузы *Zea mays* L. / **Д.Н. Федорин**, М.А. Добычина, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2017. – № 4. – С. 78-81.

14. **Федорин Д.Н.** Выделение изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев гороха методом ионообменной хроматографии / **Д.Н. Федорин**, А.Т. Епринцев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т. 18. – Вып. 4. – С. 563-567.

15. **Федорин Д.Н.**, Епринцев А.Т. Выделение изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев гороха методом ионообменной хроматографии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2018. Т. 18. С. 916-920.

16. **Федорин Д.Н.** Регуляция активности АТФ-цитратлиазы в щитках при прорастании семян кукурузы / **Д.Н. Федорин**, М.А. Добычина, А.А. Уваров, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2019. – № 2. – С. 42-47.

17. **Федорин Д.Н.** Анализ метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов промотора гена *sdh3-1* сукцинатдегидрогеназы при прорастании семян кукурузы / **Д.Н. Федорин**, А.П. Пельтихина, С.Д. Крылова, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – Т. 1. – С. 29-34.

18. **Федорин Д.Н.** Анализ промоторов генов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы и разработка праймеров для оценки их

метильного статуса / **Д.Н. Федорин**, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – Т. 2. – С. 45-50.

19. **Федорин Д.Н.** Структура промоторов генов субъединиц каталитического димера сукцинатдегидрогеназы *Arabidopsis thaliana* и разработка метилспецифичных праймеров / **Д.Н. Федорин**, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – Т. 1. – С. 66-71.

20. Федорина О.С. Участие оксидоредуктазных и декарбоксилирующих ферментов малатдегидрогеназной системы в поддержании метаболического гомеостаза в листьях кукурузы при засолении / О.С. Федорина, **Д.Н. Федорин**, А.Т. Епринцев // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – № 3. – С. 42-48.

21. **Федорин Д.Н.** Метилирование ДНК как способ регуляции экспрессии генов / **Д.Н. Федорин**, А.Т. Епринцев // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2022. – № 2. – С. 44-51.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

22. Popov V.N. Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A / V.N. Popov, А.Т. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, А.У. Igamberdiev // FEBS letters. – 2010. – Т. 584. – №. 1. – С. 199-202. (МБД – Scopus, WoS).

23. Eprintsev А.Т. Ca²⁺ is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate dehydrogenase gene *sdh1-2* in *Arabidopsis* / А.Т. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, А.У. Igamberdiev // Journal of plant physiology. – 2013. – Т. 170. – №. 15. – С. 1349-1352. (МБД – Scopus, WoS).

24. Igamberdiev А.У. Phytochrome-mediated regulation of plant respiration and photorespiration / А.У. Igamberdiev, А.Т. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, V.N. Popov // Plant, cell & environment. – 2014. – Т. 37. – №. 2. – С. 290-299. (МБД – Scopus, WoS).

25. Eprintsev А.Т. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in germinating maize seeds / А.Т. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, E.V. Starinina, А.У. Igamberdiev // Physiologia plantarum. – 2014. – Т. 152. – №. 2. – С. 231-240. (МБД – Scopus, WoS).

26. Eprintsev А.Т. Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. // А.Т. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, А.В. Salnikov, А.У. Igamberdiev / Journal of plant physiology. – 2015. – Т. 181. – С. 1-8. (МБД – Scopus, WoS).

27. Eprintsev А.Т. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize scutellum / А.Т. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, M.V. Nikitina, А.У. Igamberdiev // Journal of plant physiology. – 2015. – Т. 181. – С. 14-19. (МБД – Scopus, WoS).

28. Епринцев А.Т. Световая регуляция экспрессии гена *sdh2-3* субъединицы в сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, Л.А. Карабутова, Т.А. Покусина // Физиология растений. –

2016. – Т. 63. – № 4. – С. 1-7. (МБД – Scopus, WoS).

29. Eprintsev A.T. Light inhibition of fumarase in *Arabidopsis* leaves is phytochrome A-dependent and mediated by calcium / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, O.V. Sazonova, A.U. Igamberdiev // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2016. – V. 102. – P. 161-166. (МБД – Scopus, WoS).

30. Eprintsev A.T. Expression of genes encoding subunits A and B of succinate dehydrogenase in germinating maize seeds is regulated by methylation of their promoters / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, L.A. Karabutova, A.U. Igamberdiev // *Journal of Plant Physiology*. – 2016. – V. 205. – P. 33-40. (МБД – Scopus, WoS).

31. Eprintsev A.T. Expression and promoter methylation of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize under anoxic conditions / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, M.A. Dobychnina, A.U. Igamberdiev // *Journal of plant physiology*. – 2017. – Т. 216. – С. 197-201. (МБД – Scopus, WoS).

32. Eprintsev A.T. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in sunflower cotyledons / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, O.V. Sazonova, A.U. Igamberdiev // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2018. – V. 129. – P. 305-309. (МБД – Scopus, WoS).

33. Епринцев А.Т. Получение и свойства изоферментов сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы (*Zea mays* L.) / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, Л.А. Карабутова, О. Флорес, М. Пуглла // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2018. – Т. 54. – №1. – С. 42-45. (МБД – Scopus, WoS).

34. Eprintsev A.T. Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, M.A. Dobychnina, A.U. Igamberdiev // *Plant Science*. – 2018. – Т. 272. – С. 157-163. (МБД – Scopus, WoS).

35. Eprintsev A.T. Expression of succinate dehydrogenase and fumarase genes in maize leaves is mediated by cryptochrome / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, M.V. Cherkasskikh, A.U. Igamberdiev // *Journal of plant physiology*. – 2018. – Т. 221. – С. 81-84. (МБД – Scopus, WoS).

36. Епринцев А.Т. Роль метилирования CpG-островков промотора гена *csy3* в световой регуляции активности АТФ-цитратлиазы в листьях кукурузы / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, М.А. Добычина // *Физиология растений*. – 2019. – Т.66. – № 2. – С. 121-127. (МБД – Scopus, WoS).

37. Eprintsev A.T. Regulation of expression of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize leaves via phytochrome / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, M.V. Cherkasskikh, A.U. Igamberdiev // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2020. – Т. 146. – С. 157-162. (МБД – Scopus, WoS).

38. Епринцев А.Т. Выделение в гомогенном состоянии конститутивных изоферментов сукцинатдегидрогеназы из щитков кукурузы и исследование их характеристик / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин** // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2020. – Т. 56. – С. 141-146. (МБД – Scopus, WoS).

39. Епринцев А.Т. Молекулярно-биохимические аспекты световой регуляции 2-оксоглутаратдегидрогеназы в растениях / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, Г.Б. Анохина, А.В. Седых // *Физиология растений*. – 2020. – Т. 67. –

C. 206-213. (МБД – Scopus, WoS).

40. Eprintsev A.T. Two forms of NAD-malic enzyme in maize leaves are regulated by light in opposite ways via promoter methylation / A.T. Eprintsev, M.O. Gataullina, **D.N. Fedorin**, A.U. Igamberdiev // Journal of Plant Physiology. – 2020. – Т. 251. – С. 153193. (МБД – Scopus, WoS).

41. Епринцев А.Т. Особенности функционирования сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в листьях шпината *Chenopodium foliosum* L. и амаранта *Amaranthus caudatus* L. при солевом стрессе / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, О.С. Федорина // Известия РАН. Серия биологическая. – 2021. – Т. 48. – С. 57-64. (МБД – Scopus, WoS).

42. Eprintsev A.T. Aconitate isomerase from maize leaves: Light-dependent expression and kinetic properties / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, M.A. Dobychina, A.U. Igamberdiev // Journal of Plant Physiology. – 2021. – Т. 257. – С. 153350. (МБД – Scopus, WoS).

43. Eprintsev A.T. Effect of Salt Stress on the Expression and Promoter Methylation of the Genes Encoding the Mitochondrial and Cytosolic Forms of Aconitase and Fumarase in Maize / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, M.V. Cherkasskikh, A.U. Igamberdiev // International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 11. – С. 6012. (МБД – Scopus, WoS).

44. Eprintsev A.T. Effects of light, anoxia and salinity on the expression of dihydroxyacid dehydratase in maize / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, G.B. Anokhina, A.U. Igamberdiev // Journal of Plant Physiology. – 2021. – Т. 265. – С. 153507. (МБД – Scopus, WoS).

45. Епринцев А.Т. Эпигенетический механизм регуляции экспрессии генов мембраносвязанной субъединицы с сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, О.Х. Флорес Каро // Физиология растений. – 2022. – Т. 69. – № 2. – С. 142-148. (МБД – Scopus, WoS).

46. Епринцев А.Т. Регуляция активности глутаматдегидрогеназы в листьях кукурузы (*Zea mays* L.) при изменении светового режима / А.Т. Епринцев, Г.Б. Анохина, **Д.Н. Федорин** // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2022. – № 1. – С. 37-45. (МБД – Scopus, WoS).

47. Eprintsev A.T. Light Dependent Changes in Adenylate Methylation of the Promoter of the Mitochondrial Citrate Synthase Gene in Maize (*Zea mays* L.) Leaves / A.T. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, A.U. Igamberdiev // International journal of molecular sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 21. – С. 13495. (МБД – Scopus, WoS).

48. **Федорин Д.Н.** Хроматографическое выделение изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы при солевом стрессе / **Д.Н. Федорин**, О.Х. Флорес Каро, А.Т. Епринцев // Сорбционные и хроматографические процессы, 2022, Т. 22, вып. 4, С. 545-551. (МБД – Scopus, WoS).

49. **Федорин Д.Н.** Светорегуляция изоферментов цикла трикарбоновых кислот в растениях / **Д.Н. Федорин**, А.Т. Епринцев, А.У. Игамбердиев // Физиология растений. – 2022. – Т. 69. – № 6. – С. 589-596. (МБД – Scopus, WoS).

50. Епринцев А.Т. Очистка и некоторые кинетические характеристики изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы при солевом стрессе / А.Т. Епринцев, **Д.Н. Федорин**, О.Х. Флорес Каро // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 6. – С. 629-634. (МБД – Scopus, WoS).

51. **Федорин Д.Н.** Идентификация электрофоретическим способом продуктов рестрикционного анализа по сайту GATC геномной ДНК пшеницы при солевом стрессе / **Д.Н. Федорин**, В.О. Чуйкова, А.Т. Епринцев // Сорбционные и хроматографические процессы. – Воронеж. – 2023. – Т. 23. – Вып. 2. – С. 299-306. (МБД – Scopus, WoS).

52. **Fedorin D.N.** Effect of Salt Stress on the Activity, Expression, and Promoter Methylation of Succinate Dehydrogenase and Succinic Semialdehyde Dehydrogenase in Maize (*Zea mays* L.) Leaves / **D.N. Fedorin**, А.Т.Еprintsev, О.Ј.Фlorez Caro, А.У. Igamberdiev // Plants. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 68. (МБД – Scopus, WoS).

53. Eprintsev А.Т. Light-Dependent Expression and Promoter Methylation of the Genes Encoding Succinate Dehydrogenase, Fumarase, and NAD-Malate Dehydrogenase in Maize (*Zea mays* L.) Leaves / А.Т. Eprintsev, **D.N. Fedorin**, А.У. Igamberdiev // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 12. – С. 10211. (МБД – Scopus, WoS).