

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
“ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ”  
(ФГБОУ ВО «ВГУ»)

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

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант  
Епринцев Александр Трофимович

Воронеж – 2023

**СОДЕРЖАНИЕ**

Введение	7
ГЛАВА 1. Обзор литературы	14
1.1 Ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот	14
1.1.1 Строение сукцинатдегидрогеназы	14
1.1.1.1 Молекулярные аспекты функционирования сукцинатдегидрогеназы	20
1.1.2 Структура и регуляция цитратсинтазы	24
1.1.2.1 Формы цитратсинтазы и их функциональная роль	31
1.1.2.2 Молекулярная биология цитратсинтазы	35
1.1.3 Общая характеристика аконитазной системы	38
1.1.3.1 Регуляция аконитатгидратазы	44
1.1.3.2 Генетическая детерминация аконитазы	46
1.2 Роль фоторецепторов с световой регуляцией метаболизма растений	48
1.2.1 Общая характеристика фитохромов	48
1.2.2 Внутрядерные транскрипционные факторы	52
1.2.3 Роль катионов кальция в реализации фитохромного сигнала в растительной клетке	54
1.2.4 Структура и функциональная роль кальмодулина	58
1.3 Эпигенетические механизмы регуляции функционирования ферментов	71
1.3.1 Роль метилирования в организации генома	71
1.3.2 Метилирование остатков аденина в ДНК растений	74
1.3.3 Ферменты, осуществляющие метилирование ДНК	77
1.3.4 Метилирование промоторов, как механизм регуляции экспрессии генов	78

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	79
2.1 Объект исследования	79
2.2 Методы исследования	79
2.2.1 Создание разных условий светового режима	79
2.2.2 Определение активности сукцинатдегидрогеназы	80
2.2.3 Определение активности цитратсинтазы	80
2.2.4 Определение активности аконитатгидратазы	80
2.2.5. Определение количества белка	81
2.2.6 Выделение ядер	81
2.2.7 Определение концентрации катионов $Ca^{2+}$	81
2.2.8 Определение перекрестного загрязнения фракций	82
2.2.9 Электрофоретическое исследование сукцинатдегидрогеназы	82
2.2.10 Очистка сукцинатдегидрогеназы	82
2.2.11 Очистка цитратсинтазы	83
2.2.12 Очистка аконитазы	84
2.2.13 Исследование регуляторных свойств ферментов	84
2.2.14 Выделение РНК	85
2.2.15 Аналитический электрофорез нуклеиновых кислот	85
2.2.16 Обратная транскрипция	85
2.2.17 Полимеразная цепная реакция в реальном времени	87
2.2.18 Выделение ДНК и обработка бисульфитом	88
2.2.19 Анализ промоторов генов исследуемых изоферментов и подбор праймеров для метилспецифичной ПЦР	88

2.2.20 Метилспецифическая полимеразная цепная реакция	88
2.2.21 Расчет степени метилирования промоторов генов исследуемых изоферментов	89
2.2.22 Статистическая обработка данных	89
ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение	90
3.1 Очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы из кукурузы	90
3.1.1 Очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы	90
3.1.2 Определение физико-химических характеристик сукцинатдегидрогеназы	94
3.1.3 Определение величины константы Михаэлиса для изоферментов сукцинатдегидрогеназы	95
3.1.4 Определение рН-оптимума для изоферментов сукцинатдегидрогеназы	96
3.1.5 Влияние малоната на активность изоферментов сукцинатдегидрогеназы	98
3.2 Очистка аконитатгидратазы из кукурузы	100
3.2.1 Исследование гомогенности и специфической активности аконитатгидратазы из кукурузы	102
3.2.2 Регуляция активности аконитатгидратазы органическими кислотами	102
3.3 Очистка цитратсинтазы из кукурузы	103
3.4 Световая регуляция экспрессии генов исследуемых изоферментов	106
3.4.1 Экспрессия генов сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима	108
3.4.2 Исследование экспрессии генов сукцинатдегидрогеназы в листьях <i>Arabidopsis thaliana</i> дикого типа и дефицитных по генам фитохрома А и В	111
3.4.3 Экспрессия генов аконитазы в листьях кукурузы в условиях различного	117

светового режима	
3.4.4 Экспрессия генов цитратсинтазы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима	119
3.5 Трансдукция светового сигнала	122
3.5.1 Роль катионов кальция в трансдукции фоторецепторного сигнала к клетке	122
3.5.2 Экспрессия факторов PIF в условиях разного светового режима	128
3.5.3 Роль кальмодулинов в трансдукции фоторецепторного сигнала в клетках кукурузы	142
3.6 Эпигенетические механизмы регуляции генов исследуемых изоферментов	150
3.6.1 Анализ промоторов генов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы	150
3.6.2 Анализ степени метилирования промоторов генов исследуемых изоферментов в различных световых режимах	163
Заключение	172
Список литературы	180

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ,  
СИМВОЛОВ, ТЕРМИНОВ**

СДГ - сукцинатдегидрогеназа

ЭТЦ - электронтранспортная цепь

ЦТК - цикл трикарбоновых кислот

ФАД - флавинадениннуклеотид

СУР – сукцинатубихинонредуктаза

ЩУК – щавелево-уксусная кислота

мтДНК - митохондриальная ДНК

сАМФ - аденозинмонофосфат

сGMP - гуанозинмонофосфат

САМ - кальмодулин

ДКС - дальний красный свет

ДХФИФ - дихлорфенолиндофенол

НАД - никотинамидадениндинуклеотид

рРНК – рибосомальная РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

КС – красный свет

мРНК – матричная РНК

PIF – Phytochrom interacting factor (фактор фитохромного взаимодействия)

Фк – неактивная форма фитохрома

Фдк – активная форма фитохрома

## 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-фосфоглицеральдегид 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, так же, как и фитохром,

реализует за счет специализированных семейств факторов транскрипции типа COP1 и HY5 (Zhang *et al.*, 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-островок в промоторе. В промоторах, несодержащих 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 проведено 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 ядра листьев кукурузы в различных световых режимах.
4. Установить роль отдельных кальмодулинов во внутриклеточной трансдукции фоторецепторного сигнала в растительной клетке.

5. Определить зависимость уровня транскриптов генов фитохром-зависимых факторов семейства PIF от наличия активной и неактивной форм фитохромов А и В 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 ФАДН<sub>2</sub> 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 немитохондриальным 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 Ca<sup>2+</sup>-CaM зависимой киназой кальмодулины 7 и 3 обеспечивают контроль за функционированием транскрипционного фактора P1F3, регулирующего экспрессию генов изоферментов СДГ, АГ и ЦС в зеленых листьях кукурузы.

4. Изменение метильного статуса отдельных CG-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 CG-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, модулирующий 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, 2012, 2013, 2014, 2015, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023), 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), Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий» (Нижний Новгород, 2022), ежегодных научных сессиях, отчетных конференциях преподавателей и сотрудников Воронежского госуниверситета (2013-2023).

**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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Ферменты метаболизма ди- и трикарбоновых кислот

#### 1.1.1 Строение сукцинатдегидрогеназы

Сукцинатдегидрогеназа (сукцинат:акцептор-оксидоредуктаза, сукцинат-убихинон редуктаза, СДГ КФ 1.3.99.1) осуществляет сукцината в фумарат. Данный фермент функционирует как в цикле Кребса, так и в электронтранспортной цепи митохондрий (рис. 1), где осуществляется перенос двух протонов на убихинон (Епринцев, Попов, 1999, Игамбердиев, Фалалеева, 1994).

При исследовании пространственной организации молекулы сукцинатдегидрогеназы удалось установить, что она имеет гантелеобразную форму. При этом длина молекулы оставляет  $126,28\text{\AA}$ , это есть расстояние между глутамином 551 субъединицы А и глутамином субъединицы В. Однако, наименьший диаметр молекулы определяется в области расположения субъединицы С, где он составляет  $23\text{\AA}$  между тирозином 96 и глицином 16 (Епринцев *и др.*, 2010).

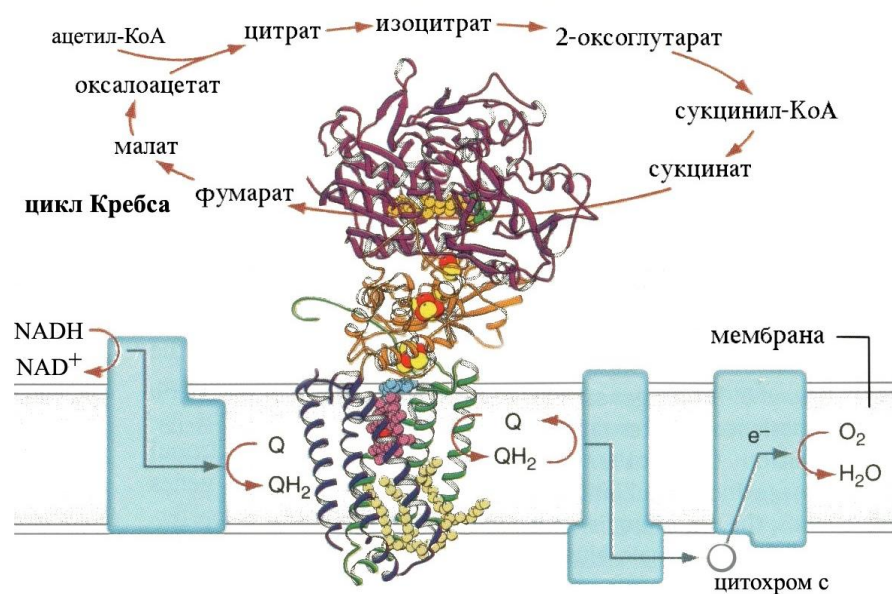


Рис 1. Локализация СДГ в мембране митохондрии и роль в функционировании цикла Кребса и электронтранспортной цепи.

Исследования, проводимые в области биохимии, позволили охарактеризовать ферментный комплекс сукцинатдегидрогеназы у бактерий и эукариот, выявив его тетрамерное строение во всех исследованных организмах. Первые две субъединицы флавопротеин (СДГА) и железо-серный белок (СДГВ) ориентированы в митохондриальный матрикс и гидрофильны. Две другие субъединицы являются гидрофобными, мембранно-связанными белками - СДГС и СДГD (Рис. 2).

Большая субъединица СДГ обращена в матрикс митохондрий и формирует сукцинатоокисляющий центр с ковалентно связанным флавинадениндиноклеотидом

(ФАД). Железо-серная субъединица содержит три Fe-S-кластера, осуществляющих передачи электронов от сукцината к убихинону. Каталитический димер СДГА-СДГВ взаимодействует с цитохром-b-обогащенной фракцией (СДГС-СДГD), которая закрепляет весь комплекс на внутренней стороне внутренней мембраны митохондрий. Тетрамерный комплекс СДГ способен осуществлять окисление убихинона за счет электронов сукцината, но при этом также установлена каталитическая активность димера СДГА-СДГВ, но природный акцептор этой реакции не установлен (Епринцев, Попов, 1999).

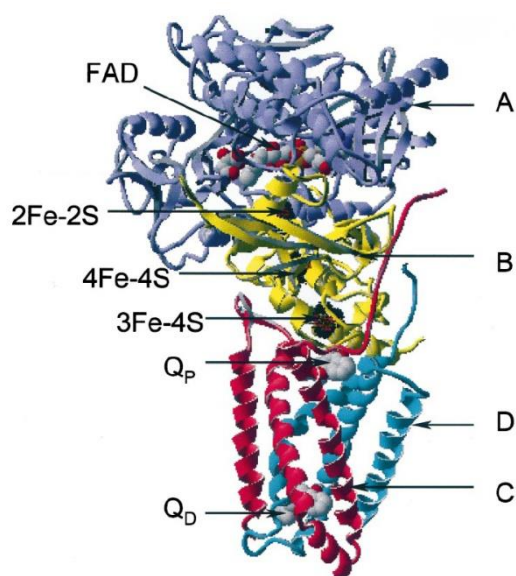


Рис. 2. Структура белковой молекулы сукцинат:убихинон-оксидоредуктазы *E. coli*. А – флавопротеин с ковалентно связанным кофактором флавинадениндинуклеотидфосфатом (FAD). В - железо-серная субъединица, содержащая (2Fe-2S), (4Fe-4S) и (3Fe-4S) кластеры. С и D – мембраносвязанные субъединицы. Qp и Qd - молекулы хинона.

Как говорилось ранее флавопротеин СДГ расположена в матриксе митохондрий, к которой ковалентно присоединен к 44 гистидину ФАД (Moise, 1982). Флавин представляет собой фоторецептирующий элемент, поглощающий свет с длиной волны 450 нм, при этом происходит его конверсия из неактивной формы в активную. Данный элемент, совместно с тремя Fe-S компонентами,



представляют собой редокс-комплекс СДГ и осуществляют внутримолекулярный перенос электронов (Yankovskaya *et al.*, 2003).

Анализ структуры СДГ показал наличие специфического центра связывания карбоксильных групп, расположенный в субъединице А, необходимого для взаимодействия с субстратом - сукцинатом (Yankovskaya *et al.*, 2003).

Гидрофобная часть СДГ, необходимая для закрепления всего комплекса в мембране, представлена двумя белковыми компонентами с молекулярными массами 16,7 и 16,6 кДа, соответственно (Епринцев и др., 2010).

Исследование гидрофобной части СДГ, с использованием мутационного анализа, выявило наличие двух участков взаимодействия с убихиноном (Qp и Qd) (Yankovskaya *et al.*, 1996, Westenberg *et al.*, 1993). Участок Qp необходим для взаимодействия с восстановленным убихиноном, в то время как участок Qd, для взаимодействия с окисленным убихиноном.

Применение спектроскопии и анализа аминокислотных последовательностей субъединицы В СДГ позволило установить состав входящих у нее железо-серных кластеров. СДГ содержит три группы железо-серных кластеров – центр 1 (S-1), центр 2 (S-2), центр 3 (S-3), которые связаны только с субъединицей В. По содержанию ионов железа и серы их относят: S-1 к кластеру 2Fe-2S, S-2 к кластеру 4Fe-4S, S-3 к кластеру 3Fe-3S. Показано, что данная ферментативная система имеет в своем составе все три типа железо-серных кластеров (Gomes *et al.*, 1999).

Мембранный якорь СДГ состоит из гетеродимера СДГС-СДГD и внедренного фрагмента гема b. Структура СДГ млекопитающих показывает, что СДГС содержит четыре общих спирали, в то время как СДГD - пять (Sun *et al.*, 2005). N-концевая спираль СДГD локализуется в митохондриях и взаимодействует с СДГВ, способствуя мембранной локализации гидрофильного димера. Каждая субъединица имеет две трансмембранные спирали, формирующие четырехвинтовой пучок, который организует ядро мембранного якоря, в то время как оставшиеся трансмембранные спирали каждой субъединицы фланкируют сердцевину. Остальные спирали каждой субъединицы выступают из мембраны и

организуются антипараллельно, по существу прикрывая трансмембранное ядро. В дополнение к спиральной организации этого домена, структура показывает, что СДГС и СДГD располагают гем b кофактор в середине четырехвинтового пучка, который взаимодействует с порфириновым кольцом (Van Vranken *et al.*, 2015). Каждая субъединица имеет консервативный остаток гистидина, который координирует гемовое железо, в то время как два аргининовых остатка, один от СДГС, а другой от СДГD, также как другой гистидиновый остаток от СДГС, взаимодействуют с гемовыми пропионатными группами (Sun *et al.*, 2005).

Домен мембранного якоря содержит сайт связывания и восстановления убихинона, что в конечном итоге способствует переносу электрона от сукцината на следующие комплексы ЭТЦ. По сути, эта область содержит два участка связывания убихинона, которые отличаются своим сродством к убихинону (Oyedotun, Lemire, 2001, Lemire, Oyedotun, 2002, Oyedotun *et al.*, 2007). Сайт с высоким сродством (Qp-проксимальный) располагается ближе к внутренней митохондриальной мембране и является главным убихинон-связывающим сайтом (рис. 1).

Сайт Qp, состоит из остатков от СДГС, СДГD и СДГВ, включая терминальный 3Fe-4S кластер от СДГВ (Sun *et al.*, 2005). Второй сайт связывания (Qd-дистальный) лежит ближе к внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны и представляет собой сайт низкого сродства. Этот сайт полностью состоит из остатков от СДГD (Sun *et al.*, 2005). Восстановление убихинона происходит в две стадии одноэлектронных переходов, в отличие от двухэлектронного восстановления ФАД. Важно отметить, что сайт Qp стабилизирует частично восстановленные промежуточные семихиноны и облегчает полное восстановление убихинона до убихинола, тем самым предотвращая образование активных форм кислорода (Yankovskaya *et al.*, 2003).

Четыре классические субъединицы обнаруживаются во всех эукариотических организмах и формируют нативные комплексы массой примерно 110 кДа (Huang, Millar, 2013). Но стало известно, что растительный комплекс СДГ может иметь серию дополнительных субъединиц с неизвестной функцией,

нативная масса данного комплекса составляет 160 кДа. Эти субъединицы были обнаружены с использованием нативного электрофореза с окрашиванием Куммаса у большого числа двудольных растений и идентифицированы у арабидопсиса с помощью масс-спектрометрии (Eubel *et al.*, 2003, Millar *et al.*, 2004).

Активный центр, связывающий молекулу фермента и молекулу сукцината, находится на субъединице СДГА. Метиленовые группы янтарной кислоты за счет наличия карбоксилов обладают высокой реакционной способностью. Боковые группы Tyr254, Glu354 и Arg399 субъединицы А обеспечивают правильное положение сукцината в активном центре, а флавин осуществляет передачу электронов на железо-серный кластер (2Fe-2S) при окислении (Kenney, 1975). Именно специфическое строение сайтов связывания объясняет процессы ингибирования фермента. Соответственно все ингибиторы делятся на 2 класса, в зависимости от того, на какой активный центр действуют.

Активный центр связывающий убихинон расположен между субъединицами В, С, D, а точнее в специальном углублении между ними. Убихинон стабилизируется боковыми группами Glu207 субъединицы В, Ser27 и Arg31 субъединицы С и Tyr83 субъединицы D. Хиновое кольцо окружено Ile28 субъединицы С и Pro160 субъединицы В. Эти аминокислотные остатки вместе с Ile209, Trp163 и Trp164 субъединицы В, и Ser27 субъединицы С, образуют гидрофобное окружение в кармане для связывания хинона (Horsefield *et al.*, 2006).

Считается, что два активных центра связаны между собою цепью редокс-потенциалов, длина которой не превышает 40Å. Состоит эта цепь из ФАД и трех железосерных кластеров, расстояние между которыми не превышает 14 Å (Yankovskaya *et al.*, 2003).

В настоящее время возникают спорные вопросы по поводу участия гема b сукцинатдегидрогеназы в ее функционировании. Вероятно, электрон переходит к убихинону от (3Fe-4S) кластера данный процесс является обратимым. Вероятно, гем играет роль аккумулятора электронов, предотвращая их несанкционированное

перемещение на молекулярный кислород, что привело бы к образованию активных форм кислорода.

Кроме того, иная точка зрения говорить, что может существовать так называемый «воротный механизм», предотвращающий прямой перенос электрона с (3Fe-4S) кластера на гем. Важную роль в данном процессе выполняет гистидин-207 железо-серной субъединицы, расположенный в непосредственной близости к железо-серным кластерам и гемму, недалеко от связанного убихинона. Предположительно, данная аминокислота может принимать участие в регуляции потоков электронов между этими редокс-центрами (Tran *et al.*, 2006).

#### 1.1.1.1 Молекулярные аспекты функционирования сукцинатдегидрогеназы

Особое положение сукцинатдегидрогеназы в метаболизме митохондрий растений, а именно, участие в работе ЦТК и ЭТЦ, требует необходимости контроля ее функционирования. Выяснение механизмов регуляции СДГ позволяет понять процессы контроля клетки за переключением клетки с одного метаболического пути на другой, регулируя свой гомеостаз (Епринцев *и др.*, 2010).

Сукцинатдегидрогеназа играет важную роль в регулировании роста растений и стресс-реакции; путем снижения активности СДГ происходят некоторые метаболические изменения, которые отвечают за изменения в развитии растений, а также СДГ считается прямым источником активных форм кислорода в растительных митохондриях (Jardim-Messeder *et al.*, 2015). Различные мутации субъединиц сукцинатдегидрогеназы влияют на дифференциально-физиологические процессы в растениях; в трансгенном томате (*Solanum lycopersicum* L.), экспрессирующем в антисмысловой ориентации ген, кодирующий СДГ2, снижение активности сукцинатдегидрогеназы увеличивает ассимиляцию углекислого газа на 25% и увеличение биомассы у зрелых растений. Это явление было связано со скоростью транспирации и устьичной проводимости, определяющей роль промежуточных продуктов ЦТК в фотосинтетическом метаболизме регуляции устьичной апертуры (Araujo *et al.*, 2012). В *Arabidopsis* были идентифицированы

мутантная субъединица СДГ1-1 в комплексе II, растения с такой мутацией в СДГ1 имеют дефектный СДГ, влияющий на активность митохондриальной транспортной цепи. Эта мутация делает растения более восприимчивыми к грибковым и вирулентным бактериальным патогенам, потому что эта мутация провоцирует снижение продуцирования митохондриального  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{mH}_2\text{O}_2$ ), которое является эффективным в защите растений. Их выводы дают новую перспективу о важности оптимальной функции СДГ1, необходимой для экспрессии защитного гена, опосредованного салициловой кислотой, в *Arabidopsis* (Gleason *et al.*, 2011). Другие исследования, связанные с мутантами СДГ1 в *Arabidopsis* с умеренным дефицитом в митохондриальном комплексе II (СДГ), показали, что эти растения имели значительно более высокие уровни усвоения  $\text{CO}_2$  и повышенный рост, связанный с различиями в апертуре устьиц, а также измененный метаболизм аминокислот, который позволял растениям значительно улучшаться в условиях ограничения азота. Хотя подробные молекулярные механизмы, связывающие дефицит СДГ с устьичным биогенезом и функцией и метаболизм азота, далеки от понимания и заслуживают дальнейшей работы (Fuentes *et al.*, 2011).

Митохондриальное дыхание в растениях обеспечивает энергию для биосинтеза, а его баланс с фотосинтезом определяет скорость накопления биомассы растений. Регулирование дыхания происходит на уровне транскрипции, особенно для генов с ядерным кодированием, и на посттрансляционном уровне внутри митохондрий при нормальном развитии и реакции стресса (Millar *et al.*, 2011). Изменения в активности СДГ существенно влияют не только на скорость функционирования ЦТК, но также на баланс между фотосинтезом, дыханием и фотодыханием в растительной клетке. Важным механизмом регуляции дыхания митохондрий под световыми условиями является роль фитохрома А, участвующего в модуляции митохондриального дыхания посредством его воздействия на экспрессию СДГ. Анализ растений *Arabidopsis thaliana*, несущих мутантные гены фитохромов А и В, показал, что фитохром А участвует в регуляции активности фермента СДГ. Активная форма фитохрома А подавляла экспрессию гена СДГ1-2

и приводила к снижению активности СДГ (Porov *et al.*, 2010).

Для растений характерно двойственное кодирование компонентов дыхательных комплексов митохондрий. Гены соответствующих ферментных систем детерминированы в ядерном и митохондриальном геномах. Для гена *sdh1*, флавопротеина СДГ показана исключительно ядерная локализация у всех исследованных эукариот (Scheffler, 1998, Lang *et al.*, 1999, Boore, 1999).

При этом, для генов мембраносвязанных субъединиц, гена *sdh2* *Marchantia polymorpha* и покрытосеменных установлено присутствие генов в митохондриальном геноме (Oda *et al.*, 1992, Gray *et al.*, 1998, Adams *et al.*, 2001), либо могут быть представлены как псевдогены у некоторых покрытосеменных (Giege *et al.*, 1998).

Показано, что для растений характерно наличие сложной генетической детерминации СДГ-комплекса. В модельном объекте *A. thaliana* субъединица А кодируется двумя генами - *sdh1-1* (At5g66760) хромосома 5 и *sdh1-2* (At2g18450) хромосома 2, субъединица В – тремя – *sdh2-1* (At3g27380) хромосома 3, *sdh2-2* (At5g40650) хромосома 5 и *sdh2-3* (At5g65165) хромосома 5; субъединица С - двумя генами- *sdh3-1* (At5g09600) хромосома 5 и псевдоген *sdh3-2* (At4g32210) хромосома 4, субъединица Д – одним – *sdh4* (At2g46505) хромосома 2 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Гены дополнительных субъединиц СДГ растений также имеют ядерную локализацию: субъединица 5 кодируется одним геном (At1g47420) хромосома 1, субъединица 6 – одним (At1g08480) хромосома 1, субъединица 7 – двумя (At3g47833 и At5g62575) хромосомы 3 и 5, соответственно, и субъединица 8 – одним (At2g46390) хромосома 2 (Millar *et al.*, 2004).

Для кукурузы было установлено наличие двух генов, кодирующих белковую молекулу флавопротеина и определение их степень сродства, которая показала более 80% сходства с нуклеотидными последовательностями генов *A. thaliana* (Епринцев *и др.*, 2010).

Отсутствие в мтДНК генов, кодирующих комплекс II, поднимало вопросы, касающиеся эволюционного происхождения соответствующих ядерных генов, а именно, были ли они изначально представлены в ядерном геноме безмитохондриальных эукариот или были привнесены в эукариотическую клетку в процессе эндосимбиоза, и впоследствии переместились в ядерный геном. Daignan-Fornier и др. описали ядерный ген *sdh3* дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), являющийся гомологом гена *sdhC* *E. coli*, отметив, что этот ген также гомологичен по аминокислотному составу неопознанной открытой рамке считывания *orf137*, которая ранее была найдена в митохондриальном геноме печеночника *Marchantia polymorpha* (Daignan-Fornier *et al.*, 1994). Впоследствии, Gertraud Burger и др. было показано, что гены *sdh2*, *sdh3* и *sdh4* закодированы в мтДНК двух эволюционно далеких эукариот, *Porphyra purpurea*, многоклеточной красной водоросли (rhodophyte) и *Reclinomonas americana*, одноклеточного, рано дивергировавшего бактеривора, члена группы протистов (Burger *et al.*, 1996). Таким образом, гены *sdh2*, *sdh3* и *sdh4* первоначально были закодированы в геноме протомитохондрий и впоследствии были перенесены в ядерный геном у большинства эукариот, то есть митохондрии имеют монофилетическое происхождение.

Было показано, что гены *sdh3* и *sdh4* присутствуют и экспрессируются в митохондриальном геноме неродственных покрытосеменных, но при этом происходили частые потери этих генов из митохондриального генома в ходе эволюции цветковых растений. Также было показано, что множественный перенос обоих генов *sdh3* и *sdh4* в ядерный геном происходил недавно (Adams *et al.*, 2001).

Чрезвычайно интересен факт частого перемещения *sdh3* и *sdh4*, что сходно с генами других белков, участвующих в дыхании. Некоторые гидрофобные мембранные белки трудно импортируются в органеллы и внедряются в мембрану (Porot, 1990, Claros *et al.*, 1995). Эта характеристика рассматривается как лимитирующий фактор для успешного функционального перемещения дыхательных генов в ядро (Doolittle, 1998, McFadden, 1999, Palmer *et al.*, 2000, Palmer, 1997, Thorsness, Weber, 1996). В дополнение к этому, было предположено,

что митохондриальные гидрофобные белки могли быть ошибочно доставлены в эндоплазматический ретикулум, если синтезировались в цитозоле (Von Heijne, 1986). Так, уменьшение гидрофобности, как предполагается, облегчило перенос гена *cox3* в ядро двух зеленых водорослей (Perez-Martinez *et al.*, 2000). Функциональное перемещение *sdh3* у покрытосеменных могло быть облегчено потерей одного или трех трансмембранных сегментов у общего предка эвдикотов и однодольных вместе с редукцией гидрофобности белков, кодируемых некоторыми переносимыми *sdh3* генами. Становясь менее гидрофобными, СДГС белки могут свободно перемещаться в митохондрию и встраиваться в правильное положение. В связи с этим, примечательно, что у покрытосеменных ген *sdh3* исчезал из митохондриального генома и предположительно перемещался в ядро более часто, чем *sdh4*, для которого у всех исследованных последовательностей покрытосеменных сохранились все три трансмембранных сегмента (Adams *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Структура и регуляция цитратсинтазы

Цикл трикарбоновых кислот имеет важное значение в метаболизме клетки, поскольку является этапом полного окисления пирувата, основным поставщиком которого в клетке является гликолиз.

Первая реакция цикла катализируется ферментом цитратсинтазой (ЦС, КФ 2.3.3.1), при этом ацетильная группа ацетил-СоА конденсируется с оксалоацетатом, в результате чего образуется лимонная кислота (Karpusas *et al.*, 1990). Вероятно, в данной реакции в качестве промежуточного продукта образуется связанный с ферментом цитрил-СоА. Затем, последний самопроизвольно и необратимо гидролизуется с образованием цитрата и HS-СоА. Цикл лимонной кислоты является необходимым компонентом аэробного клеточного дыхания и цитратсинтаза встречается повсеместно во всех аэробных организмах. Цитратсинтаза действует как индуктор цикла лимонной кислоты, который необратим в стандартных условиях из-за сильного отрицательного изменения



свободной энергии синтеза цитрата ( $\Delta G^{\circ} = -31,4$  кДж), вызывая весь цикл (Garrett *et al.*, 2013).

Фермент цитратсинтаза, обнаруженный у животных, растений, грибов и археобактерий, представляет собой гомодимер, состоящий из двух идентичных мономерных субъединиц. Каждая субъединица имеет вес 48,92 кДа и изоэлектрическую точку (pI) 7,01 и состоит из 437 аминокислотных остатков (Gasteiger *et al.*, 2005). Общий вес двух субъединиц в гомодимере составляет 97,84 кДа.

Цитратсинтаза *T. acidophilum* существует в виде димера  $M_r \sim 90\ 000$ , причем каждый мономер содержит 384 аминокислоты. Оптимальная активность наблюдается при 55°C, хотя при комнатной температуре наблюдается пониженная активность, при этом кинетические параметры, зарегистрированные при повышенной температуре, сходны с показателями для цитратсинтазы свиньи при мезофильных температурах. Фермент стабилен и активен после инкубации в течение 10 мин при 78°C, при этом наблюдается изменение альфа-спирального состава в спектрах кругового дихроизма (CD), зарегистрированных при 55°C или 80°C. Напротив, цитратсинтаза из свиньи не проявляет активности после инкубации в течение 10 мин при 45°C (Russell, 1994).

Каждая субъединица состоит из 20 альфа-спиралей, которые вместе составляют 75% аминокислотной структуры, а остальные остатки в значительной степени неструктурированы, за исключением одного бета-листа из 13 остатков на каждой из субъединиц (Weigand, Remington, 1986). Весь фермент, образует плотную глобулярную молекулу (Russell, 1994). Каждая из субъединиц цитратсинтазы имеют свой собственный активный сайт, которые функционируют независимо друг от друга (Karpusas *et al.*, 1990).

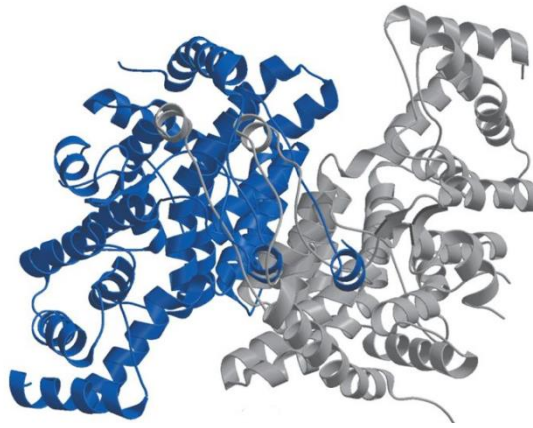


Рис. 7. Пространственная структура цитратсинтазы *E.coli*.

В субъединице выделяют большой домен, содержащий 15 альфа-спиралей, и малый домен, содержащий пять альфа-спиралей (рис. 7). Две субъединицы димера взаимодействуют друг с другом через четыре пары спиралей (каждая пара состоит из одной спирали от каждой субъединицы), которые скручиваются вместе, чтобы сформировать структуру, напоминающую бета-лист (Weigand, Remington, 1986). Remington с соавторами проводили кристаллографическое исследование цитратсинтазы и обнаружили две формы, которые отличаются расположением доменов. Тетрагональная форма с большой щелью между малым и большим доменами, которая позволяет получить доступ к субстрату к активному участку. Моноклинная форма из-за поворота на  $18^\circ$  внутрь малого домена. В тетрагональной форме оксалоацетат связывается с активным центром, вызывая конформационное изменение моноклинной формы, которое не только защищает субстрат внешней среды, но также открывает сайт связывания ацетил-СоА (Remington *et al.*, 1982). Как только субстраты связаны, три боковые цепи активного сайта, состоящие из двух гистидиновых остатков (His 274 и His 320) и одного аспарагинового остатка (Asp 375), осуществляют кислотно-основной катализ реакции конденсации, образуя две молекулы цитрата на белковый димер (Karpusas *et al.*, 1990, Remington *et al.*, 1982).

Активный сайт цитратсинтазы образован высококонсервативным каталитическим центром, состоящим из His307, His353 и Asp408, что установлено

для *Arabidopsis*. До сих пор значение цистеиновых остатков для каталитической активности ферментов эукариотической цитратсинтазы не изучалось сайт-направленным мутагенезом, хотя Cys108 и Cys365 были зарегистрированы как наиболее консервативные остатки цистеина, которые имеют потенциал для образования дисульфидных связей (Stevens *et al.*, 1997). Показано, что варианты формы ЦС4, которые не имеют либо Cys108, либо Cys325 (последний из которых сохраняется только в растениях), имеют лишь небольшую каталитическую активность по сравнению с немодифицированной формой. Являются ли эти цистеиновые остатки вовлеченными в фактическую каталитическую активность цитратсинтазы *Arabidopsis*, неясны, и, возможно, они важны для правильного складывания фермента. Следовательно, Cys108 и Cys325 особенно важны для функции цитратсинтазы *Arabidopsis* (Schmidtman *et al.*, 2014).

Рядом исследований установлено, что Cys365 является единственным цистеином, который является высококонсервативным во всех организмах. Когда Cys365 мутируется, фермент не так активен, как ЦС4 в его восстановленном состоянии, но действительно интересное наблюдение заключалось в том, что Cys365 не слишком чувствителен к окислительной инактивации. Таким образом, Cys365 играет ключевую роль в окислительной инактивации цитратсинтазы *Arabidopsis*, и это, скорее всего, самая важная мишень, которая регулируется с помощью TRX *in vivo*. Однако было продемонстрировано, что TRX не только уменьшает дисульфидные связи, образованные Cys365, так как все межмолекулярные и внутримолекулярные смешанные дисульфидные мостики в ЦС4. Таким образом, TRX-зависимая активация ЦС4, скорее всего, является важным механизмом регуляции цикла ЦТК *in vivo* (Schmidtman *et al.*, 2014).

В составе активного центра ЦС обнаружено наличие двух центров связывания, один для лимонной кислоты или оксалоацетат, а другой для коэнзима А. Активный центр данного фермента содержит три ключевых остатка аминокислот: His274, His320 и Asp375, которые являются весьма избирательным во взаимодействии с субстратом.

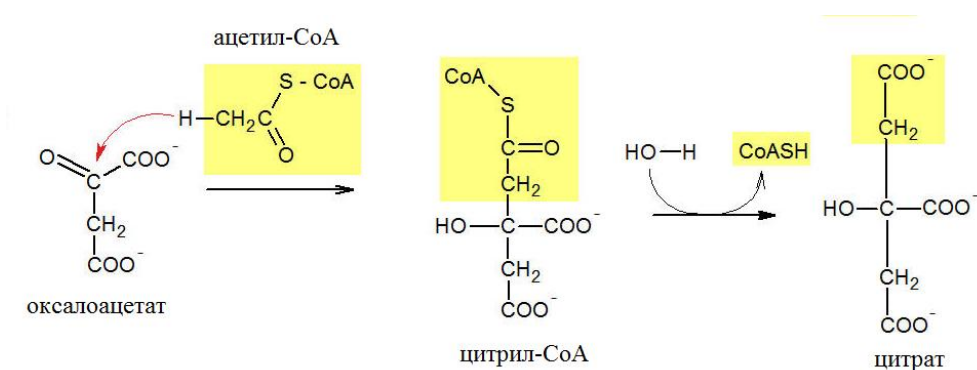


Рис. 8. Механизм реакции, катализируемой цитратсинтазой. CoA – кофермент А.

Эти аминокислотные остатки активного центра катализируют превращение ацетил-СoА ( $\text{H}_3\text{CO-SCoA}$ ) и оксалоацетат ( $\text{COO-CH}_2\text{COCOO}^-$ ) в цитрат ( $\text{COOCH}_2\text{CONHCOOCH}_2\text{COO}^-$ ) и  $\text{HS-CoA}$  в альдольной реакции конденсации (рис. 8). Это формирует тетраэдрический промежуточный продукт и, как результат, высвобождение  $^-SCoA$  от карбонильной группы (Karpusas *et al.*, 1990, Garrett *et al.*, 2013). В дальнейшем  $^-SCoA$  протонируется и формируется  $\text{HS-CoA}$ . На последнем этапе происходит присоединение гидроксильной группы к карбонильной и образуется цитрат ( $^-COOCH}_2\text{CONHCOO-CH}_2\text{COO}^-$ ) (Weigand, Remington, 1986).

Учитывая большое отрицательное изменение свободной энергии цитратсинтазы и ее движущую роль в цикле лимонной кислоты, большое число исследований фермента в основном касаются того, как он регулируется. Исследования выявили наличие нескольких аллостерических ингибиторов, которые контролируют активность цитратсинтазы, в частности НАДН и АТФ (оба являются продуктами цикла лимонной кислоты). Эти молекулы связывают аллостерически с цитратсинтазой и уменьшают ее сродство к субстратам. Третья молекула, сукцинил-СoА, регулирует цитратсинтазу посредством конкурентного ингибирования путем связывания с ее активным центром, тем самым блокируя доступ субстрата к сайту связывания. Сукцинил-СoА является продуктом более поздней стадии цикла лимонной кислоты, и его накопление в матрице митохондрий указывает на обилие носителей электронов (в виде НАДН и ФАДН<sub>2</sub>)

и, следовательно, свободной энергии (в виде АТФ) в клетке, указывая на возможность ингибирования катаболизма. Таким образом, сукцинил-СоА служит в качестве конкурентного ингибитора цитратсинтазы по типу обратной связи, ингибируя цикл лимонной кислоты и останавливая дальнейший катаболизм (Remington *et al.*, 1982). Наконец, сам цитрат регулирует активность цитратсинтазы, конкурируя с оксалоацетатом за связывание с активным центром. Таким образом, лиазная реакция конкурирует с реакцией конденсации в цитратсинтазе (Weigand, Remington, 1986).

Эксперименты с нативной и очищенной цитратсинтазой *E. coli* подтвердили, что 2-оксоглутарат является ингибитором этого фермента. Ингибирование 2-оксоглутаратом, по-видимому, ограничивается одним семейством грамотрицательных организмов, а именно *Enterobacteriaceae*. Другие бактерии, как грамположительные, так и грамотрицательные, и высшие организмы не показали такого ингибирования цитратсинтаз. Во всех случаях ферменты, которые реагируют на 2-оксоглутарат, могут быть «десенсibiliзирoваны» к этому ингибитору путем повышения ионной силы, предполагая аллостерический механизм регуляции. Цитратсинтазы грамотрицательных бактерий являются значительно более крупными молекулами, чем молекулы грамположительных бактерий или эукариот, и, кроме того, только «большие» цитратсинтазы аллостерически ингибируются НАДН. Цитратсинтазы, которые проявляют ингибирование 2-оксокетоглутаратом, также являются «крупными» типами. Взаимодействие ЦС с 2-оксоглутаратом вполне может привести к перегруппировке субъединиц, подобных тем, которые наблюдались в случае НАДН. Исследования с *E. coli* показали, что ингибирующее действие 2-оксоглутарата на цитратсинтазу является типичным случаем торможения исходного фермента конечным продуктом пути (Weitzman, Dunmore, 1969).

Ингибирование цитратсинтазы различными нуклеотидами и поликарбоксилатными соединениями не является неожиданным, поскольку многие из этих соединений являются аналогами субстрата цитратсинтазы. Эти эффекторы

интересны в силу того факта, что многие из них являются промежуточными и/или конечными продуктами в метаболическом пути, для которых цитратсинтаза может являться первым этапом. Как следствие, можно предложить регуляцию цитратсинтазы АТФ (или потенциал фосфорилирования) с помощью ацил-СоА (уровень ацилирования) и НАДН (окислительно-восстановительный потенциал). Помимо этих предполагаемых контролей, возможно, что основным контролем активности цитратсинтазы является изменение концентрации его субстратов, ацетил-КоА и оксалоацетата (Gerald, Greenblatt, 1973).

Ингибирование цитратсинтазы жирными ацил-СоА-соединениями является сложным, поскольку степень ингибирования зависит от времени (Wieland, Weiss, 1963). Было обнаружено, что кинетически обнаруживаемые концентрации цитратсинтазы (20 нг) потеряли 15% от их максимальной скорости в первые минуты взаимодействия в присутствии 2 г олеил-СоА. Ингибирование увеличилось до 50% после 5 мин присутствия оксалоацетата. Бычий сывороточный альбумин может защитить от ингибирования ЦС олеил-СоА (Srere, 1965), но не смог восстановить исходную активность после полной инактивации (инкубация 5 мин).

Существует немало вопросов о том, что цитратсинтаза может сильно ингибироваться низкими концентрациями жирных ацил-СоА. Противоречие сосредотачивается вокруг того, является ли ингибирование неспецифическим детергентным эффектом или специфическим ингибированием. Специфика в таком контексте подразумевает физиологическое значение, и четкая демонстрация конкретного взаимодействия для одного фермента предполагает роль жирных ацил-СоА в качестве отрицательного эффектора для других ферментов, ингибируемых ацил-СоА (Hsu, Powell, 1975).

Некоторые ферменты цикла Кребса были идентифицированы как тиоредоксиновые мишени *in vitro*. Существование какой-либо тиоредоксин-зависимой регуляции, известной для цикла Кальвина, еще предстоит продемонстрировать. Было проведено исследование окислительно-

восстановительной регуляции фермента цитратсинтазы *Arabidopsis* путем сайт-направленного мутагенеза его шести цистеиновых остатков. Результаты показали, что окисление ингибирует активность фермента путем образования смешанных дисульфидов, так как частично окисленная цитратсинтаза образует большие окислительно-восстановительные агрегаты. Кроме того, было продемонстрировано, что тиоредоксин может расщеплять разнообразные внутри-, а также межмолекулярные дисульфидные мостики, которые сильно усиливают активность фермента. Измерения активности с вариантами модифицированного цистеина фермента выявили важные остатки цистеина, влияющие на общую активность фермента, а также окислительно-восстановительную чувствительность фермента (Schmidtman *et al.*, 2014).

Показано регуляторное действие различных ионов на скорость функционирования цитратсинтазы. Ферментативная активность цитратсинтазы из сердца свиньи может ингибироваться различными ионами. Порядок ингибирующего действия одновалентных катионов составляет  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , а анионов  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , тартрат. Двухвалентные катионы, такие как  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , намного эффективнее одновалентных катионов, при этом тиоцианат столь же эффективен, как двухвалентные катионы. АТФ также является мощным ингибитором, но dАТФ не оказывает никакого эффекта. Торможение моно- и двухвалентными катионами и АТФ можно преодолеть за счет увеличения концентрации одного из субстратов, ацетил-кофермента А, но не оксалацетата (Wu, Yang, 1970).

#### 1.1.2.1 Формы цитратсинтазы и их функциональная роль

Цитратсинтаза катализирует реакцию конденсации, происходящую между четырехуглеродной молекулой оксалацетата и двухуглеродной молекулой ацетил-СоА и часто рассматривается как первая стадия цикла трикарбоновой кислоты (Ferne *et al.*, 2004). Несмотря на стратегическое положение и важность этого фермента, исследования ее метаболического значения в растениях остаются

актуальными (Blasing *et al.*, 2005, Pracharoenwattana *et al.*, 2005, Urbanczyk-Wochniak *et al.*, 2006). Тем не менее, многие исследования направлены на выяснение роли этого пути во взаимодействии растений и почв. В этом контексте цитратсинтаза была показана как важный детерминант экссудации цитрата корнями (Kochian *et al.*, 2004) и как важный медиатор поглощения фосфатов и толерантности к алюминию (Apoor *et al.*, 2003). Более того, роль цитратсинтазы была постулирована в процессе цветообразования (Yui *et al.*, 2003).

Применение мутантных форм растений с антисмысловой цитратсинтазой показало в значительной степени неизменные скорости фотосинтеза, несмотря на явное изменение метаболизма, что указывает на то, что клетка может компенсировать уменьшенную экспрессию митохондриальной цитратсинтазы в трансформантах. Растения с таким мягким снижением активности ЦС способны продуцировать с активностью 6% (Landschütze *et al.*, 1995). Хотя возможно, что пероксисомальная цитратсинтаза обеспечивает более высокий вклад в общую активность в томате, чем в картофеле, но вряд ли объясняет такое большое расхождение в степени ингибирования. Еще одна возможность заключалась бы в том, что существует вторая, пока еще неохарактеризованная митохондриальная изоформа цитратсинтазы в томате. Однако крайнее сходство геномов томатов и картофеля не поддерживает эту гипотезу. Учитывая эти аргументы, предполагается, что различие, скорее всего, связано с относительной эффективностью самого антисмыслового торможения. Результаты исследований, также предполагают важную роль регуляции пероксисомальной цитратсинтазы, и, что эта регуляция обеспечивает контроль изоформы митохондрий. В таком случае цитрат, полученный во время работы глиоксилатного цикла, может либо быть дополнительным метаболитом в пероксисоме, либо экспортироваться в митохондрии и расходоваться, либо в виде цитрата, либо в изоцитрате, взамен оксалоацетата посредством ранее охарактеризованного транспортера карбоновых кислот (Picault *et al.*, 2002). Возможно, что оксалоацетат, экспортируемый из митохондрий, впоследствии может быть использован пероксисомами для



поддержания активности пероксисомальной цитратсинтазы. Тем не менее, независимо от того, происходит ли это *in vivo* или если он сначала преобразован в аспартат перед импортом, он остается спорным (Pracharoenwattana *et al.*, 2005). Независимо от субстрата, импортированного в пероксисому, имеются значительные доказательства сильной координации метаболизма между пероксисомными и митохондриальными процессами, которые выходят за рамки их совместной работы в путях, таких как фотодыхание, которые разделяются между несколькими органеллами. Результаты, полученные в отношении растений с дефицитом митохондриальной цитратсинтазы, согласуются с результатами других лабораторий, демонстрируя роль пероксисомального образования цитрата в контексте с функционированием ЦТК при окислении ацетильных звеньев  $\beta$ -окисления жирных кислот (Hooks, Rosenstrom, 2002, Pracharoenwattana *et al.*, 2005). Полученные данные также помогают объяснить наблюдения о том, что активность пероксисомальной цитратсинтазы обнаруживается в широком диапазоне тканей, а не только в тех, в которых активен глиоксилатный цикл (Cornah, Graham, 2002).

Хотя ограничение активности митохондриальной цитратсинтазы не имеет серьезных последствий для роста или физиологии растений, наблюдаются значительные сдвиги в обмене веществ. Анализ уровней мРНК с помощью микрочипа показал, что несколько транскриптов, связанных с метаболизмом азота, были подавлены, однако эта тенденция не была универсальной, предполагая, что сокращение ассимиляции нитратов было, по крайней мере, частично, опосредованным на посттрансляционном уровне. Оценка установившихся уровней метаболитов, в общем и целом соответствовала ограничению ассимиляции нитратов. Во-первых, уровень нитратов был повышен в трансгенных линиях, хотя следует отметить, что общее содержание азота в листьях трансгенных растений не изменялось. Во-вторых, в трансформантах были уменьшены уровни некоторых аминокислот. В-третьих, повышенный уровень крахмала и растворимых углеводов и снижение уровней фотосинтетических пигментов, наблюдаемых у трансформантов, являются диагностикой снижения скорости ассимиляции

нитратов (Fritz *et al.*, 2006, Gaude *et al.*, 2007). Тем не менее, несмотря на четкое ограничение ассимиляции нитратов, уровни, как аспарагин, так и глицин были значительно увеличены в трансформантах. Увеличение этих метаболитов при снижении нитратов не имеет приоритета, поскольку Orsel с сотрудниками сообщил об аналогичном наблюдении в *Arabidopsis* (Orsel *et al.*, 2006). Анализ изменений суточных уровней аспарагина и глицина показал, что они были менее различимы в конце темного периода, что подтверждает гипотезу о том, что это каким-то образом связано с изменениями ассимиляции нитратов. Кроме того, данные ряда исследований, предполагают, что это увеличение может быть обусловлено, по крайней мере, частично, усиленной деградацией белка и дифференцированной мобилизацией аминокислот внутри трансформантов. Например, существует явная регуляция генов, связанных с деградацией белка в трансформантах и скоростью метаболизма аминокислот с высоким содержанием азота, что указывает на то, что линии могут хорошо демонстрируют измененные темпы оборота белка. Действительно, многие аспекты метаболит-профилей митохондриальных цитратсинтаз растений, включая накопление глицина и аспарагина, напоминают те, которые обнаружены во время продолжительной ночной экспозиции или даже во время старения, вызванного темнотой (Shizaki *et al.*, 2005, Gibon *et al.*, 2006, Fahnenstich *et al.*, 2007).

Семейство белков оксокислотлиаз включает не только цитратсинтазу, но также несколько других белков с аналогичными функциями: 2-метилцитратсинтазу и АТФ-цитратсинтазу (Moss, 2013). Лиазы включают белки, которые катализируют разрушение химических связей между двумя атомами с помощью иных способов, чем гидролиз. Лиазы оксокислот являются представителями подгруппы углерод-углеродлиазы (Moss, 2013), поскольку они катализируют лизис углерод-углеродных связей. В случае цитратсинтазы обратной реакцией конденсации является реакция лиазы, так как шестиугольный цитрат может быть расщеплен с образованием ацетил-CoA и оксалацетата (Remington *et al.*, 1982). Функция 2-метилцитратсинтазы аналогична функции цитратсинтазы в том, что она

ответственна за синтез цитрата. Однако, данный фермент, обнаружен только у водорослей и граммотрицательных бактерий (Weigand, Remington, 1986). В отличие от цитратсинтазы, 2-метилцитратсинтаза является гексамерной. С другой стороны, АТФ-цитратлиазная реакция протекает аналогично лиазной реакции цитратсинтазы, поскольку происходит расщепление цитрата с образованием ацетил-СоА. Однако, АТФ-цитратлиаза функционирует в цитозоле и не является димером, а скорее тетрамером (Sun *et al.*, 2010).

Кластерный анализ цитратсинтазы на основе, как первичной структуры, так и третичной структуры привел к обнаружению большого количества белков гомологов. Первым используемым инструментом был NCBI-специфичный итеративный базовый локальный инструмент поиска назначений (PSI BLAST), который сравнивает исследуемую аминокислотную последовательность, в данном случае цитратсинтазу, с последовательностями известных белков на основе их гомологии. При использовании как PSI-BLAST, так и Dali для поиска гомологов, цитратсинтаза оказалась сходной как по структуре, так и по аминокислотной последовательности с 2-метилцитратсинтазой (Altschul *et al.*, 1997, Holm, Rosenstrom, 2010).

#### 1.1.2.2 Молекулярная биология цитратсинтазы

Анализ баз данных показал, что на сегодня имеются определенные данные о генетической детерминации цитратсинтазы для ряда организмов.

Цитратсинтаза *Arabidopsis thaliana* L. кодируется семейством ядерных генов: *CSY1* (AT3G58740) хромосома 3, и *CSY2* (AT3G58750) хромосома 3, *CSY3* (AT2G42790) хромосома 2, *ATCS* (AT2G44350) хромосома 2, *CSY5* (AT3G60100) хромосома 3 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome)).

Филогенетический анализ показывает, что они делятся на две группы: по два и три гена. Интронная/экзоновая структура генов сильно сохраняется в двух группах, но не между ними. Одна группа состоит из двух генов: At2g44350 и At3g60100, которые кодируют митохондриальные формы и содержат

специфические последовательности на своих N-концах. Ген At2g44350 также был идентифицирован в митохондриальном протеоме (Heazlewood *et al.*, 2004). Три белка в другой группе более похожи по последовательностям с пероксисомальной ЦС тыквы (*Cucurbita pepo*) (Kato *et al.*, 1996) и содержат последовательности пероксисомальной локализации типа 2 (PTS2) на их N-концах. Такие последовательности PTS2 характеризуются консервативным мотивом R(X)6HL. Это предполагаемые пероксисомальные: CSY-гены *CSY1* (At3g58740), *CSY2* (At3g58750) и *CSY3* (At2g42790).

Показано, что пероксисомальная ЦС является необходимой для метаболизма жирных кислот (ЖК) при прорастании *Arabidopsis*. Двойные мутанты *csy2* и *csy3* неспособны метаболизировать ЖК, что указывает на то, что они блокируют  $\beta$ -окисление жирных кислот. Следовательно, пероксисомальная ЦС необходим для  $\beta$ -окисления жирных кислот и в отсутствие ЦС ацетил-СоА, по-видимому, не может быть далее метаболизирован. Таким образом, ЦС требуется для экспорта углерода из пероксисомы (Pracharoenwattana *et al.*, 2005).

Митохондрии *Arabidopsis* обладают двумя изоформами цитратсинтазы: ЦС4 (At2g44350) и ЦС5 (At3g60100), кодируемыми двумя отдельными ядерными генами. Форма ЦС4 является основной изоформой и намного более распространенной, чем ЦС5. Обе изоформы ранее были идентифицированы в митохондриях *Arabidopsis* с применением разных протеомных подходов. При этом, белок только более распространен, чем ЦС5, но и транскрипт ЦС4 присутствует в *Arabidopsis* на гораздо более высоких уровнях на всех этапах развития, в то время как транскрипт ЦС5 имеет довольно низкий уровень (Schmidtman *et al.*, 2014).

Анализ генетической базы данные NCBI позволил установить, что в геноме кукурузы цитратсинтаза так же, как и в модельном объекте, арабидопсисе, кодируется семейством генов (табл. 1).

В частности, показано, что разные формы исследуемого фермента кодируется генами, расположенными в разных хромосомах. Гомология,

выявленная методами кластерного анализа, между генами, кодирующими цитратсинтазу кукурузы, составила 82,1%.

Таблица 1.

## Генетическая детерминация цитратсинтазы кукурузы

Молекулярная форма фермента	Ген	Описание	Локализация гена
ЦСа	<i>cts1</i>	citrate synthase 1	Chromosome 5, NC_024463.2 (126813410..126819537)
ЦСб	<i>cl5118_1</i>	Citrate synthase 2	Chromosome 4, NC_024462.2 (239005558..239012630)

Используя биоинформатику для идентификации последовательностей, сходных с цитратсинтазой свиньи, показано, что данный фермент, состоит из 466 аминокислот и содержит N-концевую митохондриальную последовательность и мотив, высококонсервативный для цитратсинтаз. Закрытые ортологи были обнаружены у свиней, цыплят и дрожжей с сохранением 100% в последовательности цитратсинтазы. Анализ нозерн-блоттинга выявил высокую экспрессию ЦС в сердце и мышцах, промежуточную экспрессию в головном мозге, почках и поджелудочной железе и более низкую экспрессию во всех других исследованных тканях, за исключением тимуса и тонкой кишки, которые не проявляли экспрессии (Liu *et al.*, 2000).

По анализу базы данных определили, что ген ЦС транскрибируется в 2 варианта сплайсинга, которые названы ЦСа и ЦСб (Kim *et al.*, 2013). ЦСа не имеет 2 экзона и кодирует белок из 466 аминокислот с 27-аминокислотным N-концевым митохондриальным сигналом, за которым следует каталитический домен цитратсинтазы. ЦСб содержит 2 экзон и кодирует 400-аминокислотный белок, который N-терминально усечен по сравнению с ЦСа. Он не имеет сигнала митохондриального таргетинга, но имеет домен цитратсинтазы. Количественный ПЦР клеток HeLa и HEK293 определил высокую экспрессию ЦСа и незначительное выражение ЦСб. Вестерн-блот-анализ обнаружил ЦСа при

кажущейся молекулярной массе около 50 кДа, при этом флуоресцентная метка ЦСа была локализована в митохондриях.

### 1.1.3 Общая характеристика аконитазной системы

Аконитатгидратаза (АГ, КФ 4.2.1.3) представляет собой фермент, который катализирует стереоспецифическую изомеризацию цитрата в изоцитрат через цис-аконитат в цикле трикарбоновых кислот, представляющий собой невосстановительно-активный процесс (Beinert, Kennedy, 1993, Flint *et al.*, 1996, Beinert *et al.*, 1996).

Аконитаза относится к семейству детерратаз, содержащих железо-серный кластер, активность которых зависит от целостности кластера (4Fe-4S) (Guerinot, Yi, 1994, Noctor, Foyer, 1998). Установлено, что лигандами для (4Fe-4S)-центра являются остатки трех цистеинов, при этом в активном состоянии ион железа кластера соотносится не с Cys, а молекулами H<sub>2</sub>O. Он участвует в связывании субстратов с активным центром, взаимодействующим с карбоксильными и гидроксильными группами субстратов (McCord *et al.*, 1971).

Подобное поведение активного элемента аконитазы отличается от других белков, содержащих Fe-S в которых форма Fe-S-центра относительно статична (Beinert, 1990). Таким образом, аконитаза представляет собой модель для возможного способа реагирования активности белка на изменения доступности железа (Brouquisse *et al.*, 1987).

Исследование строения аконитазы из сердца свиньи показало наличие 23 остатков аминокислот активного центра из всех четырех доменах аконитазы. Эти остатки участвуют в распознавании субстрата (Arg447, Arg452, Arg580, Arg644, Gln72, Ser166, Ser643), лигирования и взаимодействия кластеров (Cys358, Cys421, Cys424, Asn258, Asn446) и образовании водородных связей, поддерживающих боковые цепи активного центра (Ala74, Asp568, Ser571, Thr567). К остаткам, участвующим в катализе, относятся Ser642 и три пары гистидинкарбоксилата (Asp100-His101, Asp165-His147, Glu262-His167).

Аконитаза имеет в своем составе два важных функциональных элемента. Один элемент представляет собой небольшое углубление на поверхности и осуществляет непосредственное взаимодействие активного центра с кластером (4Fe-4S) (Robbins, Stout, 1989). Второй осуществляет взаимодействие фермента и субстрата, но его структура является дискуссионной (Lauble *et al.*, 1992, Talbot, Brand, 2005).

Для аконитазы характерна специфическая роль железо-серного кластера, поскольку он не участвует в передаче электронов в ходе катализа, а обеспечивает взаимодействие фермента и субстрата.

Аконитаза использует механизм дегидратации-гидратации в качестве основы катализа, где остатки аминокислот His-101 и Ser-642 играют ключевую роль. His-101 протонирует гидроксильную группу на С3 цитрате, вызывая его дегидратацию. Ser-642 одновременно забирает протон на С2, формируя двойную связь между С2 и С3 с образованием цис-аконитатного интермедиата. В этот момент промежуточный продукт поворачивается на 180° (flip-flop поворот) (Beinert *et al.*, 1996). Из-за этого промежуточный элемент переходит из «режима цитрата» в «режим изоцитрата» (Lauble, Stout, 1995). Этот механизм способствует тому, что во время последующих реакций цикла лимонной кислоты вода сначала удаляется из цитрата и затем добавляется в транс-положение к вращающемуся аконитату с выходом изоцитрата из реакции (Xin *et al.*, 2005).

Аконитаза найдена в двух клеточных компартментах, при этом митохондриальная форма вовлечена в Цикл Кребса, а физиологическая роль цитоплазматической формы до конца не выяснена. Для различных организмов роль цитоплазматической АГ отличается у растений и млекопитающих (Peyret *et al.*, 1995, Andersson *et al.*, 1998).

Аконитаза цикла трикарбоновых кислот у дрожжей представляет собой продукт с одним транслятом, который имеет двойную локализацию и распределяется между митохондриями и цитозолем с помощью уникального механизма, включающего обратную транслокацию (Ben-Menachem *et al.*, 2011).

Цитозольное количество аконитазы очень мало (~ 5% от общего количества). Однако, относительно большое количество изопротеина в одном субклеточном компартменте перекрывает незначительное количество другого изопротеина в другом компартменте (Ben-Menachem *et al.*, 2011).

Очень небольшая часть аконитазы локализуется в цитозоле (затмевается), тогда, как для фумаразы находятся в обоих компартментах клетки в равных соотношениях. Во-вторых, импорт аконитазы может происходить *in vivo* и *in vitro* в митохондрии после окончания трансляции, в то время как импорт фумаразы должен быть связан с ее трансляцией (Ben-Menachem *et al.*, 2011).

В эукариотических организмах в клетке присутствует митохондриальная аконитаза и цитозольная аконитаза, каждая из которых обеспечивает протекание соответствующего метаболического пути. Аконитаза участвует в работе ЦТК, глиоксилатном пути и метаболизме аконитата и цитрат в цитозоле клетки. (Courtois-Verniquet, Douce, 1993, Hayashi *et al.*, 1995, Cercos *et al.*, 2006, Sadka *et al.*, 2000, Sadka *et al.*, 2000a). Помимо этого, у дрожжей аконитаза является компонентом митохондриального нуклеоида (Chen *et al.*, 2007), или обеспечивает поддержание гомеостаза железа в клетке в условиях действия стрессового фактора (Moeder, 2007, Arnaud *et al.*, 2007).

Аконитаза растений менее изучена, но рядом исследователей показано, что, по меньшей мере, два изофермента аконитазы присутствуют в интактных клетках растений: один легко выделяется после снятия клеточной мембраны и присутствует в цитозоле; другой находится внутри митохондрий. Оказалось, что аконитаза в митохондриях растений отличается от аконитазы митохондрий млекопитающих по нескольким параметрам. Например, спектр электронного парамагнитного резонанса, наблюдаемый в окисленном митохондриальном матриксе из клубней картофеля (*Solanum tuberosum*), похож на спектр окисленной формы цитоплазматической аконитазы печени, но явно отличается от спектров митохондриальной аконитазы печени и сердца свиней (Beinert, Thompson, 1983).



Исследования фракционирования различных тканей растений подтвердили предположение об участии аконитатгидратазы в метаболизме цитозольного цитрата, поскольку была обнаружена активность данного фермента, ассоциированная как с цитозолем, так и с митохондриями. При этом, цитозольная активность равна, если не намного больше, чем в митохондриях (Hooks *et al.*, 2014, Hayashi *et al.*, 1995).

У растений цитоплазматическая и митохондриальная аконитазы имеют высокую гомологию и не могут дифференцированы. С другой стороны, у животных аконитазы легко разделяются при помощи ионообменной хроматографии и кодируются двумя различными генами. Было показано, что аконитаза растений ингибируется  $H_2O_2$  и ее присутствие не было обнаружено в глиоксисомах, но предлагается, что растительная цитоплазматическая аконитаза участвует в глиоксилатном цикле (Peuret *et al.*, 1995). Сделан вывод, что глиоксисомы, вероятно, лишены аконитазы и, что глиоксилатный цикл требует дополнительного этапа в цитозоле, который содержит мощную аконитазную активность (Courtois-Verniquet, Douce, 1993). Это требует экспорта цитрата из глиоксисомы, вероятно, путем свободной диффузии, его цитозольное превращение в изоцитрат и перенос изоцитрата в глиоксисому для использования изоцитратлиазой (Courtois-Verniquet, Douce, 1993).

В тканях растений, не содержащих липиды, цитозольная аконитаза участвует в формировании изоцитрата для 2-оксоглутарата, необходимого для синтеза глутамата (Gupta *et al.*, 2012).

Нативная молекулярная масса аконитазы составляет 90 кДа, что убедительно свидетельствует о том, что митохондриальная аконитаза растений, как и ее аналог у млекопитающих состоит из одной полипептидной цепи (Verniquet *et al.*, 1991).

Две изоформы аконитазы, митохондриальная и цитозольная, различаются электрофоретической подвижностью, и они проявляют отчетливую чувствительность к доступности железа: в то время как митохондриальный фермент устойчив к недостатку железа, цитозольный фермент теряет свою

активность при этом, что приводит к более высоким уровням накопления цитрата, что, в частности, было показано на цитрусовых (Degu *et al.*, 2011).

*Arabidopsis* имеет три изофермента, АСО1, АСО2 и АСО3, каждый из которых кодируется отдельным геном. Исследования субклеточного фракционирования показали, что АСО1 и АСО2 являются цитозольными и митохондриальными, соответственно. Было обнаружено, что АСО3 является преимущественно митохондриальным в 10-дневных проростках и исключительно митохондриальным в листьях 4-недельных растений. В 4-недельных растениях АСО3 приходилось почти 80% общей активности данного фермента (Arnaud *et al.*, 2007, Moeder *et al.*, 2007, Bernard *et al.*, 2009). В 3-х дневных же проростках напротив 90% АСО3 имеет цитозольную локализацию. Установлено, что АСО3 является цитозольным в проростках и функционирует в цитратном катаболизме, согласующемся с действием классического глиоксилатного пути, а не прямым катаболизмом цитрата в митохондриях (Hooks *et al.*, 2014).

Оказалось, что АСО1 и АСО2 могут компенсировать отсутствие АСО3, но его функция не может быть заменена полностью. Было показано, что АСО3 является основным ферментом катаболизма цитрата в проростках. Информация об аминокислотных последовательностях указывает на митохондриальную локализацию как АСО2, так и АСО3, имеющие N-концевые специфические последовательности, отсутствующие у АСО1 (Arnaud *et al.*, 2007).

Возможно, АСО3 является двойной мишенью для митохондрий и цитозоля, аналогично АСО дрожжей и изофермент значительно проявляется в *Arabidopsis*, что облегчает высвобождение почти 90% АСО3 обратно в цитозоль (Hooks *et al.*, 2014).

Однако есть противоположные результаты на этиолированных семядолях тыкв. Было подсчитано, что 90% общей активности АСО присутствует в цитозоле (De Bellis *et al.*, 1993). Исследования АСО тыквы выявили три изофермента, два из которых были цитозольными, а один был митохондриальным (De Bellis *et al.*,

1995). Один цитозольный изофермент показал переходную индукцию и последующее исчезновение, когда проростки были выставлены на свет.

Активность АСОЗ функционально тесно связана как с первичным метаболизмом углерода, так и с регуляцией клеточного окислительно-восстановительного баланса. Аконитаза может способствовать доступности восстановительных эквивалентов в стрессовых условиях (Hooks *et al.*, 2014).

Из кукурузы были очищены две молекулярные формы аконитатгидратазы (*Zea mays* L.). Цитозольный изофермент имел более высокий рН-оптимум (8,0), в два раза выше аффинность к цитрату ( $K_m$  - 9,5 мМ) и немного более низкую аффинность к изоцитрату ( $K_m$  - 1,7 мМ) по сравнению с митохондриальным изоферментом:  $K_m$  по цитрату 21 мМ и по изоцитрату 1,5 мМ (Eprintsev *et al.*, 2015).

Это указывает на то, что образование цитрата является более значительным, особенно для митохондриальной аконитазы, что благоприятствует его оттоку из ЦТК и функционированию последнего как неполного цикла в условиях повышенного окислительно-восстановительного потенциала в митохондриях (Igamberdiev, Gardeström, 2003).

Возможно также, что цитозольная аконитаза и НАДФ-изоцитратдегидрогеназа могут играть значительную роль в метаболизме быстрорастущих клеток, производя углеродные скелеты для биосинтетических целей (например, синтез аминокислот). В этих условиях наличие глутаминсинтетазы, глутаматсинтазы, аконитазы и НАДФ-связанной изоцитратдегидрогеназы в цитозоле растительных клеток дает объяснение ассимиляции чистого аммиака за счет 2-оксоглутарата (Igamberdiev, Gardeström, 2003).

Недавнее исследование показало, что аконитаза наряду с другими ферментами глиоксилатного пути и цикла Кребса активируются у *A. thaliana* при заражении *Pseudomonas syringae*, что предполагает роль для аконитазы в защите растений от патогенов (Gourley *et al.*, 2003).

Аконитаза может выступать в качестве одного из факторов вирулентности. Одним из ферментов, который может способствовать успешной пролиферации *Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria* в организме хозяина - в апопласте перцовых растений, является аконитаза, которая катализирует превращение цитрата, который и является индикатором активных форм кислорода (АФК), и изменений уровня железа в клетках (Kirchberg *et al.*, 2012).

Было показано, что аконитаза способна изменить компактизацию мтДНК путем регуляции белка Abf2p. Таким образом, аконитаза может интегрировать метаболические сигналы и поддержание структуры мтДНК (Chen *et al.*, 2007).

Таким образом, будет существовать двухсторонний механизм, при котором ЦТК может быть ингибирован, что приведет к уменьшению АФК, полученной из электрон-транспортной цепи, в связи с защитой митохондриального генома от текущего окислительного стресса окружающей среды, связанного с нуклеоидом Aco1p (Gerald, 2005). Аконитаза также может регулировать поток углерода между метаболизмом органических кислот и метаболизмом сахарозы (Carrari *et al.*, 2003).

#### 1.1.3.1 Регуляция аконитатгидратазы

Активность аконитазы подвергается множественным уровням регуляции. Например, поскольку фермент содержит железо-серный кластер, наличие железа вызывает переключение между связыванием РНК и аконитазной активностью (Volz, 2008).

В клетках млекопитающих ферментативная активность аконитазы и стабильность железо-серного кластера регулируются за счет посттрансляционных модификаций, включая фосфорилирование, нитрозилирование и окисление остатков, присутствующих на поверхности белка (Lushchak *et al.*, 2014). Было обнаружено фосфорилирование Ser91 в *Arabidopsis* аконитазы 3, но его физиологическое воздействие остается неясным. Вероятным сценарием могло бы быть то, что PP2A-B0c-зависимое дефосфорилирование аконитазы 3 препятствует развитию окислительного стресса посредством структурных перестроек, которые

повышают стабильность FeS-кластера у цитозольной аконитазы 3 (Konert *et al.*, 2015).

Среди митохондриальных протеинов аконитаза обычно используется в качестве чувствительного маркера окислительного стресса (Talbot, Brand, 2005), а также окислительного повреждения при различных дегенеративных заболеваниях и старении (Bulteau *et al.*, 2004). Этот может использоваться в качестве меры митохондриального окислительного повреждения (Cherkasov *et al.*, 2010).

Окислительная деактивация аконитазы может иметь важное значение для митохондриальной функции и может служить 'выключателем', уменьшающим поток эквивалентов через цикл трикарбоновых кислот, замедляя уровень формирования АФК. Митохондриальная аконитаза может быть повторно активирована Fe<sup>2+</sup> и клеточными тиолами, таким образом, восстановив схему работы ЦТК (Vasquez-Vivar *et al.*, 2000). Присутствие цитрата, субстрата фермента, уменьшает выделение Fe, разборку кластера и ферментативную инактивацию (Bulteau *et al.*, 2004).

Митохондриальная аконитаза неоднократно указывалась как основная мишень «опосредованной NO-токсичности», и была показана инактивация аконитазы в опухолевых клетках, гепатоцитах крысы, клетках Купфера и  $\beta$ -клетках Лангерганса с помощью систем «NO» или «NO-генерация». Аналогичным образом «NO» участвует в активации железочувствительного связывающего белка в макрофагах. Потеря наблюдаемой активности аконитазы была приписана прямым реакциям NO с кластером железа и серы (Castro *et al.*, 1994). Также NO и активные формы кислорода инактивируют как ферменты растений, так и животных и индуцируют РНК-связывающую активность в клетках животных (Navarre *et al.*, 2000). NO ингибирует аконитазу при гипоксии, что приводит к накоплению цитрата, который, в свою очередь, индуцирует альтернативную оксидазу и вызывает смещение метаболизма в сторону биосинтеза аминокислот. При этом сильное ингибирование аконитазы посредством NO усиливается при более низком значении pH (Gupta *et al.*, 2012).

Интересно, что повышенные уровни свободного железа, возникающие в результате разрушения железо-серных кластеров аконитазы и других дегидратаз посредством NO или АФК, были вовлечены в перекисное окисление липидов и повреждение ДНК. Таким образом, NO и АФК могут вносить вклад в гибель клеток в листьях табака, зараженных вирусом табачной мозаики, путем повышения уровней свободного железа, дестабилизируя кластеры железа и серы и/или, возможно, превращая цитоплазматическую аконитазу табака в функциональный железо-содержащий белок. Присутствие АФК и повышенное содержание железа в клетках, подвергающихся гиперчувствительному ответу, вероятно, оказалось бы губительно, как для хозяина, так и для патогена (Navarre *et al.*, 2000)

На сегодняшний день идентифицированы три специфических ингибитора аконитазы - фторцитрат, оксаломалат и цитрамалат. При этом аконитаза, выделенная из цитозоля клеток млекопитающих, менее чувствительна к фторцитрату, чем аконитаза, обнаруженная в цитозоле растительных клеток (Dequ *et al.*, 2011). Механизм ингибирования происходит за счет превращения фторцитрата в 4-гидрокси-транс-аконитат, который затем стабильно занимает активный центр, однако при высоких концентрациях фторцитрат может также блокировать цитрат (Dequ *et al.*, 2011).

Предполагается, что увеличение цитрата, вызванное ингибированием аконитазы, индуцирует синтез аминокислот и ГАМК-шунт (Dequ *et al.*, 2011). Кроме того, аконитаза ингибируется трансаконатом, сукцинатом, фумаратом, малатом и глиоксилатом. Трансаконат был более эффективным ингибитором в присутствии любого субстрата для митохондриальной формы по сравнению с цитозольной.

#### 1.1.3.2 Генетическая детерминация аконитазы

Анализ изоформ цитозольных и митохондриальных аконитаз животных показал, что эти белки имеют разные биохимические свойства и кодируются различными генами. Напротив, растительные митохондриальные и цитозольные

аконитазы имеют сходные кинетические свойства. Данные ряда исследований свидетельствуют о том, что они кодируются одним и тем же геном/генами (Moeder *et al.*, 2007).

Аконитаза дрожжей кодируется одним ядерным геном *Aco1* (778 аминокислот), который продуцирует единственный продукт трансляции, который, тем не менее, распределяется между митохондриями и цитозолем (Regev-Rudzki *et al.*, 2005, Regev-Rudzki, Pines, 2007). Белок присутствует во внеклеточной жидкости, обогащенной клеточной оболочкой фракции, митохондриях, цитозоле и пероксисомах дрожжевых клеток, что установлено методом вестерн-блоттинга и иммуноцитохимическим анализом (Andersson *et al.*, 1998).

У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* обнаружены два гена, *Aco1* (SPAC24C9.06с), кодирующий только аконитазный домен, и *Aco2* (SPBP4H10.15), кодирующий домен аконитазы, связанный с митохондриальным рибосомальным белком L21 (Mrp49) бактериального происхождения. Изучение их функционирования показало, что для жизнеспособности клеток необходим, по существу, любой ген (Kim *et al.*, 2010, Hayles, 2013).

Ген аконитазы постоянно экспрессируются на высоком уровне в проростках и цветах *A. thaliana* (Lauble *et al.*, 1992). Однако, у *Arabidopsis* третий ген (*ACO3*) действует только в течение первых 3 дней прорастания (Rosso *et al.*, 2003). *Aco3*-мутант проявил замедленный ранний рост проростков, изменил ассимиляцию (<sup>14</sup>C) ацетата и показал повышенный уровень цитрата, который был почти в 4 раза больше, чем у мутантов по *Aco1* или *Aco2* и дикого типа арабидопсиса (Hooks *et al.*, 2014).

Филогенетическое исследование, проведенное для семейства *Aco* у 14 видов растений, показывает наличие 5 подсемейств *Aco* и что предок однодольных и двудольных видов имеет, по меньшей мере, один ген *Aco* (Degu *et al.*, 2011).

Кластер *Aco1* составлен из последовательностей как одно-, так и двудольных, что указывает на то, что их предки присутствовали в растениях до расхождения одно- и двудольных групп. Субкластеры *Aco2* и *Aco3* содержат только

гены из видов двудольных, тогда как кластеры *Aco4-Aco5* образуются только однодольными. Это указывает на то, что эти кластеры появились после расхождения однодольных и двудольных растений, чтобы дать начало новым подсемействам. Следует отметить, что все виды двудольных растений, за исключением тополя и сои, имеют 3 гена *Aco*, которые распределены в кластеры *Aco1*, *Aco2* и *Aco3*. Было обнаружено, что организация субкластеров однодольных аналогична (Terol *et al.*, 2010). Соя и тополь содержат 6 и 4 гена *Aco*, соответственно, в то время, как только два были обнаружены в Трахиния двуколосковая (Terol *et al.*, 2010).

У цитрусовых схема экспрессии двух из трёх генов, *CcAco1* и *CcAco2*, обычно ассоциируется со временем снижения содержания цитрата в большинстве генотипов (Peuret *et al.*, 1995). Активация работы исследуемых генов аконитазы связана с увеличением pH цитоплазмы клетки и соотносилась со снижением содержания цитрата. Полученные данные указывают на цитозольную локализацию форм АГ, кодируемых генами *CcAco1*, и *CcAco2* (Terol *et al.*, 2010).

У кукурузы активные гены представляют собой *Aco1* и *Aco4*, соответствующие локусам LOC100304315 (ORF номер регистрации NM 001165757 и номер белка NP 001159229) и LOC100216599 (Номер доступа ORFN 001143012 и номер доступа белка NP 001136484). Оба гена активно транскрибируются во время прорастания семян, в то время как третий потенциально активный ген *Aco5* не имеет установленного профиля экспрессии, а его номер локализации не назначен (номер доступа ORF NM 001153959 и номер доступа NP 001147431 белка) (Eprintsev *et al.*, 2015).

В томате был обнаружен единственный ген *Aco1*. Мутация в гене *Aco1* томата снижала уровень белка аконитазы и уровни активности как в цитозоле, так и в митохондриях. Это может свидетельствовать об его двойном импорте в соответствующие компартменты клетки.



## 1.2 Роль фоторецепторов в световой регуляции метаболизма растений

### 1.2.1 Общая характеристика фитохромов

Фитохромы представляют собой фоторецепторы красной части спектра света и принимают участие в регуляции важных процессов клетки, таких как регуляция роста растений, морфогенез, контроль экспрессии генов. В настоящее время известно пять видов фитохромов (от А до Е) из которых фитохром А является фотолabileм и обеспечивает фотоморфогенетический ответ растений на дальний красный свет. Фитохромы от В до Е фотостабильны и фитохром В – преобладающий фитохром регулирующий деэтилирующий ответ в области красного света. Основное место локализации и синтеза фитохромов – цитоплазма, где они находятся в неактивной форме. После восприятия света нужной длины волны они переходят в активную форму и мигрируют, или в ядро, или в околоядерное пространство. Свободное перемещение в ядро осуществляет только фитохром В, в то время как для фитохрома А необходимы дополнительные белковые компоненты: FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1 (FHY1) и FHY1-LIKE (FHL). Фитохром может работать как светозависимая серин-треонин киназа и фосфорилировать некоторые белки *in vitro*, включая самих себя. Фитохромы являются фосфопротеинами и могут быть дефосфорилированы многими протеинфосфатазами. Активная форма фитохромов осуществляет контроль экспрессии генов за счет угнетения активности CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) или обеспечивая деградацию E3 убиквитин-лигазы, взаимодействующей с некоторыми фотоморфогенез-ответственными транскрипционными факторами и, в-третьих, путем индукции быстрого фосфорилирования и деградации факторов PHYTOCHROM INTERACTING FACTORS (PIF) – группы белковых транскрипционных факторов, подавляющих фотоморфогенез. Фитохромы утилизируются при помощи COP1 путем убиквитин 26S-протеосомного пути (Mas, Yanovsky, 2009, Alabadı, Blazquez, 2009).

Долгое время предполагалось, что фитохромы имеют исключительно цитозольными фоторецепторами, что основывалось на биохимических и

иммунологических исследованиях. Недавние исследования показали, что фитохромы должны проникнуть в ядро, чтобы осуществить реализацию светозависимых ответов. При этом, передачи сигнала от фитохрома в ядро является ключевым этапом реализации фоторецепторного сигнала в растительной клетке. Последние публикации начинают проливать свет на молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса (Yamaguchi *et al.*, 1999).

Внутриядерное накопление фитохрома В эффективно инициируется непрерывным красным светом и в меньшей степени синим светом, и совершенно не зависит от дальнего красного света. Одиночные импульсы света не способны вызывать накопление фитохрома В в ядре. Следует отметить, что уровень фитохромов В-Е в ядрах этиолированных растений крайне низкий, но детектируемый.

Структурно-функциональный анализ впервые показал, что С-концевой участок фитохрома В достаточен, чтобы локализовать бета-глюкоронидазу в ядре. Согласно этому, С-концевой домен фитохрома В содержит в себе предполагаемый сигнал ядерной локализации (NLS). Этот факт был подтвержден исследованием, которое показало, что зеленый флуоресцирующий белок (GFP) соединен с N-терминальным участком фитохрома В и локализуется в цитоплазме, в то время как GFP соединенный с С-концевым участком, локализуется в ядре.

Перемещение фитохрома А в ядро организовано по иному механизму, чем для фитохрома В. Важным моментом транслокации фитохрома А является восприятие света любой длины волны, а именно, красного, дальнего красного или синего. При этом для запуска механизма транслокации фитохрома А достаточно короткого импульса света. В ответ на это, перемещение фитохрома А в ядро осуществляется очень быстро (несколько минут), в то время как для фитохрома В это может длиться несколько часов.

Подобный механизм быстрого перемещения фитохрома А в ядро клетки возможно благодаря отсутствию в его составе участка NLS (сигнал ядерной сигнализации), поэтому сам процесс перемещения осуществляется за счет

специфического механизма. Данный механизм реализуется благодаря белкам FHY1 (дальний красный элогизирующий гипокотиль 1) и FHL (дальний красный элогизирующий гипокотиль-зависимый), как было показано, содействуют ядерной транслокации фитА. FHY1 и FHL два маленьких гомологичных белка были обнаружены у представителей двудольных и однодольных растений. Исследования показали, что оба белка способны к гомо- и гетеродимеризации через С-концевую область (Li *et al.*, 2011).

Поскольку за транслокацию фитохрома А в ядро ответственны FHY1 и FHL, важно отметить, что любое нарушение их синтеза оказывает влияние и на ядерный импорт фитохрома А. На данный момент функции FHY3 (дальний красный элогизирующий гипокотиль 3) и FAR1 (удаленный дальний красный ответ) мало изучены, но предполагается, что они принимают участие в регуляции синтеза FHY1 (Lin *et al.*, 2008, Hudson *et al.*, 2003). В 2007 году было показано, что белки FHY3 и FAR1 представляют собой транскрипционные факторы семейства транспозаз и непосредственно взаимодействуют с промоторами генов FHY1 и FHL за счет специфического сайта (FBS), что приводит к активации генов. Подтверждением этого является отсутствие соответствующих факторов в двойных мутантах по генам *fhy3* и *far1* (Feng *et al.*, 2008).

Недавние исследования показали, что HY5 представляет собой транскрипционный фактор, обеспечивающий фотоморфогенез при изменении светового режима растений. Свое действие данный фактор проявляет благодаря взаимодействию со специфическим участком ACGT, что, как правило, имеет локализацию около 10 нуклеотидов от другого регуляторного элемента промотора - FHY3/FAR1-связывающего сайта. Подобное взаимодействие снижает доступность сайта FHY1/FHL для FHY3/FAR1. Иной механизм связан с прямым взаимодействием HY5 и FHY3/FAR1-сайта. Следовательно, HY5 проявляет ингибирующее действие на FHY1/FHL-зависимые промоторы генов за счет регуляции активности факторов FHY3 и FAR1 (Li *et al.*, 2010, Sibout *et al.*, 2006).

FHY1 и FHL необходимы для ядерного накопления фитА. FHY3 и FAR1 - два транскрипционных фактора, которые непосредственно активируют транскрипцию FHY1 и FHL и, таким образом, косвенно регулируют накопление фитА в ядре и последующие ответные реакции. После восприятия кванта света активированная форма фитА перемещается в ядро за счет специализированных белков FHY1/FHL, что запускает механизмы фоторегуляции, в том числе наблюдается уменьшение количества COP1 и накоплению HY5, а обратная связь регулируется уровнем транскрипции FHY3 и FAR1. HY5 играет двойную роль в фитохромной сигнализации: содействие фотоморфогенезису и отрицательная регуляция уровня транскрипции FHY1/FHL путем модуляции деятельности транскрипционных факторов FHY3 и FAR1. FHY 3 и FHY1 более весомые участники процесса фитохромной сигнализации, чем их гомологи FAR1 и FHL (Wang, Deng, 2003).

### 1.2.2 Внутрядерные транскрипционные факторы

Подтверждением того, что фитохромы проявляют киназную активность является изучение очищенных препаратов фитА, которые вызывали фосфорилирование сериновых остатков путем автофосфорилирования. Доказательством киназной активности фитохромов является их взаимодействие с транскрипционными факторами семейства PIF (фитохром-взаимодействующие факторы). Факторы PIF подвергаются фосфорилированию и убиквинтированию при облучении растений светом, что в последствии приводит к их деградации фитохром-зависимым способом (Al-Sady *et al.*, 2006). Изучение механизмов действия фитохромов показали, что фитА и фитВ принимают непосредственное участие в фосфорилировании транскрипционного фактора PIF3 *in vitro*. Все выше изложенные факты указывают на то, что фитохромы проявляют протеинкиназную активность и реализуют сигнал через фосфорилирование факторов PIF.

Подобные механизмы взаимодействия между белковыми компонентами клетки необходимы для обеспечения реализации каскадных сигнальных систем.

Для фитохром были выявлены ряд белков, непосредственно принимающих участие в реализации сигнала по каскадному механизму, среди которых выделены следующие: PIF3 и другие известные PIF, PKS1, NDPK2, CRY1, CRY2, AUX/IAA, FyPP, COP1, PAPP5, FHY1/FHL.

Белки PIF относятся к семейству basic helix-loop-helix (bHLH, белок спираль-петля-спираль) транскрипционных факторов и играют важную роль в реализации фитохром-зависимого сигнала (Ni *et al.*, 1998). Как члены суперсемейства bHLH PIF имеют в своем составе элемент bHLH, представленный 15 аминокислотами и обеспечивающий его взаимодействие с ДНК, и HLH регион (около 60 аминокислотных остатков), который ответственен за процесс димеризации фактора. Практически все белки, содержащие bHLH домен, взаимодействуют с элементом E-box, при этом для PIF установлен специфические элемент - G-box (Oh *et al.*, 2004).

В составе всех факторов семейства PIF обнаруживается N-концевом участке, который для связывания с активной формой фитохрома В. Исключением являются транскрипционные факторы PIF1 и PIF3, которые специфически рецептируются с фитохромом А, при этом для PIF1 сродство выше, чем для PIF3.

Исследование растений, мутантных по генам разных типов фитохромов, указывают на их участие в фотоморфогенезе и регуляции экспрессии генов. Результаты исследований показали, что светозависимые гены являются мишенями для взаимодействия с транскрипционными факторам семейства bHLH, к которым относятся и факторы PIF (Oh *et al.*, 2004). Подтверждением этого факта является обнаружение в растениях после обучения светом фосфорилированных форм факторов семейства PIF. Подобная модификация PIF приводит к их убиквинтированию и деградации. Мутанты по генам *Pif1* и *Pif3* показали отсутствие наблюдаемого эффекта. Следовательно, результаты проведенных исследований на фитохром-зависимое фосфорилирование и протеолиз транскрипционных факторов семейства PIF и подобные механизм является

основным способом реализации фитохромного сигнала, обеспечивающего регуляцию генов.

При облучении растений красным и дальним красным светом фитохромы А и В проявляют свое действие путем подавления двух основных путей световой сигнализации: COP1 и PIF. Активность фактора COP1 (Е3-убиквитинлигаза) ингибируется на свету, что приводит к регуляции ряда транскрипционных факторов, таких как HY5, HYH, LAF1 и HFR1, разрушая их. PIF – подсемейство bHLH транскрипционных факторов необходимых для скотомофогенезиса (Weller *et al.*, 2009). Фотоактивные фитохромы непосредственно взаимодействуют с PIF, фосфорилированная форма которых быстро разрушается, однако, в тоже время COP1 способствует увеличению содержания PIF. Факторы COP1 и PIF вносят вклад в разрушение фитВ, в первую очередь путем взаимодействия между фитВ и COP1 (Lau, Deng, 2010.). Например, HY5, положительный фотоморфогенный регулятор, который стимулирует развитие растений в условиях света (Osterlund *et al.*, 2000, Oyama *et al.*, 1997), подвергается контролю негативными фотоморфогенными регуляторами, такими как COP1 и COP9 (Osterlund *et al.*, 1999). Свет контролирует этот процесс, модулируя субклеточную локализацию COP1. COP1 имеет преимущественно цитоплазматическую локализацию на свету, но накапливается в ядрах в темноте, где он непосредственно взаимодействует с HY5 (von Arnim, Deng, 1994), при этом для его деградации необходимо ядерное взаимодействие COP1-HY5 (Osterlund *et al.*, 2000).

HY5 является основным фактором транскрипции и локализуется в ядре конститутивно (Ang *et al.*, 1998). Было показано, что HY5 связывается с G-box нескольких светоиндуцируемых промоторов и необходим для оптимальной экспрессии соответствующих генов (Zhang *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2005). Деградация HY5 в темноте обеспечивает механизм, посредством которого активность HY5 и, в конечном счете, HY5-опосредованная экспрессия генов, может регулироваться на свету (Chattopadhyay *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2011).

### 1.2.3 Роль катионов кальция в реализации фитохромного сигнала в растительной клетке

Наряду с фитогормонами и светом,  $\text{Ca}^{2+}$  выступает в роли регулятора роста и развития растений, проявляя свое действие на клеточном уровне и контролируя множество клеточных процессов, включая контроль транспорта ионов через биологические мембраны и экспрессию генов. Этот контроль возможен благодаря существованию в растениях системы ионного гомеостаза, которая поддерживает концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме на постоянном уровне.

В растительной клетке можно выделить несколько мембранных компартментов, каждый из которых характеризуется постоянным уровнем концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . В цитоплазме клетки  $\text{Ca}^{2+}$  распределен неравномерно. Относительно стабильный электрохимический градиент  $\text{Ca}^{2+}$  поддерживается по обе стороны плазматической мембраны, тонопласта и мембран эндоплазматического ретикулума. Общепринято, что этот градиент может меняться в ходе сигнальной трансдукции. Очевидно, что данные градиенты устанавливаются в результате динамического баланса между входом и выходом кальция через клеточные мембраны, выступающими в роли барьеров между различными внутриклеточными компартментами.

Наибольший электрохимический градиент  $\text{Ca}^{2+}$  существует по обе стороны плазматической мембраны. Для растительной клетки  $\text{Ca}^{2+}$  цитозоля поддерживается на уровне порядка  $10^{-7}$  М, в то время как в апопласте эта величина эта величина располагается между  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М сходный градиент характерен для тонопласта, так как концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в вакуоле составляет  $10^{-3}$  М концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  внутри везикул эндоплазматического ретикулума не превышает 50 мМ (Медведев, 2005).

Пластиды и митохондрии не играют такой важной роли в аккумуляции кальция, как вакуоль и эндоплазматический ретикулум. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в них находится на миллимолярном уровне и большая часть ионов в них связана с фосфатами и липидами. Другим важным моментом является зависимость величины

электрохимического градиента на мембранах пластид и митохондрий от фотосинтетической и дыхательной активности. Эксперименты с использованием конфокальной микроскопии не выявили заметных различий в содержании  $\text{Ca}^{2+}$  между ядром и цитоплазмой, что объясняется наличием пор в ядерной мембране, размер которых достаточно велик для того, чтобы  $\text{Ca}^{2+}$  беспрепятственно диффундировал в обоих направлениях (Zhu *et al.*, 2013).

Согласно мембранной гипотезе  $\Phi_{\text{дк}}$  способен изменять мембранный потенциал плазмолеммы за счет изменения проницаемости для различных ионов, в первую очередь катионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Исследования на проростках табака смогли продемонстрировать независимое повышение уровня ядерного и цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в ответ на механическое (ветер) и холодовое шоковое воздействие, соответственно. Интересно что оба типа  $\text{Ca}^{2+}$  сигнала привели к повышению экспрессии NpCAM (генов кальмодулина *Nicotiana plumbaginifolia*), что так же подтверждает конвергенцию этих различных путей (Luan *et al.*, 2002). Этот опыт подтверждает, что кальций принимает участие в регуляции экспрессии генома, как переносчик сигнальных систем различного действия.

Изменение концентрации свободного цитозольного кальция в клетке является механизмом трансдукции огромного числа абиотических и биотических сигналов. Однако в последнее время активно обсуждается вопрос о высокой специфичности такого сигнала. Три больших класса кальциевых сенсоров были выявлены в растениях. Первый и преобладающий класс – кальмодулины – широко распространенные у эукариот и играющие важную роль в превращении кальциевых сигналов в собственно клеточные ответы в различных компартментах клетки (Snedden, Fromm, 2001, Xiong *et al.*, 2004). Кальций зависимые протеин киназы представляют второй класс  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров. Третий тип это кальценеврин-В подобные белки, которые так же являются  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорами растений (Luan *et al.*, 2002). Связывание кальция с  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорами вызывает конформационные изменения и/или изменение ферментативной активности за счет участия этих



активированных комплексов в индукции соответствующих клеточных ответов с помощью модуляции функции целевых белков, участвующих в многочисленных клеточных процессах, таких как ионный транспорт, обмен веществ, посттрансляционное изменение белков и экспрессии генов. Все больше фактов указывает на важность  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулина в регуляции транскрипционных процессов в ответ на эндогенные и экзогенные раздражители (рис. 11).

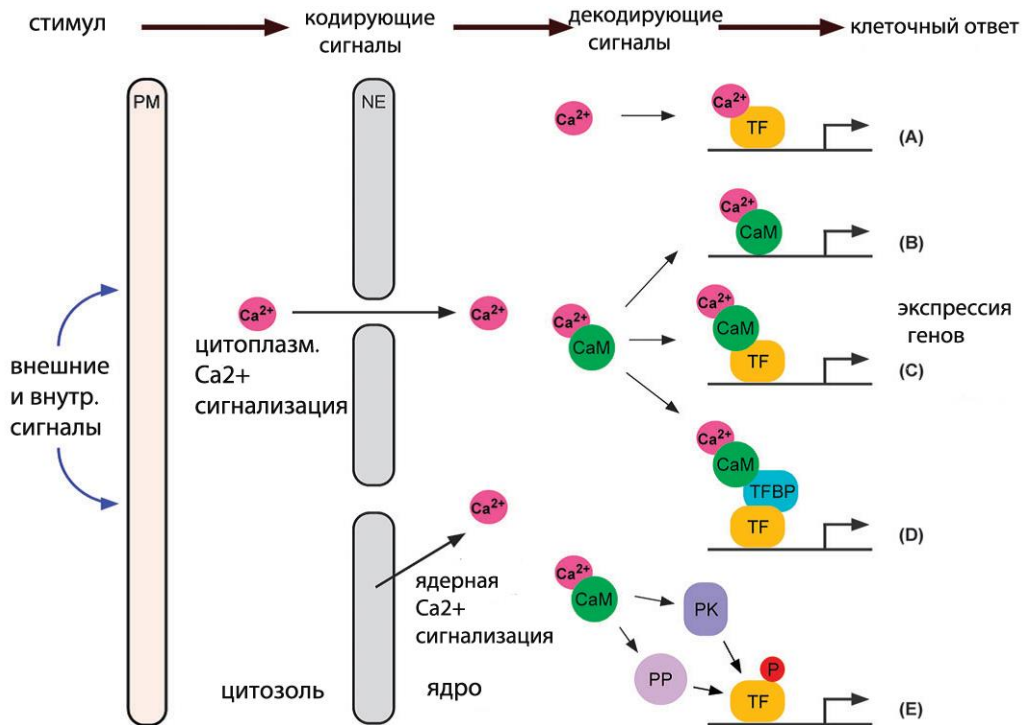


Рис 11. Механизмы регуляции транскрипции посредством  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулинов у растений. (A) кальций связывается непосредственно с фактором транскрипции (TF) и регулирует его работу. (B) Связанный с кальцием кальмодулин функционирует как фактор транскрипции. (C) чаще всего  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM комплекс связывается с фактором транскрипции и модулирует его функцию. (D)  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM комплекс косвенно регулирует транскрипцию, участвуя в многокомпонентных транскрипционных механизмах, которые содержат CaM/ $\text{Ca}^{2+}$  комплекс, фактор транскрипции и фактор-транскрипции-связывающий белок (TFBP). Последний выполняет функцию связующего звена между  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM комплексом и фактором транскрипции. (E)  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM регулирует экспрессию за счет модуляции фосфорилирования факторов транскрипции. Осуществляется CaM-связывающей протеинкиназой и CaM-связывающей протеинфосфатазой.

Предполагается что изменение уровня цитозольного кальция в ответ на раздражители может оказывать влияние на ядерную кальциевую сигнализацию путем простой диффузии  $\text{Ca}^{2+}$  ионов через ядерный поровый комплекс. Однако недавние исследования свидетельствуют о том, что ядра растительных клеток обладают собственным механизмом  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации. Ядра демонстрируют явное независимое изменение уровня кальция по сравнению с цитозолем в ответ на облучение синим светом, осмотические, механические, тепловые раздражители (Baum *et al.*, 1999).

В целом же, уровень кальция в ядрах в среднем составляет 3-10 мМ, как показано для *Galleria mellonella* (Lepidoptera) (Przelecka, Pogorelov, 1988). Регуляция транскрипционного процесса с участием  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулинов (CaM) осуществляется разными путями.

Таким образом, именно контроль экспрессии генов в сложных экологических условиях имеет решающее значение для запуска клеткой ответных мер для поддержания нормального функционирования.

#### 1.2.4 Структура и функциональная роль кальмодулина

Известно, что  $\text{Ca}^{2+}$  регулирует два семейства протеинкиназ, т.е.  $\text{Ca}^{2+}$ /фосфолипидзависимые протеинкиназы (Nishizuka, 1992) и  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-зависимые протеинкиназы (CCaMK) (Braun, Schulman, 1995, Sugita *et al.*, 1994, Nairn, Picciotto, 1994). В клетках животных различные ферменты этих семейств были очищены, а также определены их свойства (Hanks *et al.*, 1988.). В растениях выявлено третье, биохимически отличное семейство протеинкиназ -  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые протеинкиназы (Stone, Walker, 1995). Эти киназы не требуют липидов или CaM для их активации. Они представляют собой одиночные полипептиды, содержащие консервативные каталитические домены для фосфорилирования серина/треонина, соединительных доменов, которые участвуют в аутоингибировании и регулирующих доменах (рис. 12). Нормативный домен этих

киназ подобен CaM и содержит четыре EF-руки для связывания Ca<sup>2+</sup> (Harper *et al.*, 2004).

Существование этого семейства киназ было зарегистрировано у многих растений, и показано, что они участвуют в различных нормативных процессах (Botella *et al.*, 1996).



Рис. 12. Схема взаимного расположения структурных и функциональных элементов Ca<sup>2+</sup>-зависимой протеинкиназы (CDPK) и Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимой протеинкиназы (CCaMK) (Harper *et al.*, 2004).

Показано, что Ca<sup>2+</sup>/липид-зависимые киназы играют существенную роль в регуляции роста растений (Karibe *et al.*, 1995), и их присутствие было показано на многих растениях (Verhey *et al.*, 1993). Известно, что CCaMK-зависимые киназы участвуют в ответах на различные внеклеточные сигналы процессов в системах животных (Colbran *et al.*, 1989). Открытие CaM в растениях, его сходства с животными CaM (Jena *et al.*, 1989), его многофункциональности (Braam, 1992) и важности в передаче сигналов Ca<sup>2+</sup> положило начало попыткам идентифицировать CCaMK в растениях.

CaM и кальцинейрин B-подобные протеины (CBL) представляют собой небольшие белки, которые содержат несколько связывающих Ca<sup>2+</sup> доменов, но не имеют других эффекторных доменов, таких как киназный домен в CDPK. Для передачи сигнала Ca<sup>2+</sup> CaMs и CBL взаимодействуют с белками-мишенями и регулируют их активность. Целевые белки CaM были идентифицированы у высших растений и включают протеинкиназы, метаболические ферменты, связанные с цитоскелетом белки и другие (Snedden *et al.*, 1996). Семейство SNF1-подобных протеинкиназ было идентифицировано как мишень для CBL-белков (Shi

*et al.*, 1999). Целевые белки  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров затем регулируют активности, которые составляют клеточные реакции, инициируемые внешним сигналом. Поэтому датчики  $\text{Ca}^{2+}$  являются частью комплексной сигнальной сети взаимосвязанных путей. Будет интересно определить, как эта сеть установлена и как она функционирует для связывания дискретных сигналов с конкретными ответами. В этом обзоре мы фокусируемся на двух семействах небольших  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров (CaM и CBL) и их целях, чтобы исследовать, как конкретные сигналы могут передаваться посредством комбинированного действия этих белков.

Кальмодулины и кальмодулин-подобные белки соединяются с белками-мишенями, включая ионные каналы, факторы транскрипции и протеинкиназы. Эффективность связывания с определенным белком-мишенью зависит от свойств самого кальмодулина. Например, эксперименты на табаке показали, что каждая из трех изоформ кальмодулина и кальмодулин-зависимой НАД-киназы имеет свою константу диссоциации. Причем уровень гомологии между аминокислотными последовательностями был довольно высок (Ranty *et al.*, 2006). Этот факт указывает на то, что различные типы кальмодулинов принимают участие в регуляции разнообразных процессов в клетке. Соответственно, реакции организма на различные абиотические и биотические стрессы, такие как засуха, засоление, наличие тяжелых металлов, холод и атаки чужеродных агентов также будут отличаться (Virdi *et al.*, 2015).

Кроме регуляции стрессовых ответов эти белки играют важную роль в развитии растений и определяют их рост. Например, у мутанта по гену кальмодулина-7 (CaM 7) рода *Arabidopsis* выявлено снижение экспрессии светоиндуцируемых генов, которые необходимы для фотоморфогенеза, так как фактор транскрипции этих генов регулируется самим (CaM 7) (Kushwaha *et al.*, 2008).

Кальмодулины могут связываться с различными ферментами, каналами и транспортёрами, и ферментами, регулируя их активность. Также эти белки могут участвовать в реакциях на биотические и абиотические стрессы посредством

взаимодействия с факторами транскрипции. Кальмодулин-связывающий участок обнаружен на С-конце глутаматдекарбоксилазы в клетках растений и дрожжей. Глутаматдекарбоксилаза – фермент цикла Кребса, синтезирующий  $\gamma$ -аминомасляную кислоту из глутамата. У риса обнаружены изоформы данного фермента, в которых кальмодулин-связывающий участок отсутствует (Viridi *et al.*, 2015). Кальций-зависимый механизм передачи сигнала способствует накоплению ГАМК в клетках растений, что является ответной реакцией на стрессовое воздействие. Тяжёлые металлы в небольших концентрациях необходимы растениям, так как входят в состав некоторых ферментов. При этом высокая концентрация таких опасных химических элементов оказывает токсическое действие на растительный организм, ингибируя дыхание и фотосинтез. В связи с этим растительные клетки оснащены специальными ионными каналами, отвечающими за поглощение этих токсичных, но нужных веществ. Такие каналы активируются цНМФ и являются лиганд-зависимыми (Viridi *et al.*, 2015).

Негативный эффект снимается удалением кальмодулин-связывающего участка, что указывает на связь кальмодулинов с перераспределением ионов различных металлов в растении.

В приведённой ниже таблице представлены результаты различных работ, связанных с кальмодулин-связывающими белками и их ролью в ответах на воздействие различных стрессоров (табл. 2). СаМ-белки обладают не только каталитической активностью, но принимают участие в реализации различных сигналов, обеспечивая фосфорилирование соответствующих элементов.

Приведём несколько примеров связи кальмодулинов с внутриклеточными ферментами. Так, у растений конститутивная экспрессия апиразы, гидролизующей нуклеозид ди- и трифосфаты (ген из гороха экспрессированный в арабидопсисе) ускоряет рост растения, повышает интенсивность транспорта фосфатов и устойчивость к гербицидам и циклогексанам. *Arabidopsis* имеет также собственные апиразы в двух разных изоформах, причем сами изоформы отличаются сродством к

кальмодулину. На данный момент точно не известно, как формируется ответ на гербициды через кальциевый путь передачи сигнала.

Ещё один белок, который активируется кальмодулином - каталаза, разлагающая  $H_2O_2$  на воду и кислород. Присоединение кальмодулина снимает автоингибирование на С-конце каталазы, так как там находится автоингибиторный кальмодулин-связывающий домен (Yang, Poovaiah, 2002). Следовательно, кальмодулин выступает связующим звеном в формировании ответа на АФК, так как каталаза необходима для снижения концентрации этих опасных для организма соединений.

Таблица 2.

Кальмодулины и кальмодулиноподобные белки растений  
и вызываемые ими эффекты

№	Кальмодулин-связывающий белок	Источник гена	Трансгенное растение, содержащее ген	Метод	Эффект, связанный с ответом на стресс
1	Ca <sup>2+</sup> -зависимая CaM-рецептор-подобная киназа (GsCBRLK)	<i>G. max</i>	<i>A. thaliana</i>	Конститутивная экспрессия	Повышенная устойчивость при холодовом, солевом и осмотическом стрессах
2	Ca <sup>2+</sup> /CaM-регулируемая рецептор-подобная киназа (AtCRLK1)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Т-ДНК-инактивация гена	Повышенная устойчивость при холодовом стрессе
3	CaM-связывающая протеинкиназа 3 (AtCBK3)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Конститутивная экспрессия	Повышенная устойчивость при тепловом стрессе

4	CaM-связывающая серин/треониновая фосфатаза (AtPP7)	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	Конститутивная экспрессия	Повышенная устойчивость при тепловом стрессе
5	CaM-связывающая МАРК фосфатаза (NtМКР1)	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	Конститутивная экспрессия	Снижение индукции генов ответа на механические повреждения
6	CaM-связывающая МАРК фосфатаза (OsМКР1)	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>	Потеря функции с помощью ретротранспозона <i>Tos17</i>	Постоянная индукция генов ответа на механические повреждения
7	Полноразмерный CaM-связывающий цНМФ-активируемый канал (NtСВР4)	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	Конститутивная экспрессия	Повышенная устойчивость к Ni <sup>2+</sup> , при это повышенная чувствительность к Pb <sup>2+</sup>
8	NtСВР4 с удалённый CaM-связывающими домен	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	Конститутивная экспрессия	Повышенная устойчивость к Ni <sup>2+</sup> без повышенной чувствительности к Pb <sup>2+</sup>

В числе кальмодулин-связывающих белков обнаруживаются киназы и фосфатазы. Это позволяет предположить, что CaM обеспечивают взаимосвязь фосфатного и кальциевого путей передачи сигнала. Кальмодулин-связывающий домен чаще всего находится на N- или C-конце у многих стресс-регулируемых киназ. Экспрессию этих киназ регулируют разнообразные фитогормоны и стрессоры, роль которых как раз может быть связана с реакциями организма на абиотические стрессы. Кальмодулины способны активировать или ингибировать данные киназы в зависимости от их типа. С помощью биоинформатических методов у *Arabidopsis* обнаружено около 600 гомологов, кальмодулин-

связывающих киназ, относящихся к серин/треониновому типу. Большая часть этих белков предположительно локализована в плазмалемме, и только около 25% – в цитоплазме. Кальмодулин-связывающие белки встречаются как среди цитоплазматических киназ, так и среди цитозольных.

Уровень экспрессии ряда киназ у *Arabidopsis* и *Glycine* увеличивается при холодовом и солевом стрессах. Синтез белка является более медленным ответом, что позволяет предположить связь данных киназ не только с кратковременным ответом, но и с акклиматизацией растения (Viridi *et al.*, 2015).

С кальмодулинами также связан и сигнальный каскад серин-треонин протеинкиназ (МАРК). В нём происходит последовательное фосфорилирование, которое впоследствии приводит к изменению экспрессии генов. Функционирование данного каскада регулируется путём фосфорилирования МАРК фосфатазами и дефосфорилирования МАРК киназами. В свою очередь, МАРК фосфатазы и киназы находятся под контролем кальмодулина, что является характерной чертой растительных организмов. Гены МАРК фосфатаз, регулируемые кальмодулином в присутствии кальция были получены из растений риса, пшеницы, резуховидки, и табака. Так, в белках *Arabidopsis* и *Triticum* обнаружено по два таких кальмодулин-связывающих домена, а у *Oriza* и *Nicotiana* только один. Вероятно, кальмодулин обеспечивает активацию МАРК-каскада (Новикова *и др.*, 2007). SOS3 является кальмодулин-подобным пептидом, который представляет собой  $Ca^{2+}$ -зависимый протеинкиназу. Данный пептид принимает участие в обеспечении ответной реакции на засоление, что проявляется в активации протеинкиназы SOS2, внутримембранных ионных переносчиков. Стандартное состояние данного белка является неактивным за счет автоингибирования. При развитии солевого стресса наблюдается увеличение содержания внутриклеточного кальция, что вызывает активацию SOS3. При этом, активная форма SOS3 присоединяет фосфатную группу к SOS2 и происходит ее деблокирование. Фосфорилированная форма SOS2 активирует ионные каналы,



что способствует нормализации ионного статуса клетки и восстановлению гомеостаза (Новикова и др., 2007).

Развитие растительного организма, а также воздействие на него стрессовых факторов, часто связано с изменением работы генетического аппарата. В данном случае важное значение играют факторы транскрипции белковой природы, расположенные в ядре. Ряд данных элементов контролируются кальмодулинами, при этом для разных факторов имеется свой набор кальмодулинов. Взаимодействие ТФ и кальмодулина может быть обеспечено путем белок-белкового взаимодействия, но также возможен вариант с присоединением фосфатной группы, т.е. фосфорилирования (рис. 13).

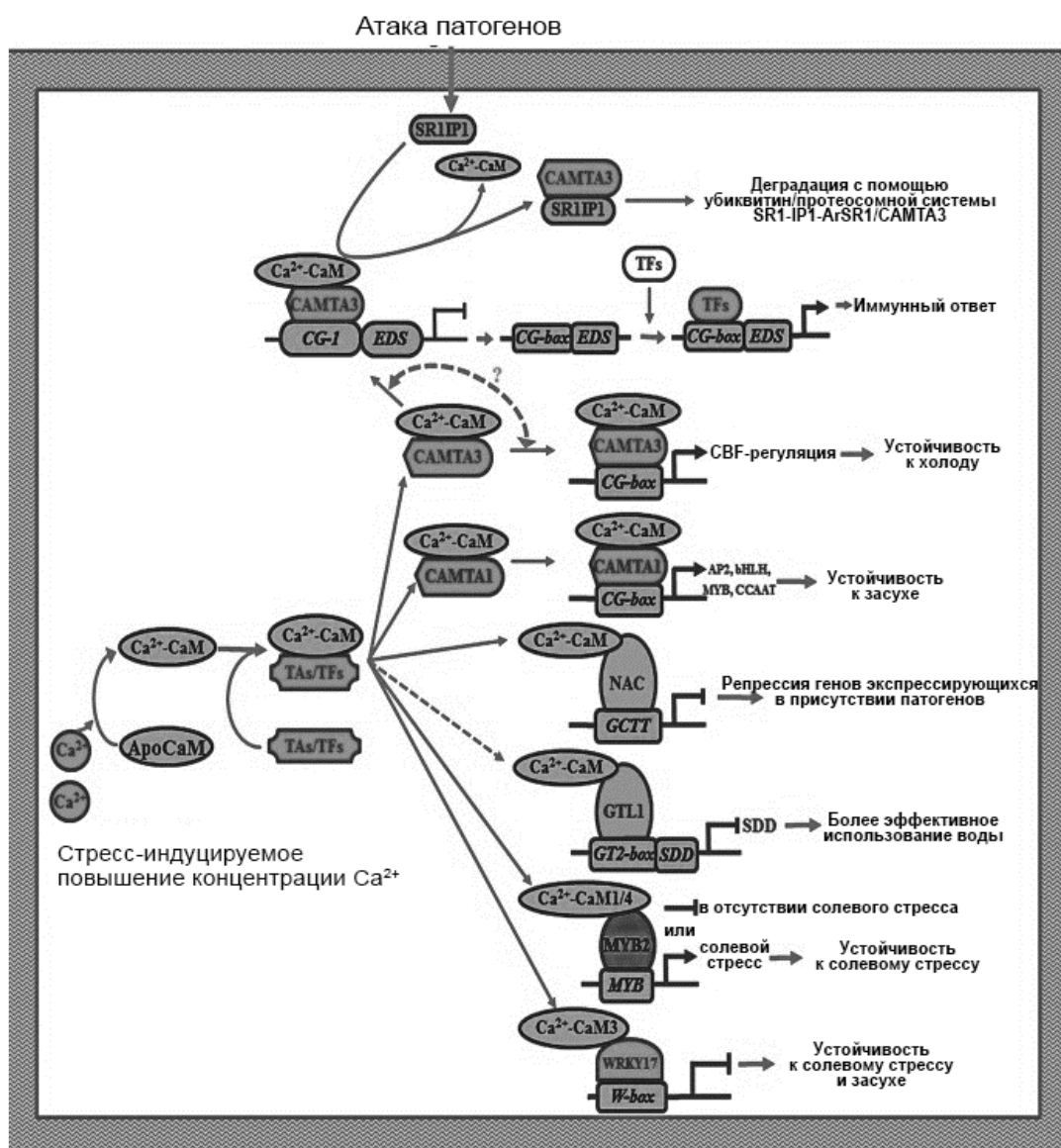


Рис. 13. Регуляция экспрессии транскрипционного фактора CAMTA3.

САМТА3 (кальмодулин-связывающий активатор транскрипции) представляет собой специфический транскрипционный фактор, который также называется СВФ (фактор связывания С-повторов (ССААТ)) (рис. 13). Он принимает участие в обеспечении адаптивной реакции клетки растений в холодовом стрессе. Так же данный фактор является фактором общего стрессового ответа, обеспечивающего взаимодействие с цис-элементами стрессовых генов-мишеней. Те САМТА, которые экспрессируются в клетке постоянно, могут непосредственно взаимодействовать с ДНК и при отсутствии специфических кальмодулинов. Однако, для элемента быстрого реагирования на стресс (RSRE) характерно взаимодействие с ДНК только в присутствии кальмодулина (Viridi *et al.*, 2015).

Кроме холодной адаптации САМТА3 принимает участие в контроле иммунитета, что было выявлено на основе анализа устойчивости к бактериям *Pseudomonas syringae*. Данный ответ обусловлен активацией генов стресс-ответа на развитие патогенов и отсутствием специфических рецепторов. Меньшее время ответной реакции на стресс связано с тем, что САМТА3 ингибирует белок повышенной восприимчивости к болезням 1 (EDS1), являющийся регулятор синтеза салициловой кислоты (Du *et al.*, 2009).

Транскрипционный фактор САМТА1 ответственен за взаимодействие кальциевого и ауксинового путей сигнализации. Ауксин вызывает увеличение содержания кальция в цитоплазме и запускает процесс синтеза фактора MYB77 (Galon *et al.*, 2010, Pandey *et al.*, 2013).

Различные факторы транскрипции, обеспечивающие формирование ответной реакции клетки на стресс, направлены на поддержание не только осмоса, но и фотосинтеза, с ответами на засуху, солевой стресс и репрессию патогенов (Pandey *et al.*, 2013) (рис. 13). Для данных транскрипционных факторов характерно наличие NAC-домена, который был обнаружен в ряде растений, включая *Arabidopsis* и рис (Nuruzzaman *et al.*, 2010).

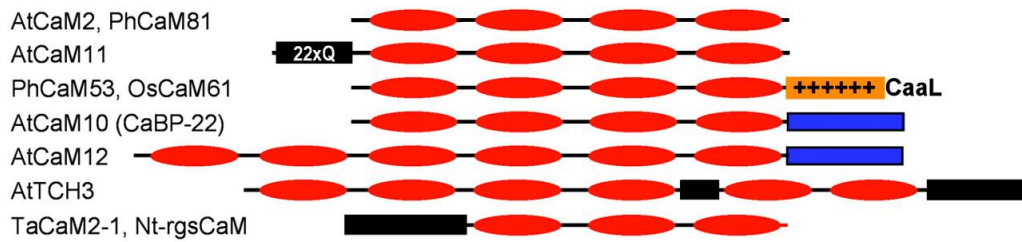


Рис. 14. Схема CaMs и CaM-связанных белков в растениях.

Транскрипционные факторы WRKY и GTL связаны с кальций-зависимым механизмом регуляции генов, проявляющимся при воздействии на растения стрессовых факторов различной природы (Park *et al.*, 2005, Viridi *et al.*, 2015).

Следовательно, показано, что у растений большинство кальмодулин-связывающих факторов транскрипции обеспечивают ответную реакцию организма на стрессовое воздействие.

Типичные CaMs (такие как *Arabidopsis* (At) CaM2 и петунья (Ph) CaM81) содержат четыре руки EF (красные овалы). CaM-связанные белки показывают дополнительные домены (обозначенные коробочками) и/или удаление или добавление рук EF. Например, *Arabidopsis* CaM11 содержит вставку из 22 Gln-остатков (22xQ), которые следуют за первыми четырьмя аминокислотами белка *Petunia* CaM53 и риса (Os) CaM61, содержат С-концевое удлинение, которое включает полибазический домен (+) и блок CaaL, который определяет пренилирование GGTase-I (Dong *et al.*, 2002) (рис. 14). Сохраненное С-концевое расширение неизвестной функции присутствует как в *Arabidopsis* CaM10, так и в CaM12, но последнее содержит две дополнительные руки EF. Дополнительные руки EF и несвязанные последовательности также встречаются в белке, кодируемом *Arabidopsis* TCH3, индуцированным касанием геном (Sistrunk *et al.*, 1994). Замена руки EF для несобственной последовательности наблюдается у пшеницы (Ta) CaM2-1 (Enslin *et al.*, 1994) и табака (Nt) rgsCaM, которая была обнаружена как супрессор после затенения транскрипционных генов (Anandalakshmi *et al.*, 2000).

У *Arabidopsis* обнаружено семь генов кальмодулинов, кодирующих четыре различные изоформы. Отличия их состоят в структуре аминокислот на обоих концах белка. Кроме этого имеется ещё 50 генов, которые кодируют кальмодулин-подобные белки, которые гомологичны с истинными кальмодулинами всего на 16-50%, но также являются  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками. Исследование структуры этих белков (наличие EF-рук) осуществлялось на основе биоинформатических методов (Ranty *et al.*, 2006).

кДНК с последовательностями, аналогичными последовательностям животных ССаМК были выявлены у некоторых растений, например, яблони (Watillon *et al.*, 1995), лилии (Takezawa *et al.*, 1996) и кукурузы (Lu *et al.*, 1996). Все эти гомологи показывают значительную сходство с их аналогами у животных на уровне кДНК. Гомолог киназы из яблока (*Malus domestica* L. Borkh) представляет собой единственный полипептид (46,5 кДа) с серин/треонин-киназой каталитического домена и смежного регулятора -  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -связывающего домена. Он показывает значительное сходство с соответствующими областями гена ССаМК II у млекопитающих (Watillon *et al.*, 1995). Ген ССаМК из пыльников лилии представляет собой химерный ген, в котором нейрон-визинин-подобный  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий домен слит с CaM-связывающим доменом. N-терминальная область кодированного белка содержит все одиннадцать консервированные субдомены, характерные для серин/треониновых протеинкиназ, и область связывания CaM имеет высокое сходство (79%) с субъединицами ССаМК млекопитающих (Patil *et al.*, 1995). Клон кДНК из лилиевых пыльников были найдены у *Escherichia coli*, а его биохимические свойства указывают на то, что он является ССаМК, регулируемым  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Takezawa *et al.*, 1996). ССаМК из корней кукурузы (Lu *et al.*, 1996) содержит все одиннадцать поддоменов, характерных для протеинкиназ-каталитических доменов со всеми консервативными аминокислотными остатками, причем последовательности в этой области идентичны таковым у дрожжей СМК 1 (42%), субъединице CaMK II крысы (37%) и яблони СВ 1 (34%). Однако, биохимические свойства кодированных

белков не были изучены. Тем не менее, на основании полученных результатов можно говорить о присутствии ССаМК в растениях.

Установлено снижение уровня экспрессии ССаМК в *Zea mays* при помощи красного света. Свет является одним из основных экологических сигналов, которые влияют на рост и развитие растений на каждом этапе, в основном за счет фосфорилирования/дефосфорилирования. Было установлено, что уровень экспрессии киназы варьирует при обработке светом различных длин волн. Обработка красным светом в течение 5 мин уменьшала уровень киназы по сравнению с колеоптилями, выдержанными в темноте (контрольными). Обработка красным светом, сопровождаемая последующим действием дальним красным светом, не восстанавливала уровень киназы. Только красный свет не влиял на уровень киназы. Инкубация колеоптилей, обработанных 5-кратным красным светом в темноте в течение 2 ч, еще больше уменьшала уровень киназы. Обработка белым светом в течение 5 мин также слегка уменьшала уровень ZmССаМК (Virdi *et al.*, 2015).

Автофосфорилирование является важным свойством киназ, проявляющееся как у растительных, так и у животных систем.  $\text{Ca}^{2+}$  и СаМ влияют на автофосфорилирование киназ по-разному. В животных системах СаМ-киназы, как  $\text{Ca}^{2+}$ , так и СаМ необходимы для автофосфорилирования, и эта активность ингибируется ЭГТА, а также различными ингибиторами СаМ. В растениях кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK) подвергаются аутофосфорилированию полностью зависимым кальцием образом. Хотя активность автофосфорилирования CDPK не зависит от добавления экзогенного СаМ, он может ингибироваться ЭГТА, а также различными ингибиторами СаМ, возможно, из-за присутствия СаMLD в этих киназах. Известные киназы СаМ из растений имеют некоторые уникальные характеристики. В ССаМК из литых пыльников аутофосфорилирование является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым/стимулированным, но, интересно, СаМ ингибирует эту активность зависимым от концентрации образом (Takezawa *et al.*, 1996).

Подобно киназам CaM животной системы, активность фосфорилирования субстрата ZmССаМК регулируется собственным фосфорилированием. Как видно из кинетики времени обеих реакций, автофосфорилированию предшествует активность фосфорилирования субстрата. Автофосфорилированный ZmССаМК мог также фосфорилировать субстрат в присутствии ЭГТА, не проявляя необходимость в кальции и указывая на возможный механизм регуляции активности киназы. ZmССаМК активен в своей аутофосфорилированной форме, для которой единственным требованием является кальций. После его активации кальцием он может фосфорилировать различные субстраты без потребности в кальции. CaM, вероятно, связывается с аутофосфорилированной формой ZmССаМК и либо стабилизирует его, либо как-то повышает доступность субстрата.

Помимо демонстрации интересной двойной регуляции активности кальцием и CaM, ZmССаМК также показал очень специфическое регулирование светом. Обработка красным светом в течение 5 мин уменьшала уровень протеина киназы, который не мог быть отменен дальним красным светом. Эта потеря реверсивности красного света может быть связана с очень быстрым характером реакции, которая каким-то образом не вызывает обратимость при красном свете или может быть феноменом, опосредованным ФитВ. Облучение красным светом в разные периоды времени, уменьшала уровень киназы зависящим от времени. Исключена возможность того, что длительный период облучения красным светом имел пагубный эффект. Воздействие 5 мин красного света, после чего 2 ч темновая инкубация показала тот же уровень ZmССаМК, что и 30-минутная непрерывное облучение красным светом.

В системах *in vivo* в ответ на любой сигнал, такой как свет, киназы и фосфатазы реагируют совместно друг с другом, поскольку воздействие на любого из них, может вызвать такой же ответ. Фитохром (форма Фк) после поглощения красного света преобразуется в форму Фдк, и недавно было показано, что сам фитохром присутствует в фосфорилированной форме. Фитохром после поглощения

света может либо воздействовать на киназы, либо на фосфатазы, чтобы вызвать тот же ответ, то есть регулирование фосфорилирования может быть связано с увеличением активности/уровня киназ или из-за снижения активности/уровня фосфатаз и наоборот (Sopory, Munshi, 1998). Сообщается о многих путях, которые показывают увеличение фосфорилирования, но наличие киназы, которая регулируется красным светом, указывает на возможность существования других сложных регуляторных путей.

Хотя уровень ZmССаМК уменьшается при красном свете, синий свет не влиял на его уровень во все моменты времени и интенсивности. Низкие уровни ZmССаМК в ответ на облучение красным светом могут быть объяснены следующими способами. Показано, что свет влияет на экспрессию ряда генов, как в положительном, так и в отрицательном направлении (Neuhaus *et al.*, 1997). Такие ответы, как правило, очень быстрые, и изменение уровня транскрипта может быть обнаружено в течение 1-5 мин. Таким образом, эта киназа может быть одним из таких примеров, показывающих понижающую регуляцию светом и, таким образом, может быть задействована в светосигнальном пути. Другими возможностями могут быть очень быстрый оборот белка или какая-то релокализация в ответ на красный свет. Недавно было показано, что регуляторный фактор фосфо-белка мигрирует в ядро после облучения светом (Wellmer *et al.*, 1999). В настоящее время нет доказательств в поддержку какой-либо из версий, и необходимы дальнейшие исследования для окончательного подтверждения механизма контроля.

### 1.3 Эпигенетические механизмы регуляции функционирования ферментов

#### 1.3.1 Роль метилирования в организации генома

Метилирование ДНК представляет собой модификацию не затрагивающую нуклеотидную последовательность и является одним из механизмов эпигенетического контроля генома клетки (Bethany, Defossez, 2013). Механизм метилирования ДНК заключается в химическом присоединении метильной группы к цитозину в 5 положении, как правило, входящих в состав CG-динуклеотида.

Данный процесс обратим и цитозин может обратно деметилироваться при помощи специальных ферментных систем (Kohli, Zhang, 2013).

Изменение метильного статуса ДНК характерно для эукариотических организмов, и наблюдается обычно в CpG-динуклеотидах. Для соматических клеток характерно метилирование CpG-динуклеотидах, в то время как для эмбриональных клеток метилирование встречается в других сайтах (Dodge *et al.*, 2002).

Особенностью растений является метилирование как по симметричному типу (на CpG или CpNpG), так и по асимметричному, когда метилируется в соответствующем сайте только одна цепь ДНК (на CpNpNp, где N обозначает любой нуклеотид, кроме цитозина).

Риггс, Холлидей и Пью предположили, что метилирование цитозина влияет на экспрессию генов. Данная гипотеза, была основана на частоте встречаемости метилцитозина при повторном метилировании при репликации ДНК (Pugh, 1975). Позже было показано, что модели метилирования клонально унаследованы (Wigler *et al.*, 1981), и метилирование ДНК подавляет транскрипцию генов и изменения в метилировании ДНК можно соотнести с изменениями в экспрессии генов тканеспецифичным способом. Эти данные корреляционны, и до сих пор не ясно, играет ли метилирование ДНК главную роль в регуляции экспрессии генов.

Если метилирование ДНК является важным для тканеспецифических или регулируемых генов, то должен быть механизм, позволяющий передать модель метилирования между поколениями. У млекопитающих, глобальное деметилирование на ранней стадии эмбриогенеза следует за реметилированием при имплантации. Половые клетки закладываются на ранней стадии развития и поэтому не влияют на изменения метилирования в конкретных органах.

Растения, вероятно, не подвергаются глобальному деметилированию с последующим реметилированием во время развития эмбриона, потому что растения арабидопсиса с *ddm1* мутантными или антисмысловыми метилтрансферазами имеют существенное снижение метилирования ДНК, в



отличии от тех, что потеряли данную мутацию или получены путем антисмыслового трансгенного скрещивания (Finnegan *et al.*, 1996, Kakutani *et al.*, 1995).

Каким образом картины метилирования изменяются в растениях? Активность транспозонных элементов кукурузы, Ac и Spm, отличалась, при наследственной передаче гамет от мужских или женских, что, вероятно связано с изменением метилирования в ходе гаметогенеза (Fedoroff, Banks, 1988, Schwartz, 1988). Spm и Mu элементы сильнее метилированы в листьях в верхней части растения, чем в первых развивающихся листьях, это указывает, что метилирование транспозонов ДНК увеличивается во время развития (Martienssen, Baron, 1994).

Показано, что уровни метилирования ДНК в молодых проростках были примерно на 20% ниже, чем в зрелых листьях, как у томатов, так и у арабидопсиса (Messeguer *et al.*, 1991). Деметилирование этих повторяющихся последовательностей, вероятно, произошло во время гаметогенеза или в начале развития семян, так как центромерная повторность также менее метилирована в ДНК семян *Arabidopsis*. Гиперметилирование одной копии ДНК во время эмбриогенеза, с последующим деметилированием специфических последовательностей во время прорастания, обеспечивает механизм для перераспределения уровня метилирования в растениях. Данные для арабидопсиса и кукурузы показывают, что метилирование транспонируемых элементов и других повторяющихся последовательностей увеличивается во время развития, возможно, для того, чтобы эти последовательности упаковывались в гетерохроматин до формирования гамет.

По мере развития молекулярной биологии стало известно, что наряду с четырьмя классическими основаниями (аденин, гуанин, цитозин и тимин) могут существовать некоторые метилированные основания. 5-метилцитозин (<sup>m5</sup>C) был обнаружен первоначально в качестве второстепенного основания в различных ДНК и <sup>m6</sup>-метиладенин (<sup>m6</sup>A) был обнаружен затем в бактериальной ДНК (Dunn, Smith, 1958). Происхождение этих оснований в ДНК было неизвестно в течение

длительного времени. Только в 1963 году были обнаружены специфические ферменты, ДНК-метилтрансферазы в бактериях, а затем и у эукариот. Эти ферменты переносят метильные группы из S-аденозил-L-метионина селективно на определенные цитозин или аденин в цепи ДНК (Gold, Hurwitz, 1964). Стало ясно, что незначительная часть оснований ( $m^5C$  и  $m^6A$ ) не включаются в ДНК в готовом виде, а их модификация происходит в результате ферментативного метилирования обычных оснований (С, или, соответственно, А) в цепочках ДНК, которые, образуются или уже сформированы. Более того, широко распространено понятие, что эти модифицированные основания не имеют никакого существенного значения как в структуре самой ДНК, как и в ее функционировании.

Классический объект традиционной генетики, дрозофила, служил по ошибке очень часто в качестве «непреодолимого» доказательства этого постулата. В самом деле,  $m^5C$  в геноме этого насекомого не обнаруживали в течение очень долгого времени. Кроме того, геном дрозофила имеет дефицит последовательностей CpG, которые обычно служат основными субстратами в естественных условиях для метилирования ДНК у эукариот. Согласно мнению Ванюшина, сильное уменьшение CpG в геноме *Drosophila* может быть связано только с метилированием остатков цитозина (Mazin, Vanyushin, 1988). Поскольку не были обнаружены надлежащие ДНК-метилтрансферазы у дрозофила, ряд ученых объяснили данный эффект модификацией ДНК. Недавние исследования показали, что ДНК у дрозофила метилирована и эта модификация ДНК имеет важное значение для нормального развития насекомых, а также были обнаружены специфические цитозин-ДНК-метилтрансферазы (Lyko *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Метилирование остатков аденина в ДНК растений

Минорное основание N<sup>6</sup>-метиладенин был обнаружен в составе ДНК эукариот недавно и только для ряда организмов, таких как водоросли и их вирусов, грибы, простейшие и растения (Nelson *et al.*, 1998).

Это может означать, что у эукариот в геноме может метилироваться как цитозин так и аденин. Кроме того, для растений обнаружен N<sup>6</sup>-метиладенин в как в геномной, так и в митохондриальной ДНК. Показано, что у пшеницы имеются специализированные ферментные системы - аденин-ДНК-метилтрансферазы, а не цитозин-ДНК-метилтрансферазы (Кирнос и др., 1980, Vanyushin, 2005).

На основе компьютерного анализа и имеющихся нуклеотидных баз данных установлено наличие белков, гомологичных прокариотическим ДНК-(амино)метилтрансферазами в геномах таких организмов, как *Leishmania*, *Cerevisiae* и *Homo sapiens* (Shorning, Vanyushin, 2001). Консервативные мотивы, характерные для бактериальной ДНК-(амино)-метилтрансферазы были обнаружены в аминокислотных последовательностях этих предполагаемых белков. В митохондриальных ДНК животных и растений нуклеотидные последовательности значительно гомологичны генам прокариотических ДНК-(амино)-метилтрансфераз. Таким образом, открытые рамки считывания гомологичны бактериальным аденин-ДНК-метилтрансферазам присутствующим в ядрах простейших, дрожжей, насекомых, нематод, высших растений, позвоночных и других эукариот (Shorning, Vanyushin, 2001).

Фермент (wadtase) метилирует внутренний остаток аденина в последовательности TGATCA преимущественно в одноцепочечной ДНК и, вероятно, участвуют в регуляции митохондриальной репликации ДНК (Fedoreyeva, Vanyushin, 2002). К сожалению, до сих пор не известно, изменяет ли этот фермент остаток аденина в ядерной ДНК, или ядерная ДНК метилируется другой аденин-ДНК-метилтрансферазой.

Анализ полученных данных указывает, что метилирование ДНК у растений разнообразнее и сложнее, чем у животных. Для растений характерно наличие большого количества характерных только им ДНК-метилтрансфераз обладающих в своем составе убиквитин-связывающим доменом (Finnegan *et. al.*, 1996). При этом, нокаут по DMT1 не является летальным для растений и это, вероятно, может быть компенсировано другими ДНК-метилтрансферазами в клетках растений. Один и

тот же ген может быть в растении метилированный как по аденину, так и цитозину (Ashapkin *et. al.*, 2002). Следовательно, в растениях должна существовать система взаимного контроля для обоих этих модификаций генома. Метилирование аденина в ДНК может влиять на метилирование цитозина и наоборот. Например, в *Arabidopsis* метилирование остатков аденина в GATC сайте генов ДНК-метилтрансферазы DRM2 хорошо экспрессируются в растениях дикого типа, но был сильно ингибирован в трансгенных растениях с выраженной антисмысловой конструкцией ДНК-метилтрансферазы гена MET1 (Ashapkin *et. al.*, 2002).

К сожалению, функциональная роль метилирования аденина ДНК у высших эукариот по-прежнему практически неизвестна. Предполагается, что, как и метилирование цитозина, он может контролировать репликацию ДНК и экспрессию генов у эукариот. Кроме того, контроль за метилированием аденин в ДНК (N<sup>6</sup>-производные аденина) в результате их включения в ДНК может быть одним из механизмов регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки в растениях (Vanyushin, 1984). На самом деле, было недавно установлено, что цитокинин-6-бензиламинопурин ингибирует метилирование ДНК в культуре пластид платана и индуцирует там экспрессию ферментов, обеспечивающих фотосинтез (Ngerprasirtsiri *et. al.*, 1988). Существуют доказательства непосредственного участия производных аденина (цитокенинов) в модификации ДНК растений и протистов путем изменения метильного статуса N<sup>6</sup>-метиладенин в ДНК. Подобные модификации ДНК растений вызывают значительные изменения в транскрипции генов и репликации ДНК (Kudryashova, Vanyushin, 1986).

Исследования модельного растительного объекта *Arabidopsis thaliana*, в частности механизмов функционирования его генома, способствовали улучшению понимания процесса метилирования ДНК у растений. Базовыми ферментами в данном процессе выступают метилтрансферазы Met1, Cmt3 и Dnm2. Данные фермента по аминокислотному составу имеют значительное сходство с метилтрансферазам ДНК млекопитающих. Фермент Dnm2 принимает участие в *de novo* метилировании ДНК, однако, имеется информация и об его участии в

поддержании метильного статуса ДНК на поздних стадиях развития организма. Ферменты Cmt3 и Met1 наоборот, выполняют задачу поддержания метильного статуса ДНК на протяжении жизненного цикла клетки. Помимо этих основных ферментов-метилтрансфераз в растениях обнаружены и другие метилтрансферазы, но их функция пока не выяснена. Предполагается, что основным модулятором работы ДНК метилтрансфераз выступает РНК, в частности, РНК-транскрипты, экспрессирующиеся с определенных участков ДНК-матрицы. Данные РНК-транскрипты представляют собой двухцепочные молекулы, которые могут взаимодействовать с малыми интерферирующими РНК (siRNA), либо с микроРНК (miRNA). Данный тип взаимодействия обеспечивает правильную локализацию метилтрансфераз на участках ДНК (Сао, Jacobsen, 2002).

### 1.3.3 Ферменты, осуществляющие метилирование ДНК

На сегодняшний момент выделяют несколько групп ДНК-метилтрансфераз (DNMT), энзимов, осуществляющих перенос метильной группы на азотистое основание нуклеотида:

- цитозин(С5)-ДНК-метилтрансферазы (КФ 2.1.1.37) – ферменты, ответственные за поддержание картины метилирования генома клетки;
- ферменты системы рестрикции-модификации, проявляющие (КФ 2.1.1.72) аденин(Н6)-ДНК-метилтрансферазную и (КФ 2.1.1.113) цитозин(Н4)-ДНК-метилтрансферазную активности, которые, в сущности, не являются основными для этих ферментов; примерами могут служить ферменты PvuII и TaqI.

Основным источником метильной группы для всех метилтрансфераз выступает S-аденозил-метионин (Bestor, 2000).

В растительном организме принято выделять три группы ДНК метилтрансфераз. ДНК-метилазы растений семейства Met1 идентичны по структуре и свойствам с ферментами семейства DNMT1 млекопитающих. У *Arabidopsis thaliana* обнаружены ферменты METI и METII, которые отличаются от такого фермента мыши строением N-концевого элемента (Buryanov, Shevchuk,

2005). Второе семейство ДНК-метилтрансфераз характерно для растений. Были обнаружены ферменты CMT3 *Arabidopsis thaliana* и Zmet2 кукурузы, относящиеся к данному типу метилтрансфераз, особенностью которых является поддержание метильного статуса ДНК по CpNpG элементы и асимметричным сайтам (Buryanov, Shevchuk, 2005). Третье семейство ДНК-метиляз – это ферменты, у которых имеют особенности строения, связанные с комбинацией функциональных доменов. Гены этих метилтрансфераз, были обнаружены у ряда растений, в частности у арабидопсиса, кукурузы, сои. Особенностью ферментов данного семейства является наличие N-концевого домена, содержащего убиквитинсвязывающий участок. В функциональном плане эти ДНК-метилтрансферазы сходны с семейством DNMT3 млекопитающих и также способны осуществлять *de novo* метилирование ДНК по асимметричным сайтам (Goll *et. al.*, 2006).

Существуют и другие ДНК-метилтрансферазы растений, такие как METIII *Arabidopsis thaliana*, лишённая N-концевого домена.

ДНК метилтрансферазы не являются критичными ферментами, в отличие от ферментов животных. Потеря их активности не приводит к смерти организма, но приводит к аномалиям развития (Buryanov, Shevchuk, 2005).

#### 1.3.4 Метилирование промоторов, как механизм регуляции экспрессии генов

Изменение статуса метилирования ДНК – один из взаимосвязанных эпигенетических механизмов (с гистоновыми модификациями и малыми интерферирующими РНК), контролирующими экспрессию генов (Salmon, Ainouche, 2010). Недавние геномные исследования *Arabidopsis thaliana* свидетельствует о наличии специфических участков в составе ДНК, подвергаемым метилированию. Как правило, метильный статус меняется в регуляторных областях генов (промоторах) или в транскрибируемых областях. При этом метильный статус отдельных нуклеотидов коррелирует с уровнем транскрипции соответствующих генов (Shawn *et. al.*, 2011).

Определенное местоположение отдельных CG-динуклеотидов в составе ДНК имеет важное значение для ее нормального функционирования. Гены, в составе которых обнаружены CpG-островки часто являются генами домашнего хозяйства и имеют более-менее постоянный уровень экспрессии в самых различных тканях. Однако имеются и исключения, ряд генов, обладающих тканеспецифичностью, также регулируются путем изменения метильного статуса CpG-островков в промоторе (Antequera, Bird, 1993). Отсутствие метилирования в промоторе гена не всегда указывает на его активную транскрипцию. Но принципиальное значение в активности гена играет состояние CpG-островка, отсутствие метилирования в котором необходимо для транскрипции. Изменение метильного статуса промотора генов, содержащих CpG-островки, играет роль регулятора его транскрипционной активности (Comb, Goodman, 1990).

Исследования в области биохимии и молекулярной биологии показали, что наряду с четырьмя классическими основаниями (аденин, гуанин, цитозин и тимин) могут существовать дополнительные метилированные основания. 5-метилцитозин (<sup>m5</sup>C) был обнаружен сначала в качестве второстепенного основания в различных ДНК (Hotchkiss, 1948, Wyatt, 1950), и <sup>m6</sup>- метиладенин (<sup>m6</sup>A) был обнаружен затем в бактериальной ДНК (Dunn, Smith, 1955, Dunn, Smith, 1958).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. 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<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. 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).

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Создание разных условий светового режима

В качестве источников белого света использовались лампы дневного света в климатической камере LabTech LCC-2-MP. После прорастания растения помещались в темную камеру на 24 часа (вариант «темнота») и облучались красным (вариант «КС») и/или дальним красным (вариант «КС» и «КС+ДКС») светом в течении 15 минут. Для этого использовались светодиоды с областью испускания 640-680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710-750 нм (ЗЛ127А-5, Россия). Интенсивность света составляла 4 мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. Пробы для дальнейшего анализа отбирались через 3 часа с момента облучения.

### 2.2.2 Определение активности сукцинатдегидрогеназы

Активность сукцинатдегидрогеназы измерялась 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).

### 2.2.3 Определение активности цитратсинтазы

Среда для определения каталитической активности цитратсинтазы: 100 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 0,2 мМ 5,5-дителиобис(2-нитробензоат) (DTNB), 0,2 мМ оксалацетата, 0,2 мМ MnCl<sub>2</sub> и 0,2 мМ ацетил-СоА. Инициацию реакции осуществляли внесением фермента в реакционную смесь и судили о работе фермента по образованию аниона тионитробензоата из DTNB и SH-КоА при 412 нм (Kim *et. al.*, 2013).

### 2.2.4 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 (Васон *et. al.*, 1961). Среда для анализа содержала 100 мМ Трис-НСl буфер, рН 8,0, 40 мМ тринатрийцитрата или 4 мМ тринатрий d,1-изоцитрат и 2 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). За единицу активности принимали количество фермента, образующего 1 мкмоль цис-аконитата за 1 минуту.

#### 2.2.5. Определение количества белка

Общее количество белка определяли по методу Lowry с совт. (Lowry *et al.*, 1951). Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре при 750 нм. Содержание белка рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta D \cdot K \cdot V_{\text{общ}}}{V_{\text{внес}}},$$

где,  $\Delta D$  – оптическая плотность,  $K$  – пересчетный коэффициент,  $V_{\text{общ}}$  – общий объем раствора, мл,  $V_{\text{внес}}$  – объем взятой на белок пробы, мл.

Удельная активность выражается в ферментативных единицах на мг белка:

$$УД_{\text{акт}} = E/A.$$

#### 2.2.6 Выделение ядер

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

#### 2.2.7 Определение концентрации катионов $\text{Ca}^{2+}$

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.

### 2.2.8 Определение перекрестного загрязнения фракций

Перекрестное загрязнение определяли по активности цитоплазматических маркерных ферментов алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы по скорости восстановления НАД<sup>+</sup> 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).

### 2.2.9 Электрофоретическое исследование сукцинатдегидрогеназы

Электрофоретический анализ проводили по Davis (Davis, 1994). Использовали 7,5% разделяющий и 2% концентрирующий гели. Электродный буфер представлял собой смесь 0,05 М Трис-глицинового буфера, рН 8,3 с 2 мл 1%-ного бромфенолового синего. Универсальное окрашивание белков в гелях осуществляли с помощью AgNO<sub>3</sub> (Shevchenko *et. al.*, 1996). Специфическое проявление геля проводили тетразолиевым методом в среде следующего состава: 0,05 М Трис-НСI буфер, рН 7,4, 0,01 М сукцинат натрия, 0,01 М феназинметсульфат и 0,01 М нитросиний тетразолий.

### 2.2.10 Очистка сукцинатдегидрогеназы

Для получения высокоочищенных препаратов СДГ использовали 5-стадийную схему очистки. Все операции проводили при температуре 0-4°C.

Стадия 1. Гомогенизация. Навеску растительного материала (5 г) гомогенизировали в соотношении 1 : 5 со средой выделения (50 мМ Трис-НСI буфера, рН 7,5, содержащий 0,3 М сахарозу, 2,5 мМ ЭДТА, 1 мМ КСI и 4 мМ MgCl<sub>2</sub>) с целью экстракции неразрушенных митохондрий.

Стадия 2. Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугируют в течение 5 мин при 1500g. Надосадочную жидкость центрифугировали в течение 15 мин при 10000g. Осадок, содержащий в основном митохондрии и микротельца, ресуспендировали в 1 мл среды выделения без сахарозы.

Стадия 3 и 4. Фракционирование сульфатом аммония с последующей гельфильтрацией на колонке с сефадексом G-25. К супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония до 20% насыщения. Центрифугируют 20 мин при 15000 об/мин. Супернатант фракционировали до 60% насыщения сульфатом аммония и вновь центрифугировали 20 мин при 12000g. Осадок ресуспендировали в 1-2 мл среды выделения без сахарозы.

Полученный ферментативный препарат наносили на колонку, заполненную сефадексом G-25 (1,5 × 35 см), для освобождения от низкомолекулярных примесей. Элюцию осуществляли средой, содержащей 20 мМ фосфатный буфер (pH 6,2) и 20 мМ сукцинат натрия.

Стадия 5. Ионообменная хроматография. Фермент наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (Whatman, Англия) (1,5 × 40 см), предварительно уравновешенную средой 3, а затем десорбировали с колонки градиентом концентрации от 0,03 до 0,2 М KCl со средой десорбирования.

#### 2.2.11 Очистка цитратсинтазы

Митохондриальная и пероксисомальная формы ЦС были очищены из фракции митохондрий и пероксисом, полученные после изоплотностного центрифугирования. Органеллы разрушали в 25 мМ Трис-HCl буфер, pH 8,0, содержащем 0,01% твина 80 и фракционировали сульфатом аммония (насыщение 40–70% для митохондриальной формы и 50–70% для пероксисомальной формы). Осадок после центрифугирования при 15 мин при 15000 об/мин растворяли в том же буфере и загружали на колонку с сефадексом G-25 (1,5 × 35 см). Элюат, содержащий активные фракции с ЦС-активностью загружали на колонку DEAE-Sephacel (GE Healthcare, Швеция) (1,5 × 40 см) и элюировали линейным градиентом KCl (0–300 мМ). Полученные активные фракции собирали и далее очищали гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-200 (2 × 70 см).

### 2.2.12 Очистка аконитазы

Очистка цитозольной и митохондриальной форм аконитазы была выполнена из цитозольной и органоидной фракций, соответственно, как описано ранее (Eprintsev *et. al.*, 2014). Все процедуры проходили при 0-4°C. Два граммов щитка кукурузы гомогенизировали в 10 мл 100 мМ Трис-НСl буфер, рН 8,0, содержащий 0,3 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА и 20 мМ цитрата и центрифугировали при 1300g в течение 5 мин. Супернатант снова центрифугировали при 14000g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость использовали для определения цитозольной активности аконитазы и ее очистка. Осадок митохондрий (загрязненных пероксисомами и другие органеллы) использовали для определения митохондриальной аконитазы и ее дальнейшего очищения. Надосадок (5 мл) ресуспендировали в том же буфере без сахарозы, но содержащего 0,01% Твин 80, повторно центрифугировали в тех же условиях и супернатант использовали для дальнейшей очистки аконитазы. Очистка включала фракционирование сульфатом аммония (насыщение 50-65%), обессоливание на колонке с сефадексом G-25 (1,5 × 35 см), гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-150 (2 × 60 см) и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе (Whatman, Англия) с колонкой (1,5 × 40 см) с использованием линейного градиента KCl (60-140 мМ). Колонки уравнивали 10 мМ Трис-НСl буфером, рН 8,0, содержащем 5 мМ цитрата. Митохондриальную форму аконитазы элюировали при 93 мМ KCl и цитозольную форму при 120 мМ KCl.

### 2.2.13 Исследование регуляторных свойств ферментов

Кинетические характеристики исследуемых ферментов изучали на гомогенных препаратах. В качестве модуляторов активности применяли малат, фумарат, малонат и другие интермедиаты клеточного метаболизма. Определение констант ингибирования проводилось с помощью графика зависимости  $1/V$  от  $(S)$  (по Диксону) (Остерман, 1981).

#### 2.2.14 Выделение РНК

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

#### 2.2.15 Аналитический электрофорез нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты разделяли в 1% геле агарозы (Helicon, Россия), содержащем 0,1% интеркалирующего красителя – бромистого этидия. Электрофорез проводился в горизонтальной электрофоретической камере в буфере 1xTAE (pH 8,5) при напряжении 70 В в течении 50 минут.

#### 2.2.16 Обратная транскрипция

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

#### 2.2.17 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 $\alpha$*  (Nicot *et. al.*, 2005).

В качестве праймеров к генам исследуемых изоферментов, подобранных с помощью программного обеспечения Primer3, использовали нуклеотидные последовательности:

для гена *SDHI-1* (LOC103636824): прямой 5'-gagaggcaccsaaaagcagtc-3';  
обратный 5'-асаасgataggcctgaccac-3';

для гена *SDHI-2* (LOC100279930): прямой 5'-сааасgggtcacttссааст-3';  
обратный 5'-ссaaaactgtcccacgtctt-3';

для гена *SDH2-1* (LOC103653238): прямой 5'-aacagattactcacatcaagca-3',  
обратный 5'-taggtttaagtttactcgagttt-3';

для гена *SDH2-2* (LOC109945721): прямой 5'-aacagatcacacatcaagca-3',  
обратный 5'-agcagagttttattgcttggtg-3';

для гена *SDH2-3* (LOC109944584): прямой 5'-gagaggctacaggcaataactgag-3',  
обратный 5'-agttttaaacattgattcttattg-3';

для гена *SDH3-1* (LOC100283351): прямой 5'-aaggaggcttctccatctcc-3',  
обратный 5'-cagagctgctacaggggaag-3';

для гена *SDH4* (LOC100280324): прямой 5'-aaccactgggaagagacst-3', обратный  
5'-gacgattgacgcgagaattt-3';

для гена *CSY1* (LOC100279573): прямой 5'-tttcttcgcagcggctcta-3', обратный 5'-  
tggatccttgggcaaatgct-3';

для гена *CSY2* (LOC100275174): прямой 5'-aatgggttagctgggscact-3', обратный  
5'-agtggatcctcgggcaaatg-3';

для гена *ACO1* (LOC100304277): прямой 5'-tggaaggagatgctgtcagt-3', обратный  
5'-cgtatagcgcctccacatg-3';

для гена *ACO2* (LOC100281040): прямой 5'-саагттсгсгсгсгсгсг-3', обратный  
5'-гсаагггсгсгсгсгсгсг-3'.

Для определения уровня транскриптов генов кальмодулинов использовали следующие нуклеотидные последовательности:

для гена *CALM1* (LOC103634668, кальмодулин 1): прямой – 5'-  
gcatcaccassaaggaactt-3', обратный 5'-tcctcagagtcggtgtcctt-3',

для гена *CALM2* (LOC542533, кальмодулин 2): прямой – 5'-  
tgatggccagatcaactacg-3', обратный 5'-cgcaaggatagcgtgaagac-3',

для гена *CALM3* (LOC542420, кальмодулин 3): прямой – 5'-  
acgaggaggtcgatgagatgc-3', обратный 5'-tcttcattggggaacgaag-3',

для гена *CALM7-1* (LOC542415, кальмодулин 7): прямой – 5' -  
tccgttagcgggtgtagtc-3', обратный 5' -cacgctccatacасааага-3',

для гена *CALM7-2* (LOC103639205, кальмодулин 7): прямой – 5'-gatgaccaacctaggcgaga-3', обратный 5'-gagcggggttactatacca-3',

для гена *CALM7-3* (LOC103634668, кальмодулин 7): прямой – 5'-ggccagatcaactacgagga-3', обратный 5'-attgatgcagcgagaggaac-3',

для гена *CALM7-4* (LOC100502442, кальмодулин 7): прямой – 5'-ggcacttgatgaccaacctc-3', обратный 5'-cacaggatcacgcatttctg-3'.

Для определения экспрессии генов факторов семейства PIF использовали следующие нуклеотидные последовательности:

для гена *PIF1*: прямой 5'-gattacttcgatcggtgaggt-3', обратный 5'-accagcactcgcggatgtggc-3';

для гена *PIF3*: прямой 5'-асааactgccattagtcacc-3', обратный 5'-tggttcactctcaggcagaga-3';

для гена *PIF4*: прямой 5'-ссааactggctattcgtcact-3', обратный 5'-gggttcattctgaggaagaga-3':

для гена *PIF5*: прямой 5'-ctggtgactgctgctgatgt-3', обратный 5'-ggtcggcgaaaaасааата-3',

для гена *PIF6*: прямой 5'-ctcaagattggatgccctgt-3', обратный 5'-ggaaagggaacatctcgtca-3'.

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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода (Livak, Schmittgen, 2001) с использованием программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (Biorad, США).

#### 2.2.18 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 (Warneske *et. al.*, 2002) с некоторыми изменениями. Исходную пробу ДНК (50 мкг) денатурировали 0,3 М раствором NaOH и подвергали дезаминированию, используя 4,15 М раствор бисульфита и 0,2 М раствор гидрохинона при pH 5,0. Полученный образец обессоливали с помощью набора QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (150) («QIAEX», Германия). Десульфонирование проводили 0,3 М раствором NaOH с последующей нейтрализацией 10 М раствором ацетата аммония и 96% этанолом при pH 5,6.

#### 2.2.19 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 нуклеотидные последовательности в направлении 5'→3', разработанные в программе MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>).

#### 2.2.20 Метилспецифическая полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию с метилспецифичными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Реакция ПЦР проводилась 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.

#### 2.2.21 Расчет степени метилирования промоторов генов исследуемых изоферментов

Расчет численных значений МС-ПЦР проводили на основании результатов электрофореза ПЦР-продуктов. Значения степени метилирования промотора



являются суммарным показателем результатов ПЦР-анализа исследуемых CG-динуклеотидов в промоторе конкретного гена. Поскольку результат может быть трех типов: отсутствие метилирования, частичное метилирование и полное метилирование, при расчетах ввели следующие обозначения: 0% метилирования – все три исследованных CG-динуклеотида неметилированные; 25% метилирования – частично метилированы 1 или 2 CG-динуклеотида; 50% метилирования – полностью метилированы 1 или 2 CG-динуклеотида; 75% метилирования – 1 или 2 CG-динуклеотида частично метилированы, а остальные – полностью метилированы; 100% метилирования – все три CG-динуклеотида метилированы (Епринцев *и др.*, 2012).

#### 2.2.22 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  $\pm$  стандартное отклонение. Обсуждаются статистически значимые различия при  $p < 0,05$ . Изображения электрофореграмм представляют собой данные типичного эксперимента, повторенного три-четыре раза.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### **3.1 Очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы, аконитатгидратазы и цитратсинтазы из кукурузы**

##### 3.1.1 Очистка изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы

Сукцинатдегидрогеназа, фермент, обеспечивающий метаболизм янтарной кислоты в растительной клетке. Установлено, что данная ферментная система может быть представлена несколькими молекулярными формами в различных организмах, но при этом все они имеют митохондриальную локализацию

(Игамбердиев, Родионова, 1994). Полученные ранее данные свидетельствуют о важной роли промежуточных метаболитов ЦТК, и, в частности, сукцината, как в целом по отношению к фотосинтетическому метаболизму, так и в частности, в отношении их роли в регуляции устьиц (Araujo *et al.*, 2011). Эти растения характеризуются повышенными показателями интенсивности фотосинтеза и роста при нормальных условиях, а также более интенсивной работой фотосинтеза в условиях неоптимальных концентраций углекислого газа (Sweetlove *et al.*, 2010, Nunes-Nesi *et al.*, 2011).

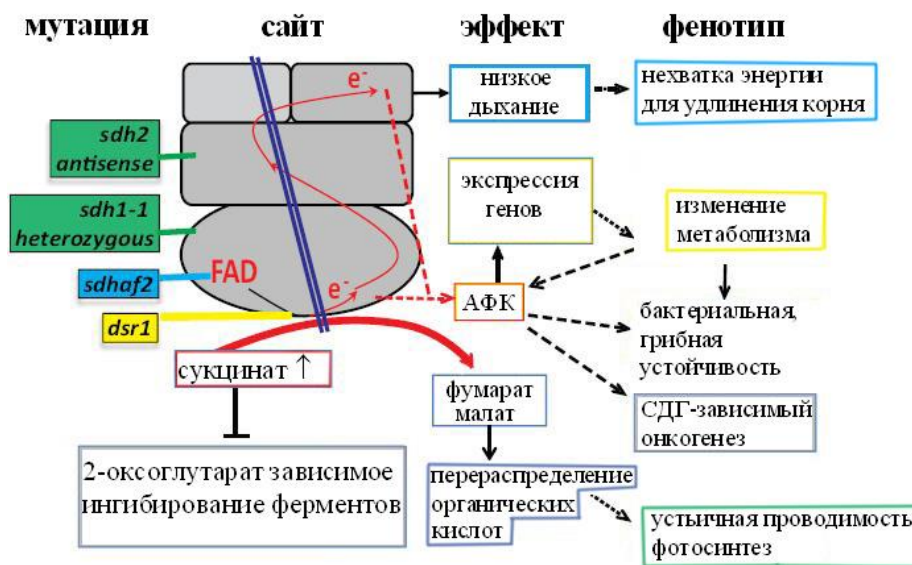


Рис. 15. Роль высокой концентрации сукцината в изменениях метаболизма клетки.

Полученные результаты свидетельствуют о важности сукцинатдегидрогеназы в метаболизме митохондрий и фотосинтеза, в частности, в мезофилл-опосредованной регуляции устьиц. Кроме того, ингибирование СДГ проявляется в воздействии на дыхание (King *et al.*, 2006, MacKenzie *et al.*, 2007), метаболизм серы и деметилирование гистонов (Smith *et al.*, 2007). Как повышенное содержание сукцината ингибирует функции растительных клеток пока неизвестно (рис. 15).

Изучение состава множественных молекулярных форм СДГ в листьях кукурузы было проведено с помощью диск-электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле. Специфическое проявление геля на активность СДГ позволило установить наличие двух изоферментов с разной электрофоретической подвижностью (Федорин *и др.*, 2016) (рис. 16). Полученные данные по изоферментному составу сукцинатдегидрогеназы в нашей работе соответствуют ранее полученным данным из других объектов исследования, в частности, для прокариот и эукариот (Епринцев *и др.*, 2010а).

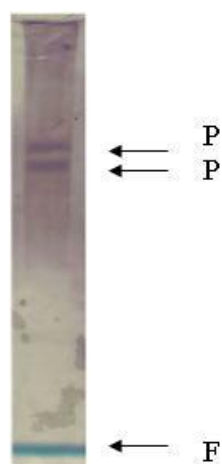


Рис. 16. Изоферментный состав сукцинатдегидрогеназы в зеленых листьях 14-дневных проростков кукурузы. P – белковая полоса, F – фронт красителя бромфенолового синего.

Препараты изоферментов СДГ из зеленых листьев кукурузы получали методом очистки, включающей 5 стадий (табл. 3). Десорбирование изоферментов осуществляли хлоридом калия в пределах 50-250 мМ и содержанием сукцината натрия в среде 20 мМ, позволила получить два препарата с сукцинатдегидрогеназной активностью. Удельная активность для первой изоформы фермента (СДГ1) равнялась 0,768 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 64 раз, выход – 0,91%. Для второй изоформы (СДГ2) значение удельной активности было 0,492 Е/мг белка, а степень очистки и выход – 41 раз и 0,94%, соответственно.

Разделение изоферментов СДГ из листьев кукурузы обеспечило использование стадии ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, что способствовало получению изоферментов в электрофоретически гомогенном состоянии. Показано, что первая форма (СДГ1) десорбируется с ДЭАЭ-целлюлозы при концентрации хлорида калия 46,9 мМ, а вторая форма (СДГ2) при 109,4 мМ, что может указывать на различие в структурной организации полипептидных компонентов двух форм сукцинатдегидрогеназы.

Таблица 3.

Очистка сукцинатдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы (n=3, p<0,05)

Стадия очистки	Объём, мл	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки	
Гомогенат	9,3	124,062	1,488	0,012	100	1	
Фракция митохондрий	8,4	17,388	1,349	0,076	14,02	6,3	
Фракционирование сульфатом аммония	1	4,265	0,642	0,151	3,44	12,5	
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	4,025	0,640	0,159	3,24	13,3	
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1	3	1,125	0,864	0,768	0,91	64
	2	3	1,170	0,576	0,492	0,94	41

Диск-электрофорез полученных препаратов СДГ в полиакриламидном геле свидетельствует об их гомогенности, поскольку на гелевой пластинке обнаруживается только одна полоса в каждой из проб (рис. 17). Расчет величин электрофоретической подвижности для каждого образца СДГ показал, что они совпадают с данными нативного электрофореза из листьев кукурузы и составляют для СДГ1 с  $R_f = 0,31$  и СДГ2 с  $R_f = 0,25$ .

Следовательно, нами был использован эффективный способ получения гомогенных препаратов изоферментов СДГ из зеленых листьев кукурузы, что подтверждено с помощью электрофоретического метода с универсальным

окрашиванием на белок нитратом серебра.

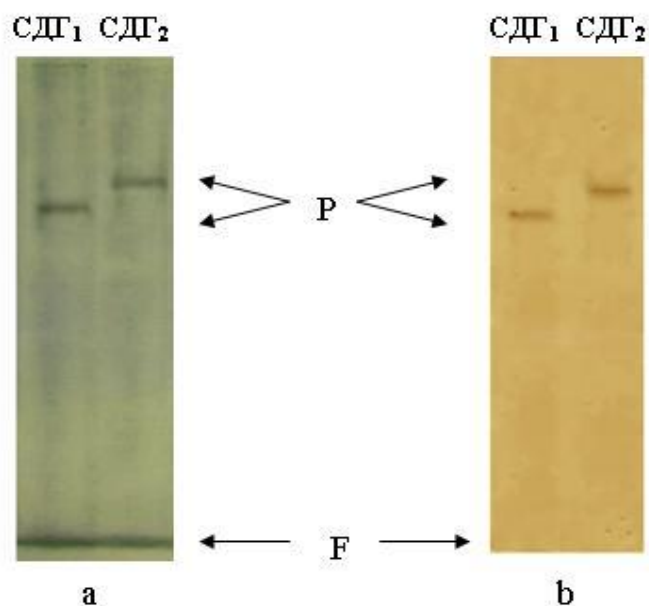


Рис. 17. Электрофореграммы препаратов СДГ зеленых листьев 14-дневных проростков кукурузы: (а) – специфическое проявление, (б) – окрашивание нитратом серебра, F – фронт красителя бромфенолового синего.

Полученные результаты позволяют заключить, что десорбция изоферментов при ионообменной хроматографии при разных значениях концентрации KCl свидетельствует об отличии в их строение. Различие полипептидных элементов изоферментов СДГ характеризует отличие в поверхностном заряде молекул. Препараты исследуемого фермента позволили изучить их физико-химические, кинетические и регуляторные свойства, что может способствовать выяснению механизмов регуляции сукцинатдегидрогеназы и интенсивности окислительного метаболизма митохондрии в целом.

### 3.1.2 Определение физико-химических характеристик сукцинатдегидрогеназы

Изучение четвертичной структуры СДГ<sub>1</sub> показало наличие двух субъединиц в ее составе с молекулярными массами 72 кДа, далее 37 кДа, следовательно, данный изофермент гетеродимером.

Электрофоретические исследования с применением додецилсульфата натрия позволили выявить величину молекулярных масс каждой субъединицы для обоих исследуемых изоферментов, при этом для СДГ2 было показано наличие 4 субъединиц разной молекулярной массы: 72 кДа, 37 кДа, 13 и 15 кДа (рис. 18). Таким образом, можно заключить, что изофермент СДГ2 представляет собой гетеротетрамер.

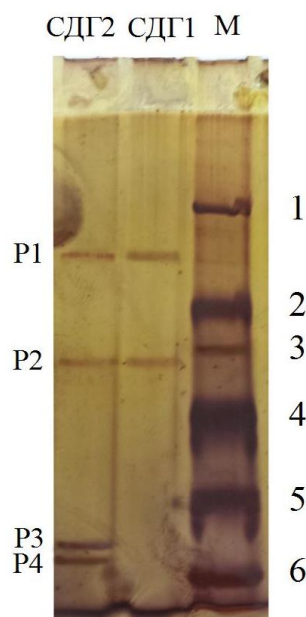


Рис. 18. Определение молекулярной массы субъединиц изоферментов СДГ методом Ds-Na-электрофореза. М – маркерные белки: 1 - целлюлаза (94,6 кДа), 2 - бычий сывороточный альбумин (66,2 кДа), 3 - яичный альбумин (45 кДа), 4 - карбоангидраза (31 кДа), 5 - ингибитор трипсина (21,5 кДа), 6 - лизоцим (14,4 кДа).

Результаты проведенных исследований по изучению субъединичного строения изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы свидетельствуют соотносятся с ранее установленными молекулярными массами данных компонентов СДГ из других объектов. Ранее было установлено, что исследуемый фермент сои имеет так же 4-х субъединичное строение с молекулярной массой компонентов 67, 30, 15 и 13 кДа (Burke *et. al.*, 1982), из томата состоит из двух субъединиц массой 65 и 26 кДа (Douce, 2012). При этом, молекулярные массы субъединиц, рассчитанных с помощью методов

биоинформатики на платформе Compute pI/Mw также оказались близкими по значениям с полученными нами данными. Расчетные значения молекулярных масс субъединиц СДГ на основе данных аминокислотных последовательностей NCBI составили 68, 33,8, 15,2 и 12,6 кДа.

### 3.1.3 Определение величины константы Михаэлиса для изоферментов сукцинатдегидрогеназы

Значения констант Михаэлиса для препаратов изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы были исследованы с применением метода Лайнуивера-Берка в системе двойных обратных координат. Для изофермента СДГ1 значение величины  $K_m$  соответствует 3,8 мкМ (табл. 4).

Таблица 4.

Значения  $K_m$  по сукцинату для изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы ( $n=2$ ,  $p \leq 0,05$ )

Формы	Величина $K_m$
СДГ1	3,8 мкМ
СДГ2	1,4 мкМ

Для изофермента СДГ2 величина данного показателя была выше, чем для СДГ 1 и составила 1,4 мкМ, что свидетельствует о большем сродстве к субстрату у СДГ2, чем у СДГ1. Тетрамерный изофермент СДГ обладает большим сродством к сукцинату, что, вероятно, обеспечивает более быстрое протекание окислительного фосфорилирования за счет ЭТЦ митохондрий путем дополнительного включения в данный процесс электронов при утилизации янтарной кислоты.

### 3.1.4 Определение pH-оптимума для изоферментов сукцинатдегидрогеназы

Исследование зависимости активности изоферментов сукцинатдегидрогеназы от pH среды показало, что pH-оптимум для СДГ1 составил 8,0 (рис. 19), при этом для изофермента СДГ2 определено значение концентрации

протонов, обеспечивающих максимальную активность исследуемой формы фермента, со значением 7,0 (рис. 20).

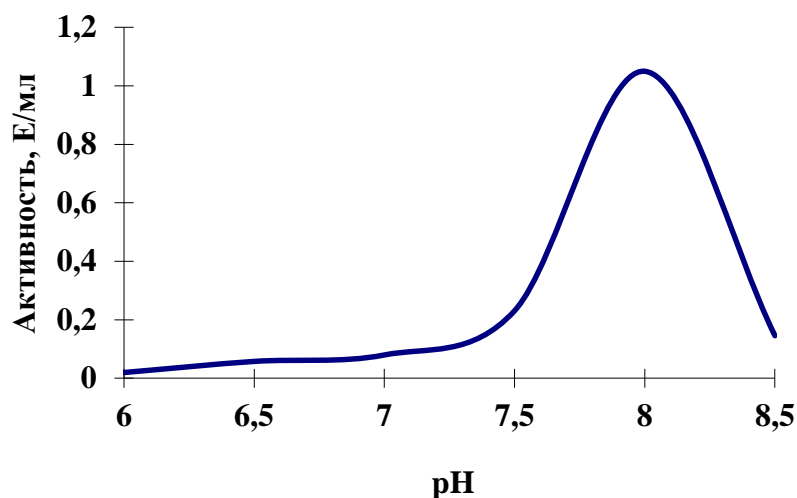


Рис. 19. Влияние концентрации ионов водорода на активность СДГ2 из листьев кукурузы.

В ходе исследования показано, что СДГ1 имеет более кислое значение pH, обеспечивающее высокую скорость его каталитической активности (рис. 19). Данные изменения в свойствах изоферментов также могут отражаться на их функционировании в листьях кукурузы в условиях автотрофного типа питания при изменении светового режима. Разницу в интенсивности метаболических потоков ди- и трикарбоновых кислот в темное и светлое время суток могут обеспечивать соответствующие изоферменты. Изменение величины pH в матрице митохондрий вызывает изменение дыхательного метаболизма за счет регуляции различных митохондриальных ферментов.

Изменения pH также влияют на структурную организацию дыхания, что было показано на изолированных митохондриях картофеля, в которых подкисление вызывало диссоциацию суперкомплексов (Ramirez-Aguilar *et al.*, 2011). Подкисление клеток также вызывает активацию альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ у арабидопсиса.



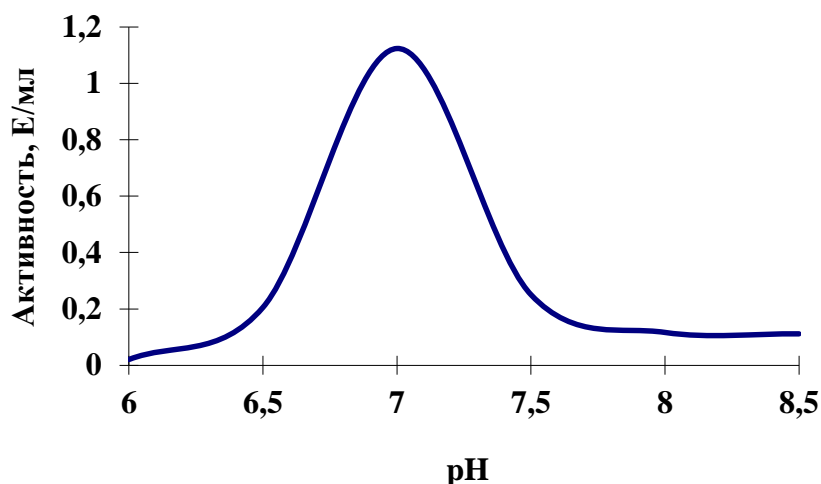


Рис. 20. Влияние концентрации ионов водорода на активность СДГ1 из листьев кукурузы.

Изменения pH оказывают непосредственное влияние на внутримитохондриальные концентрации дыхательных субстратов, многие из которых находятся в динамическом равновесии с градиентом протонов, который определяет их импорт. В частности, это характерно для некоторых органических кислот, например, пирувата (Schwarzländer, Finkemeier, 2013). Поэтому изменения в градиенте pH тесно связаны с метаболической регуляцией, в том числе на уровне сукцинатдегидрогеназной системы. Снижение величины pH матрикса митохондрий на свету приводит к формированию димерного изофермента, обладающего большей активностью при данных значения величины pH по сравнению с тетрамерным изоферментом.

### 3.1.5 Влияние малоната на активность изоферментов сукцинатдегидрогеназы

Исследование влияние малоната на активность сукцинатдегидрогеназной системы имеет важное значение, так как в многочисленных источниках именно малонат указывался как один из самых сильных конкурентных ингибиторов для данного фермента (Muller *et. al.*, 2008).

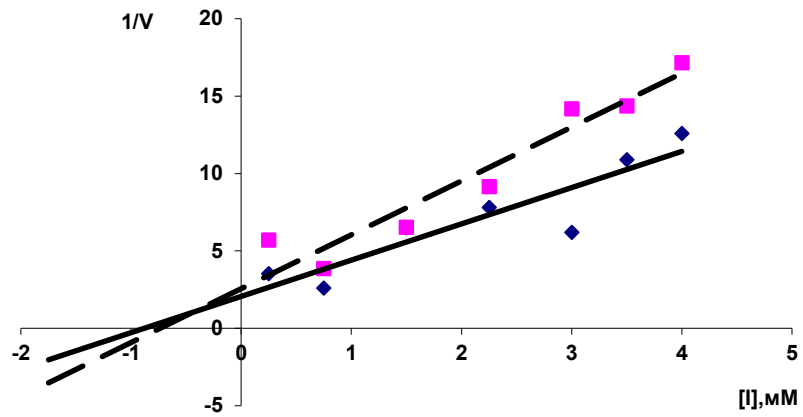


Рис. 21. Определение константы ингибирования малонатом изофермента СДГ1. Сплошная линия – 2 мМ сукцината натрия, пунктирная линия – 1мМ сукцината натрия.

Кинетические характеристики исследуемых форм сукцинатдегидрогеназы в определенной степени подтверждают их участие в разных метаболических процессах. Было установлено, что  $K_i$  по малонату для СДГ1 составляет 0,5 мМ, при этом для СДГ2 данный показатель выше и равен 0,95 мМ (рис. 21 и 22). Влияние малоната на активность изоферментов СДГ свидетельствует о разнице в механизмах регуляции их активности. Функционирование изоферментов СДГ из листьев кукурузы может регулироваться за счет влияния на них различных интермедиатов клетки, что является механизмом клеточного контроля активности исследуемого энзима. Поскольку для изофермента СДГ2 выявлен ингибирующий эффект более низкими значениями малоната, то это может свидетельствовать о его большей чувствительности к данному действующему веществу. Отличие в величинах констант ингибирования для изоферментов СДГ может быть связано с разницей в их структуре, что обусловлено отличием в генетической детерминации изоферментов. Полученные нами данные согласуются с ранее полученными при изучении влияния малоната на активность СДГ из различных организмов (Valls-Lacalle *et. al.*, 2016, Belt *et. al.*, 2017).

Следовательно, при исследовании регуляторных характеристик выделенных изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы, связанных с действием малоната на их активность, было показано, что он проявляет ингибирующее действие на данный показатель обеих изоформ СДГ. При этом установлено, что изофермент СДГ1 более чувствителен к действию малоната, поскольку константа его ингибирования составляет 0,5 мМ, а для СДГ2 величина исследуемого показателя составляет 0,95 мМ.

Получение гомогенных препаратов СДГ позволило провести изучение их регуляторных характеристик, в частности влияние различных АТФ, как показателя энергетического статуса митохондрий. Установлено, что изоферменты СДГ1 и СДГ2 ингибируются высокими концентрациями АТФ, однако, для формы СДГ1 значительное снижение активности наблюдается при концентрациях более 50 мкМ, а для формы СДГ2 - при более 20 мкМ.

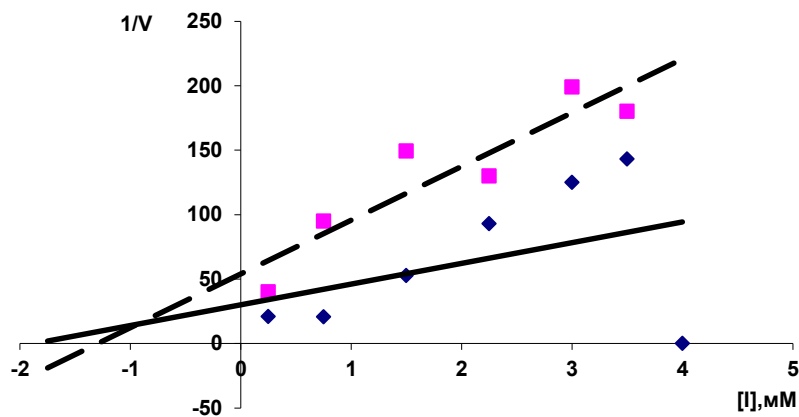


Рис. 22. Определение константы ингибирования малонатом изофермента СДГ2. Сплошная линия – 2 мМ сукцината натрия, пунктирная линия – 1 мМ сукцината натрия.

Полученные результаты по влиянию энергетического эквивалента клетки (АТФ) позволяют предположить, что его высокие концентрации угнетают работу обеих изоформ сукцинатдегидрогеназы. Более чувствительный к исследуемому

энергетическому эквиваленту клетки является СДГ2, о чем свидетельствует изменение его активности уже при низких величинах АТФ. Следовательно, можно предположить, что именно АТФ способна быть регуляторным компонентом клетки, контролирующим скорость окислительного метаболизма на уровне сукцинатдегидрогеназы в условиях активно функционирующего фотосинтеза. Эффективность контроля активности митохондриальных ферментов обусловлена наличием в ее мембране АТФ/АДФ-антипортов.

Таким образом, был разработан эффективный способ очистки СДГ из зеленых листьев кукурузы, включающий ионообменную хроматографию. В качестве определяющей стадии очистки осуществляли ионообменную хроматографию, позволившую получить две формы исследуемого фермента в гомогенном состоянии, что подтверждается результатами электрофоретического исследования с универсальным окрашиванием на белок. Показано, что все формы СДГ десорбируются с ДЭАЭ-целлюлозы при разных концентрациях хлорида калия, что может указывать на различие в структурной организации полипептидных компонентов изоферментов сукцинатдегидрогеназы. Полученные в гомогенном состоянии препараты исследуемого фермента позволили изучить их регуляторные свойства, так показано ингибирующее действие высоких концентраций энергетического эквивалента клетки (АТФ) на скорость функционирования обеих изоформ сукцинатдегидрогеназы и различная их чувствительность к малонату, что может быть одним из механизмов регуляции интенсивности окислительного метаболизма митохондрий.

### 3.2 Очистка аконитатгидратазы из кукурузы

Пятистадийная схема, примененная при получении гомогенных препаратов аконитазы из листьев кукурузы, позволило изоферменты, чистота которых подтверждена электрофоретическим методом (табл. 5). Методология проведения очистки изоферментов аконитатгидратазы обеспечила получение препаратов с

высокой удельной активностью, при этом каждая стадия приводила к уменьшению содержания сопутствующих белков (Епринцев *и др.*, 2007).

Важное значение в используемой схеме очистки играла стадия хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе с применением линейного градиента KCl (75-120 мМ) в качестве десорбирующего фактора. Проведение ионообменной хроматографии с применением ДЭАЭ-целлюлозы позволило становить различие в величинах концентрации хлорида калия, необходимых для десорбции изоферментов аконитатгидратазы из листьев кукурузы. Результаты ионообменной хроматографии позволяют сделать заключение об отличии поверхностного заряда белковых молекул изоферментов АГ.

Таблица 5.

Очистка изоферментов аконитатгидратазы из листьев кукурузы (n=3, P ≤ 0,05)

Стадии очистки	Объем, мл	Актив-ность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Степень очистки	Выход, %
Гомогенат	50	16,950	329	0,05	1	100
Фракционирование сульфатом аммония (50-65%)	3,5	5,742	25,367	0,23	4,6	34
Гель-фильтрация на колонке с Сефадексом G-25	2,5	4,899	20,136	0,24	5	30
Гель-хроматография на колонке с Сефадексом G-150	2,5	1,345	1,939	0,69	15,6	9
Ионообменная хроматография на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой	2,5	0,381	0,118	3,22	64,4	3
	2,5	0,648	0,124	5,23	104,6	3

Удельная активность полученных препаратов изоферментов аконитатгидратазы составила 3,22 и 5,23 Е/мг белка (табл. 11) со степенью очистки 64,4 и 104,6 раз, соответственно, для первого и второго изоферментов.

### 3.2.1 Исследование гомогенности и специфической активности аконитатгидратазы из кукурузы

Универсальное проявление полиакриламидного геля с препаратами изоферментов аконитатгидратазы из листьев кукурузы показало, что на геле обнаруживается только одна белковая полоса в каждом из препаратов, что указывает на их гомогенность (Остерман, 1981). Электрофоретические подвижности для выделенных изоферментов были следующие: для АГ1 - 0,58, для АГ2 - 0,52.

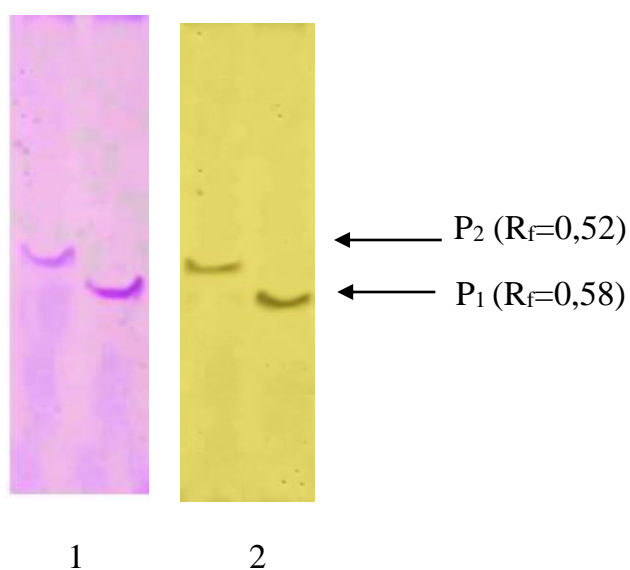


Рис. 23. Подтверждение гомогенности полученных изоферментов аконитатгидратазы из листьев кукурузы. 1 – специфическое проявление на активность аконитатгидратазы. 2 – окрашивание геля нитратом серебра (на белок). P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> – белковые полосы

### 3.2.2 Регуляция активности аконитатгидратазы органическими кислотами

Регуляцию активности препаратов изоферментов аконитатгидратазы из листьев кукурузы интермедиатами клетки исследовали с использованием малата,

сукцината, фумарата, глиоксилата. Все исследуемые препараты органических кислот проявляли ингибирующее действие на изучаемые изоферменты аконитатгидратазы по конкурентному типу. Величины констант ингибирования, определенные для каждого из изоферментов АГ, колебались в пределах от 1,24 до 2,15 мМ. Максимальное значение ингибирующего эффекта характерно для фумаровой кислоты (величины  $K_i$  от 1,24 до 1,72 мМ), которая также проявляет свое действие по конкурентному типу.

Анализ результатов ингибиторного анализа для изоферментов аконитатгидратазы, выделенных из листьев кукурузы, указывает, что АГ1 (митохондриальная форма) наиболее чувствительна ко всем примененным в данной работе веществам, что указывает на ее высокую чувствительность. Важно отметить, что значительную роль в регуляции ферментативной активности изозимов аконитазы играет глиоксилат, о чем свидетельствуют данные о его высоком ингибирующем действии на оба исследуемых изофермента.

Таблица 6.

Значения  $K_i$  интермедиатами клетки изоферментов аконитатгидратазы из листьев кукурузы ( $n = 5; p \leq 0,05$ )

Название вида растения		Значение $K_i$ , мМ			
		Сукцинат	Малат	Фумарат	Глиоксилат
Кукуруза	1	1,75	2,14	1,24	2,05
	2	2,06	2,86	1,72	2,18

1 – АГ из митохондрий; 2 – АГ из цитоплазмы

### 3.3 Очистка цитратсинтазы из кукурузы

Из листьев кукурузы была проведена очистка изоферментов цитратсинтазы и получены препараты двух форм. Очистка митохондриального изофермента цитратсинтазы была осуществлена в 152,4 раз, при этом выход составил 8%. Величина удельной активности данного изофермента - 0,23 Е/мг белка (табл. 7).

Для глиоксисомальной формы ЦС выход составил 7,1%, а степень очистки 113,8 раз (табл. 8).

Таблица 7.

Очистка митохондриального изофермента цитратсинтазы  
из листьев кукурузы ( $n = 5$ ;  $p \leq 0,05$ )

Стадия	Объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход %	Степень очистки
Гомогенат	95	138	435	0,317	100	1
Фракция митохондрий	18	48	61	0,751	34,8	2,4
Фракционирование сульфатом аммония (40-70%)	7	39	14	2,786	28,3	8,8
Гель-фильтрация на Сефадексе G-25	5	36	11	3,272	26,1	10,3
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	6	34	1,4	22,3	24,6	70,3
Гель хроматография на Сефадексе G-200	3	11,1	0,23	48,3	8	152,4

Таблица 8.

Очистка пероксисомального изофермента цитратсинтазы  
из листьев кукурузы ( $n = 5$ ;  $p \leq 0,05$ )

Стадия	Объем, мл	Общая активность, Е	Белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход %	Степень очистки
Гомогенат	52	82	241	0,34	100	1
Фракция глиоксисом	14	26	41	0,63	31,7	1,9
Фракционирование сульфатом аммония (40-70%)	3,0	20,8	21,5	0,97	25,4	2,9
Гель-фильтрация на Сефадексе G-25	6,5	17,3	16,2	1,07	21,1	3,2
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	5,5	14,8	2,12	6,98	21,9	20,5
Гель хроматография на Сефадексе G-200	2,5	5,8	0,15	38,7	7,1	113,8



Полученные препараты изоферментов цитратсинтазы из листьев кукурузы использовали для исследования некоторых кинетических и регуляторных характеристик. Показано, что данные изоферменты имеют значительные отличия в исследуемых характеристиках.

В ходе проведенного исследования свойств изоферментов цитратсинтазы было установлено, что митохондриальная и пероксисомальная формы различаются по оптимальному рН и сродству к оксалоацетату и ацетил-СоА (табл. 9). Глиоксисомальная форма наиболее активна при нейтральном рН (7,7), имеет более низкое сродство к оксалоацетату (71 мкМ) и к ацетил-КоА (26 мкМ) и по сравнению с митохондриальной формой, имеющей значение  $K_m$  25 мкМ для оксалоацетата и 6 мкМ для ацетил-СоА. Наибольшую активность глиоксисомальный изофермент проявляет в щелочном значении рН и оптимальное значение было выявлено при рН 8,2.

Таблица 9.

Кинетические характеристики митохондриального и пероксисомального изоферментов цитратсинтазы из листьев кукурузы ( $n = 5$ ;  $p \leq 0.05$ )

Изофермент	К <sub>м</sub> (мкМ)		рН-оптимум
	оксалоацетат	ацетил-СоА	
Митохондриальный	71	26	7,7
Пероксисомальный	25	6	8,2

Выявленные различия в кинетических характеристиках изоферментов цитратсинтазы позволяют предположить их разную роль в организации метаболизма цитрата в клетках листьев кукурузы. Более низкое значение величины константы Михаэлиса для пероксисомальной формы по отношению к оксалоацетату и ацетил-СоА свидетельствует о большем сродстве энзима к этим субстратам, чем у митохондриального изофермента. В период активной мобилизации запасных веществ семени это может играть важную роль, поскольку

преобладание анаболических процессов необходимо для обеспечения растительного организма не только энергией, но и биосубстратами.

Высокая активность глиоксилатного цикла сопряжена не только с максимальной активностью пероксисомальной формы ЦС, но также и митохондриальной формы. Следовательно, цикл Кребса также имеет высокую скорость функционирования в данный период. Роль пероксисомального изофермента цитратсинтазы, вероятно, заключается, вероятно, в обеспечении метаболизма цитрата и поставки его в цикл трикарбоновых кислот в митохондриях. Важность пероксисомальной ЦС может быть обусловлена особенностями метаболизма щитков кукурузы, поскольку основным источником углеводов в них является эндосперм, в щитках которого запасаются липиды (Gayral *et. al.*, 2015). Гидролиз жирных кислот, активно протекающий в щитках кукурузы, может принимать участие в подкислении эндосперма, что способствует более быстрому расщеплению запасного крахмала во время прорастания (Ma *et. al.*, 2016), и цитрат, поставляемый цитратсинтазой, может играть роль в этом процессе.

#### 3.4 Световая регуляция функционирования исследуемых изоферментов

Изучение влияния светового режима на скорость функционирования СДГ, ЦС и АГ в зеленых листьях кукурузы показало изменение величины исследуемого показателя в 3-4 раза в условиях темноты и на свету (рис. 24).

Величина активности СДГ и митохондриальных изоферментов АГ и ЦС уменьшается при экспонировании растений на свету и меняется за довольно короткий промежуток времени (2-3 часа), что дает возможность растению быстро осуществлять переход от одного типа энергетического метаболизма к другому в зависимости от условий освещения. В отсутствие света наблюдается высокая скорость функционирования исследуемых ферментов, что свидетельствует об активации СДГ и цикла Кребса.

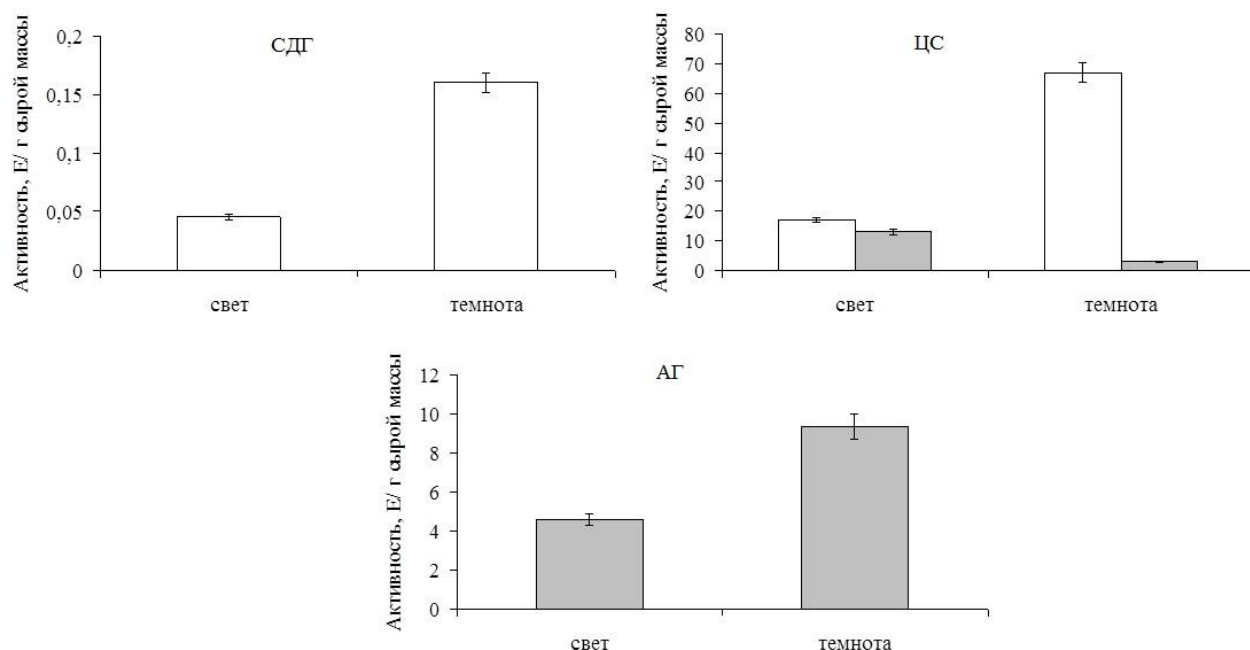


Рис. 24. Активность сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы (белые столбцы – митохондриальная форма, серые столбцы – пероксисомальная форма) и аконитатгидратазы в листьях кукурузы при смене светового режима растений.

Увеличение каталитической активности цитоплазматических 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).

Изменение активности изоферментов СДГ, ЦС и АГ в листьях кукурузы в условиях различного освещения растений свидетельствуют об их светозависимости. Вероятно, в регуляции изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот принимают участие фоторецепторные системы, обеспечивающих тонкий механизм координации метаболических процессов. Одним из способов такой регуляции является контроль уровня транскриптов генов в клетке (Quail, 2007).

### 3.4.1 Экспрессия генов сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима

Световая регуляция функционирования СДГ в растениях играет важную роль в организации дыхательного метаболизма клетки и посредниками в данном процессе могут выступать фоторецепторные системы. Для определения роли отдельных рецепторов красного света был проведен анализ содержания мРНК генов субъединиц сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы при облучении растений светом разной длины волны.

Полученные результаты по исследованию уровня транскриптов анализируемых генов в условиях разного освещения свидетельствуют, что в растениях на свету и после облучения красным светом с длиной волны 660нм относительная концентрация мРНК гена *SDH1-2* значительно меньше, чем данный показатель в растениях, находящихся в темноте и после облучения дальним красным светом. Так, относительный уровень транскриптов для вариантов «темнота» и «КС+ДКС» составлял 11,7 и 22,1 единиц, соответственно, в то время как в вариантах «свет» и «КС» этот показатель был 1,2 и 0,3 единицы (рис. 25).

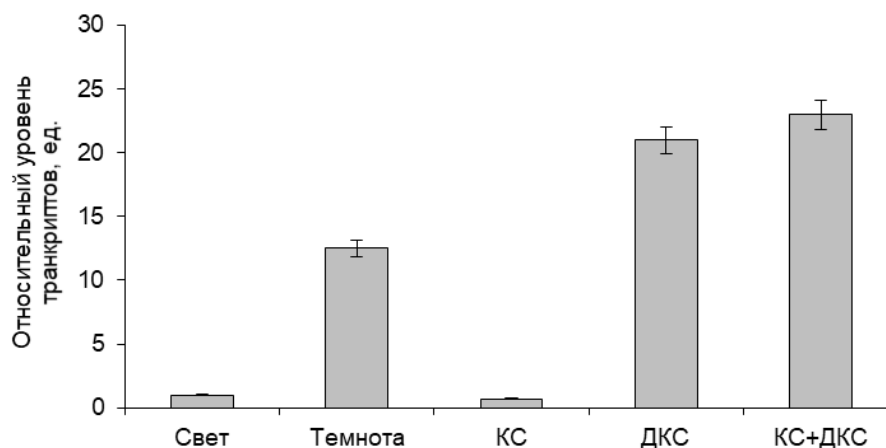


Рис. 25. Относительный уровень транскрипции гена *SDH1-2* в листьях кукурузы при разных световых режимах. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

В опытах по влиянию красного и дальнего красного света на уровень экспрессии гена *SDH1-2* было показано, что активация фитохрома вызывает изменения в работе генетического аппарата клетки, уменьшая количество мРНК СДГ в клетке растений. Противоположный эффект наблюдается при действии дальнего красного света, что вызывает увеличение содержания транскриптов гена *SDH1-2* в клетках листьев кукурузы.

Проведенный анализ образцов кДНК из кукурузы с праймерами к гену *SDH2-3* в условиях разного светового режима позволил установить, что в растениях на свету и после облучения красным светом с длиной волны 660нм относительная концентрация мРНК исследуемого гена значительно меньше, чем данный показатель в растениях, находящихся в темноте. Противоположный эффект вызывает воздействие на кукурузу дальнего красного света. Так, уровень относительной транскрипции для вариантов опыта «ДКС» и «КС+ДКС» была в 5-5,3 раза выше такового показателя варианта «свет» (рис. 26).

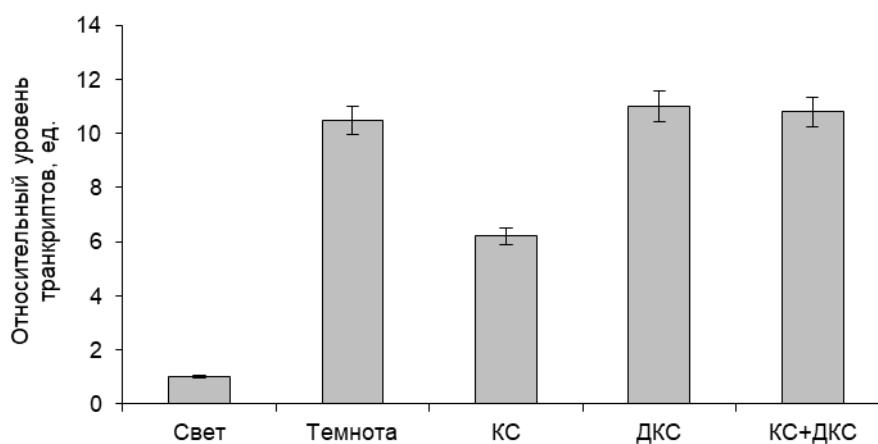


Рис. 26. Относительный уровень транскрипции гена *SDH2-3* в листьях кукурузы при разных световых режимах.

Уменьшение количества транскриптов гена *SDH2-3* в листьях кукурузы при их облучении красным светом, обусловлено формированием в клетке активной формы фитохрома в данных условиях. Противоположный эффект наблюдается при воздействии на растения ДКС и последовательное действие КС и ДКС.

Следовательно, обнаружена фитохром-зависимая система координации работы генетического аппарата клеток кукурузы при облучении растений светом разной длины волны. Активная форма фитохрома проявляет ингибирующее действие по отношению к генам каталитического димера СДГ. снижение транскрипционной активности генов *SDH1-2* и *SDH2-3*, вероятно, обусловлено снижением сродства РНК-полимеразы по отношению к промотрону части данных генов из-за фитохром-зависимой деградации соответствующих транскрипционных факторов (Paik *et al.*, 2017).

Проведенные исследования свидетельствуют об участии фитохромной системы в регуляции функционирования СДГ в зеленых листьях арабидопсиса, при этом ключевую роль в регуляции активности генов СДГ играет активная форма фитохрома А, снижающая скорость транскрипции гена *SDH1-2* (Ponov *et al.*, 2010).

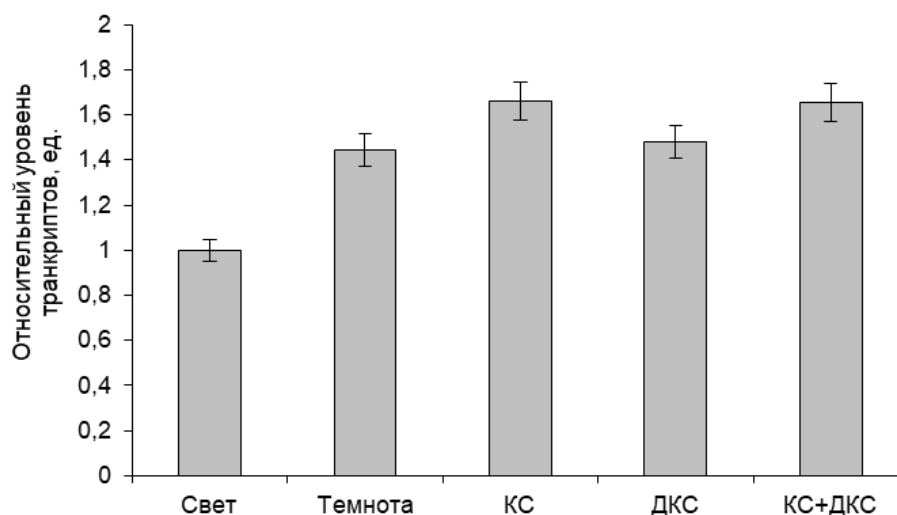


Рис. 27. Относительный уровень транскриптов гена *SDH3-1* в листьях кукурузы в условиях разного светового режима.

Изучение количественных показателей содержания мРНК генов мембраносвязанных субъединиц СДГ в листьях кукурузы в условиях различного светового режима показал, что экспрессия генов *SDH3-1* и *SDH4* имеет низкое значение у растений, находящихся под действием света (рис. 27 и 28). Однако, наблюдается незначительное увеличение количества транскриптов генов

мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы при инкубации растений в темноте. Освещение растений КС и ДКС не происходит изменения в анализируемом показателе и содержание транскриптов генов мембраносвязанных субъединиц СДГ соотносится с таковым показателем варианта «темнота».

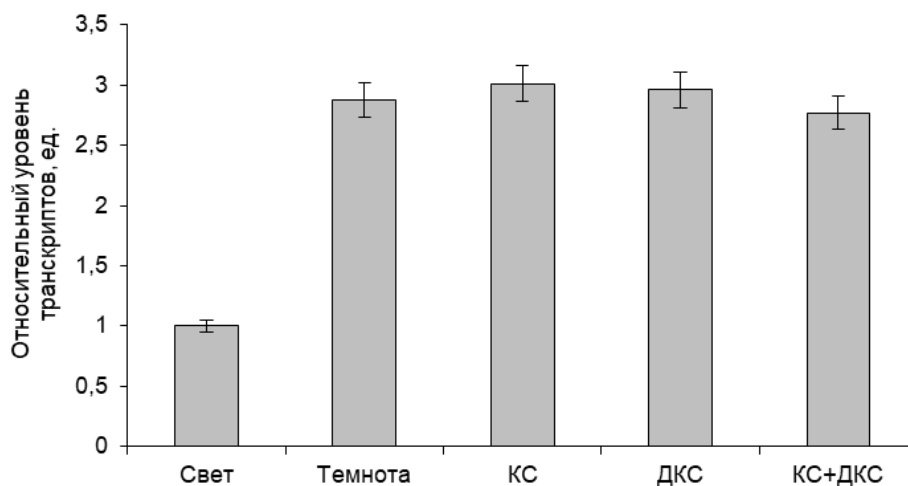


Рис. 28. Относительный уровень транскриптов гена *SDH4* в листьях кукурузы в условиях разного светового режима.

На основании результатов исследования можно заключить, 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. Однако, механизм данной регуляции не связан с фитохромной системой, вероятно, может обеспечиваться иными способами. В частности, криптохромной системой или энергетическим статусом клетки.

#### 3.4.2 Исследование экспрессии генов сукцинатдегидрогеназы в листьях *Arabidopsis thaliana* дикого типа и дефицитных по генам фитохромов А и В

Проведенные ранее исследования по влиянию светового режима на скорость функционирования СДГ в листьях *Arabidopsis thaliana* показали, что данная

характеристика фермента на свету значительно снижена, по сравнению с темнотой. Однако, на свету не происходит полного ингибирования СДГ, что вероятно связано не с энергетическими функциями митохондрий в данных условиях, а с поставкой метаболитов для биосинтетических процессов (Епринцев *и др.*, 2010).

Одним из опосредованных механизмов световой регуляции активности фермента могут выступать фитохромы и криптохромы. Ранее было установлено, что фитохромная система участвует в регуляции активности различных ферментов (Chen *et. al.*, 2014, Nan *et. al.*, 2017). Фитохром может непосредственно воздействовать на фермент, изменять состояние мембран, или контролировать функционирование ДНК клетки (Кузнецов *и др.*, 1986, Феденко *и др.*, 1995). Регуляция экспрессии генов может осуществляться активной формой фитохрома А, который способен проникать в ядро благодаря специализированным белкам-переносчикам достаточно быстро, и контролировать работу транскрипционных факторов или состояние хроматина. Кроме того, свое действие фитохром может реализовывать посредством различных мессенджеров (Klose *et. al.*, 2015, Oh, Montgomery, 2014).

Исследование действия света разной длины волны на содержание транскриптов гена *SDH1-2* в листьях арабидопсиса дикого типа выявило зависимость данного показателя от состояния фитохрома. Активная форма фитохрома, образование которой вызвано облучением растений красным светом, вызывала уменьшение количества транскриптов анализируемого гена. Отличие в содержании мРНК гена флавопротеина СДГ на свету и при воздействии на растения красного света от вариантов «темнота» и «ДКС» было в 6,7 и 32,7 раза, соответственно (рис. 29). Полученные результаты указывают на ингибирующее действие активной формы фитохрома на транскрипционную активность гена *SDH1-2*.

Облучение растений светом с длиной волны 730 нм вызывало уменьшение содержания транскриптов гена *SDH1-2* флавопротеина СДГ более чем в 35 раз по отношению к экспериментальному варианту «темнота». При этом, аналогичная



ситуация наблюдалась и при последовательном облучении растений КС и ДКС, что вызывало снижение анализируемого показателя в 32,69 раза по отношению к показателю в растениях, инкубируемых в темноте.

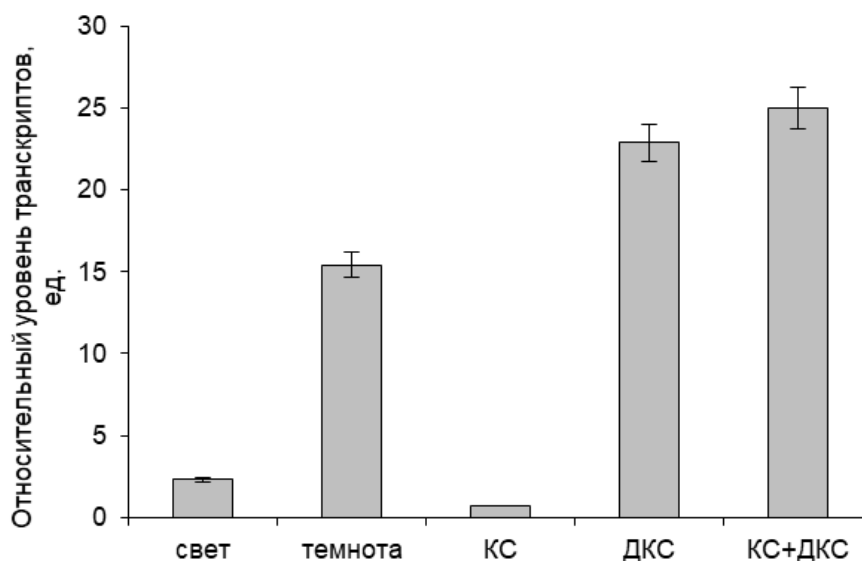


Рис. 29. Относительный уровень транскриптов гена *SDHI-2* в листьях арабидопсиса дикого типа при разных световых режимах.

Применение в исследовании растений *Arabidopsis thaliana*, нокаутных по генам фитохромов А и В, позволило установить функциональную роль каждого из них в регуляции экспрессии генов СДГ-системы (рис. 30 и 31).

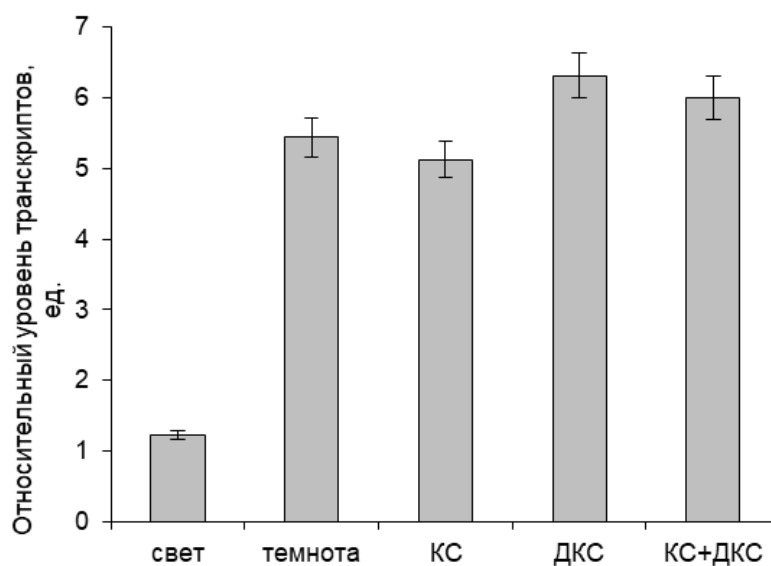


Рис. 30. Относительный уровень транскриптов гена *SDHI-2* в листьях арабидопсиса, мутантного по гену фитохрома А при разных световых режимах.

Из полученных данных видно, что содержание транскриптов гена *SDH1-2* в растениях арабидопсиса, нокаутных по гену фитохрома А, на свету и в темноте соответствовало таковым показателям у дикого типа. Относительный уровень транскриптов исследуемого гена в вариантах «темнота» и «свет» составлял 5,44 и 1,23, и 15,67 и 1,96 единиц, соответственно (рис. 32А и 32В).

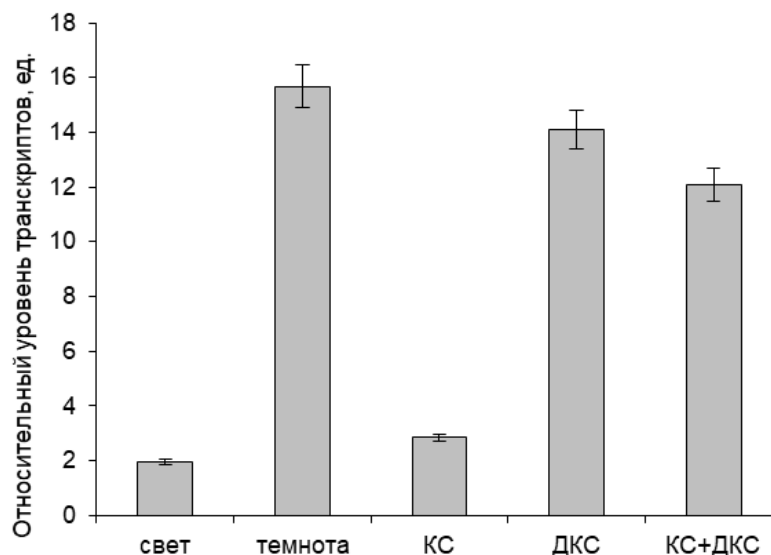


Рис. 31. Относительный уровень транскрипции гена *SDH1-2* в листьях арабидопсиса, мутантного по гену фитохрома В при разных световых режимах.

Значительные отличия наблюдались при облучении мутантных растений арабидопсиса красным светом с длиной волны 660 нм. Было установлено отсутствие изменения содержания мРНК гена *SDH1-2* в растения арабидопсиса, мутантного по гену фитохрома А, во всех варианта светового режима. Однако, мутантов по гену фитохрома В наблюдалось изменение исследуемого показателя, в частности, уменьшение в 5,52 раза количества транскриптов варианта «КС» по отношению к варианту «темноте». Действие дальнего красного и последовательное действие красного и дальнего красного света также не приводило к значительным изменениям в содержании мРНК гена *SDH1-2* в нокаутных растениях арабидопсиса, относительно варианта «темнота».

Таким образом, анализ данных по влиянию красного и дальнего красного света на мутантные растения арабидопсиса по генам фитохрома А и В позволяет

говорить, что только активная форма фитохрома А обеспечивает регуляцию содержания транскриптов генов сукцинатдегидрогеназы. Ранее в растениях *Arabidopsis thaliana* показана зависимость работы генов ретеноннечувствительных НАДН-дегидрогеназ от состояния фитохромной системы. Активная форма стимулировала скорость функционирования гена *Nda1*, воздействуя на его промотор (Escobar *et al.*, 2004).

Результаты проведенного исследования позволили выявить механизм световой регуляции СДГ в растениях *A. thaliana* при их облучении светом разной длины волны. Активная форма фитохрома А снижает уровень транскриптов гена *SDH1-2* флавопротеина СДГ, что соотносится с уменьшением каталитической активности исследуемого фермента и согласуется с ранее установленными данными для трансгенных растений *A. thaliana* (Popov *et al.*, 2010). Вероятно, регуляция функционирования сукцинатдегидрогеназы осуществляется на генетическом уровне, действующим фактором в данном случае выступает фитохром А, приводящий к координации работы гена субъединицы А сукцинатдегидрогеназы.

Исследование содержания относительного уровня транскриптов гена *SDH2-3*, кодирующего субъединицу В СДГ, в листьях арабидопсиса дикого типа и мутантов по генам фитохромов А и В в условиях различного светового режима, показало определенную зависимость (рис. 32).

Изменение содержания транскриптов гена субъединицы В СДГ соотносится с экспрессией гена *SDH1-2* в растениях дикого типа в аналогичных световых условиях. Количество мРНК для обоих генов было снижено в мутантах, дефицитных по гену фитохрома А при облучении дальним красным светом, а в мутантах по гену фитохрома В экспрессия *SDH2-3* была сходна с уровнем экспрессии гена субъединицы А в арабидопсисе дикого типа.

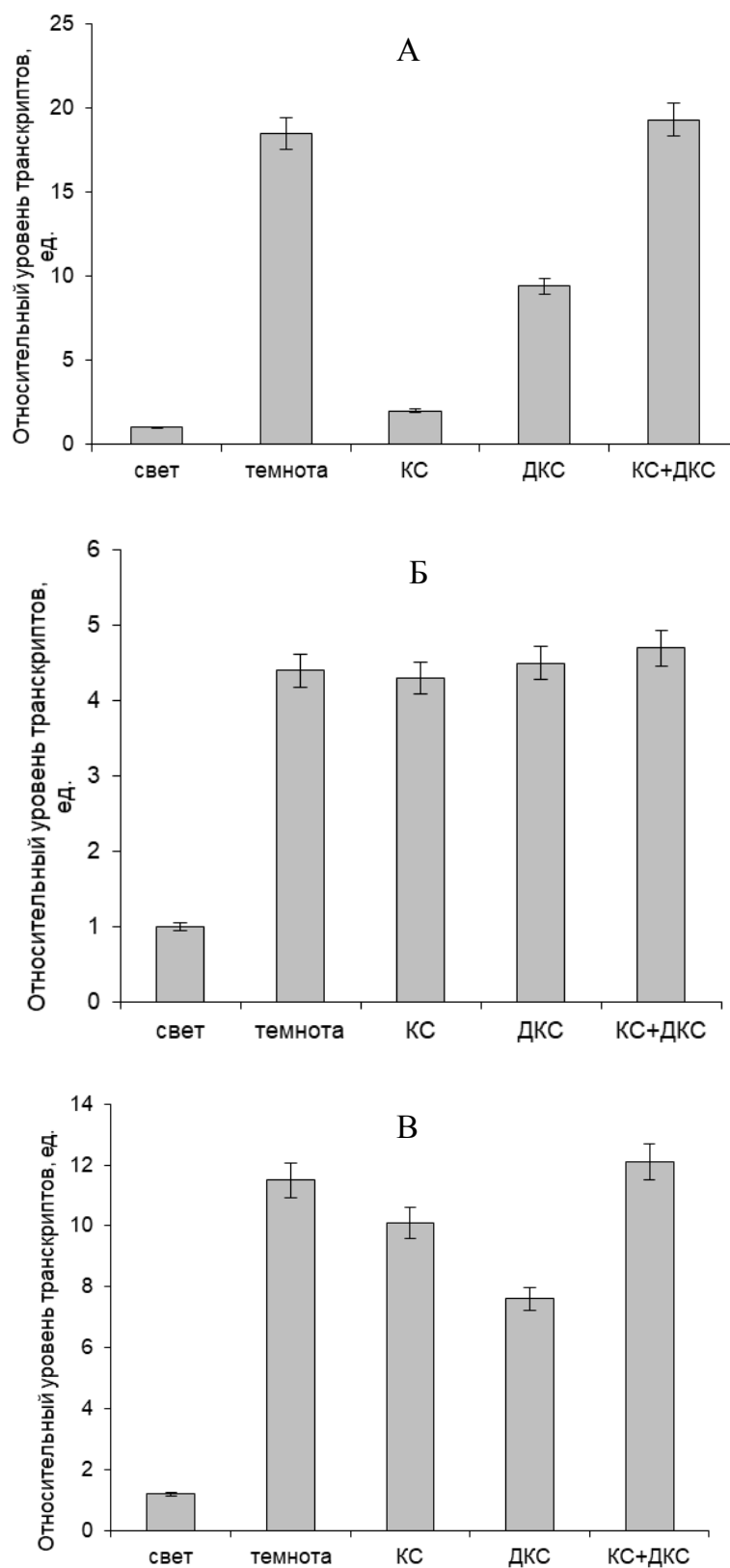


Рис. 32. Относительный уровень транскриптов гена *SDH2-3* в листьях арабидопсиса дикого типа (А), мутантного по гену фитохрома А (Б) и мутантного по гену фитохрома В (В), при разных световых режимах.

Отсутствие изменений в содержании транскриптов гена железо-серной субъединицы сукцинатдегидрогеназы в листьях арабидопсиса, дефицитного по фитохрому А, позволяет предположить ключевую роль данного фоторецептора в его регуляции. Активная форма фитохрома А проявляет ингибирующее действие на ген *SDH2-3*. Однако, выявлены незначительные колебания концентрации транскриптов гена *SDH2-3* в листьях арабидопсиса, дефицитного по гену фитохрома В, относительно варианта «темнота», также указывают на его причастность к регуляции СДГ при изменении светового режима растения.

Результаты исследования нокаутных растений арабидопсиса по генам фоторецепторов красного света, показали, что в регуляции экспрессии гена субъединицы В сукцинатдегидрогеназы принимают участие как фитохром А, так и фитохром В.

#### 3.4.3 Экспрессия генов аконитазы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима

При исследовании влияния светового режима на уровень транскриптов генов аконитатгидратазы, было показано, что данный показатель проявляет определенную зависимость (рис. 33). При облучении растений красным светом происходит значительное снижение величины данного показателя с 12,8 ед. до 0,52 ед. относительно варианта «темнота». При этом, облучение листьев кукурузы дальним красным светом и последовательное облучение красным и дальним красным светом не приводит к существенному изменению содержания транскриптов гена митохондриальной формы аконитазы относительно варианта «темнота». Следовательно, полученные результаты могут свидетельствовать о зависимости скорости работы гена *ACO1* от состояния фитохромной системы. Активная форма фитохрома проявляет ингибирующее действие на данный ген, вызывая снижение концентрации его транскриптов. Такой эффект красного света согласуется с данными, полученными для генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы при исследовании действия на них красного и дальнего

красного света. В данном случае, снижение содержания транскриптов генов митохондриальных изоферментов цикла Кребса (АГ и СДГ) обусловлено торможением работы всего метаболического пути в условиях активно функционирующего фотосинтеза.

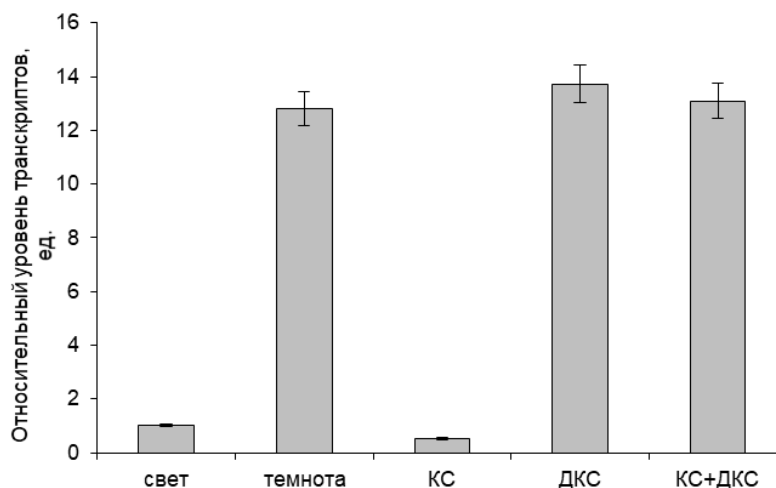


Рис. 33. Уровень транскриптов гена *ACO1* в листьях кукурузы при их облучении светом разной длины волны.

Иная картина наблюдалась при исследовании действия красной части спектра на содержание транскриптов гена цитозольной формы аконитазы. В условиях света и при облучении растений кукурузы красным светом наблюдалось большее содержание его мРНК, чем в условиях темноты (рис. 34). В данном случае увеличение концентрации транскриптов составило 1,15 раза относительно варианта «темнота». Противоположная картина наблюдалась при освещении листьев кукурузы дальним красным светом, уровень транскриптов был равен таковому показателю в условиях темноты.

Изучение величины содержания транскриптов гена цитоплазматического изофермента аконитатгидратазы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима показало, что анализируемый показатель изменяется в зависимости от состояния фитохромной системы. В темноте, уровень мРНК гена *ACO2* ниже, чем на свету.

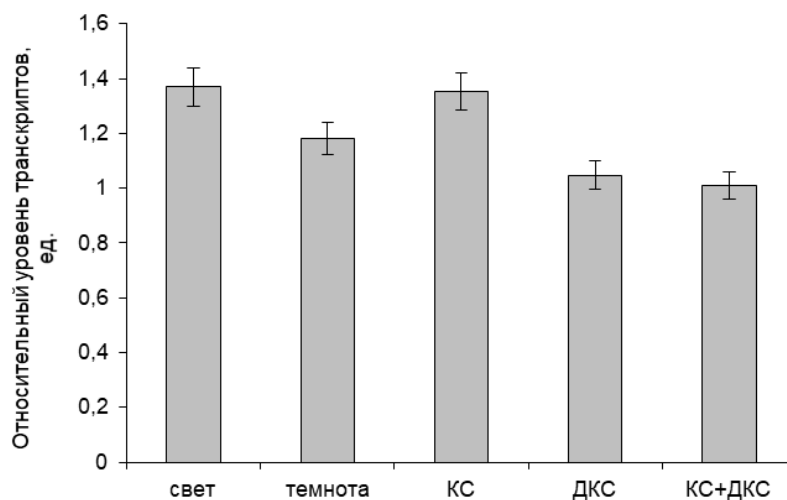


Рис. 34. Уровень транскриптов гена *ACO2* в листьях кукурузы при их облучении светом разной длины волны.

Увеличение транскрипционной активности гена *ACO2* в листьях кукурузы при облучении красным светом, вероятно, связано активацией цитозольной формы данного фермента, необходимого для протекания биосинтетических процессов. Ранее показано, что в условиях активно функционирующего фотосинтеза работа цикла трикарбоновых кислот претерпевает изменения и наблюдается отток цитрата из митохондрии в цитоплазму (Meyer *et al.*, 2011, Hanning, Heldt, 1993). Очевидно, на свету ЦТК может функционировать не замкнуто и поставлять углеродные скелеты для биосинтетических процессов [Igamberdiev, Gardeström, 2003, Fernie *et al.*, 2004]. Было высказано предположение, что цитрат является основным экспортируемым продуктом цикла Кребса в условиях фотосинтеза [Hanning, Heldt, 1993]. Обсуждение роли фитохрома в регуляции экспрессии этих ферментов представлено в обзоре Расмуссона и Эскобар (Rasmusson, Escobar, 2007).

#### 3.4.4 Экспрессия генов цитратсинтазы в листьях кукурузы в условиях различного светового режима

Изменение уровня транскриптов генов *CSY1* (кодирующего митохондриальную ЦС) и *CSY2* (кодирующего пероксисомную ЦС) было сходно с

картиной активности соответствующих форм. Инкубация растений на свету способствовала снижению экспрессии *CSY1* и к увеличению такого показателя для *CSY2*. Воздействие света разной длины волны на транскрипционную активность генов митохондриального и цитозольного изоферментов цитратсинтазы позволило выявить определенную зависимость.

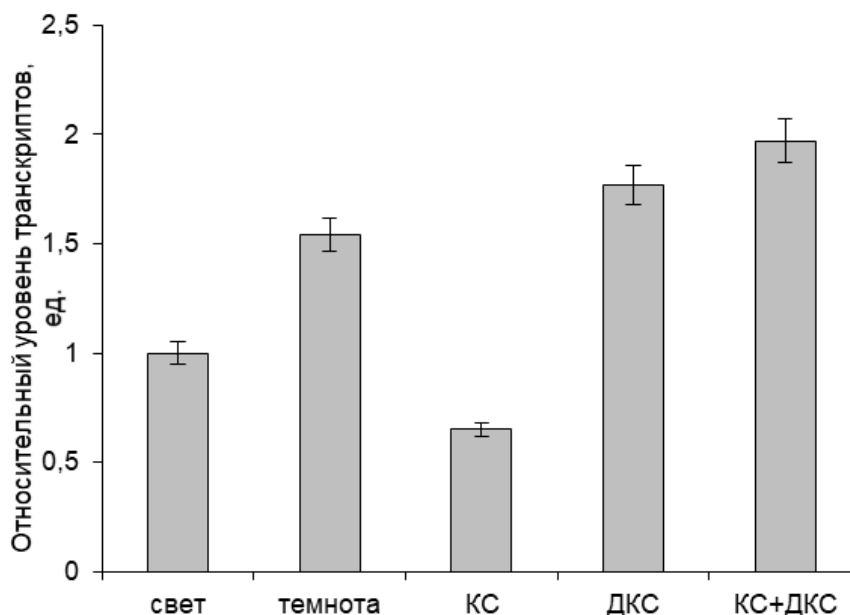


Рис. 35. Относительный уровень транскрипции гена *CSY1* в листьях кукурузы при разных световых режимах.

При облучении растений КС наблюдалось увеличение количества мРНК гена *CSY2* в листьях кукурузы, но в тоже время значительно снижался данный показатель для гена *CSY1* (митохондриальный изофермент). ДКС или последовательное воздействие КС и ДКС вызывали противоположное изменение уровня транскриптов генов изоферментов цитратсинтазы (рис. 35 и 36).

Результаты исследования влияния КС и ДКС на уровень транскриптов генов цитратсинтазы показали противоположную зависимость для митохондриального и пероксисомального изоферментов.

В растениях, подвергнутых световому переходу и, следовательно, механизму фитохром-зависимого регулирования, наблюдается подавление гена, кодирующего митохондриальную форму ЦС, белым или красным светом. В тоже время



транскрипция гена пероксисомальной формы ЦС активируется белым и красным светом (рис. 36). Выявленные изменения транскрипционной активности генов ЦС при облучении растений светом разной длины волны соответствуют изменениям активности изоферментов ЦС, локализованных в разных компартментах клетки. Противоположный механизм контроля экспрессии генов изоферментов ЦС обуславливает возможность реорганизации метаболических процессов клетки при изменении режима освещения растений.

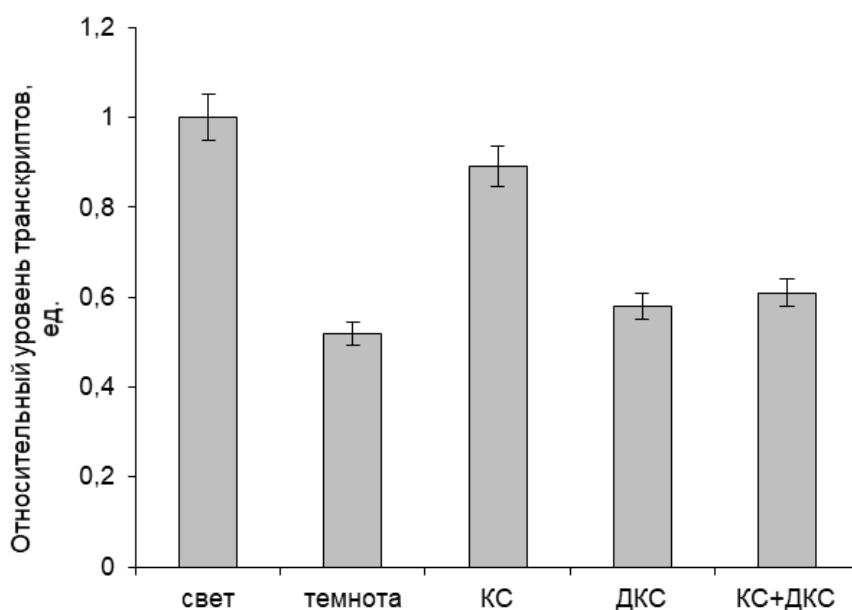


Рис. 36. Относительный уровень транскрипции гена *CSY2* в листьях кукурузы при разных световых режимах.

Ингибирование митохондриальной формы ЦС на свету может представлять собой один из ответных реакций метаболизма клетки, связанных с торможением дыхания на свету. Это согласуется с данными изменения активности и экспрессии генов митохондриальных изоферментов СДГ и АГ в соответствующих условиях освещения кукурузы и является общим механизмом экспрессионного контроля дыхательного метаболизма на уровне экспрессии энзимов ЦТК. Активация пероксисомальной формы на свету может быть связана с ее возможным участием в фотодыхательном обмене (Igamberdiev *et al.*, 2014).

### 3.5 Трансдукция светового сигнала

#### 3.5.1 Роль катионов кальция в трансдукции фоторецепторного сигнала в клетке

В реализации фитохромного сигнала чаще всего задействованы внутриклеточные и внутриядерные трансдукторы (Klose *et al.*, 2015, Oh, Montgomery, 2014). Поскольку фитохром имеет в большей степени цитозольную локализацию, а сигнал передается в ядро на молекулу ДНК, то возникает необходимость задействования 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 сигнальный механизм передачи фитохромного сигнала, где внутриклеточными посредниками являются  $\text{Ca}^{2+}$ , кальмодулин, цАМФ, G-белки и др. (Bowler *et al.*, 1994, Neuhaus *et al.*, 1997, Li *et al.*, 2011).

С целью определения механизмов внутриклеточной реализации фитохромного сигнала в растительной клетке, было проведено исследование содержания свободных катионов кальция в ядрах клеток. Полученные результаты указывают, что изменение концентрации свободных катионов кальция в ядрах листьев кукурузы зависит от состояния фитохромной системы, при этом активная форма фитохрома вызывает увеличение их содержания в ядрах клеток.

Выяснение механизмов изменения количества свободных катионов кальция в ядрах растений является актуальной задачей. Возможно несколько путей реализации данного явления. Изменение концентрации свободных катионов кальция может быть обусловлено его перераспределением между компартментами клетки (Echevarria *et al.*, 2003, Leite *et al.*, 2003), или высвобождением из кальциевых депо (Xiong *et al.*, 2004).

Установлено, что при воздействии на растения ДКС и темноты, наблюдается снижение количественных показателей содержания свободных

катионов кальция в ядрах листьев кукурузы. Облучение растений КС вызывало увеличение уровня катионов кальция в ядрах в 1,4 раза по сравнению с вариантом «темнота». Полученные результаты свидетельствуют о роли катионов кальция как внутриклеточного мессенджера фитохромного сигнала. Концентрационные колебания свободных катионов кальция в ядрах клеток являются фитохром-зависимым фактом, при этом увеличение их количества в ядрах клеток обусловлено формированием активной формы фитохрома при облучении растений красным светом.

Для исключения ошибок в измерениях концентраций катионов кальция в различных фракциях клетки, был проведен анализ перекрестного загрязнения на основе активности маркерных ферментов, соответствующих клеточных компартментов. Перекрестное загрязнение ядерной фракции контролировали определением активности алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы, для которых характерна цитозольная локализация. Установлено, что степень загрязнения ядерной фракции составила 6,4 и 6,1% соответственно, что учитывалось при определении содержания кальция в ядрах клеток растений при разных световых режимах (табл. 10).

Таблица 10.

Определение перекрестного загрязнения фракций ядер по маркерным ферментам цитоплазмы ( $n = 4$ ,  $p \leq 0,05$ )

Фермент	Гомогенат клеток		Фракция ядер	
	АДГ	ЛДГ	АДГ	ЛДГ
Активность, Е/мг белка	0,0210±0,0040	0,0180±0,0030	0,0014±0,0001	0,0011±0,0001
Загрязнение, %	100	100	6,4	6,1

Применение специфического ингибитора кальциевых каналов рутения красного показало, что при облучении растений кукурузы светом различной длины волны не приводит к концентрационным колебаниям содержания кальция

в их ядрах. В частности, при облучении растений КС, ДКС и при последовательном воздействии КС и ДКС изменения количества свободных катионов кальция в ядрах клеток листьев кукурузы были незначительными и находились в пределах статистической погрешности.

Кроме того, применение комплексона ЭГТА для связывания свободного кальция также показало аналогичные результаты, как и с рутением красным. Значительных изменений содержания свободных катионов кальция в ядрах листьев кукурузы при их облучении красным и дальним красным светом в разных сочетаниях не обнаружено. Во всех анализируемых вариантах светового режима количество катионов кальция составляло 1,24-1,26 мМ/г сырой массы, что соответствовало значениям варианта «темнота» (рис. 37).

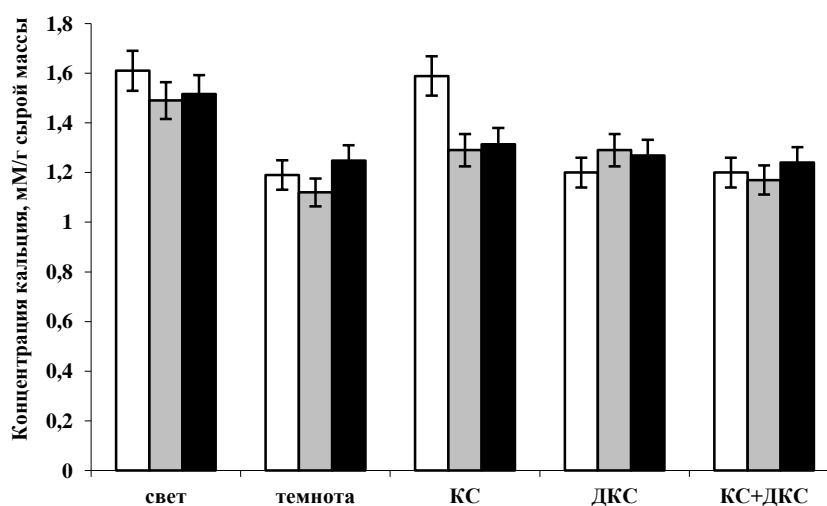


Рис. 37. Влияние светового режима на содержание кальция в ядрах зеленых листьев кукурузы в норме (белые столбцы), в присутствии рутения красного (серые столбцы) и в присутствии ЭГТА (черные столбцы).

Результаты проведенных исследований с рутением красным и ЭГТА показали, что изменение содержания свободного кальция в ядрах клеток листьев кукурузы связано с его перераспределением между компартментами клетки, в частности с переносом ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы в ядро, при изменении светового режима, являющегося одним из ключевых факторов регуляции метаболизма

растительной клетки. Ранее было установлено, что облучение растений *A. thaliana* и кукурузы красным светом изменяет работу генетического аппарата клетки, что выражается в ингибировании скорости транскрипции генов энзимов дыхательного метаболизма (Porov *et al.*, 2010, Епринцев *и др.*, 2012).

Такой механизм регуляции осуществляется посредством фитохромной системы, где в качестве вторичного мессенджера сигнала выступают свободные катионы кальция (Kim *et al.*, 2009, Kreslavski *et al.*, 2012). Регуляция количества транскриптов гена флавопротеина СДГ в листьях кукурузы было показано ранее при этом, вероятно, изменение внутриклеточного количества свободных катионов кальция является одним из механизмов контроля скорости транскрипции светозависимых генов СДГ-комплекса (Епринцев *и др.*, 2012).

Увеличение концентрации кальция в ядрах в ответ на облучение растений КС, приводит к запуску каскадных механизмов фитохром-зависимой регуляции экспрессии генов посредством внутриядерных трансдукторов сигнала.

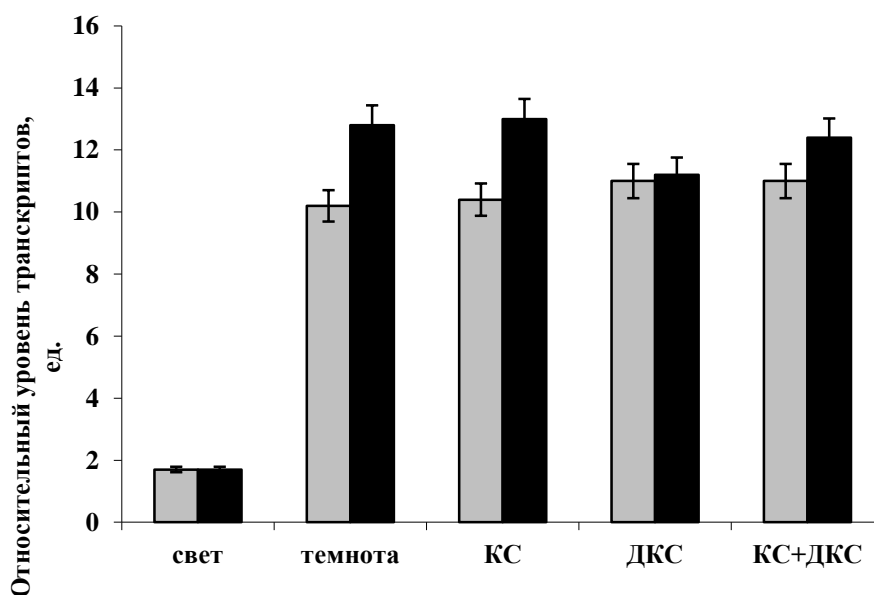


Рис. 38. Экспрессия гена *SDHI-2* в присутствии рутения красного (серые столбцы) и ЭГТА (штрихованные столбцы) при облучении растений кукурузы светом разной длины волны.

Результаты исследований по изменению содержания транскриптов гена *SDH1-2* флавопротеина СДГ в листьях кукурузы в условиях различного светового режима показали, что в присутствии рутения красного и ЭГТА не обнаружено изменения содержания транскриптов анализируемого гена относительно варианта «темнота» (рис. 38).

Изучение изменения количества транскриптов гена субъединицы В сукцинатдегидрогеназы в присутствии специфического ингибитора кальциевых каналов (рутений красный) указывает на отсутствие вариабельность анализируемого показателя при облучении растений кукурузы светом разной длины волны (рис. 39). Во всех вариантах воздействия светового режима на растения установлено, что количество мРНК исследуемого гена было равное или выше такового показателя варианта «темнота».

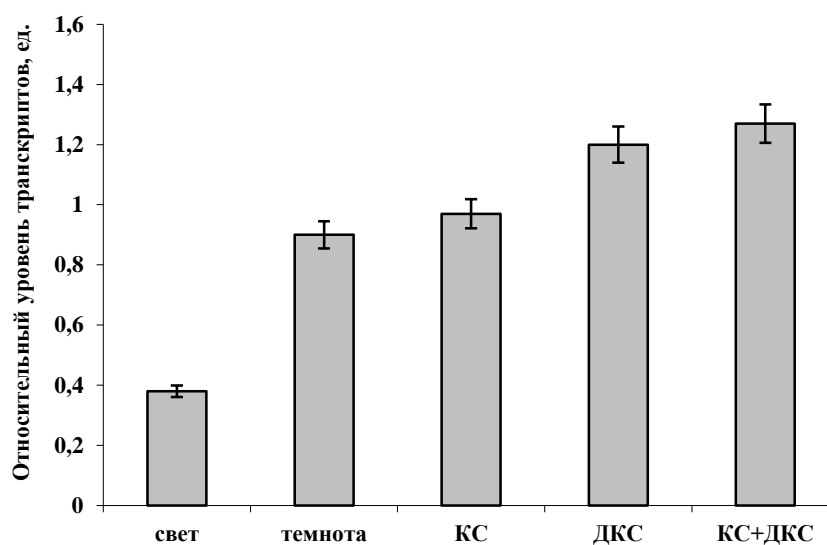


Рис. 39. Экспрессия гена *SDH2-3* в присутствии рутения красного при облучении листьев кукурузы светом разной длины волны.

В присутствии рутения красного у растений при разных типах облучения растений также не выявлено изменения в количестве мРНК гена *SDH2-3* железосерной субъединицы СДГ. Блокирование мембранного транспорта кальция не

приводит к изменению содержания последнего в ядрах клеток, что, в свою очередь, не влияет на уровень транскриптов исследуемого гена.

Полученные результаты указывают на важную роль свободных катионов кальция во внутриклеточной трансдукции фитохромного сигнала. Применение специфического ингибитора кальциевых каналов позволило установить механизм изменения концентрации кальция в ядре клетки. Данный эффект связан с перераспределением кальция между компартментами клетки, в частности, между цитоплазмой и ядром, вероятно, путем его закачки из цитоплазмы посредством кальциевых каналов.

Аналогичные исследования были проведены для гена *sdh2-3* железо-серной субъединицы СДГ. Присутствие ЭГТА в клетках растений не влияет на экспрессию исследуемого гена во всех вариантах светового режима растений (рис. 40).

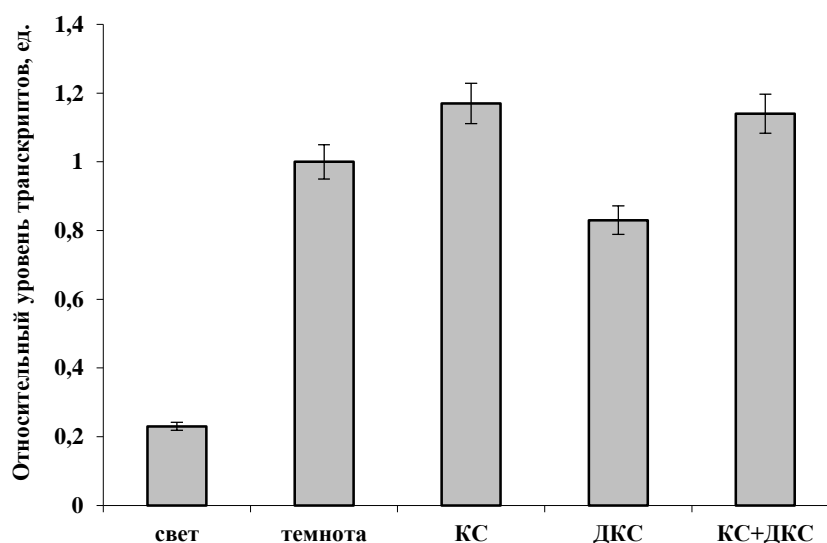


Рис. 40. Уровень экспрессии гена *SDH2-3* в норме и в присутствии ЭГТА при облучении растений кукурузы светом разной длины волны.

Показано, что при облучении растений красным светом в присутствии комплекса ЭГТА не наблюдалось значительных изменений содержания транскриптов гена *SDH2-3* относительно варианта «темнота». Облучение растений ДКС привело к аналогичным результатам по содержанию транскриптов

исследуемых генов. Относительный уровень мРНК гена железо-серной субъединицы после облучения растений КС был близок к таковому показателю варианта «темнота».

Аналогичные результаты были получены для гена *SDH2-3* в листьях кукурузы при последовательном облучении растений красным и дальним красным светом в присутствии ЭГТА. Сочетанное действие красного и дальнего красного света не приводило к изменению содержания транскриптов исследуемого гена в листьях исследуемых растений относительно темнового варианта. На основании полученных данных можно заключить, что отсутствие концентрационных колебаний свободных катионов кальция в ядрах клеток растений не приводит к изменению в работе светозависимых генов, в частности *SDH1-2* и *SDH2-3* (рис. 38-40).

Проведенные 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. Вероятно, катионы кальция играют значительную роль в трансдукции фитохромного сигнала, модулируя различные механизмы регуляции экспрессии генетического материала клетки (Eprintsev *et al.*, 2013, Galon *et al.*, 2010).

### 3.5.2 Экспрессия факторов PIF в условиях разного светового режима

Состояние фитохромной системы может контролировать внутриклеточное перераспределение свободных катионов кальция, что является одним из механизмов регуляции экспрессии генов. Концентрационные колебания  $Ca^{2+}$  в ядрах растительных клеток вызывают изменения в функционировании  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназы и фосфатазы, осуществляющих контроль взаимодействия ДНК с транскрипционными факторами и регуляцию экспрессии генов (Galon *et al.*, 2010, Eprintsev *et al.*, 2013).



Взаимодействие между фитохромами и PIF необходимо для светозависимого фосфорилирования последнего, потому что мутанты *pif1* и *pif3*, у которых нарушено взаимодействие с фитохромами А и В, не подвергаются свет-зависимому фосфорилированию. В темноте происходит быстрое восстановление пула PIF-факторов, которые способны реализовывать фитохромные сигналы, что приводит к их разрушению. Все это указывает на динамичность PIF в ядрах клеток, и данный процесс находится под контролем фитохрома. Таким образом, фитохром-индуцированное фосфорилирование и протеолиз PIF могут представлять основной биохимический механизм передачи фитохромного сигнала в ядре, обеспечивая регуляцию экспрессии генов (Lau, Deng, 2010).

С целью выявления участия фактора PIF3 в регуляции скорости экспрессии генов СДГ была проведена количественная оценка относительного уровня транскриптов гена *PIF3* в листьях кукурузы при изменении светового режима растений. Результаты исследования показали, что мРНК гена *PIF3* имеет определенную зависимость от состояния фитохромной системы. Облучение растений красным светом приводило к увеличению содержания транскриптов *PIF3*, как и в растениях, экспонируемых на свету. Однако, при облучении листьев кукурузы дальним красным светом и последовательным облучением красным и дальним красным светом концентрация транскриптов исследуемого гена снижалась на 30-35% (рис. 41).

На основании результатов исследования экспрессии *PIF3* можно заключить, что транскрипционный фактор PIF3 выполняет роль внутриядерного посредника фитохромного сигнала в растительной клетке. Активная форма фитохрома вызывает увеличение количества транскриптов гена *PIF3*, что в свою очередь имеет определенную корреляцию с интенсивностью работы генов *SDH1-2* и *SDH2-3*. Фитохром-зависимая деградация белков PIF3 приводит к снижению транскрипционной активности генов каталитического димера СДГ в листьях кукурузы.

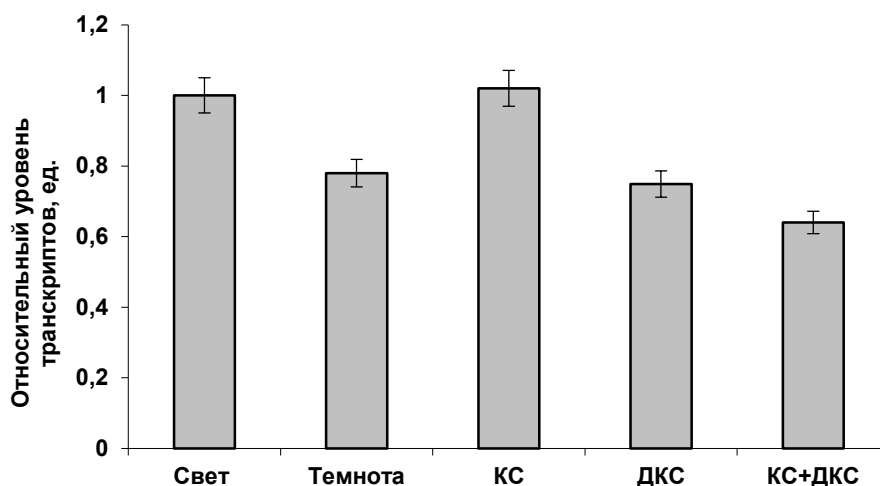


Рис. 41. Относительный уровень транскрипции фактора *PIF3* в листьях кукурузы при разных световых режимах.

Установленное нами увеличение содержания свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в ядре, при облучении растений красным светом, вызывает увеличение содержания транскриптов гена транскрипционного фактора *PIF3* (Lorrain *et al.*, 2006), следовательно, именно фитохром А контролирует экспрессию гена *PIF3*. Активная форма фитохрома А стимулирует транспорт катионов кальция в ядро, что вызывает активацию гена *Pif3*, необходимую для компенсации пула данного фактора, который подвергается фосфорилированию и последующей деградации в данных условиях. Снижение фактора *PIF3* в клетке вызывает снижение количественных показателей транскриптов генов *SDH1-2* и *SDH2-3* каталитического димера СДГ. Свое действие *PIF3* проявляет благодаря специфическому сайту связывания (G-участку) (Oh *et al.*, 2009, Martínez-García *et al.*, 2000). Исследование нуклеотидной последовательности промоторов генов каталитического димера СДГ позволило выявить в их составе специфических участков связывания факторов *PIF*, что свидетельствует о возможности регуляции уровня их транскрипции за счет взаимодействия с *PIF3* (Shin *et al.*, 2007, Hornitschek *et al.*, 2009).

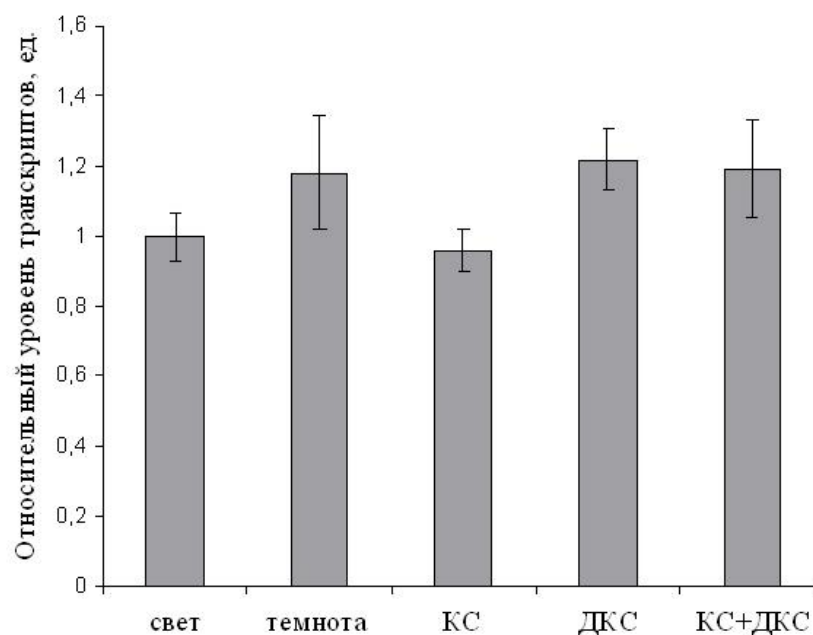


Рис. 42. Относительный уровень экспрессии фактора *PIF1* в листьях кукурузы при разных световых режимах.

При этом, для генов *SDH3* и *SDH4* не обнаружено наличия специфического G-участка в составе их промоторов, что исключает возможность взаимодействия фактора PIF3 с ними. Данные гены СДГ не проявляют фитохром-зависимости, что, вероятно, обусловлено отсутствием в составе их промотора центра связывания фитохром-зависимого транскрипционного фактора PIF.

С целью выяснения процессов внутриядерной трансдукции фитохромных сигналов, нами было проведено исследование зависимости скорости экспрессии фактора PIF1, от состояния фитохромной системы, как потенциального агента в механизмах регуляции функционирования исследуемых генов (Lau, Deng, 2010).

Анализ уровня экспрессии гена *Pif1* в зеленых листьях кукурузы показал незначительные колебания количества его продукта, наблюдаемые при изменении светового режима (рис. 42), что свидетельствует о его пассивности в трансдукции фитохромного сигнала в клетках листе кукурузы. Из всех исследованных на сегодняшний момент транскрипционных факторов семейства PIF, наибольшее сродством к фитохромам имеет PIF1, но при этом, степень взаимодействия между ними в значительной степени зависит от светового режима, качества и количества

поступаемого света на растение. Основным фактором деградации PIF1 на свету является фитохром А, проявляющий свое действие даже при импульсном облучении. Однако, фитохромы В и D также вызывают разрушение фактора PIF1 при облучении растений светом, но данный эффект наблюдается только при длительном действии света (Imaizumi *et al.*, 2000).

PIF1 быстро фосфорилируется и убиквитинируется под действием красного и дальнего красного света, соответственно. Скорость деградации данного транскрипционного фактора происходит очень быстро, в частности, период полураспада составляет от 1 до 2 минут при облучении красным светом (Loggins *et al.*, 2006).

Данный транскрипционный фактор имеет широкий профиль взаимодействий с разными фитохромами. Он способен взаимодействовать как с фитохромом В, при этом сохраняется активным ФитВ-связывающая последовательность, он взаимодействует с ФитА через дополнительный ФитА-связывающую область. Взаимодействие с фитохромом является необходимым, но не достаточным для светоиндуцированного фосфорилирования и разрушения PIF1.

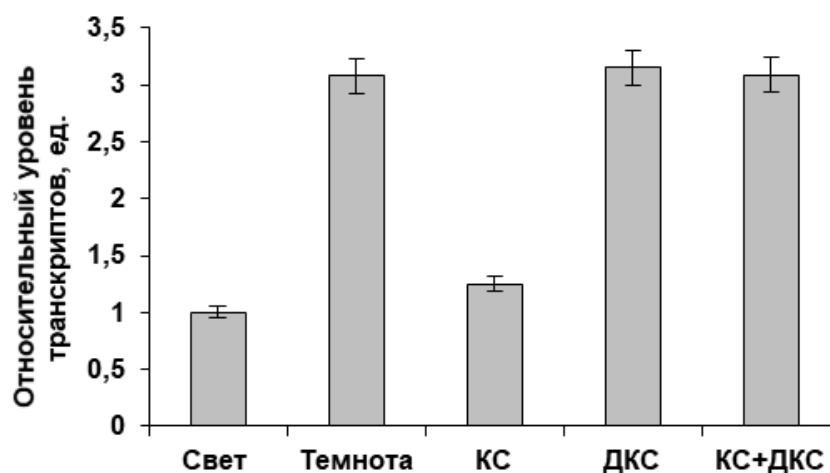


Рис. 43. Относительный уровень экспрессии фактора *PIF4* в листьях кукурузы при разных световых режимах.

Результаты исследования показали, что PIF4 не участвует в фитохром А-зависимом регуляторном эффекте, обеспечивающем реализацию сигнала в клетке,

поскольку не наблюдается увеличения концентрации транскриптов его гена в клетке при наличии активной формы фитохрома. В пробах «свет» и «КС» экспрессия фактора снижена в сравнении с остальными пробами. Это даёт основания предполагать, что этот фактор не активируется в ответ на накопление в клетке активной формы фитохрома при облучении растений красным светом (рис. 43). Однако, он может принимать важную роль в активации транскрипционных процессов клетки в темноте, в частности, PIF4 играет важную роль в контроле содержания свободных светозависимых микроРНК, например, miR165a (Zhang *et al.*, 2020).

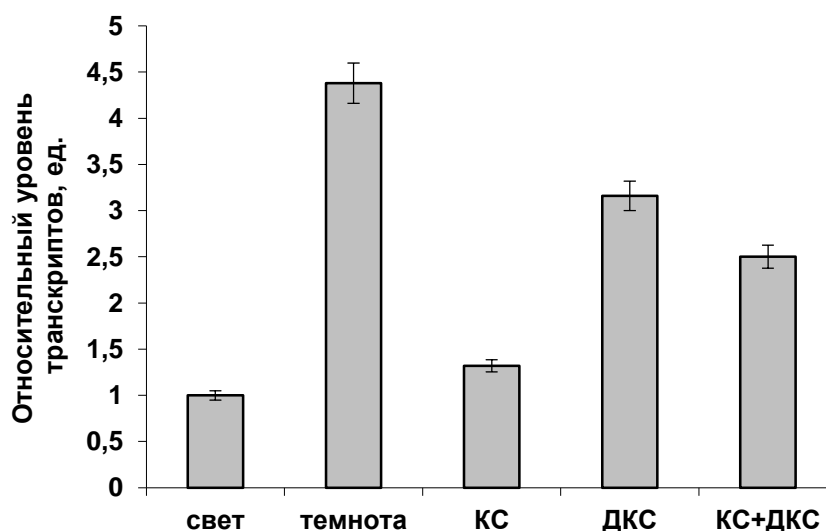


Рис. 44. Относительный уровень транскриптов гена *PIF5* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Показано, что уровень транскриптов факторов PIF5 и PIF6 зависит от состояния фитохромной системы (рис. 44). Высокое содержание транскриптов PIF5 в темноте обусловлено его накоплением в темновой период в результате диссоциации комплекса фитохром В-фактор PIF5, необходимым для перехода растений к фотосинтетической активности после длительного пребывания в темноте. Показано, что содержание транскрипционного фактора PIF6 также

проявляет зависимость от состояния фитохромной системы (рис. 45), что обусловлено регуляцией суточного цикла растений (Shen *et al.*, 2007).

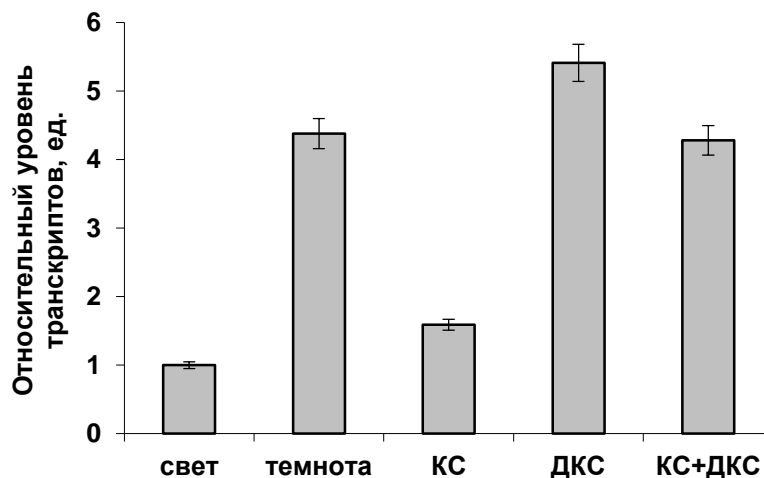


Рис. 45. Относительный уровень транскриптов гена *PIF6* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

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 из всех проанализированных в нашей работе факторов семейства PIF, основным посредником во внутриядерной передаче фитохромного сигнала выступает транскрипционный фактор PIF3, обеспечивающего трансдукция сигнала от фитохрома А. Однако, анализ транскрипционной активности генов *PIF4*, *PIF5*, *PIF6* свидетельствует об их накоплении в темновой период, что необходимо для правильной организации фотопериодичности растений.

Таким образом, в ходе исследования выяснено, что внутриклеточное перераспределение кальция зависит от состояния фитохромной системы. Кальций, выполняя функцию вторичного мессенджера фитохромного сигнала, активирует внутриядерные факторы транскрипции благодаря киназам (Poovaiah, Reddy, 1993). Выявлено, что каскадный механизм фитохром-зависимой регуляции генов СДГ, ЦС и АГ обеспечивает транскрипционный фактор PIF3, поскольку его накопление

вызвано образованием активной формы фитохрома в растительной клетке в ответ на ее облучение красным светом. Возможность данного механизма регуляции генов исследуемых изоферментов обусловлена наличием в составе их промоторов специфических участков, рецептируемых фактором PIF3.

GACGCGTCGACATGGGAAGCAGAGAAGGAGAGCTTGTGCGGGGAAGAAGACGATACATGTGACAGAGCAGGAGATGTCATATATGCTTAATTTTCGATТАCTGA CACGTGACTGTGCGAAAATAAСТТАТТТТТАGCGGGTACATACCAGCCACCGAAATТААТТГАТТТТТТТTCGCCCGCTAGAAAAATТААСТААТТТТТCCGACGATCTATACGTTAGGGTTCGAAAATAAСТTCGATТАТТТТGGGTGCTGAAATTTAGGTTGGCCGCTCAAA GTTGTТТТGATGCAGTGAАСТGTCTAGCTGAGGCCСТААГААТАГАААGACATGACAAAGTCTCTGAGTATТАGТТТGAGAGTCATAAAACCGGAGTAGATТАGAGTGACTAGAATCCTCTТААТТАТТCAAAAТТАGCTCAAАСТGGTCTААТCGGACATCGATAACGGATGGGGTCACGCTGCCACAACGCTGGTGCCTCAGCAAAGGAGCAATGGCACGTAGGGGATGТТТТGTGCCGCTATCATCTCTCGTTCGTGGCCGTTCCACTCTCCACTCATCAAAAAGAAGAGTTCCCTCACGACAAGGAACGAACCAAGAAACCCAAGCCACCCACCCACCGTGAATТААТGCATACACATCAGGGAAGGATAAAAATTTCTACTTTATCTACCTTTTCCCCTCAAGATAAAAATТАТТGTTCCAT CAACTGGACAAGTCATCTGCGAACAAGATGTGGCTTGATGGCCAACCAААТGTGTGCAGGAAAAAAAAATТGTCAAAAAGCTTGТAAAACCTGACGTСACAGCAAAGTTAAAAATCATCATCATCATCATCATATAAAAACGAAАСТААТGCAAACAАААCAAGAAACGAAGAAATCATCAATCAA CAACAАААGAAAAAAAAAGGAAAGAGCAGTGGCGCAAGAATCTTCAAААТCCGAAGGGCAAAAATGGTCCCATGAAAAGCCCTACTTTGCCCGAGAATAAACAAAACGACCTCCTCCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCTGCCCGTCCGGCGTТGТТТTCGTCTCCACCGCCGCTCTCCTCTCCAGTCTCCCACCACCGCTCGTCTCCCCGTACCGCCCGCAACCCCCCTCCCCTGCGAGATCCGGGGCGCGATG

Рис. 46. Нуклеотидная последовательность промотора гена *SDH1-2* кукурузы с указанием положения G-участка (выделено серым с подчаркиванием) и E-участков (выделено серым) связывания фактора PIF и стартовым кодоном (выделено подчеркиванием).

TATGCATAGCAGGTTGCACTTGTACGGTTCCTATATCAAАСТGGTTGGCCGGAGGATACCTACTCCCTATGAAGTCTGAACTCGAGATGAGATGCCACTAGAGCAGTAGCTAGAAGAACAАСТGGGCTCAGTGGCTACGCTTCTGCATGCATATТАGACTCAAСТGACGAGCAGGTTTTACTACTAGAAGCCGGTGAACGACGACGATGGCCTCAGCTTCACTCGCCGCCAGCATTTGCAATAAAAACAACGAAGTTCCCTGGCACACGCGGTGA AАCСACTGGTCCAGCAGCAGTACATGTG CAGCTCTGTTAGTCAGTGGTTAAATAGTCGCAGCAAATCCAAGCCTACGCCGGCGCGGCCACGGCTAACTAATCAGGCGTGCGCTCTGAAGTTTACTCCTGCTGACGTCCGGTGCAGGAGATGCTGACGAGACACGGGGCTCGTCTCGTCAAAGTTTTACATGATGGAATACCGAATACACAATACAATA

CGCGGCTCGCGCTTTCCTCCGCGTCCCTGTTCATCTCAAGTTCAGCGCCAACCCGG  
 CGCGGACGCGTGAAAATTCCTTCTAGAACAGCACGACCTGTGCCGATAGCAACGG  
 TGGTCAATGGTCGCCGGGGAGGGGAGCGCCCCCTTTCCTCTGCCCTTCCCTCGG  
 AGGGGAGCCGGCGTGGGATCTGTCTGGCTTTCCTCCCGGCCGGTTCCTTTTTTACGT  
 CGGATAGGATAGGAGATCGAAACCTGCTGCCGCTTTCAGCTAGTAACTTGAGTTCG  
 ATTGTTTTCTCAGCTCCATGAAACGGCCCACGACAGCCCATGATTGTTGCCTGTTT  
 TCAGTTCCAAAAACAAAAATCGCAAAAAACAAAAAACAACGCTATGGGCCGAGC  
 CGACTGCTGCCTCGCATCGCTCCACCGTTCGCGCCATCCCGGCCGTGCCGCGGCAGA  
 CGTGTGACAGAGCTGGCACGTGCCGTGCGGGGCGCATCCTTATAACTCACTTC  
 CTTCCCTCGCCACTCGCCAGCCACTCTCTCAGGCTCTCTGCAAGCGAGCAGGATG

Рис. 47. Нуклеотидная последовательность промотора гена *SDH2-3* кукурузы с указанием положения G-участка (выделено серым с подчаркиванием) и E-участков (выделено серым) связывания фактора PIF и стартовым кодоном (выделено подчеркиванием).

Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов *SDH1-2* и *SDH2-3* кукурузы показал, что в их составе обнаруживаются специфические участки связывания (E-участки) для транскрипционных факторов PIF. PIF напрямую связываются со специфическими последовательностями - G-участками и E-участками (CANNTG) в промоторах их генов-мишеней. При этом показано, что транскрипционный фактор PIF3 обеспечивает взаимодействие как с G-участками, являющимися приоритетными (Martinez-Garcia *et al.*, 2000), так и E-участками, входящими в состав промоторов регулируемых генов (Jiang *et al.*, 2017). Наличие данного участка в составе промоторов исследуемых генов указывает на возможность регуляции их работы на уровне изменения сродства РНК-полимеразы к промотору этих генов. Каскадный механизм внутриклеточной трансдукции фитохромного сигнала приводит к модуляции PIF3, который является посредником фитохромного сигнала в ядре растительной клетки, обеспечивая регуляцию генов *SDH1-2* и *SDH2-3* (рис. 49 и 47). Фосфорилированная форма транскрипционного фактора PIF3 разрушается и теряет связь с E-участками промоторов генов *SDH1-2*



и *SDH2-3*, что снижает уровень их транскрипции за счет уменьшения сродства РНК-полимеразы.

Важно отметить, что в промоторах генов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназ (С и D субъединицы) также обнаружены специфические E-участки. Вероятно, отсутствие фитохром-зависимого эффекта на содержание транскриптов данных генов в различных световых режимах обусловлено иными механизмами контроля, не связанными с действием PIF3, для которого важным является наличие G-участка.

Следовательно, активация фитохрома приводит к перераспределению катионов кальция между цитозолем и ядром. Увеличение содержания  $Ca^{2+}$  в ядре приводит к индуцированию определенных механизмов регуляции внутриядерных транскрипционных факторов, вероятно, путем их фосфорилирования киназами и фосфатазами. Активная форма фитохрома А вызывает увеличение транскриптов гена *PIF3* для восстановления пула белков данного фактора. При этом противоположное действие вызывает облучение растений ДКС. Фосфорилированная форма фитохром-зависимого транскрипционного фактора связывается с E-участками промоторов генов *SDH1-2* и *SDH2-3* и снижает уровень их транскриптов в растительной клетке.

Применение методов биоинформатики позволило провести анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов цитратсинтазы и аконитатгидратазы. Результаты поиска в анализируемых последовательностях специфичных к факторам семейства PIF участков свидетельствуют, что в составе промоторов генов *CSY1* и *CSY2* данные элементы обнаружены (рис. 48 и 49). Наличие E-участков в составе исследуемых промоторов подтверждают полученные данные об их фитохром-зависимой регуляции.

TTTTTCCATGAAAAGTGTGAAGCCGTCTCACTTTCTAGGTGGCAAAGTGTGACC  
TAGСТАССАААТТСАААТСАТТАССТАСАГАТТАТТСАГАТСААССТТТСТАААС  
ААССАГАТСАТГТГТТТГСТСАСГАГАГССААААССГАТГСССТТТТСТТТТ  
ТТГТГГААТСГАААТАТГГААГАГГТАСГСГТТГСАТСАГАТТТТГТТТТТААТТ  
ТГСАГТТГТГТГТТСАГТГТТСТАТТСТТСАТТТТАСАТАТТААТТТТГТГАС

TACAGCCCTGAAGCGCCTTTCCATCCATGTATAAAATCCCATATTACGGAGGACT  
 GAAAGGGGTGACATTCATATATATATATATATATATATGGCTGGAGCTTAAAAGTCC  
 AATCTGTGTTCTTTTCTACCTCTTTCGGTCTCCGCTGAGACTTGAAACAGCCTTT  
 CATGGATGTACTGAAGAGAAAAAGAACCTTTTGTACCATAAGATAGTAGAACAGA  
 ATTGGTGTCTCAGGTATCTTTGCCCCACCGTCTCCAGTATCTCAAAAATCCAACG  
 CATAACTCACAAAAATGACCATAATATGGTTTGAACCGTTTGTTTACAAATTTGG  
 ATATGCCATTTTCGATTTTCAGATTTCTTCAAAGTTCTGAGTCTCAAATTTGGCAA  
 AAGTTGAAGTTAATGGGGGCCATGTGCATGTGTCCGGGTCCGGCATCTGGAAATG  
 GAATGGTACTCCAATATATATTTCCGGCTCGCCCCCTACCAACCGGTGGAGGACGAC  
 GACCGGTCCCATTTCCCCCGCCCCAACTTGTCAAGACTCAAGAGGCTCCCCTCCT  
 CCCTCGCCGCGGAACACGCGCGCCGTCTGTCGCCAGCCGGGTTTCAATTTCTCCGTT  
 CCTTGGTAAGCAAGTCTAGGCCTAATGTTTCGTTTTATTCGCTGGGATTGGGATCT  
 CTTCCCATCGCGAGCCCTCGAATCCAGCCTCATCTTCGCTCCGATCTGCCCC  
 CGCTCAGCCGCGGATTTCTTTCGCTGCGTGGTGGGACGGAGCCGAGTAGTAATTAT  
 CCGTTTGCTTCCCCTAATTTCTTCTCTGGGGTCTCGGTCAAATTCGGCTGCGGCG  
 GTGACCTGATGGGATCCTCTATTTGTTTGGTTGCTGTGTCTGTGCAGGTGCGGTG  
 GTAGCCGAGCGCTCCGGCCATG

Рис. 48. Нуклеотидная последовательность промотора гена *CSY1* кукурузы с указанием положения E-участка (выделено серым) связывания фактора PIF и стартовым кодоном (выделено подчеркиванием).

CTGGTAAGCACATCCATAATTATAATAAAAGTCATAGGAGACAAAAAGTCACTTT  
 GTCTCATACCCCTCAGTCCCAACGTGTGGAAATTTAGGGACTTAATTAGACTAAA  
 AAAAAAATAATCTTTAGTGCTGTTGGGGTCACTCCAAAAATTTCACTTTGGT  
 TTTACAGTTTCACTATAAAACAATTTCAACAAAAACATTAAGGTGAGTTCGAAGA  
 GTGTTTTGTTTGTACATGGACTCTAGCTTCTGTAATACAATAAATTTGTGTGAAT  
 TTTTLAGATTACCTTTAATAATTAGTAGGCTGTCACAAGAGAATCGAAGTAGTAT  
 GTTGTGTAACCGGTGGTATGGTGATTAATTTTTGTGTAACCTTCATGATGATATAT  
 GAAAATAGTGTTTGTGAAGTACCTCTTGAGGAGCATCGCGACCTGTTTGAATAGA  
 AGAAAATGAAATGAATCCGAAATTTCTTAGTCTCCCAAAGAGGCGCTAAATATGTA  
 TATGTGATTTCAATCAATTTCTGGCATAAAAAAATTTGTGTGCATTTTGAATGCAA  
 ATATACTCCATTGTACCTCTCATATCTATTACTTAGAGGCCCATAAAAATAGAAG  
 AAAAACAAATTAATAAAATGTTAAGTTACTAATTTCCATCTATTTTGTGAGCCTC  
 AACATAGTAACATAGTGGATACGCTGCAAAGCAGCCTTTGCATCGGGATGTACAA  
 TTTTTTTTTTCCCTCTAGGACCTGTATATATTCATGTCCCGAGAACTTGTCAAGC  
 TCTCTTCCCTCCCTCGCCGCGGAACACGCGCCCCGTCTCGCCCGCCCGTGTTCAT  
 CTCTCCATTCATACCTTGGTAAGCAATTTAGACGTAATCGTTCGTTTTCATTCG  
 CTGGGATTGGGATCTCTTCTCTCATCGCGAGCCCTCGAATCCAACCCAGATTTCG

TCTCTAATCTGCCCTCCCCGCTCTGTCTGGACTGTCTCGGATTCGTTTCGCTGCGTG  
 GCGGGGCGGAGCCGATTAGTAACTATCCATTTGCTTCCCGTAGTTTTCCTCTGGGA  
 GTTTCGGTTAAATTCGGTTGTGGTGAGGACATGATGGGATCGTCTGTGTTTGTGTTG  
 TTCCTGTGTCTGTGCAGCAGTGCAGGTGCGGTGGTAGCCGAGCGCTCCGGCCATG

Рис. 49. Нуклеотидная последовательность промотора гена *CSY2* кукурузы с указанием положения E-участков (выделено серым) связывания фактора PIF и стартовым кодоном (выделено подчеркиванием).

Изучение структуры промоторов генов *ACO1* и *ACO2* выявило, что в их составе отсутствуют последовательности, характерные для E-участков связывания факторов PIF, но присутствуют G-участки. Данные по изменению уровня транскриптов этих генов показывают зависимость от режима освещения и регулируются фитохромной системой. Вероятно, в данном случае важную роль в регуляции функционирования генов АГ играют PIF-зависимые механизмы, обусловленные действие именно PIF3. Понимание механизмов взаимодействия промоторов генов-мишеней с транскрипционными факторами семейств спираль-петля-спираль (bHLH) и базовой лейциновой застежки (bZIP) значительно расширились, и, как показано в настоящее время, семейство bHLH является вторым по величине семейством транскрипционных факторов в растениях (Carretero-Paulet *et al.*, 2010). По меньшей мере, 80 представителей из семейства bHLH имеют точный аминокислотный состав в своем ДНК-связывающем домене, необходимый для связывания с элементами G-box (Heim *et al.*, 2003, Carretero-Paulet *et al.*, 2010). При этом, многие представители семейства bHLH могут связываться с элементами E-box, которые сохраняют четыре нуклеотида, характерные для G-box (ACGT или CANNTG). Семейство bZIP также расширилось с четырех генов-основателей до более чем 70 (Correa *et al.*, 2008). Даже не-G-box-связывающие представители bHLH и другие факторы HLH могут косвенно регулировать G-box-регулируемые гены, конкурируя с G-box-связывающими факторами bHLH (Нао *et al.*, 2012, Oh *et al.*, 2014). Кроме того, bZIP и bHLH могут действовать антагонистически, конкурируя за связывание с одними и теми же сайтами,

например, за конкуренцию связывания с мишенями, общими для фактора bHLH3 (PIF3) и фактора bZIP (HY5) (Toledo-Ortiz *et al.*, 2014).

Поиск соответствующих дополнительных элементов (E-участков) в составе промоторов генов аконитатгидратазы показал их наличие (рис. 50 и 51). Следовательно, регуляция экспрессии генов *ACO1* и *ACO2* осуществляется за счет фитохром-зависимых факторов транскрипции, взаимодействующих с E-элементами промотора.

АТАССТТТТGAGTCAТТАAGATTGCAAGAATTGTCTTAGATТТТGGTТАGТАТАТ  
 TAGАСАСТТТТGTАТАТGAAACCАТСТGAAATAAAGАТАТТАТТGAAGTCGTТТА  
 GАСТАТАAGAATTGTCTTAGATGTТАGТGAGТАТАТТАGАСАТТТСТAAATATAA  
 ААТТАТСТТСАТАТGАТАТТТСТААТТАGАСАТАТТGTGAAAAAATGTAGТAAAT  
 ААТGAАТТСААСТТАСТТТGATGАТАТАТСТСТТCAGТТТТТТАAAACАТGAАТ  
 ССТССТСССТССАСАТТАAGGCTACCGCАСТСАТGGAAACCСТАААТТТСТАСТСТ  
 AAAAGGAАТАТТТСАТССТGGTCAGCGAGАТТСТСТАСТСТАТССТААТАСТС  
 CGCGТТСАТАТТCACССТАААТАТСТАСССТАТАТСААСТАССАСАТАТТТТАТС  
 АТТТТТТСССАСАСТТТТТТАТСТССАСССАССААТСТССТТССAGCACCAGТСТ  
 ССТGCCAGCACCСGGTAGAGCАССТGTСGCCGAAGAGAGGТТТТАСAGTAGCAGТ  
 TGCАТGCACCСТАGAAATAGAGТТСТGCGТТССССАССТТТАGАТАGAGTAGCAG  
 AAACAGТCACCGCTGCAGCTGAGАТТТТАСТGCАТАТGAAGCTСТАТАТССАТАG  
 CGCACCСGGTAGAGCTСТТCGGTGCGGGCAACСТАACGТТТGGCGCGTACGASTA  
 СACCАСАТCGTGCTGACGTGTGAAAАТТТАТТТАТСАТТТТСТТТТТАТGTCTТС  
 АСТТТСТСТССТGACCACGAGCCСТСАСТАGAGACTACCССТCGACCСGАТТCGG  
 ТТТGGACCСAATAAAAAAAGАТСТТТААТАТТТCGTGTCCСТТТGTТТСТСТССТ  
 CAGCTGAGCCTGCGCCTGTACTCTGATGGGCCAACCCASTAACGТТCAGCGGCAG  
 AGCCCGТТАТТТСССАСТТCAGCGCCCAСACTTGCGCCGCGGCAGCAGAACACC  
 ТТCCTGACCСGAАТТCAАТCCGTGCGCAGGCACCСТCCGCCGGCGATGGCTCACG  
 САТCGCTCGGCGCCСGCCCCACGTCCCCGAGGCGACGACCGGCACAACGCGCCСТ  
 CGCGGCGCTACCСGAСACCTGCGACGAAACGCGCCAAGТТCAGGAGCGCGTСGAC  
 ACAGGGGCTCGGGAACACGGTGTСGCCАТCGCGGAACCСТАGCGAGАТCGTСGGG  
 AAGGTCCGAAGATG

Рис. 50. Нуклеотидная последовательность промотора гена *ACO1* кукурузы с указанием положения E-участков (выделено серым) связывания фактора PIF и стартовым кодоном (выделено подчеркиванием).

GATCCAGTCCACTGTCCACATGGGTGAGAGAATATGCTACCAGTGCTGTCTAGCT  
 ACAAATAATGCACGTTGCCGTCCCTGTCTATTTGCTGGAGATATCCTTTATTGCAA  
 GGATATTTGGCTACCTTGCTCTCTACGTGTACAGTTTTTTTTTTGTTTTAGAACGAA  
 AAATTGAGTGGGTTCGTTTCATATATTCTGTGTGTGTATGAGTTAAGTGATATGC  
 GAACTGGCSTATCAGCAACCACACTCCAACACGAGACTCATGTTTCAGAGAAATA  
 TATATGTTGAGTTTGTGATCCAAATTCTGAAGAAGGCGGCAGGAGATATCACCTC  
 TATAAATATCTTTGTAAGTCGCAGGAGATATCTATCTCAATTGTAATCTTCTGC  
 GATCTGTAACCACCCGAAAATAGTGAGAAGTTGCCGGCCGGCGCTCGTGGTTTTT  
 TCCCCTTCACTTTGGAGGGGTTTTCCACGTTAAATCCGTGTCTTTTCTGTGATTG  
 ATCCTATTTGTGTTCGCATTTATTTATAACAATATAAGAGTCTGGTACCATAAAAT  
 TTAATAAGGCCGGGCGCTTTAATTTACAACGCAAGGTTTAGTAATAGAAATCATG  
 TAGAAATTTTTTTTTTTGTTTCCCTGCATATTTGAAAGAAGAATAGTAGTAGTCTAGC  
 AACATGATAGATTCTTCATGTTAATTATTAGTTGTTGGACGTATATATTAATAAT  
 AAATCCGTATGTATCATGTCCTGGCTTGTGTTGACTATGTGACTTAGATGCGTTTG  
 GTTGTAATGATTGGACGGGATGTGATGGGATGATCCCTCAAATAAGTTTTGTTTGG  
 TTCAGGGTTAAGGATTGAGACAGGTCTATCTCACTGTTGTCTCCAGTTATCCTTT  
 AAATTTGGATGAAGGAGACGTCCCTGTTGTCCCSTAAACAAACACACCSTTAATT  
 AGCACAAGTACTACACGGTAAGAATGAATGGGGAAAAAATTAAGTCTGGCCGGC  
 TGTTTCGCAGTGTGCTACTAGCGCCCACTGTACGTATAAGGAAGCGGCTGTCCCTG  
 GTCCTCACACCATCACTTGTTCTCTCTTCTCTCTCTCTCGTCGTGTGCCTGGGTC  
 GACCAGCGACCTGGCTAGCTAGCTCTCCAGCTGCGCGGCCATG

Рис. 51. Нуклеотидная последовательность промотора гена *ACO2* кукурузы с указанием положения E-участков (выделено серым) и G-участка (зачеркнутый текст) связывания фактора PIF и стартовым кодоном (выделено подчеркиванием).

Присутствие цис-элементов, к которым относятся транскрипционные факторы семейства bHLH, в промоторной области генов является ключевым фактором регуляции транскрипции. Важное значение играет не только наличие специфических сайтов взаимодействия с транскрипционными факторами, но и их расположение. Особое значение в регуляции транскрипционной активности генов играют сайты транскрипционных факторов, расположенных в области инициации транскрипции (Lis, Walther, 2016). Также эпигенетические механизмы принимают непосредственное участие в контроле этих генов, изменяя их связывание с факторами транскрипции (Medvedeva *et al.*, 2014, Escrich *et al.*, 2022). Анализ нуклеотидных последовательностей промоторов генов сукцинатдегидрогеназы

цитратсинтазы, аконитазы свидетельствует о наличии в их составе специфических сайтов связывания факторов транскрипции семейства bHLH, к которым относятся факторы PIF (табл. 11).

Таблица 11.

Распределение G- и E-областей в составе промоторов генов, кодирующих изоферменты цикла трикарбоновых кислот

Ген	G-участок	E-участок	Расположение сус-элемента в области сайта инициации траскрипции
<i>CSY1</i>	нет	3	1
<i>CSY2</i>	нет	2	2
<i>ACO1</i>	нет	3	3
<i>ACO2</i>	1	3	2
<i>SDH1-2</i>	1	2	2
<i>SDH2-3</i>	1	2	3

Промоторы всех проанализированных генов, кодирующих изоферменты СДГ, ЦС и АГ кукурузы содержат в области инициации транскрипции специфические сайты связываения с транскрипционными факторами семейства PIF, что обеспечивает фитохром-зависимый механизм их регуляции.

### 3.5.3 Роль кальмодулинов в трансдукции фоторецепторного сигнала в клетках кукурузы

Хотя регуляция процессов жизнедеятельности растительной клетки пока не изучена достаточно подробно, уже известно, что координация экспрессии трех геномов эукариотической клетки: ядерного, пластидного и митохондриального, достигается с помощью специфических сигналов. Определяющую роль в данном процессе играет клеточное ядро. Оно контролирует, каким образом кальмодулины и кальмодулин-подобные белки связываются с белками-мишенями, включая

протеинкиназы, ионные каналы и факторы транскрипции. Например, кальмодулин CaM7 у *Arabidopsis* регулирует фактор транскрипции генов, необходимых для фотоморфогенеза, а у мутанта по этому гену экспрессия светоиндуцируемых генов значительно снижается (Kushwaha *et al.*, 2008).

Исследование уровня транскриптов гена *CALM7-1*, кодирующего кальмодулин 7, показало, что данный показатель зависит от условий освещения растений. На свету уровень транскриптов был 2,4 раза ниже такового показателя в темноте (рис. 52). Облучение растений ДКС (730 нм), а также последовательное облучение красным и дальним красным светом не вызывало изменений в содержании транскриптов исследуемого гена по отношению к таковому показателю варианта «свет». Исследование показали, что в темноте CaM7 накапливается более высокие уровни транскриптов, чем на свету, что непосредственно коррелирует с его физиологическими функциями в таких условиях (Kushwaha *et al.*, 2008).

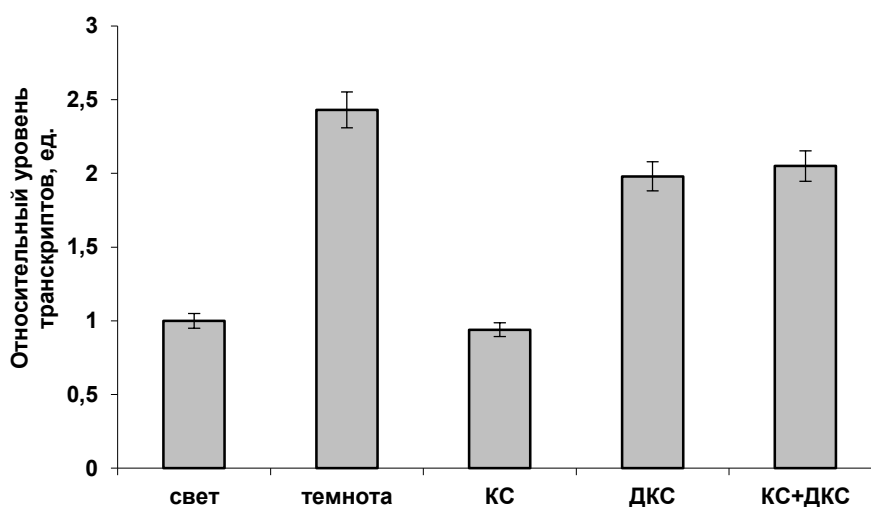


Рис. 52. Относительный уровень транскриптов гена *CALM7-1* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Высокая экспрессия CaM7 может частично подавлять уровень фактора HY5, указывая на то, что два фактора работают вместе, обеспечивая контроль развития растений на свету. При анализе относительного уровня транскриптов гена *CALM7-*

2 было установлено, что данный кальмодулин не принимает участия в трансдукции светового сигнала в клетках кукурузы, поскольку исследуемый показатель не изменяется при облучении растений красным светом (рис. 53).

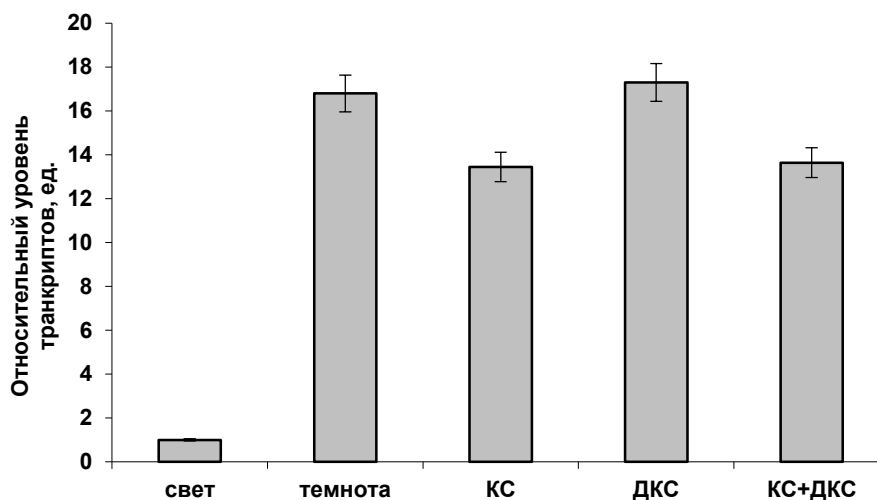


Рис. 53. Относительный уровень транскриптов гена *CALM7-2* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Установлено, что ген *CALM7-3* проявляет наибольшую активность при отсутствии света, о чем свидетельствует увеличение содержания его мРНК в клетки в данных экспериментальных условиях. Облучение растений кукурузы красным и дальним красным светом не вызывает изменений в величине содержания мРНК данного гена, что указывает на отсутствие влияния фитохромной системы на величину данного показателя (рис. 54).

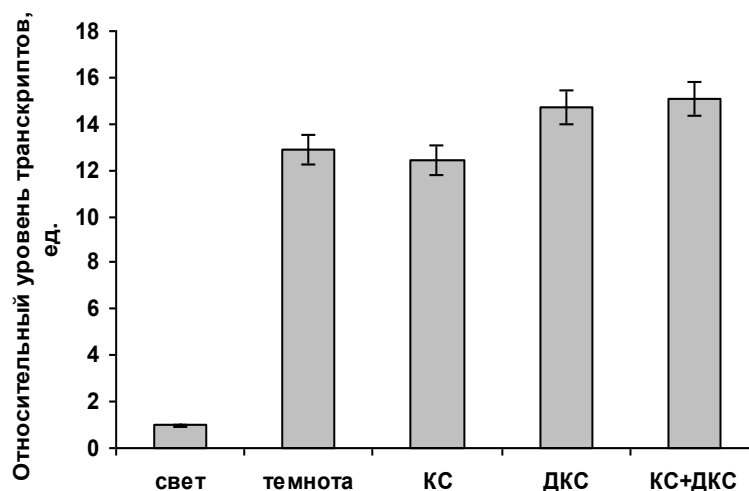




Рис. 54. Относительный уровень транскриптов гена *CALM7-3* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Исследования содержания транскриптов гена *CALM7-4* в растения при облучении светом разной длины волны позволили установить определенную зависимость. В растениях вариантов «свет» и «КС» содержание транскриптов исследуемого гена превышало на 1,7 раза таковой показатель в варианте «темнота» (рис. 55). Для растений, облученных ДКС и при последовательном воздействии КС и ДКС, изучаемый показатель скорости функционирования гена *CALM7-4* не отличался от варианта «КС» и был выше, чем в варианте «темнота».

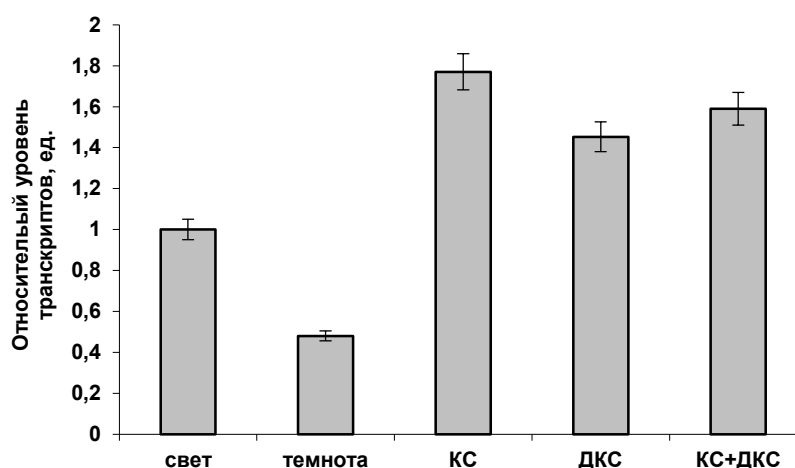


Рис. 55. Относительный уровень транскриптов гена *CALM7-4* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Напротив, уровень транскриптов *CALM3* в темноте и при облучении коротковолновым светом, как видно на графике, более высокий, чем при облучении большими длинами волн (красным и дневным светом) (рис. 56). При этом, из полученных данных видно, что именно фитохромная система является регуляторным механизмом контроля уровня транскриптов гена кальмодулина 3. Активированный фитохром снижает содержание транскриптов гена *CALM3*, в ответ на воздействие красного света на растения.

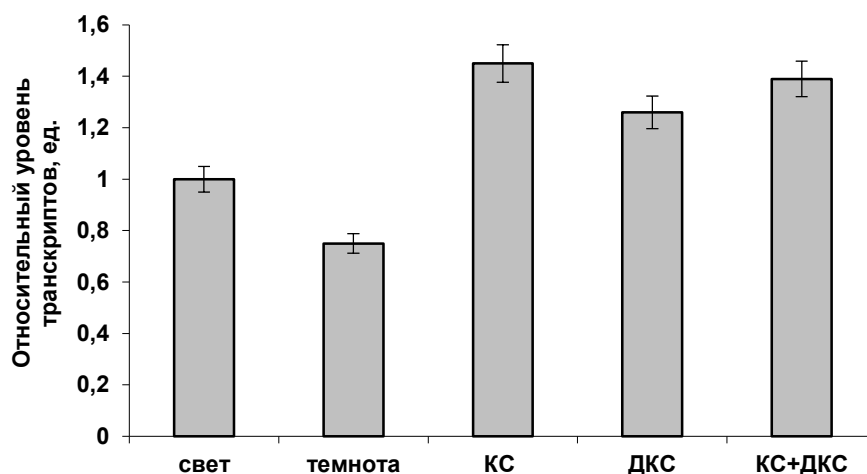


Рис. 56. Относительный уровень транскриптов гена *CALM3* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Таким образом, установлено, что данный кальмодулин принимает участие в световой регуляции клеточного метаболизма, обеспечивая реализацию фоторецепторного сигнала. Высокое содержание транскриптов гена *CALM7-1* в условиях темноты связано с его ролью регулятора свето-зависимых генов в темноте. При этом для гена *CALM3* характерна сходная картина содержания мРНК в клетке в различных световых режимах. Высокое содержание транскриптов данного гена на свету также указывает на его участие в регуляции генов в условиях освещения.

Анализ относительного уровня транскриптов гена *CALM2*, кодирующего кальмодулин 2, выявил, что исследуемый показатель не изменяется в листьях кукурузы в зависимости от условий облучения растений (рис. 57). Следовательно, данный кальмодулин не принимает участия в передаче светового сигнала от фитохрома к клеткам листьев кукурузы.

Наибольший относительный уровень мРНК гена *CALM1* обнаруживался в растениях, после их облучения ДКС и последовательным облучением КС и ДКС (рис. 58). Иная картина исследуемого показателя наблюдается на свету и при воздействии красного света, что проявляется в значительном снижении уровня

транскриптов исследуемого гена. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фитохромная система принимает участие в регуляции уровня мРНК гена *CALM1* в листьях кукурузы при изменении светового режима растений. Активная форма фитохрома вызывает снижение исследуемого показателя работы генов.

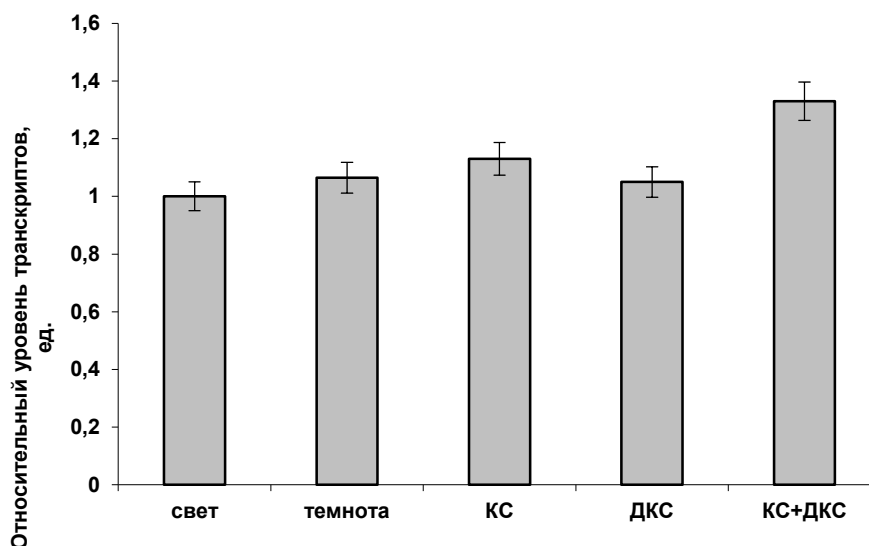


Рис. 57. Относительный уровень транскриптов гена *CALM2* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Анализ результатов проведенного исследования по выявлению уровня транскриптов генов *CALM7-1*, *CALM7-4*, и *CALM3* показал их зависимость от условий освещения растений. Установлено, что гены этих исследованных кальмодулинов принимают участие в световой регуляции клеточного метаболизма, обеспечивая реализацию фоторецепторного сигнала. При этом для гена *CALM2* не выявлено изменений в содержании мРНК при всех вариантах облучения растений красным светом, что указывает на его пассивность в реализации фоторецепторного сигнала от фитохрома.

Результаты наших исследований показывают, что ферменты цикла Кребса, экспрессия их генов в растениях, подвергаются фоторецепторной регуляции посредством фитохромов и криптохромов (Епринцев *и др.*, 2015, Епринцев *и др.*, 2015а). Кроме того, ряд исследований направлено на выяснение роли кальция в

механизме световой регуляции энзимов, в том числе кальмодулина и кальмодулиноподобных белков (Eprintsev *et al.*, 2013).

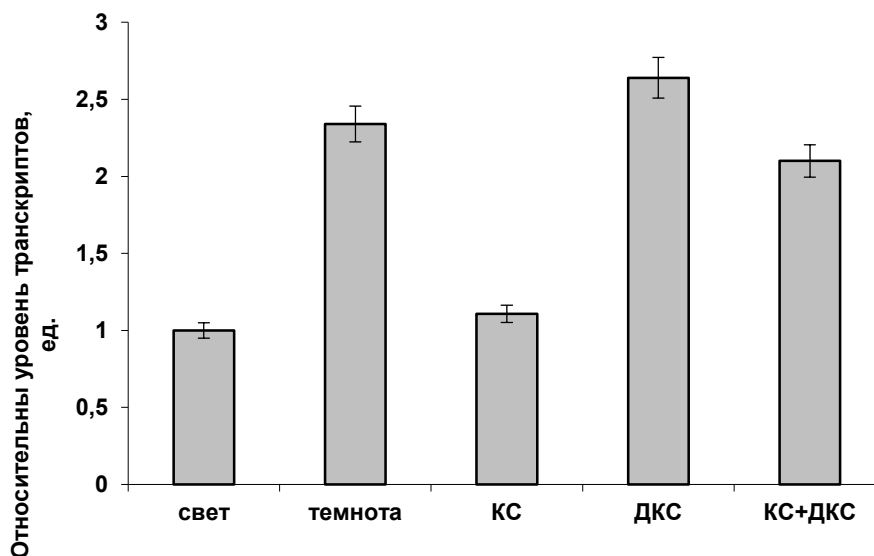


Рис. 58. Относительный уровень транскриптов гена *CALM1* в листьях кукурузы в условиях различного светового режима.

Показано, что относительный уровень транскриптов генов *CALM7-1* и *CALM7-4* увеличивается в условиях освещения растений КС. Выявлено, что кальмодулин 7 принимают участие в световой регуляции клеточного метаболизма, обеспечивая реализацию фоторецепторного сигнала. При этом для гена *CALM3* также характерно высокое содержание транскриптов на свету, указывающее, что данный кальмодулин 3 обеспечивает передачу сигнала от фитохромной системы.

Из анализа литературных данных установлено, что кальмодулины могут обеспечивать реализацию кальциевого и фосфатного пути передачи сигнала, а также участвуют в фосфорилировании (Enslin *et al.*, 1995). Кроме того, кальмодулины проявляют свое действие через непосредственное воздействие на белковые молекулы (Crivici, Ikura, 1995).

Полученные в нашей работе данные позволяют сделать заключение о механизме трансдукции фитохромного сигнала в растительной клетке. Фитохромная система регулирует содержание катионов кальция в ядрах клеток растений путем его перераспределения между компартментами. Увеличение

концентрации кальция в ядерной фракции приводит к активации внутриядерно локализованного кальмодулина 7, проявляющего киназную реакцию и способного модулировать работу транскрипционных факторов. Выявлено, что посредником во внутриядерной передаче фитохромного сигнала является транскрипционный фактор PIF3, активация которого наблюдается в ответ на накопление активной формы фитохрома А в клетке. При этом, увеличение экспрессии PIF4 в темноте может являться необходимым для контроля светозависимых генов в отсутствии света путем их активации.

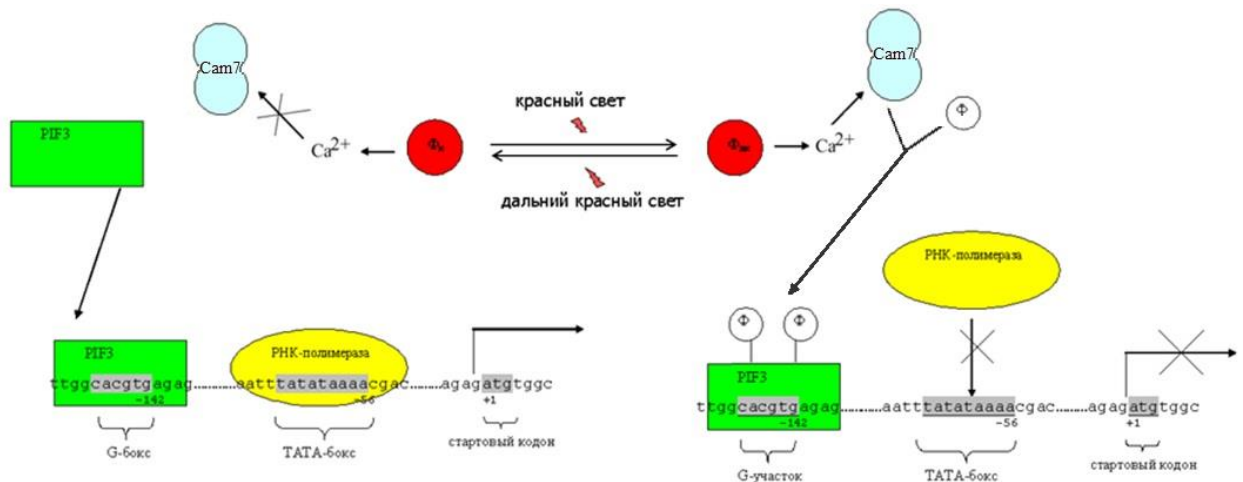


Рис. 59. Гипотетическая схема трансдукции фитохромного сигнала и механизма регуляции экспрессии генов в листьях растений. Ф<sub>к</sub> – неактивная форма фитохрома, Ф<sub>ак</sub> – активная форма фитохрома, ПФ – протеинфосфатаза, ПК – протеинкиназа, Φ – остаток фосфорной кислоты, PIF – Phytochrom interacting factor (фактор фитохромного взаимодействия), Cam7 – кальмодулин 7.

Анализ нуклеотидной последовательности промоторов генов исследуемых изоферментов кукурузы 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. 59).

### 3.6 Эпигенетические механизмы регуляции генов исследуемых изоферментов

#### 3.6.1 Анализ промоторов генов сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитатгидратазы

Механизм регуляции образования изоферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот, вероятно, связан с регуляцией экспрессии генов, кодирующих их субъединицы. Метилирование ДНК – один из факторов, влияющих на экспрессию генов. Изменение метильного статуса цитозина в растительных организмах в большей степени характерно для промоторных областей генов (Antequera, Bird, 1993), что оказывает влияние на уровень экспрессии генов, в составе промоторов которых имеются CpG-островки (Singer-Sam, Riggs, 1993). Ингибирование скорости транскрипции генов является результатом изменения состояния хроматина (увеличения его конденсации при увеличении метильного статуса), что не способствует легкости присоединения транскрипционных факторов к соответствующему гену. При этом, изменение статуса метилирования одного нуклеотида практически не влияет на процесс присоединения транскрипционного фактора к промотору гена, однако, значительные проявления наблюдаются при скоплении цитозинов в виде CpG-островка (Kass *et. al.*, 1997).

Отличия в регуляции генов за счет изменения метильного статуса наблюдаются при отсутствии в составе промотора CpG-островка. Изменение метильного статуса отдельных цитозинов в их составе оказывает значительное влияние на уровень экспрессии данных генов. Подобный эффект был определен для транскрипционного фактора фактора AP-2 (Comb, Goodman, 1990). Подобный механизм предполагается и для фактора Sp1, но этот факт требует дополнительного исследования (Clark *et. al.*, 1997, Kakutani *et. al.*, 1995).

Регуляция транскрипции генов может осуществляться и другим механизмом, за счет активности метил-связывающихся белков (MDBPs), которые имеют особое строение, обусловленное наличием в их составе ДНК-связывающего домена и домена, ингибирующего РНК-полимеразу (Hendrich, Bird, 1998).

Важное значение в определении транскрипционной активности генов играет анализ нуклеотидного состава промоторов генов, кодирующих сукцинатдегидрогеназу, цитратсинтазу, аконитатгидрогеназу, на наличие CpG-островков в промоторах. Для установления метильного статуса отдельного CG-динуклеотида с применением метилспецифичной ПЦР, необходимо использованием двух вариантов прямого праймера, отличающихся между собой по CG-сайту. В варианте «U» цитозин замещен на тимин, а в «M» - нет. При проведении ПЦР возможно получение ампликонов с разным сочетанием сработавших праймеров. Получение ПЦР-продуктов с вариантом праймеров «U» указывает на отсутствие метилирования в анализируемом CG-динуклеотиде, и наоборот, если получен продукт с вариантов «M» - то исследуемый динуклеотид метилирован. Возможно «срабатывание» обоих праймеров, тогда анализируемый цитозин является частично метилированным, поскольку в клетке присутствуют разные по метильному статусу аллели данного CG-динуклеотида (Herman *et. al.*, 1996).

Исследование структуры промоторов генов *SDHI-1* и *SDHI-2* флавопротеина СДГ кукурузы показало отличие в распределении CG-динуклеотидов в их нуклеотидных последовательностях. В промоторе гена *SDHI-2* флавопротеина сукцинатдегидрогеназы было обнаружено два CpG-островка (рис. 60), что указывает на возможность его регуляции при изменении метильного статуса CG-динуклеотидов, входящих в состав CpG-островков. Размер первого островка 174 нукл. (в положении с -354 по -527 нукл.), а размер второго островка 134 нукл. (в положении с -867 по -1000 нукл.).

На основе нуклеотидных последовательностей промоторов генов субъединицы А сукцинатдегидрогеназы разработаны праймеры для определения метильного статуса методом метилспецифичной ПЦР. Праймеры подбирались таким образом, чтобы анализируемый CG-динуклеотид располагался в области CpG-островка (для гена *SDHI-2*). Такое расположение анализируемых цитозинов позволяет определить зависимость статуса метилирования CpG-островка и его роль

в регуляции экспрессии анализируемых генов флавопротеина сукцинатдегидрогеназы кукурузы. Последовательности олигонуклеотидных затравок и положение исследуемых в работе цитозинов приведены в таблице 12.

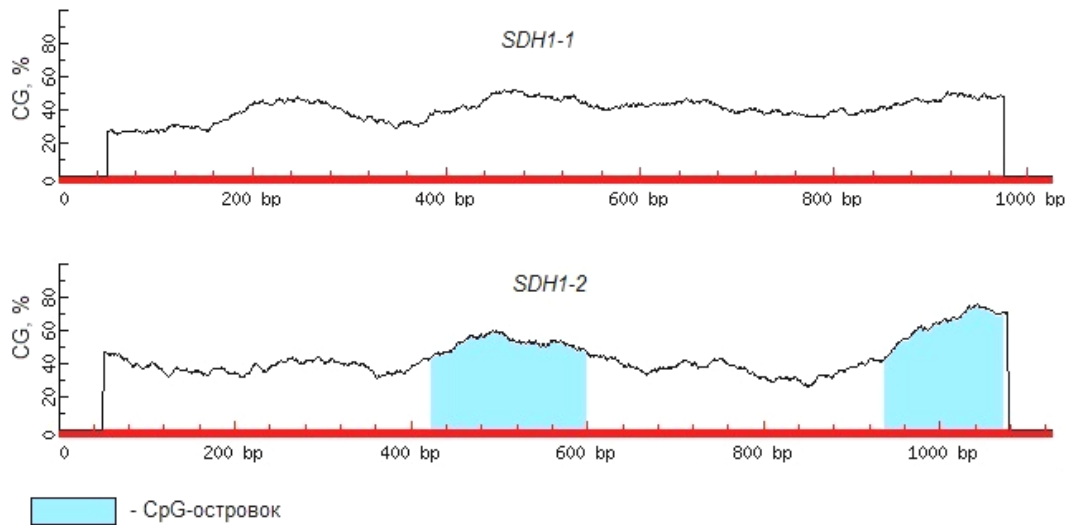


Рис. 60. Анализ CG-динуклеотидов в составе промоторов генов субъединицы А сукцинатдегидрогеназы *Z. mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

Определение величины метильного статуса промоторов генов исследуемых изоферментов осуществляли на основе результатов электрофореза ампликонов, полученных с помощью метилспецифичных праймеров.

Таблица 12.

Олигонуклеотиды для проведения метилспецифичной ПЦР для промоторов генов *SDH1-1* и *SDH1-2* с ДНК листьев кукурузы

Ген		Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
1	2	3	4	5
<i>SDH1-1</i>	I	-38 нукл.	прямой М	5'-atcattaatcaatagcc-3'
			обратный М	5'-tttttttgaggtgggt-3'
			прямой U	5'-atcattaatcaataacc-3'
			обратный U	5'-tttttttgaggtgggt-3'
	II	-61 нукл.	прямой М	5'-cccaatatataaaatgcc-3'





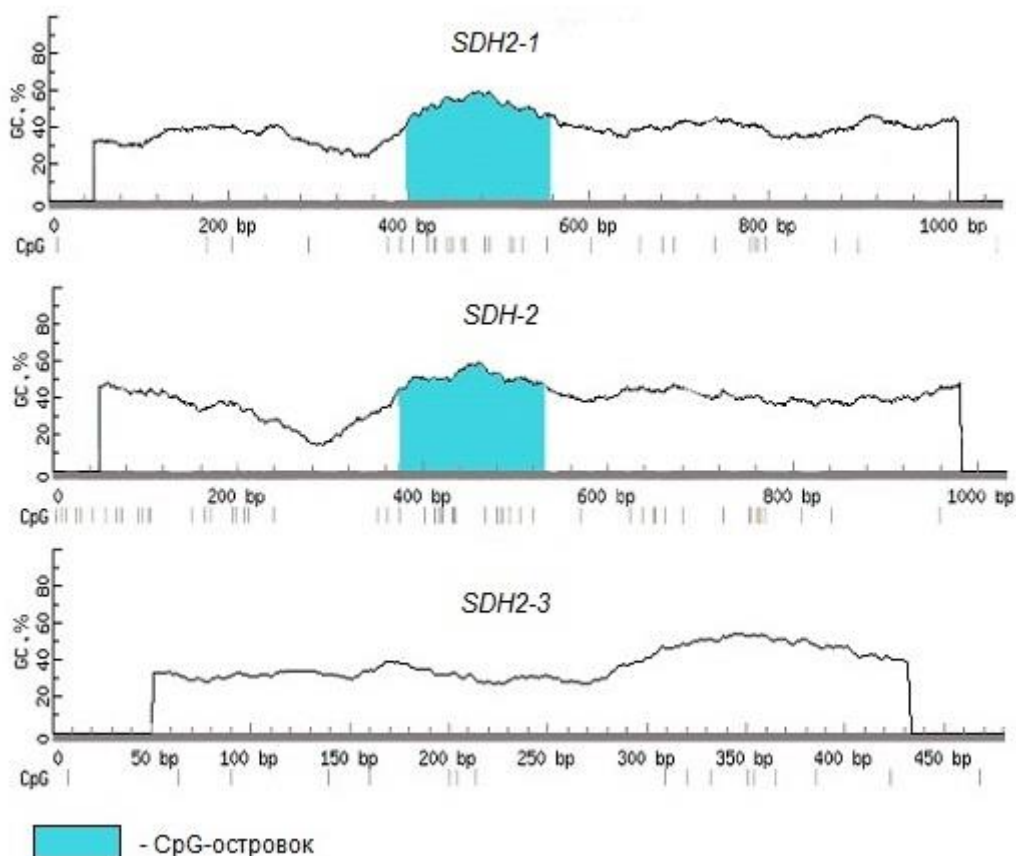


Рис. 61. Анализ CG-динуклеотидов в составе промоторов генов субъединицы В сукцинатдегидрогеназы *Z. mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

Анализ промоторов генов субъединиц сукцинатдегидрогеназы позволил установить их филогенетическое родство и выявить общность происхождения генов *SDH2-1* и *SDH2-2*, в то время как ген *SDH2-3* имеет значительные отличия в своей структуре. Различие в структуре промоторных областей генов, кодирующих железо-серную субъединицу СДГ, показало, что гены *SDH2-1* и *SDH2-2*, имеющие в своем составе CpG-островки, способны подвергаться регуляции при изменении статуса метилирования CG-динуклетидов, входящих в их состав.

Подбор праймеров к нуклеотидным последовательностям промоторов генов железо-серной субъединицы СДГ для проведения метилспецифичной ПЦР осуществляли с использованием программы MethPrimer - Li Lab, UCSF (табл. 13).

Олигонуклеотиды для проведения метилспецифичной ПЦР с ДНК листьев  
кукурузы

Ген		Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
1	2	3	4	5
<i>SDH2-1</i>	I	- 429 нукл.	прямой М	5'-gacgaagaacttctcgacgct-3'
			обратный М	5'-ttagagtgtagttttg-3'
			прямой U	5'-gacgaagaacttctcgacact-3'
			обратный U	5'-ttagagtgtagttttg-3'
	II	- 777 нукл.	прямой М	5'-tagaactcgatagagtgc-3'
			обратный М	5'-ttagagtgtagttttg-3'
			прямой U	5'-tagaactcgatagagtact-3'
			обратный U	5'-ttagagtgtagttttg-3'
	III	- 226 нукл.	прямой М	5'-aatcgtcgaaattagttacggc-3'
			обратный М	5'-caaccsaatccttaatcacaaac-3'
			прямой U	5'-aattgtgaaattagttatggtgg-3'
			обратный U	5'-caaccsaatccttaatcacaaac-3'
<i>SDH2-2</i>	I	- 164 нукл.	прямой М	ataaacaaaaaaaaaagct
			обратный М	ttggtaatttggttagg
			прямой U	ataaacaaaaaaaaaaaact
			обратный U	ttggtaatttggttagg
	II	- 228 нукл.	прямой М	aaccttaatttaataatgct
			обратный М	ttggtaatttggttagg
			прямой U	aaccttaatttaataatact
			обратный U	ttggtaatttggttagg
	III	- 280 нукл.	прямой М	atcctaattctcatattagct
			обратный М	ttggtaatttggttagg

			прямой U	atcctaattctcatattaact
			обратный U	ttggaatttggtgtagg
<i>SDH2-3</i>	I	- 109 нукл.	прямой M	5'-ttttatac gatc gagttagtagc-3'
			обратный M	5'-aaaatatctttaaataaatcttaaacc-3'
			прямой U	5'-ttttttatatgattgaggttagtatg-3'
			обратный U	5'-aaaatatctttaaataaatcttaaacc-3'
	II	- 165 нукл.	прямой M	5'-ttaataatatcaacaagcg-3'
			обратный M	5'-ttagttataaatttgattg-3'
			прямой U	5'-ttaataatatcaacaaacg-3'
			обратный U	5'-ttagttataaatttgattg-3'
	III	- 205 нукл.	прямой M	5'-aaatctttctttcaccgct-3'
			обратный M	5'-ttagttataaatttgattg-3'
			прямой U	5'-aaatctttctttcaccact-3'
			обратный U	5'-ttagttataaatttgattg-3'

Примечание: «-» указывает, на каком расстоянии от начала первого экзона гена расположен исследуемый цитозин; I, II, III – разные группы праймеров. При этом цитозин в каждой группе праймеров отличался по наличию метилирования (M) или его отсутствию (U).

Нуклеотидный состав промоторов генов мембраносвязанных субъединиц СДГ также проанализирован на наличие CpG-островков, что может быть важным фактором их регуляции (рис. 62, 63 и 64). Установлено наличие CpG-островков в промоторах генов *SDH3-2* и *SDH4*, что указывает на возможность их эпигенетической регуляции при изменении метильного цитозина. На основании нуклеотидных последовательностей промоторов разработаны праймеры для оценки метильного статуса CpG-островков методом метилспецифичной полимеразной цепной реакции.

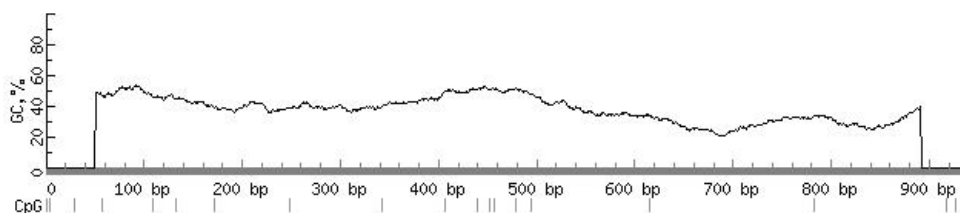


Рис. 62. Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора гена *SDH3-1* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы *Zea mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

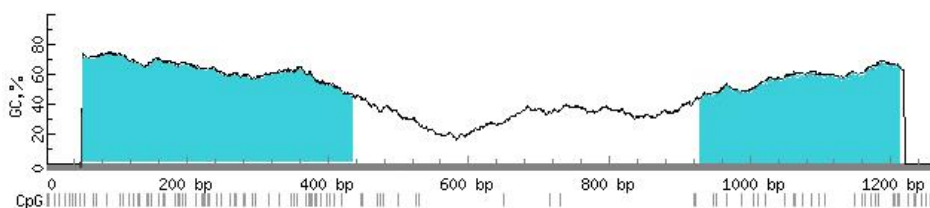


Рис. 63. Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора гена *SDH3-2* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы *Zea mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

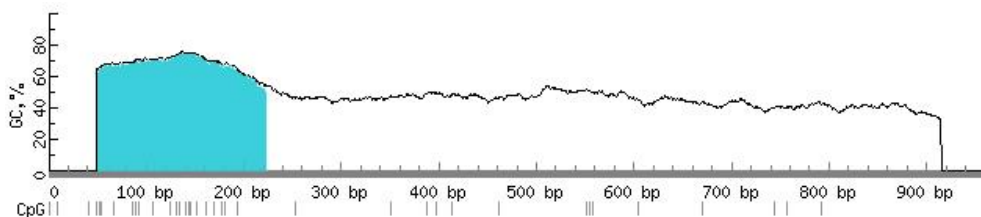


Рис. 64. Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора гена *SDH4* субъединицы D сукцинатдегидрогеназы *Zea mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

Промотор гена *SDH3-1* имеет невысокий уровень содержания CG-динуклеотидов в своем составе. Однако, для промотора гена *SDH3-2* обнаружена иная модель организации. В его составе имеется 2 CpG-островка (388 и 285 нуклеотидов) на основании последовательности которых разработаны метилспецифичные праймеры. Олигонуклеотидные последовательности для проведения метилспецифичной ПЦР на основе нуклеотидных последовательностей

промоторов генов мембраносвязанных субъединиц сукцинатадегидрогеназы представлены в таблице 14.

Таблица 14.

Праймеры к генам *SDH3-1*, *SDH3-2* и *SDH4* для метилспецифичной ПЦР

Ген		Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
1	2	3	4	5
<i>SDH3-1</i>	I	-506 нукл.	прямой М	5'-tattttatgtttttattttgcgg-3'
			обратный М	5'-tcaaggaacgagtatatctaaac-3'
			прямой U	5'-tattttatgtttttattttgtgg-3'
			обратный U	5'-ttaaggaatgagtatatttaaat-3'
	II	-454 нукл.	прямой М	5'-tataataagggtaagtgaagtcgt-3'
			обратный М	5'-tcaaggaacgagtatatctaaac-3'
			прямой U	5'-tataataagggtaagtgaagttgt-3'
			обратный U	5'-ttaaggaatgagtatatttaaat-3'
	III	-431 нукл.	прямой М	5'-ttagaggggaggtgaataggcga-3'
			обратный М	5'-tcaaggaacgagtatatctaaac-3'
			прямой U	5'-ttagaggggaggtgaatagggtga-3'
			обратный U	5'-ttaaggaatgagtatatttaaat-3'
<i>SDH3-2</i>	I	-225 нукл.	прямой М	5'-atgggccatgtcaaccgggc
			обратный М	5'-acgctcgtaacctatcgac-3'
			прямой U	5'-atgggttatgttaattcgggt-3'
			обратный U	5'-aaaaaacactcataccttatcaac-3'
	II	-265 нукл.	прямой М	5'-aagcaaacgtttgtgtcatgcc-3'
			обратный М	5'-acgctcgtaacctatcgac-3'
			прямой U	5'-aagtaaacgtttgtgttatggt-3'
			обратный U	5'-aaaaaacactcataccttatcaac-3'
	III	-280 нукл.	прямой М	5'-aataatctgaagtttatgct-3'
			обратный М	5'-acgctcgtaacctatcgac-3'
			прямой U	5'-aataattgaagtttatggt-3'
			обратный U	5'-aaaaaacactcataccttatcaac
<i>SDH4</i>	I	-57 нукл.	прямой М	5'-gatgtttttcgtcgattattttc-3'

			обратный М	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
			прямой U	5'-tggtttttgttatttttga-3'
			обратный U	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
	II	-115 нукл.	прямой М	5'-ttttaaagttttattttttcga-3'
			обратный М	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
			прямой U	5'-ttttaaagttttattttttga-3'
			обратный U	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
	III	-307 нукл.	прямой М	5'-aaattagatttaattaattcgt-3'
			обратный М	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
			прямой U	5'-aaattagatttaattaattgt-3'
			обратный U	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'

Примечание: «-» указывает, на каком расстоянии от начала первого экзона гена расположен исследуемый цитозин; I, II, III – разные группы праймеров. При этом цитозин в каждой группе праймеров отличался по наличию метилирования (М) или его отсутствию (U).

Установлено, что промоторы генов митохондриальной (*CSY1*) и пероксисомальной (*CSY2*) цитратсинтазы содержат в своем составе по одному CpG-островку размером 484 п.н. и 316 п.н., соответственно (рис. 65 и 66).

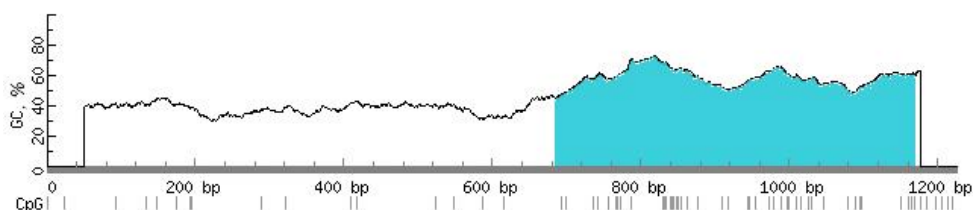


Рис. 65. Анализ нуклеотидной последовательности промотора гена *CSY1* на наличие CpG-островок. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

На основании нуклеотидных последовательностей исследуемых промоторов ЦС были разработаны праймеры для проведения метилспецифичной ПЦР с учетом положения CpG-островок (табл. 15).

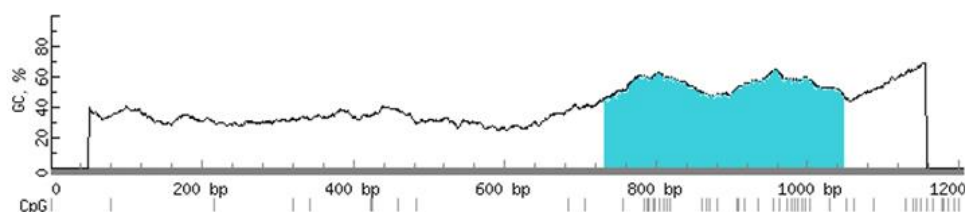


Рис. 66. Анализ нуклеотидной последовательности промотора гена *CSY2* на наличие CpG-островков. Вертикальными линиями указаны положения CpG-динуклеотидов.

Таблица 15.

Праймеры к промоторам генов цитратсинтазы для метилспецифичной ПЦР

Ген		Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
1	2	3	4	5
<i>CSY1</i>	I	-478 нукл.	прямой М	5'-gttttttattaatcgggtggaggac-3'
			обратный М	5'-gaaaaaataaacccgaactaacga-3'
			прямой U	5'-ttttttattaattggtggaggatga-3'
			обратный U	5'-caaaaaaataaacccaaactaacac-3'
	II	-488 нукл.	прямой М	5'-ttaccatgagggttatatataagcc-3'
			обратный М	5'-gaaaaaataaacccgaactaacga-3'
			прямой U	5'-ttaccataaaattatataagcc-3'
			обратный U	5'-caaaaaaataaacccaaactaacac-3'
	III	-529 нукл.	прямой М	5'-acccccggtacacgtacacaggcc-3'
			обратный М	5'-gaaaaaataaacccgaactaacga-3'
			прямой U	5'-accccccaatacacatacacaagcc-3'
			обратный U	5'-caaaaaaataaacccaaactaacac-3'
<i>CSY2</i>	I	-291 нукл.	прямой М	5'-ttttcgaatttaatttagattcgt-3'
			обратный М	5'-taaataattactaatcgactccgcc-3'
			прямой U	5'-tttttgaatttaatttagatttgt-3'
			обратный U	5'-taaataattactaatcaactccacc-3'
	II	-342 нукл.	прямой М	5'-tggaaccattcgttaagatctgca-3'
			обратный М	5'-taaataattactaatcgactccgcc-3'
			прямой U	5'-taaaaccattcattaaaatctgca-3'
			обратный U	5'-taaataattactaatcaactccacc-3'



	III	-297 нукл.	прямой М	5'-aacctagagaagagagtagcg-3'
			обратный М	5'-taaataattactaatcgactccgcc-3'
			прямой U	5'-aacctaaaaaaaaaataagcg-3'
			обратный U	5'-taaataattactaatcaactccacc-3'

Примечание: «-» указывает, на каком расстоянии от начала первого экзона гена расположен исследуемый цитозин; I, II, III – разные группы праймеров. При этом цитозин в каждой группе праймеров отличался по наличию метилирования (М) или его отсутствию (U).

В составе промоторов генов, кодирующих митохондриальный (*ACO1*) и цитозольный (*ACO2*) изофермент аконитатгидратазы, обнаружены CpG-островки (рис. 67). Промотор гена *ACO1* имеет в своем составе два CpG-островка, определяющих возможность эпигенетической регуляции данного гена.

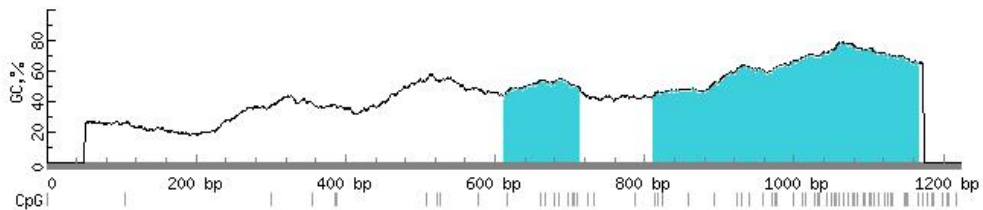


Рис. 67. Анализ CpG-динуклеотидов в составе промотора гена *ACO1* *Z. mays*. Вертикальными линиями указаны положения CpG-динуклеотидов. Сплошным полем выделен CpG-островок.

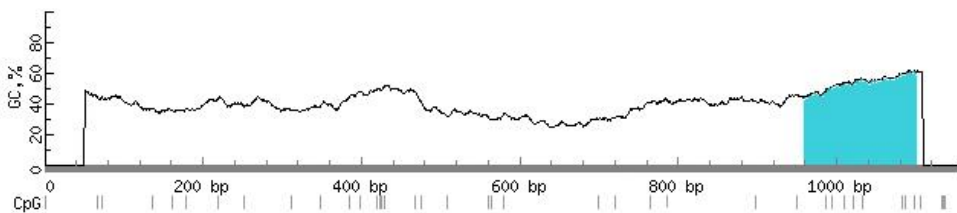


Рис 68. Анализ CpG-динуклеотидов в составе промотора гена *ACO2* *Z. mays*. Вертикальными линиями указаны положения CpG-динуклеотидов. Сплошным полем выделен CpG-островок.

Промотор гена *ACO2* характеризуется наличием в составе одного CpG-островка, имеющего локализацию, близкую к стартовому кодону (рис. 68). Установленное строение промоторной области исследуемого гена аконитатгидратазы кукурузы позволяет предположить возможность его регуляции посредством изменения метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов, входящих в состав CpG-островка.

Нуклеотидные последовательности промоторов генов митохондриальной и цитозольной форм аконитазы использовали для разработки метилспецифических праймеров, последовательности которых приведены в таблице 16.

Таблица 16.

## Олигонуклеотиды к промоторам генов для метилспецифичной ПЦР

Ген		Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
1	2	3	4	5
<i>ACO1</i>	I	-425 нукл.	прямой М	5'-tgtattttagaataagagttttgcgt-3'
			обратный М	5'-ctacgcacgaattaaattcgaат-3'
			прямой U	5'-atgtattttagaataagagttttgtgt-3'
			обратный U	5'-атасctacacасааattaaattcaaa-3'
	II	-565нукл.	прямой М	5'-tagagattatntttcgattcgattc-3'
			обратный М	5'-ctacgcacgaattaaattcgaат-3'
			прямой U	5'-gagattatntttgatttgatttggtt-3'
			обратный U	5'-атасctacacасааattaaattcaaa -3'
	III	-941нукл.	прямой М	5'-ttattaacgtttagcggtagagttc -3'
			обратный М	5'-ctacgcacgaattaaattcgaат-3'
			прямой U	5'-attaaatgtttagtggtagagttgt -3'
			обратный U	5'-атасctacacасааattaaattcaaa -3'
<i>ACO2</i>	I	-579 нукл.	прямой М	5'-attcgaaaatagtgagaagttgtc -3'
			обратный М	5'-taaaaaactaactaaccсааатcgct-3'
			прямой U	5'-ttatttgaaaatagtgagaagttgtg -3'
			обратный U	5'-tсааасааaccсаааacатаатаcатаca -3'
	II	-821 нукл.	прямой М	5'-gtttattgtacgtataaggaagc-3'

			обратный М	5'-taaaaaactaactaaccaaatcgct-3'
			прямой U	5'-gtttattgtatgtataaggaagtgg -3'
			обратный U	5'-tcaaacacaaccsaaaacataatacatataca -3'
	III	-1034нукл.	прямой М	5'-gggtattataaaatttattaaggtcgg -3'
			обратный М	5'-taaaaaactaactaaccaaatcgct -3'
			прямой U	5'-agtttggtattataaaatttattaaggttg -3'
			обратный U	5'-tcaaacacaaccsaaaacataatacatataca -3'

Примечание: «-» указывает, на каком расстоянии от начала первого экзона гена расположен исследуемый цитозин; I, II, III – разные группы праймеров. При этом цитозин в каждой группе праймеров отличался по наличию метилирования (М) или его отсутствию (U).

### 3.6.2 Анализ степени метилирования промоторов генов исследуемых изоферментов в различных световых режимах

Для выяснения эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов ферментов метаболизма ди- и трикарбоновых кислот была установлена степень метилирования их промоторов в различных световых режимах растений. Анализ степени метилирования промоторов исследуемых генов осуществляли с помощью разработанных метилспецифичных праймеров на основе нуклеотидных последовательностей промоторов данных генов.

Проведенные ранее исследования по влиянию светового режима на уровень транскриптов генов, кодирующих субъединицы сукцинатдегидрогеназы, показали его зависимость от условий освещения 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 CG-динуклеотидов, анализируемых в нашей работе. Установлено, 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. В растениях, находящихся в темноте и после облучения дальним красным светом, наблюдалась противоположная картина. Уровень метилирования исследуемых CG-динуклеотидов составлял 25% для обоих вариантов (табл. 17).

Таблица 17.

Степень метилирования CG-динуклеотидов промотора гена, кодирующего флавопротеин сукцинатдегидрогеназы в условиях различного освещения

		свет	Темнота	КС	ДКС	КС+ДКС
<i>SDH1-2</i>	I	+	±	+	±	±
	II	±	±	±	±	±
	III	±	±	±	±	±
	%	75	25	75	25	25

При этом, в данных экспериментальных условиях был установлен высокий уровень транскриптов гена *SDH1-2* сукцинатдегидрогеназы (рис. 69). Следует отметить, что полученные результаты показывают определенную зависимость высокого содержания транскриптов исследуемого гена, обусловленного низким уровнем метилирования его промотора.

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 (табл. 18). При этом, наблюдалось изменение содержания транскриптов исследуемого гена в зависимости от света, воздействующего на растения (рис. 70). Полученные данные указывают на отсутствие эпигенетического механизма регулирования уровня транскрипции гена железо-серной субъединицы СДГ.

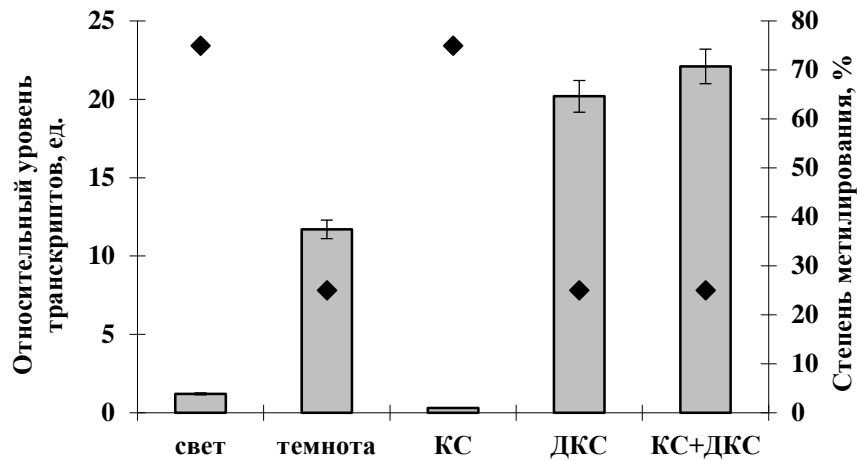


Рис. 69. Относительный уровень транскриптов гена *SDH1-2* (серые столбцы) и степень метилирования (черные точки) его промотора в листьях кукурузы в условиях различного освещения.

Следовательно, полученные результаты по исследованию изменения 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 контролем эпигенетических механизмов и зависит от степени метилирования его промотора. Увеличение метильного статуса промотора гена *SDH1-2* вызывает снижение количества его мРНК в клетках листьев кукурузы, что наблюдается в присутствии активной формы фитохрома.

Таблица 18.

Степень метилирования CG-динуклеотидов промотора гена, кодирующего железосерную субъединицу сукцинатдегидрогеназы в условиях различного освещения

		Свет	Темнота	КС	ДКС	КС+ДКС
<i>SDH2-3</i>	I	±	±	±	±	±
	II	±	±	±	±	±
	III	±	±	±	±	±
	%	25	25	25	25	25

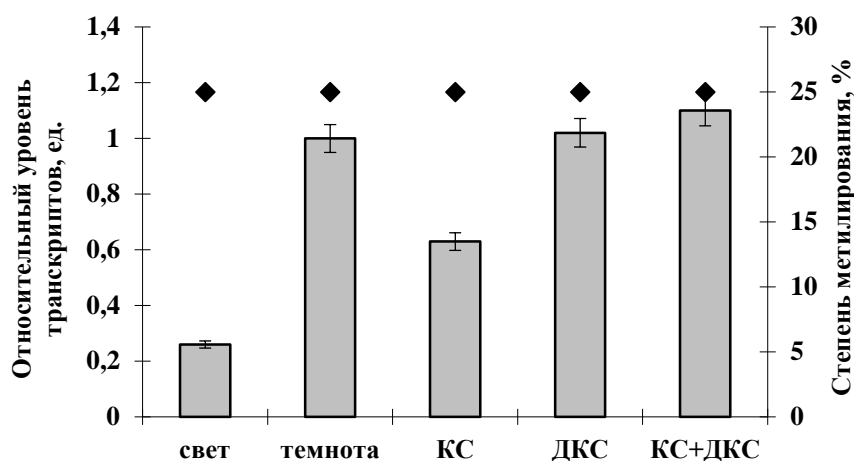


Рис. 70. Относительный уровень транскриптов гена *SDH2-3* (серые столбцы) и степень метилирования (черные точки) его промотора в листьях кукурузы в условиях различного освещения.

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 эпигенетических механизмов (табл. 19 и 20). Изменение метильного статуса промоторов генов цитратсинтазы при воздействии на растения света разной длины волны хорошо согласуются с изменением уровня их транскриптов. Выявлены изменения в содержании мРНК генов цитратсинтазы на свету, а также в растениях, подвергшихся облучению КС. Низкое значение относительного уровня транскриптов гена *CSY1*, кодирующего митохондриальный изофермент цитратсинтазы, соотносится с высокой степенью метилирования (75-100%) его промотора. Противоположная картина характерна для гена, кодирующего пероксисомальную форму этого энзима. Концентрация транскриптов гена *CSY2* на свету, а также при облучении КС резко возросла, что коррелировало с уменьшением степени метилирования исследуемых CG-динуклеотидов до 25%. Таким образом, можно заключить, что эпигенетические факторы регулируют

скорость работы генов *CSY1* и *CSY2* кукурузы при воздействии на растения кукурузы света разной длины волны (рис. 71 и 72).

Таблица 19.

Степень метилирования CG-динуклеотидов промотора гена, кодирующего митохондриальную цитратсинтазу в условиях различного освещения

		Свет	Темнота	КС	ДКС	КС+ДКС
<i>CSY1</i>	I	+	-	+	-	-
	II	+	±	+	+	+
	III	+	-	-	-	±
	%	100	25	75	50	50

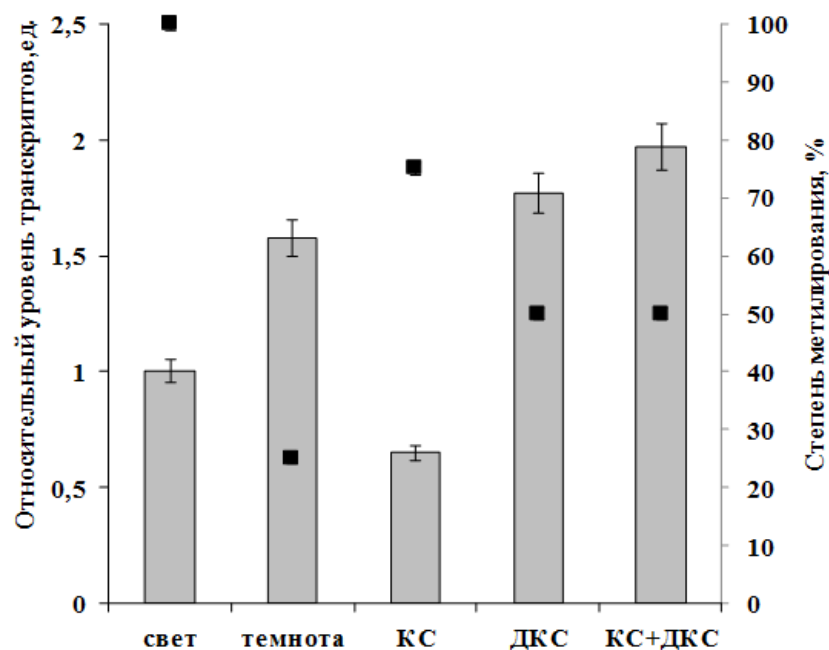


Рис. 71. Относительный уровень транскриптов (серые столбцы) и степень метилирования (черные точки) CG-нуклеотидов промотора гена *CSY1* в листьях кукурузы в условиях различного освещения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что экспрессия митохондриальной и пероксисомальной формы ЦС в листьях в ответ на свет регулируется метилированием промоторов соответствующих генов.

Степень метилирования CG-динуклеотидов промотора гена, кодирующего пероксисомальную цитратсинтазу в условиях различного освещения

		Свет	Темнота	КС	ДКС	КС+ДКС
CSY2	I	±	+	±	-	-
	II	-	+	±	-	±
	III	±	±	+	+	+
	%	25	75	50	50	50

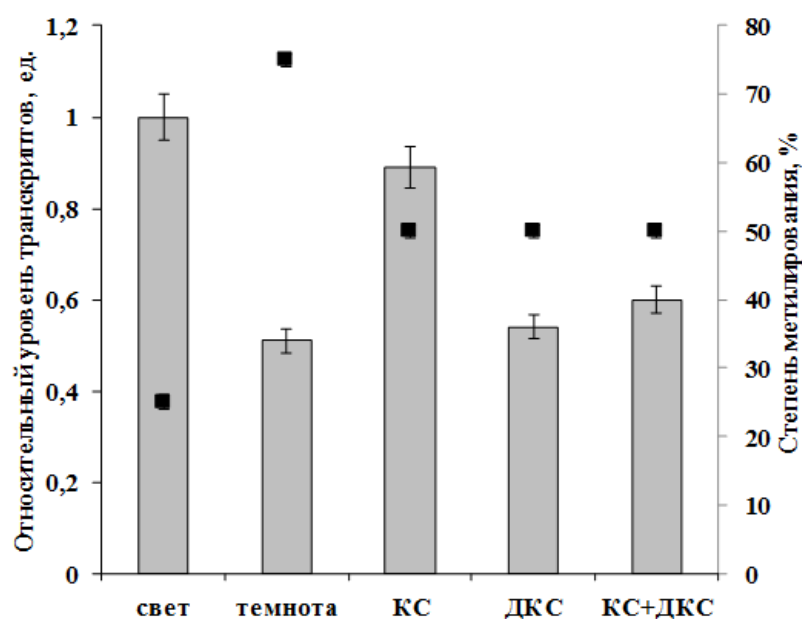


Рис. 72. Относительный уровень транскриптов (серые столбцы) и степень метилирования (черные точки) CG-нуклеотидов промотора гена *CSY2* в листьях кукурузы в условиях различного освещения.

Проведены исследования эпигенетических механизмов регуляции функционирования генов АГ в листьях кукурузы при облучении растений светом разной длины волны. Выявлена разница в статусах метилирования промоторов исследуемых генов, в растениях, при различных световых режимах (табл. 21). Показано, что промотор гена *ACO1* был практически полностью метилирован в растениях, экспонированных на свету и в варианте «КС». В растениях,



помещенных в условия темноты, метилирование исследуемых CG-динуклеотидов отсутствовало полностью.

Таблица 21.

Степень метилирования CG-динуклеотидов промотора гена, кодирующего митохондриальную аконитазу в условиях различного освещения

		свет	темнота	КС	ДКС	КС+ДКС
<i>ACO1</i>	I	+	-	+	+	-
	II	+	-	+	-	+
	III	±	-	±	-	±
	%	75	0	75	50	50

У вариантов, освещенных ДКС и последовательно освещенных светом с длиной волны 660 и 730 нм промотор исследуемого гена был частично метилирован (рис. 73). Подобная зависимость соотносится с данными оценки содержания транскриптов гена *ACO1* в листьях кукурузы.

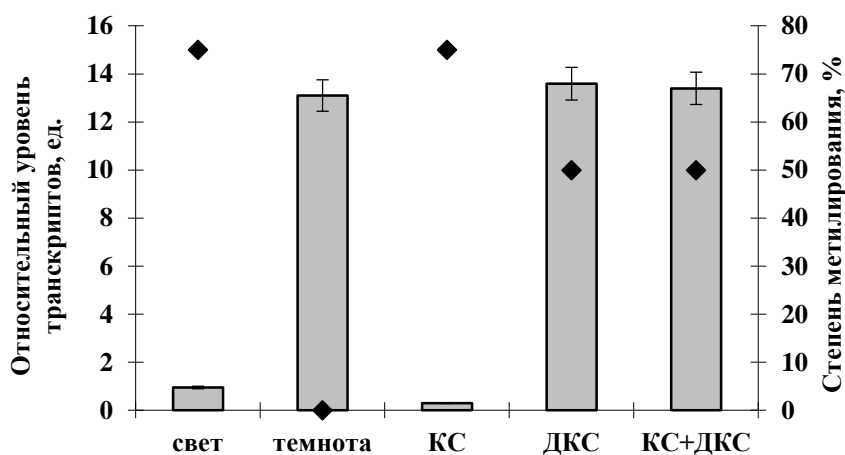


Рис. 73. Относительный уровень транскриптов (серые столбцы) гена *ACO1* и степень метилирования (черные точки) отдельных CG-динуклеотидов в его промоторе в различных режимах освещения кукурузы.

Высокая концентрация мРНК гена *ACO1* обнаружена в варианте «темнота», поскольку в данных условиях митохондриальная форма АГ обеспечивает работу цикла Кребса. По-видимому, метилирование принимает непосредственное участие в его регуляции.

Для гена *ACO2*, кодирующего цитоплазматическую форму аконитатгидратазы, выявлена зависимость статуса метилирования его промотора в образцах кукурузы в различных световых режимах (табл. 22).

Таблица 22.

Степень метилирования CG-динуклеотидов промотора гена, кодирующего цитоплазматическую аконитазу в условиях различного освещения

		свет	темнота	КС	ДКС	КС+ДКС
<i>ACO2</i>	I	-	±	±	-	±
	II	±	±	-	-	±
	III	+	+	+	-	+
	%	50	75	50	0	75

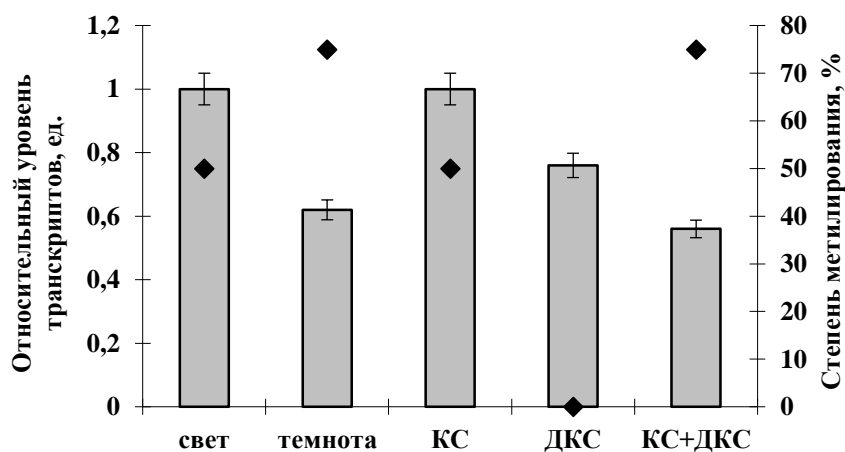


Рис. 74. Относительный уровень транскриптов (серые столбцы) гена *ACO2* и степень метилирования (черные точки) отдельных CG-динуклеотидов в его промоторе в различных режимах освещения.

Промотор данного гена был частично метилирован в пробах, подвергнутых облучению светом с длинами волн 730 и 660+730, а также в листьях кукурузы, инкубированных в темноте. В растениях варианта «свет» и облученных светом с длиной волны 660 нм, метилирование, напротив, было представлено на более низком уровне и составляло 50% (рис. 74). Выявлена зависимость метильного статуса промотора гена *Aco2* с его относительной экспрессией в растениях в условиях различного светового режима, свидетельствует, что в его регуляции метилирование принимает непосредственное участие. Высокая степень метилирования исследуемых CG-динуклеотидов промотора гена *ACO2* приводит к снижению уровня его транскриптов.

## 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 энзимов, 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 внемитохондриальные формы исследуемых энзимов, 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 внемитохондриальной и митохондриальной форм исследуемых энзимов в клетке. Митохондриальные изоферменты участвуют в ЦТК и дыхательном метаболизме, осуществляемом в темноте, а внемитохондриальные - функционируют в метаболизации потока ассимилянтов 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 (E- 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 E-участком промоторов генов *SDH1-2*, *SDH2-3*, *ACO1* и *CSY1* и снижается их транскрипционная активность (рис. 14). 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. 75).

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.

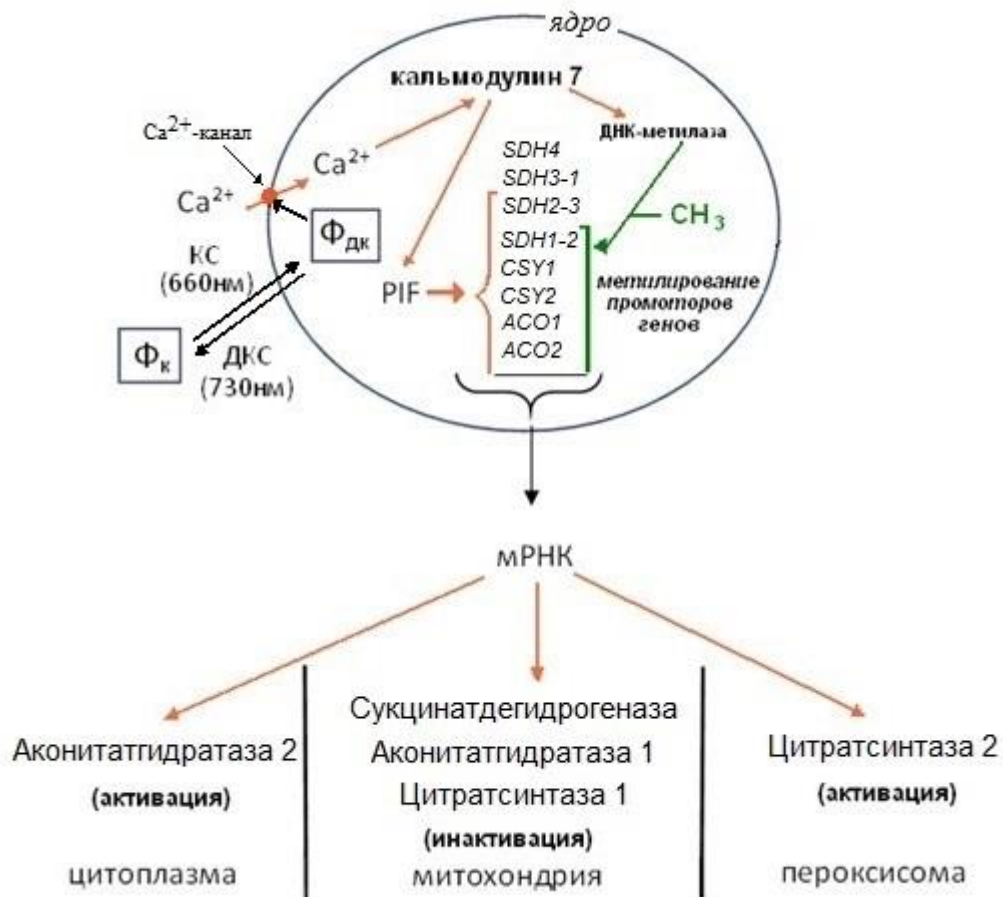


Рис. 75. Гипотетическая схема трансдукции фитохромного сигнала и механизма регуляции экспрессии генов СДГ, ЦС и АГ в зеленых листьях кукурузы. Условные обозначения: Фк – неактивная форма фитохрома, Фдк – активная форма фитохрома, КС – красный свет, ДКС – дальний красный свет, PIF3 – фитохром-индуцируемый транскрипционный фактор, 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-островок, 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 литературы

1. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др (2005) Физиология растений: Учебник для студ. Вузов [под ред. И.П. Ермакова]. М. : Издат. центр Академия, 640.
2. Войцеховская О.В. (2019) Фитохромы и другие (фото)рецепторы информации у растений. *Физиология растений*, 66, 163–177.
3. Волоотовский И.Д. (1998)  $Ca^{2+}$  и внутриклеточная сигнализация в растительной клетке: роль  $Ca^{2+}$  в фитохромной трансдукции. *Биологические мембраны*, 15, 573-587.
4. Епринцев А.Т., Москалёв Е.А., Попов В.Н. (2001) Полимеразная цепная реакция как универсальный метод диагностики и идентификации генов. *Системный анализ и управление в биомедицинских системах*, 1, 9-14.
5. Епринцев А.Т., Попов В.Н. (1999) Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях. Воронеж: Из-во Воронеж. ун-та, 192.
6. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. (2010) Сукцинатдегидрогеназа высших растений. Воронеж: Центр. Черн. Книжное изд-во, 184.
7. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. (2007) Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации?, Москва: Академкнига, 231 с.
8. Епринцев А.Т., Селиванова Н.В., Федорин Д.Н. (2015) Регуляция активности сукцинатдегидрогеназного комплекса *Arabidopsis thaliana* L. синим светом. *Биологические мембраны*, 32, 287–292.
9. Епринцев А.Т., Селиванова Н.В., Федорин Д.Н., Башкин С.С., Селезнева Е.А., Дадакина И.В., Махмуд Али С. (2012) Роль катионов кальция в механизме фитохром-зависимой регуляции экспрессии гена *sdh1-2* и активности сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы. *Биологические мембраны*, 29, 165–168.
10. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Сазонова О.В. (2015а) Фитохром-зависимая регуляция активности фумаратгидратазы в зеленых листьях кукурузы. *Физиология растений*, 62, 474-480.

11. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В. (2016) Молекулярные аспекты формирования олигомерной структуры сукцинатдегидрогеназы, Воронеж, 264.
12. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ахмад Дж.А., Попов В.Н. (2010а) Роль дифференциальной экспрессии генов *sdh1-1* и *sdh1-2* в изменении изоферментного состава сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы. *Известия РАН. Серия биологическая*, 3, 324-332.
13. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ву Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н. (2012) Роль метилирования промоторов в регуляции генов сукцинатдегидрогеназы в проростках кукурузы. *Физиология растений*, 59, 332–340.
14. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. (1995) Метаболизм органических кислот растений. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 150-152.
15. Игамбердиев А.У., Фалалеева М.И. (1994) Выделение и характеристика сукцинатдегидрогеназного комплекса митохондрий растений. *Биохимия*, 59, 1198-1999.
16. Кирнос М.Д., Меркулова Н.А., Борхсениус С.Н., Ванюшин Б.Ф. (1980) Характер метилирования ядерной ДНК у простейшего Tetrahymena. *Доклады Академии наук*, 255, 225-227.
17. Кузнецов Е.Д., Сечняк Л.К., Киндрук Н.А., Слюсаренко О.К. (1986) Роль фитохрома в растениях. М.: Агропромиздат, 288.
18. Лакин Г.Ф. (1990) Биометрия. М.: Высш. шк., 351.
19. Любимов В.Ю., Креславский В.Д., Шмарев А.Н. (2020) Фоторегуляция цитоплазматического ФГА-дегидрогеназного комплекса в листьях пшеницы. *Физиология растений*, 67, 470-474.
20. Мамушина Н.С., Зубкова Б.К. (1995) Функционирование основных этапов темнового дыхания на свету у С3 растений с разным сезонным ритмом. *Физиология растений*, 42, 30–37.
21. Медведев С.С. (2005) Кальциевая сигнальная система растений. *Физиология растений*, 51, 282-305.

22. Новикова Г.В., Мошков И.Е., Лось Д.А. (2007) Белковые сенсоры и передатчики холодового и осмотического стрессов у цианобактерий и растений. *Молекулярная биология*, 41, 478-490.
23. Остерман Л.А. (1981) Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 288.
24. Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Леонова Ю.А. (2005) Влияние света на активность сукцинатдегидрогеназы в листьях кукурузы. *Журнал стресс-физиологии и биохимии*, 1, 30–37.
25. Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н. (2007) Световая регуляция экспрессии сукцинатдегидрогеназы в листьях *Arabidopsis thaliana*. *Физиология растений*, 54, 409–415.
26. Синещеков В.А. (1998) Система фитохромов: фотобиофизика и фотобиохимия *in vivo*. *Биологические мембраны*, 15, 549–571.
27. Феденко Е.П., Касумов К.К., Лапко В.Н. (1995) Система цАМФ как посредник фитохрома в действии света. *Физиология и биохимия культурных растений*, 27, 3-11.
28. Федорин Д.Н., Карабутова Л.А., Покусина Т.А., Епринцев А.Т. (2016) Выделение изоформ сукцинатдегидрогеназы из зеленых листьев кукурузы методом ионообменной хроматографии. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 11, 900-904.
29. Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Селезнева Е.А., Карабутова Л.А., Махмуд Али С., Эсмаилпур М., Епринцев А.Т. (2011) Экспрессия генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы в щитках и зеленых листьях кукурузы. *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов.*, 13, 190-197.
30. Adams K.L., Rosenblueth M., Qiu Y.L., Palmer J.D. (2001) Multiple losses and transfers to the nucleus of two mitochondrial succinate dehydrogenase genes during angiosperm evolution. *Genetics*, 158, 1289-1300.

31. Address K.J., Basilion J.P., Klausner R.D., Rouault T.A., Pardi A. (1997) Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: implications for binding of the RNA by iron regulatory binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 274, 72-83.
32. Ahmad M., Cashmore A.R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366, 162-166.
33. Alabadi D., Blazquez M.A. (2009) Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol.*, 69, 409-417.
34. Al-Sady B., Ni W., Kircher S., Schäfer E., Quail P.H. (2006) Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell*, 23, 439-446.
35. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
36. Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J.M.Jr., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L., Vance V.B. (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 290, 142-144.
37. Andersson U., Leighton B., Young M.E., Blomstrand E., Newsholme E.A. (1998) Inactivation of aconitase and oxoglutarate dehydrogenase in skeletal muscle *in vitro* by superoxide anions and/or nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249, 512-516.
38. Ang L.H., Chattopadhyay S., Wei N., Oyama T., Okada K., Batschauer A., Deng X.W. (1998) Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. *Mol Cell*, 1, 213-222.
39. Anoop V.M., Basu U., McCammon M.T., McAlister-Henn L., Taylor G.J. (2003) Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol.*, 132, 2205-2217.
40. Antequera F., Bird A. (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *PNAS USA*, 90, 11995-11999.

41. Araujo W.L., Nunes-Nesi A., Osorio S., Usadel B., Fuentes D., Nagy R., Balbo I., Lehmann M., Studart-Witkowski C., Tohge T., Martinoia E., Jordana X., Damatta F.M., Fernie A.R. (2011) Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. *Plant Cell*, 23, 600-627.
42. Arnaud N., Ravet K., Borlotti A., Touraine B., Boucherez J., Fizames C., Briat J.F., Cellier F., Gaymard F. (2007) The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochem J.*, 405, 523-531.
43. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. (2002) The gene for domains rearranged methyltransferase (DRM2) in *Arabidopsis thaliana* plants is methylated at both cytosine and adenine residues. *FEBS Lett.*, 532, 367-372.
44. Bacon J.S.D., Palmer M.J., De Cock P.C. (1961) The measurement of aconitase activity in the leaves of various normal and variegated plants. *Biochem J.*, 78, 198–204.
45. Bakeeva L.E., Zamyatnina V.A., Shorning B.Y., Aleksandrushkina N.I., Vanyushin B.F. (2001) Effect of the antioxidant ionol (BHT) on growth and development of etiolated wheat seedlings: control of apoptosis, cell division, organelle ultrastructure, and plastid differentiation. *Biochemistry (Moscow)*, 66, 850-859.
46. Bartels A., Han Q., Nair P., Stacey L., Gaynier H., Mosley M., Huang Q.Q., Pearson J.K., Hsieh T.F., An Y.C., Xiao W. (2000) Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *PNAS USA.*, 97, 6960-6966.
47. Bartels A., Han Q., Nair P., Stacey L., Gaynier H., Mosley M., Huang Q.Q., Pearson J.K., Hsieh T.F., An Y.C., Xiao W. (2018) Dynamic DNA methylation in plant growth and development. *Int J Mol Sci.*, 19, e2144.
48. Baum G., Long J.C., Jenkins G.I., Trewavas A.J. (1999) Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *PNAS USA.*, 96, 13554–13559.



49. Beinert H., Kennedy M.C. (1993) Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J.*, 7, 1442-1449.
50. Beinert H., Kennedy M.C., Stout C.D. (1996) Aconitase as iron-minus sign sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chemical Reviews*, 96, 2335–2374.
51. Beinert H., Thomson A.J. (1983) Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. *Arch Biochem Biophys.*, 222, 333–361.
52. Belt K., Huang S., Thatcher L.F., Casarotto H., Singh K.B., Van Aken O., Millar A.H. (2017) Salicylic acid-dependent plant stress signaling via mitochondrial succinate dehydrogenase. *Plant Physiol.*, 173, 2029–2040.
53. Ben-Menachem R., Regev-Rudzki N., Pines O. (2011) The aconitase C-terminal domain is an independent dual eargeting Element. *J. Mol. Biol.*, 409, 113–123.
54. Bernard D.G., Cheng Y., Zhao Y., Balk J. (2009) An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron–sulfur proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 151, 590–602.
55. Bestor T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9, 2395–2402.
56. Bethany A.B-K., Defossez P.-A. (2013) On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics*, 8, 131—137.
57. Blasing O.E., Gibon Y., Günther M., Hohne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W.R., Stitt M. (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17, 3257–3281.
58. Boore J. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27, 1767–1780.
59. Botella J.R., Arteca J.M., Somodevilla M., Arteca R.N. (1996) Calcium dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mung bean (*Vigna radiata*). *Plant. Mol. Biol.*, 30, 1129-1137.
60. Bowler C., Neuhaus G., Yamagata H., Chua N.H. (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, 77, 73–81.

61. Braam J. (1992) Regulated expression of the CaM-related TCH genes in cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock. *PNAS USA*, 89, 3213-3216.
62. Braun A.P., Schulman H. (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinases: From form to function. *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 417-445.
63. Braun H.P., Schmitz U.K. (1997) The mitochondrial processing peptidase. *Int J Biochem Cell Biol.*, 29, 1043-1045.
64. Brazard J., Usman A., Lacomat F., Ley C., Martin M.M., Plaza P., Mony L., Heijde M., Zabulon G., Bowler C. (2010) Spectro-temporal characterization of the photoactivation mechanism of two new oxidized cryptochrome/photolyase photoreceptors. *J Am Chem Soc.*, 132, 4935-4945.
65. Brouquisse R., Nishimura M., Gaillard J., Douce R. (1987) Characterization of a cytosolic aconitase in higher plant cells. *Plant Physiol.*, 84, 1402-1407.
66. Bulteau A.L., O'Neill H.A., Kennedy M.C., Ikeda-Saito M., Isaya G., Szweda L.I. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science.*, 305, 242-245.
67. Burger G., Lang B.F., Reith M., Gray M.W. (1996) Genes encoding the same three subunits of respiratory complex II are present in the mitochondrial DNA of two phylogenetically distant eukaryotes. *PNAS USA*, 93, 2328-2332.
68. Burke J.J., Siedow J.N., Moreland D.E. (1982) Succinate dehydrogenase: a partial purification from mung bean hypocotyls and soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, 70, 1577-1581.
69. Buryanov Ya.I., Shevchuk T.V. (2005) DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification. *Biochemistry (Moscow)*, 70, 730.
70. Cao X., Jacobsen S.E. (2002) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *PNAS USA*, 10, 16491-16498.

71. Carpy A., Krug K., Graf S., Koch A., Popic S., Hauf S., Macek B. (2014) Absolute proteome and phosphoproteome dynamics during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe* (fission yeast). *Mol. Cell. Proteomics*, 13, 1925–1936.
72. Carrari F., Nunes-Nesi A., Gibon Y., Lytovchenko A., Loureiro M.E., Fernie A.R. (2003) Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiol.*, 133, 1322–1335.
73. Carretero-Paulet L., Galstyan A., Roig-Villanova I., Martínez-García J.F., Bilbao-Castro J.R., Robertson D.L. (2010) Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol.*, 153, 1398–1412.
74. Casal J.J., Yanovsky M.J. (2005) Regulation of gene expression by light. *Int. J. Dev. Biol.*, 49, 501-511.
75. Cashmore A.R., Jarillo J.A., Wu Y.J., Liu D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284, 760-765.
76. Castro L., Rodriguez M., Radif R. (1994) Aconitase Is Readily Inactivated by Peroxynitrite, but Not by Its Precursor, Nitric Oxide. *The J. of Bio. Chem.*, 269, 29409-29415.
77. Cercos M., Soler G., Iglesias D.J., Gadea J., Forment J., Talon M. (2006) Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A Proposed Mechanism for Citric Acid Utilization. *Plant Mol Biol.*, 62, 513-527.
78. Chattopadhyay S., Ang L.H., Puente P., Deng X.W., Wei N. (1998) Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell*, 10, 673–683.
79. Chen F., Li B., Li G., Charron J.B., Dai M., Shi X., Deng X.W. (2014) Arabidopsis phytochrome A directly targets numerous promoters for individualized modulation of genes in a wide range of pathways. *Plant Cell*, 26, 1949–1966.
80. Chen M., Chory J., Fankhauser C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 87–117.

81. Chen X.J., Wang X., Butow R.A. (2007) Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *PNAS USA.*, 104, 13738-13743.
82. Cheng T.L., Liao C.C., Tsai W.H., Lin C.C., Yeh C.W., Teng C.F., Chang W.T. (2009) Identification and characterization of the mitochondrial targeting sequence and mechanism in human citrate synthase. *J. Cell. Biochem.*, 107, 1002-1015.
83. Cherkasov A.A., Overton R.A.Jr., Sokolov E.P., Sokolova I.M. (2010) Temperature-dependent effects of cadmium and purine nucleotides on mitochondrial aconitase from a marine ectotherm, *Crassostrea virginica*: a role of temperature in stress and allosteric enzyme regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 210, 46-55.
84. Clark S.J., Harrison J., Molloy P.L. (1997) Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene*, 195, 67-71.
85. Claros M.G., Perea J., Shu Y., Samatey F.A., Popot J.L., Jacq C. (1995) Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. *European journal of biochemistry*, 228, 762-771.
86. Clore A.B., Doore S.M., Tinnirello S.M.N. (2008) Increased levels of reactive oxygen species and expression of a cytoplasmic aconitase/iron regulatory protein 1 homolog during the early response of maize pulvini to gravistimulation. *Plant, Cell and Environment*, 31, 144–158.
87. Cokus S.J., Feng S., Zhang X., Chen Z., Merriman B., Haudenschild C.D., Pradhan S., Nelson S.F., Pellegrini M., Jacobsen S.E. (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature Letters*, 452, 215-219.
88. Colbran R.J., Smith M.K., Schworer C.M., Fong Y.L., Soderling T.R. (1989) Regulatory domain of calcium/CaM-dependent protein kinase II: mechanism of inhibition and regulation by phosphorylation. *Biochem. J.*, 258, 3132.
89. Comb M., Goodman H.M. (1990) CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.*, 18, 3975-3982.

90. Cooper T.G., Beevers H.J. (1969) Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.*, 244, 3507–3513.
91. Cornah J.E., Graham I.A. (2002) Synthesis and function of glyoxylate cycled enzymes. In *Plant Peroxisomes*. London: Kluwer Academic Publishers, 57–101.
92. Correa L.G., Riano-Pachon D.M., Schrago C.G., dos Santos R.V., Mueller-Roeber B., Vincentz M. (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS ONE*, 3: e2944.
93. Courtois-Verniquet F., Douce R. (1993) Lack of aconitase in glyoxysomes and peroxisomes. *Biochem. J.*, 294, 103-107.
94. Crivici A., Ikura M. (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24, 85–116.
95. Cummings D.J., Tait A., Goddard J.M. (1974) Methylated bases in DNA from *Paramecium Aurelia*. *Biochim Biophys Acta*, 374, 1–11.
96. Daignan-Fornier B., Valens M., Lemire B.D., Bolotin-Fukuhara M. (1994) Structure and regulation of SDH3, the yeast gene encoding the cytochrome b560 subunit of respiratory complex II. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 15469-15472.
97. Davis B.J. (1994) Disc electrophoresis. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
98. De Bellis L., Hayashi M., Nishimura M., Alpi A. (1995). Subcellular and developmental changes in distribution of aconitase isoforms in pumpkin cotyledons. *Planta.*, 195, 464–468.
99. De Bellis L., Tsugeki R., Alpi A., Nishimura M. (1993) Purification and characterization of aconitase isoforms from etiolated pumpkin cotyledons. *Physiol. Plant.*, 88, 485–492.
100. Degu A., Hatew B., Nunes-Nesi A., Shlizerman L., Zur N., Katz E., Fernie A.R., Blumwald E., Sadka A. (2011) Inhibition of aconitase in citrus fruit callus results in a metabolic shift towards amino acid biosynthesis. *Planta*, 234, 501–513.

101. Dodge J.E., Ramsahoye B.H., Wo Z.G., Okano M., Li E. (2002) *De novo* methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene.*, 289, 41–48.
102. Dong A., Xin H., Yu Y., Sun C., Cao K., Shen W.H. (2002) The subcellular localization of an unusual rice calmodulin isoform, OsCaM61, depends on its prenylation status. *Plant Mol. Biol.*, 48, 203–210.
103. Doolittle W.F. (1998) You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in Genetics*, 14, 307-311.
104. Douce R. (2012) *Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function, and Biogenesis*. Elsevier. 344.
105. Drapier J.C., Hirling H., Wietzerbin J., Kaldy P., Kühn L.C. (1993) Biosynthesis of nitric oxide activates iron regulatory factor in macrophages. *EMBO J.*, 12, 3643–3649.
106. Du L., Ali G.S., Simons K.A., Hou J., Yang T., Reddy A.S., Poovaiah B.W. (2009)  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature*, 457, 1154-1158.
107. Dunn D.B., Smith J.D. (1955) Occurrence of a New Base in the Deoxyribonucleic Acid of a Strain of Bacterium Coli. *Nature.*, 175, 336-337.
108. Dunn D.B., Smith J.D. (1958) The occurrence of 6-methylaminopurine in deoxyribonucleic acids. *Biochem J.*, 68, 627-636.
109. Dyachenko O.V., Tarlachkov S.V., Marinitch D.V., Shevchuk T.V., Buryanov Y.I. (2014) Expression of exogenous DNA methyltransferases: Application in molecular and cell biology. *Biochemistry (Mosc)*, 79, 77-87.
110. Echevarria W., Leite M.F., Guerra M.T., Zipfel W.R., Nathanson M.H. (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.*, 5, 440-446.
111. Emery-Goodman A., Hirling H., Scarpellino L., Henderson B., Kühn L.C. (1993) Iron regulatory factor expressed from recombinant baculovirus: conversion between

- the RNA binding apoprotein and Fe-S cluster containing aconitase. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1457–1461.
112. Enslin H., Sun P., Brickey D., Soderling S.H., Klamo E., Soderling T.R. (1994) Characterization of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J Biol Chem.*, 269, 15520-15527.
113. Enslin H., Tokumitsu H., Soderling T.R. (1995) Phosphorylation of CREB by CaM-kinase IV activated by CaM-kinase IV kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 1038-1043.
114. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. (2013) Ca<sup>2+</sup> is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate dehydrogenase gene *sdh1-2* in Arabidopsis. *Journal Plant Physiology*, 170, 1349-1352.
115. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Nikitina M.V., Igamberdiev A.U. (2015) Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of aconitase in maize scutellum. *Journal of Plant Physiology.*, 181, 14–19.
116. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Salnikov A.V., Igamberdiev A.U. (2015a) Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. *Journal of Plant Physiology*, 181, 1–8.
117. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Starinina E.V., Igamberdiev A.U. (2014) Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in germinating maize seeds. *Physiol Plant.*, 152, 231–240.
118. Escrich A., Cusido R.M., Bonfill M., Palazon J., Sanchez-Munoz R., Moyano E. (2022) The Epigenetic Regulation in Plant Specialized Metabolism: DNA Methylation Limits Paclitaxel in vitro Biotechnological Production. *Front. Plant Sci.*, 13, 899444.
119. Escobar M.A., Franklin K.A., Svensson A.S., Salter M.G., Whitlam G.C., Rasmusson A.G. (2004) Light Regulation of the Arabidopsis Respiratory Chain. Multiple Discrete Photoreceptor Responses Contribute to Induction of Type II NAD(P)H Dehydrogenase Genes. *Plant Physiol.*, 136, 2710–2721.

120. Eubel H., Jansch L., Braun H.P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiology*, 133, 274-286.
121. Ezer D., Shepherd S.J.K., Brestovitsky A., Dickinson P., Cortijo S., Charoensawan V., Box M.S., Biswas S., Jaeger K.E., Wigge P.A. (2017) The G-box transcriptional regulatory code in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 175, 628-640.
122. Fahnenstich H., Saigo M., Niessen M., Zanol M.I., Andreo C.S., Fernie A.R., Drincovich M.F., Flügge U.I., Maurino V.G. (2007) Alteration of organic acid metabolism in Arabidopsis overexpressing the maize C<sub>4</sub> NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. *Plant Physiol.*, 145, 640–652.
123. Fedoreyeva L.I., Aleksandrushkina N.I., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Vanyushin B.F. (1997) Effect of Ethylene Producer Ethrel and Antioxidant Ionol (BHT) on the Proteolytic Apparatus in Coleoptiles of Wheat Seedlings during Apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 62, 1348-1357.
124. Fedoreyeva L.I., Vanyushin B.F. (2002) 2N6-Adenine DNA-methyltransferase in wheat seedlings. *FEBS Lett.*, 514, 305-308.
125. Fedoroff N.V., Banks J.A. (1988) Is the Suppressor-mutator element controlled by a basic developmental regulatory mechanism? *Genetics*, 120, 559–577.
126. Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schäfer E., Fu X., Fan L.M., Deng X.W. (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, 451, 475-479.
127. Fernie A.R., Carrari F., Sweetlove L.J. (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport chain. *Curr Opin Plant Biol.*, 7, 254–261.
128. Finnegan E.J., Kovac K.A. (2000) Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol. Biol.*, 43, 189-210.



129. Finnegan E.J., Peacock W.J., Dennis E.S. (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *PNAS USA*, 93, 8449–8454.
130. Finnegan E.J., Peacock W.J., Dennis E.S. (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr. Opin. Genet. Devel.*, 10, 217-223.
131. Flint D.H., Allen R.M. (1996) Iron–Sulfur proteins with nonredox functions. *Chemical Reviews*, 96, 2315–2334.
132. Flint D.H., Emptage M.H. (1990) Biosynthesis of branched chain amino acids. VCH Publishers Inc., New York. 285–314.
133. Florence C.V., Douce R. (1993) Lack of aconitase in glyoxysomes and peroxisomes. *Biochem. J.*, 294, 103-107.
134. Fraga M.F., Rodriguez R., Canal M.J. (2002) Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiol.*, 22, 813–816.
135. Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R., Stitt M. (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.*, 46, 533–548.
136. Fuentes D., Meneses M., Nunes-Nesi A., Araújo W.L., Tapia R., Gómez I., Holuigue L., Gutiérrez R.A., Fernie A.R., Jordana X. (2011) A Deficiency in the Flavoprotein of Arabidopsis Mitochondrial Complex II Results in Elevated Photosynthesis and Better Growth in Nitrogen-Limiting Conditions. *Plant Physiology*, 157, 1114–1127.
137. Gakh O., Cavadini P., Isaya G. (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta.*, 1592, 63–77.
138. Galon Y., Finkler A., Fromm H. (2010) Calcium-regulated transcription in plants. *Molecular Plant.*, 3, 653–669.
139. Galon Y., Snir O., Fromm H. (2010) How calmodulin binding transcription activators (CAMTAs) mediate auxin responses. *Plant Signal Behav.*, 5, 1311-1314.

140. Garrett R.H., Grisham C.M. (2013) *Biochemistry* (5th edition). Belmont, CA: Brooks/Cole. 609-621.
141. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607.
142. Gaude N., Brehelin C., Tischendorf G., Kessler F., Dörmann P. (2007) Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *Plant J.*, 49, 729–739.
143. Gavel Y., von Heijne G. (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng.*, 4, 33-37.
144. Gayral M., Bakan B., Dalgalarondo M., Elmorjani K., Delluc C., Brunet S., Linossier L., Morel M.H., Marion D. (2015) Lipid partitioning in maize (*Zea mays* L.) endosperm highlights relationships among starch lipids, amylose, and vitreousness. *J Agric Food Chem.*, 63, 3551-3558.
145. Gerald A., Greenblatt I.V. (1973) Citrate Synthase of Plants: Sensitivity to Sulfhydryl Reagents and Molecular Weight of the Enzyme. *Physiologia plantarum.*, 29, 361-364.
146. Gibon Y., Usadel B., Blaesing O.E., Kamlage B., Hoehne M., Trethewey R., Stitt M. (2006) Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes. *Genome Biol.*, 7, 76.
147. Giege P., Knoop V., Brennicke A. (1998) Complex II subunit 4 (*sdh4*) homologous sequences in plant mitochondrial genomes. *Curr. Genet.*, 34, 313–317.
148. Giovani B., Byrdin M., Ahmad M., Brettel K. (2003) Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat. Struct. Biol.*, 10, 489-90.
149. Gleason C., Huang S., Thatcher L.F., Foley R.C., Anderson C.R., Carroll A.J., Millar A.H., Singh K.B. (2011) Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *PNAS. USA.*, 108, 10768–10773.
150. Gold M., Hurwitz J. (1964) Methylation of DNA. *J. Biol. Chem.*, 239, 3858-3865.

151. Goll M.G., Kirpekar F., Maggert K.A., Yoder J.A., Hsieh C.L., Zhang X., Golic K.G., Jacobsen S.E., Bestor T.H. (2006) Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 395–398.
152. Gomes C.M., Lemos R.S., Teixeira M., Kletzin A., Huber H., Stetter K.O., Schäfer G., Anemüller S. (1999) The unusual iron sulfur composition of the *Acidianus ambivalens* succinate dehydrogenase complex. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, 1411, 134-141.
153. Gorovsky M.A., Hattman D., Pleger G.L. (1973) Methylation of replicating and nonreplicating DNA in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.*, 56, 697-701.
154. Gourley B.L., Parker S.B., Jones B.J., Zumbrennen K.B., Leibold E.A. (2003) Cytosolic aconitase and ferritin are regulated by iron in *Caenorhabditis elegans*. *The J. of Biological Chemistry*, 278, 3227–3234.
155. Gray M.W., Lang B.F., Cedergren R., Golding G.B., Lemieux C., Sankoff D., Turmel M., N. Brossard, Delage E., Littlejohn T.G., Plante I., Rioux P., Saint-Louis D., Zhu Y., Burger G. (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res*, 26, 865–878.
156. Greenberg M.V., Ausin I., Chan S.W., Cokus S.J., Cuperus J.T., Feng S., Law J.A., Chu C., Pellegrini M., Carrington J.C., Jacobsen S.E. (2011) Identification of genes required for *de novo* DNA methylation in Arabidopsis. *Epigenetics*, 6, 344-354.
157. Guerinot M.L., Yi Y. (1994) Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.*, 104, 815–820.
158. Guo B., Phillips J.D., Yu Y., Leibold E.A. (1995) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem.*, 270, 21645–21651.
159. Guo H., Duong H., Ma N., Lin C. (1999) The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.*, 19, 279-287.

160. Gupta K.J., Shah J.K., Brotman Y., Jahnke K., Willmitzer L., Kaiser W.M., Bauwe H., Igamberdiev A.U. (2012) Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1773–1784.
161. Han X., Tohge T., Lalor P., Dockery P., Devaney N., Esteves-Ferreira A.A., Fernie A.R., Sulpice R. (2017) Phytochrome A and B regulate primary metabolism in *Arabidopsis* leaves in response to light. *Front Plant Sci.*, 8, e1394.
162. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domain. *Science*, 241, 42-52.
163. Hanning I., Heldt H.W. (1993) On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Partitioning between respiration and export of redox equivalents and precursors for nitrate assimilation products. *Plant Physiol.*, 103, 1147–1154.
164. Hao Y., Oh E., Choi G., Liang Z., Wang Z.Y. (2012) Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Mol Plant.*, 5, 688–697.
165. Harper J.F., Sussman M.R., Schaller G.E., Putnam-Evans C., Charbonneau H., Harmon A.C. (1991) A calcium dependent protein kinase with a regulatory domain similar to CaM. *Science*, 252, 951-954.
166. Hayashi M., De Bellis L., Alpi A., Nishimura M. (1995) Cytosolic aconitase participates in the glyoxylate cycle in etiolated pumpkin cotyledons. *Plant Cell Physiol.*, 36, 669-680.
167. Hayles J. (2013) A genome-wide resource of cell cycle and cell shape genes of fission yeast. *Open Biol.*, 3, e130053.
168. Heazlewood J.L., Tonti-Filippini J.S., Gout A.M., Day D.A., Whelan J., Millar A.H. (2004) Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell*, 16, 241–256.

169. Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C. (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol.*, 20, 735–747.
170. Holm L., Rosenström P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucl. Acids Res.*, 38, 545-549.
171. Hooks M.A., Allwood J.W., Harrison J.K., Kopka J., Erban A., Goodacre R., Balk J. (2014) Selective induction and subcellular distribution of ACONITASE 3 reveal the importance of cytosolic citrate metabolism during lipid mobilization in Arabidopsis. *Biochem. J.*, 463, 309–317.
172. Hooks M.A., Rosenström P. (2002) Molecular biology, enzymology, and physiology of  $\beta$ -oxidation. Kluwer Academic Publishers: London. 19–55.
173. Hornitschek P., Lorrain S., Zoete V., Michielin O., Fankhauser C. (2009) Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EOMB J.*, 28, 3893–3902.
174. Horsefield R., Yankovskaya V., Sexton G., Whittingham W., Shiomi K., Omura S., Byrne B., Cecchini G., Iwata S. (2006) Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *J. Biol. Chem.*, 281, 7309–7316.
175. Hotchkiss R.D. (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.*, 175, 315-332.
176. Hsu K.H., Powell G.L. (1975) Inhibition of citrate synthase by oleoyl-CoA: a regulatory phenomenon. *PNAS USA*, 72, 4729–4733.
177. Huang S., Millar A.H. (2013) Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Current opinion in plant biology*, 16, 344-349.
178. Hudson M.E., Lisch D.R., Quail P.H. (2003) The FHY3 and FAR1 genes encode transposase-related proteins involved in regulation of gene expression by the phytochrome A-signaling pathway. *Plant J.*, 34, 453-471.

179. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N. (2014) Phytochrome-mediated regulation of plant respiration and photorespiration. *Plant Cell Environ.*, 37, 290-299.
180. Igamberdiev A.U., Gardeström P. (2003) Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochim Biophys Acta.*, 1606, 117–125.
181. Igamberdiev A.U., Hurry V., Krömer S., Gardeström P. (1998) The role of mitochondrial electron transport during photosynthetic induction. A study with barley (*Hordeum vulgare*) protoplasts incubated with rotenone and oligomycin. *Physiol. Plant.*, 104, 431-439.
182. Imaizumi T., Kanegae T., Wada M. (2000) Cryptochrome Nucleocytoplasmic Distribution and Gene Expression Are Regulated by Light Quality in the Fern *Adiantum capillus-veneris*. *Plant Cell.*, 12, 81-96.
183. Ishizaki K., Larson T.R., Schauer N., Fernie A.R., Graham I.A., Leaver C.J. (2005) The critical role of Arabidopsis electron-transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *Plant Cell.*, 17, 2587–2600.
184. Iwai K., Drake S.K., Wehr N.B., Weissman A.M., LaVaute T., Minato N., Klausner R.D., Levine R.L., Rouault T.A. (1998) Iron-dependent oxidation, ubiquitination and degradation of iron regulatory protein 2: implications for degradation of oxidized proteins. *PNAS USA*, 95, 4924-4928
185. Jardim-Messeder D., Caverzan A., Rauber R., de Souza Ferreira E., Margis-Pinheiro M., Galina A. (2015) Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses. *New Phytol.*, 208, 776–789.
186. Jena P.K., Reddy A.S.N., Poovaiah B.W. (1989) Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant CaM: signal induced changes in the expression of CaM. *PNAS. USA.*, 86, 3644-3648.

187. Jiang B., Shi Y., Zhang X., Xin X., Qi L., Guo H., Li J., Yang S. (2017) PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in Arabidopsis. *PNAS USA*, 114, 6695-6702.
188. Kakutani T., Jeddeloh J., Richards E.J. (1995) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucleic Acids Res.*, 23, 130–137.
189. Karibe H., Komatsu S., Hirano H. (1995) A calcium and phospholipid dependent protein kinase from rice (*Oryza sativa*) leaves. *Physiol. Plant.*, 95, 127-133.
190. Karpusas M., Branchaud B., Remington S.J. (1990) Proposed mechanism for the condensation reaction of citrate synthase: 1.9-A structure of the ternary complex with oxaloacetate and carboxymethyl coenzyme A. *Biochemistry*, 29, 2213-2219.
191. Kass S.U., Landsberger N., Wolffe A.P. (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol.*, 7, 157-165.
192. Kato A., Hayashi M., Kondo M., Nishimura M. (1996) Targeting and processing of a chimeric protein with the N-terminal presequence of the precursor to glyoxysomal citrate synthase. *Plant Cell*, 8, 1601–1611.
193. Kawai H., Kanegae T., Christensen S., Kiyosue T., Sato Y., Imaizumi T., Kadota A., Wada M. (2003) Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature*, 421, 287-290.
194. Kennedy M.C., Emptage M.H., Dreyer J.L., Beinert H. (1983) The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J. Biol. Chem.*, 258, 11098-11105.
195. Kennedy M.C., Mende-Mueller L., Blondin G.A., Beinert H. (1992) Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron responsive element binding protein. *PNAS USA*, 89, 11730 –11734.
196. Kenney W.C. (1975) The reaction of N-ethylmaleimide at the active site of succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 250, 3089–3094.
197. Kim D.U., Hayles J., Kim D., Wood V., Park H.O., Won M., Yoo H.S., Duhig T., Nam M., Palmer G., Han S., Jeffery L., Baek S.T., Lee H., Shim Y.S., Lee M., Kim L., Heo K.S., Noh E.J., Lee A.R., Jang Y.J., Chung K.S., Choi S.J., Park J.Y., Park Y., Kim H.M., Park S.K., Park H.J., Kang E.J., Kim H.B., Kang H.S., Park H.M.,

- Kim K., Song K., Song K.B., Nurse P., Hoe K.L. (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.*, 28, 617–623.
198. Kim M., Le H., McInerney M.J., Buckel W. (2013) Identification and characterization of re-citrate synthase in *Syntrophus aciditrophicus*. *J Bacteriol.*, 195, 1689-1696.
199. Kim M.C., Chung W.S., Yun D.J., Cho M.J. (2009) Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant.*, 1, 13–21.
200. Kim S.I., Jourlin-Castelli C., Wellington S.R., Sonenshein A.L. (2003) Mechanism of repression by *Bacillus subtilis* CcpC, a LysR family regulator. *J. Mol. Biol.*, 334, 609–624.
201. King A., Selak M.A., Gottlieb E. (2006) Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*, 25, 4675-4682.
202. Kirchberg J., Büttner D., Thiemer B., Sawers R.G. (2012) Aconitase B is required for optimal growth of *Xanthomonas campestris* vesicatoria in pepper plants. *PLoS ONE*, 7, e34941.
203. Kircher S., Gil P., Kozma-Bognar L., Fejes E., Speth V., Husselstein-Muller T., Bauer D., Adam E, Schäfer E., Nagy F. (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell*, 14, 1541–1555.
204. Klausner R.D., Rouault T.A. (1993) A Double Life: Cytosolic Aconitase as a Regulatory RNA Binding Protein. *Molecular Biology of the Cell*, 4, 1-5.
205. Kleiner O., Kircher S., Harter K., Batschauer A. (1999) Nuclear localization of the Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J.*, 19, 289-296.
206. Klose C., Viczian A., Kircher S., Schäfer E., Nagy F. (2015) Molecular mechanisms for mediating light-dependent nucleo/cytoplasmic partitioning of phytochrome photoreceptors. *New Phytol.*, 206, 965–971.



207. Kochian L.V., Hoekenga A., Pineros M.A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorus efficiency. *Annu Rev Plant Biol.*, 55, 459–493.
208. Kohli R.M., Zhang Y. (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502, 472—479.
209. Konert G., Trotta A., Kouvonen P., Rahikainen M., Durian G., Blokhina O., Fagerstedt K., Muth D., Corthals G.L., Kangasjärvi S. (2015) Protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunit B0c interacts with cytoplasmic ACONITASE 3 and modulates the abundance of AOX1A and AOX1D in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 205, 1250–1263.
210. Kregiel D., Berłowska J., Ambroziak W. (2008) Succinate dehydrogenase activity assay in situ with blue tetrazolium salt in Crabtree-positive *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 376–381.
211. Kreslavski V.D., Fomina I.R., Los D.A., Carpentier R., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S. (2012) Red and near infra-red signaling: Hypothesis and perspectives. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13, 190–203.
212. Kudryashova I.B., Vanyushin B.F. (1986) Incorporation of cytokinins in DNA of wheat seedlings. *Biochemistry (Mos)*, 51, 321-327.
213. Kushwaha R., Singh A., Chattopadhyay S. (2008) Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in Arabidopsis seedling development. *Plant Cell*, 20, 1747-1759.
214. Landschütze V., Willmitzer L., Müller-Röber B. (1995) Inhibition of flower formation by antisense repression of mitochondrial citrate synthase in transgenic potato plants leads to specific disintegration of the ovary tissues of flowers. *EMBO J.*, 14, 660–666.
215. Lang B.F., Gray M.W., Burger G. (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 33, 351–397.

216. Langenbacher T., Immeln D., Dick B., Kottke T. (2009) Microsecond light-induced proton transfer to flavin in the blue light sensor plant cryptochrome. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 14274-14280.
217. Lau O.S., Deng X.W. (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol.*, 13, 571-577.
218. Lauble H., Kennedy M.C., Beinert H., Stout C.D. (1992) Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate. *Biochemistry*, 31, 2735–2748.
219. Lauble H., Stout C.D. (1995) Steric and conformational features of the aconitase mechanism. *Proteins*, 22, 1–11.
220. Lee H.-C., Lin T.-Y. (2005) Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from recalcitrant tissue by use of a filtration column. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 53–58.
221. Leite M.F., Thrower E.C., Echevarria W., Koulen P., Hirata K., Bennett A.M., Ehrlich B.E., Nathanson M.H. (2003) Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *PNAS USA*, 100, 2975-2980.
222. Lemire B.D., Oyedotun K.S. (2001) The quinone-binding sites of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate-ubiquinone oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*., 276, 16936-16943.
223. Lemire B.D., Oyedotun K.S. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate: ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1553, 102-116.
224. Li J., Li G., Gao S., Martinez C., He G., Zhou Z., Huang X., Lee J.H., Zhang H., Shen Y., Wang H., Deng X.W. (2010) Arabidopsis transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL5 plays a role in the feedback regulation of phytochrome A signaling. *Plant Cell*, 22, 3634-3649.
225. Li J., Li G., Wang H., Deng X.W. (2011) Phytochrome signaling mechanisms. *Arabidopsis Book*, 9, e0148.

226. Lian H.L., He S.B., Zhang Y.C., Zhu D.M., Zhang J.Y., Jia K.P., Sun S.X., Li L., Yang H.Q. (2011) Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Dev.*, 25, 023–1028.
227. Liang L., Chang Y., Lu J., Wu X., Liu Q., Zhang W., Su X., Zhang B. (2019) Global methylomic and transcriptomic analyses reveal the broad participation of DNA methylation in daily gene expression regulation of *Populus trichocarpa*. *Front Plant Sci.*, 10. e:243.
228. Lin J.J., Daniels-McQueen S., Patino M.M., Gaffield L., Walden W.E., Thach R.E. (1990) Derepression of ferritin messenger RNA translation by hemin in vitro. *Science.*, 247, 74-77.
229. Lin R., Teng Y., Park H.J., Ding L., Black C., Fang P., Wang H. (2008) Discrete and essential roles of the multiple domains of Arabidopsis FHY3 in mediating phytochrome A signal transduction. *Plant Physiol.*, 148, 981-992.
230. Liu B., Liu H., Zhong D. Lin C. (2010) Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol.*, 13, 578–586.
231. Liu Q., Yu L., Han X.F., Fu Q., Zhang J.X., Tang H., Zhao S.Y. (2000) Cloning and tissue expression pattern analysis of the human citrate synthase cDNA. *J. Exp. Biol.*, 33, 207-214.
232. Lis M., Walther D. (2016) The orientation of transcription factor binding site motifs in gene promoter regions: does it matter?. *BMC Genomics.*, 17: 185.
233. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods.*, 25, 402–408.
234. Lorrain S., Genoud T., Fankhauser C. (2006) Let there be light in the nucleus!. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 9, 509–514.
235. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
236. Lu Y.T., Hidaka H., Feldman L.J. (1996) Characterisation of a calcium/CaM protein kinase homologue from maize roots showing light-regulated gravitropism. *Planta (Heidelb.)*, 199, 18-24.

237. Luan S., Kudla J., Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S., Gruissem W. (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*, 14, 389–400.
238. Lushchak O.V., Piroddi M., Galli F., Lushchak V.I. (2014) Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Reports*, 19, 8–15.
239. Lyko F., Ramsahoye B.H., Jaenisch R. (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 408, 538–540.
240. Lyubimov V.Yu., Kreslavski V.D. (2017) Phytochrome B-dependent Regulation of Reductive Phase of Photosynthetic Carbon Assimilation. *Russian J Plant Physiol.*, 64, 775-781.
241. Ma Z., Marsolais F., Bernards M.A., Sumarah M.W., Bykova N.V., Igamberdiev A.U. (2016) Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. *Plant Sci.*, 248, 7-44.
242. MacKenzie E.D., Selak M.A., Tennant D.A., Payne L.J., Crosby S., Frederiksen C.M., Watson D.G., Gottlieb E. (2007) Cell-permeating  $\alpha$ -ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 3282-3289.
243. Malapeira J., Khaitova L.C., Mas P. (2012) Ordered changes in histone modifications at the core of the Arabidopsis circadian clock. *PNAS USA*, 109, 21540–21545.
244. Malecki J., Jakobsson M.E., Ho A. (2017) Uncovering human METTL12 as a mitochondrial methyltransferase that modulates citrate synthase activity through metabolite-sensitive lysine methylation. *J. Biol. Chem.*, 292, 17950-17962.
245. Marguerat S., Schmidt A., Codlin S., Chen W., Aebersold R., Bähler J. (2012) Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells. *Cell*, 151, 671–683.
246. Martienssen R., Baron A. (1994) Coordinate suppression of mutations caused by Robertson's Mutator transposons in maize. *Genetics*, 136, 1157–1170.

247. Martínez-García J.F., Huq E., Quail P.H. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, 288, 859–863.
248. Mas P., Yanovsky M.J. (2009) Time for circadian rhythms: plants get synchronized. *Curr Opin Plant Biol.*, 12, 574-579.
249. Mazin A.L., Vanyushin B.F. (1988) CpG-Suppression in DNA. 5. "Fossil" methylation of Drosophila genes. *Mol. Biol.*, 22, 1399-1404.
250. McCord J.M., Keele B.B., Fridovich I. (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *PNAS USA*, 68, 1024-1027.
251. McFadden G.I. (1999) Plastids and protein targeting. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 339-346.
252. Medvedeva Y.A., Khamis A.M., Kulakovskiy I.V., Ba-Alawi W., Bhuyan M.S.I., Kawaji H., Lassmann T., Harbers M., Forrest A.R.R., Bajic V.B. (2014) FANTOM consortium. Effects of cytosine methylation on transcription factor binding sites. *BMC Genomics*, 15, 119.
253. Messeguer R., Ganal M.W., Steffens J.C., Tanksley S.D. (1991) Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol. Biol.*, 16, 753–770.
254. Meyer S., Scholz-Starke J., De Angeli A., Kovermann P., Burla B., Gambale F., Martinoia E. (2011) Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *Plant J.*, 67, 247–257.
255. Millar A.H., Eubel H., Jansch L., Krufft V., Heazlewood J.L., Braun H.P. (2004) Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant molecular biology*, 56, 77-90.
256. Millar A.H., Whelan J., Soole K.L., Day D.A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 62, 79–104.
257. Moeder W., Del Pozo O., Navarre D.A., Martin G.B., Klessig D.F. (2007) Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol.*, 63, 273-287.

258. Moss G.P. (2013) EC 4.1.3: Oxo Acid Lyases. IUBMB Enzyme Nomenclature.
259. Moyses A. (1982) La respiration des végétaux verts à l'obscurité: Les effets de la lumière sur cette respiration. *Bull. Soc. Bot. France*, 129, 53-72.
260. Müller F.L., Liu Y., Abdul-Ghani M.A., Lustgarten M.S., Bhattacharya A., Jang Y.C., Van Remmen H. (2008) High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J.*, 409, 491-499.
261. Nairn A.C., Picciotto M.R. (1994) Calcium/CaM-dependent protein kinase. *Semin. Cancer Biol.*, 5, 295-303.
262. Narahari J., Ma R., Wang M., Walden W.E. (2000) The aconitase function of iron regulatory protein 1. Genetic studies in yeast implicate its role in iron-mediated redox regulation. *J. Biol. Chem.*, 275, 16227-16234.
263. Navarre D.A., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D.F. (2000) Nitric Oxide Modulates the Activity of Tobacco Aconitase. *Plant Physiology*, 122, 573-582.
264. Nelson M., Burbank D.E., van Etten J.L. (1998) Chlorella viruses encode multiple DNA methyltransferases. *Biol. Chem.*, 379, 423-428.
265. Neuhaus G., Bowler C., Hiratsuka K., Yamagata H., Chua N.H. (1997) Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO Journal*, 16, 2552-2564.
266. Neumann G., Massonneau A., Langlade N. (2000) Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin. *Ann Bot.*, 85, 909-919.
267. Ngerpraditsiri J., Kobayashi H., Akazawa T. (1988) Transcriptional regulation and DNA methylation of nuclear genes for photosynthesis in nongreen plant cells. *PNAS USA*, 85, 4750-4754.
268. Ni M., Tepperman J.M., Quail P.H. (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95, 657-667.

269. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. of Exp. Bot.*, 56, 2907–2914.
270. Nishizuka Y. (1992) Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Nature*, 258, 607-614.
271. Noctor G., Foyer C.H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 249–279.
272. Nunes-Nesi A., Araújo W.L., Fernie A.R. (2011) Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155, 101–107.
273. Nuruzzaman M., Manimekalai R., Sharoni A.M., Satoh K., Kondoh H., Ooka H., Kikuchi S. (2010) Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*, 465, 30-44.
274. Occhipinti A., De Santis A., Maffe M.E. (2014) Magnetoreception: an unavoidable step for plant evolution?. *Trends Plant Sci.*, 19, 1–4.
275. Oda K., Yamato K., Ohta E., Nakamura Y., Takemura M., Nozato N., Akashi K., Kanegae T., Ogura Y., Kohchi T., Ohyama K. (1992) Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.*, 223, 1–7.
276. Oh E., Kang H., Yamaguchi S., Park J., Lee D., Kamiya Y. Choi G. (2009) Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell.*, 21, 403–419.
277. Oh E., Kim J., Park E., Kim J.I., Kang C., Choi G. (2004) PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 16, 3045-3058.
278. Oh E., Zhu J.Y., Bai M.Y., Arenhart R.A., Sun Y., Wang Z.Y. (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. *eLife*, 3: e03031.

279. Oh S., Montgomery B.L. (2014) Phytochrome-dependent coordinate control of distinct aspects of nuclear and plastid gene expression during anterograde signaling and photomorphogenesis. *Front Plant Sci.*, 30, e171.
280. Orsel M., Chopin F., Leleu O., Smith S.J., Krapp A., Daniel-Vedele F., Miller A.J. (2006) Characterisation of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol.*, 142, 1304–1317.
281. Osterlund M.T., Ang L.H., Deng X.W. (1999) The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. *Trends Cell Biol.*, 9, 113–118.
282. Osterlund M.T., Hardtke C.S., Wei N., Deng X.W. (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature.*, 405, 462–466.
283. Osterlund M.T., Wei N., Deng X.W. (2000) The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiology*, 124, 1520-1524.
284. Oyama T., Shimura Y., Okada K. (1997) The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.*, 11, 2983–2995.
285. Oyedotun K.S., Sit C.S., Lemire B.D. (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase does not require heme for ubiquinone reduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.*, 1767, 1436-1445.
286. Paik I., Kathare P.K., Kim J.I., Huq E. (2017) Expanding roles of PIFs in signal integration from multiple processes. *Mol Plant.*, 10, 1035-1046.
287. Pakhomova M.V., Zaitseva G.N., Belozersky A.N. (1968) Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Dokl. Akad. Nauk USSR*, 182, 712-714.
288. Palmer J.D. (1997) Organelle genomes: going, going, gone! *Science*, 275, 790-791.



289. Pandey N., Ranjan A., Pant P., Tripathi R.K, Ateek F., Pandey H.P., Patre U.V., Sawant S.V. (2013) CAMTA 1 regulates drought responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 14, 216.
290. Panov A.V., Scaduto R.C. (1995) Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.*, 316, 815-820.
291. Park C.Y., Lee J.H., Yoo J.H., Moon B.C., Choi M.S., Kang Y.H., Lee S.M., Kim H.S., Kang K.Y., Chung W.S., Lim C.O., Cho M.J. (2005) WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Lett.*, 579, 1545-1550.
292. Park E., Kim J., Lee Y., Shin J., Oh E., Chung W.I., Liu J.R., Choi G. (2004) Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant Cell Physiol.*, 45, 968-975.
293. Parks B.M., Folta K.M., Spalding E.P. (2001) Photocontrol of stem growth. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 436-440.
294. Pathuri I.P., Reitberger I.E., Hückelhoven R., Proels R.K. (2011) Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f.sp. hordei. *J. Exp. Bot.*, 10, 3449-3457.
295. Patil S.K., Takezawa D., Poovaiah B.W. (1995) Chimeric plant calcium/CaM dependent protein kinase gene with a neural visinin like calcium binding domain. *PNAS USA*, 92, 4897-4901.
296. Perelman S., Mazzella M.A., Muschietti J., Zhu T., Casal J.J. (2003) Finding unexpected patterns from microarray data. *Plant Physiol.*, 133, 1717-1725.
297. Perez-Martinez X., Vazquez-Acevedo M., Tolkunova E., Funes S., Claros M.G., Davidson E., King M.P., Gonzalez-Halphen D. (2000) Unusual Location of a Mitochondrial Gene subunit III of cytochrome c oxidase is encoded in the nucleus of chlamydomonad algae. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 30144-30152.
298. Peyret P., Pascual P., Alric M. (1995) Structure, genomic organization, and expression of the *Arabidopsis thaliana* aconitase gene. *J. Biol. Chem.*, 270, 8131-8137.

299. Picault N., Palmieri L., Pisano I. (2002) Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem.*, 277, 24204–24211.
300. Pizarro L., Stange C. (2009) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Cien. Inv. Agr.*, 36, 143-162.
301. Poovaiah B.W., Reddy A.S. (1993) Calcium and signal transduction in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci.*, 12, 185-211.
302. Popot J.L., Vitry C. (1990) On the microassembly of integral membrane proteins. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 19, 369-403.
303. Popov V.N., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U. (2010) Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A. *FEBS Letters*, 584, 199-202.
304. Pracharoenwattana I., Cornah J.E., Smith S.M. (2005) Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell*, 17, 2037-2048.
305. Pratt K., Hattman S. (1981) Sequence specificity of DNA adenine methylase in the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.*, 1, 600-608.
306. Przelecka A., Pogorelov A.G. (1988) Calcium content in the nucleus and nucleolus of vitellogenic oocyte of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Cell Biology International Reports*, 12, 221.
307. Pugh R.J.E. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226–232.
308. Quail P.H. Phytochrome-interacting factors. In *Light and Plant Development*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2007. 81-105.
309. Rae P.M., Spear B.B. (1978) Elaboration of telomeres in yeast: recognition and modification of termini from *Oxytricha macronuclear* DNA. *PNAS. USA.*, 75, 4992-4996.

310. Ramirez-Aguilar S.J., Keuthe M., Rocha M., Fedyaev V.V., Kramp K., Gupta K.J., Rasmusson A.G., Schulze W.X., van Dongen J.T. (2011) The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability. *J Biol Chem.*, 286, 43045–43053.
311. Ranty B., Aldon D., Galaud J.-P. (2006) Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signal Behav.*, 1, 96–104.
312. Rasmusson A.G., Escobar M. (2007) Light and diurnal regulation of plant respiratory gene expression. *Physiologia Plantarum*, 129, 57–67.
313. Ratel D., Ravanat J.L., Berger F., Wion D. (2006) N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *Bioessays*, 28, 309–315
314. Regev-Rudzki N., Karniely S., Ben-Haim N.N., Pines O. (2005) Yeast aconitase in two locations and two metabolic pathways: seeing small amounts is believing. *Biol. Cell.*, 16, 4163–4171.
315. Regev-Rudzki N., Pines O. (2007) Eclipsed distribution: a phenomenon of dual targeting of protein and its significance. *Bioessays*, 29, 772–782.
316. Remington S., Wiegand G., Hube R. (1982) Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Å resolution. *J Mol Biol.*, 15, 111-152.
317. Rhein V.F., Carroll J., Ding S., Fearnley I.M., Walker J.E. (2017) Human METTL12 is a mitochondrial methyltransferase that modifies citrate synthase. *FEBS Lett.*, 591, 1641-1652.
318. Ritz T., Wiltschko R., Hore P.J., Rodgers C.T., Stapput K., Thalau P., Timmel C.R., Wiltschko W. (2009) Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophys. J.*, 96, 3451–3457.
319. Robbins A.H., Stout C.D. (1989) The structure of aconitase. *Proteins.*, 5, 289–312.
320. Rogers S.D., Rogers M.E., Saunders G., Holt G. (1986) Isolation of mutants sensitive to 2-amiripurine and alkylating agents and evidence for the role of DNA methylation in *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.*, 10, 557-560.

321. Rosso M.G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B. (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.*, 53, 247–259.
322. Rouault T.A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.*, 2, 406–414.
323. Rouault T.A., Stout C.D., Kaptain S., Harford J.B., Klausner R.D. (1991) Structural relationship between an iron-regulated RNA-binding protein (IRE-BP) and aconitase: functional implications. *Cell*, 64, 881–883.
324. Russell R.J.M. (1994) The crystal structure of *Thermoplasma acidophilum* citrate synthase from *Escherichia coli*. Ph.D. Thesis, University of Bath.
325. Sadka A., Dahan E., Cohen L., Marsh K.B. (2000) Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol Plant*, 108, 255-262.
326. Sadka A., Dahan E., Or E., Cohen L. (2000a) NADP(+)-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development. *Plant Sci.*, 159, 173-181.
327. Salmon A., Ainouche M.L. (2010) Polyploidy and DNA methylation: New tools available. *Molecular Ecology*, 19, 213–215.
328. Scarpa A. (1972) Spectrophotometric measurement of calcium by murexide. *Methods Enzymol.*, 24, 343–351.
329. Scheffler I.E. (1998) Molecular genetics of succinate:quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.*, 60, 267–315.
330. Schmidtmann E., König A.C., Orwat A., Leister D., Hartl M., Finkemeier I. (2014) Redox regulation of *Arabidopsis* mitochondrial citrate synthase. *Molecular Plant*, 7, 156–169.
331. Schnarrenberger C., Martin W. (2002) Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. *Eur. J. Biochem.*, 269, 868-883.
332. Schwartz D. (1988) Comparison of methylation of the male- and female-derived wx-m9 Ds-cy allele in endosperm and sporophyte. *See Ref.*, 100, 351–354.

333. Schwarzländer M., Finkemeier I. (2013) Mitochondrial energy and redox signaling in plants. *Antioxid Redox Signal*, 18, 2122–2144.
334. Seitz S.B., Voytsekh O., Mohan K.M., Mittag M. (2010) The role of an E-box element: multiple functions and interacting partners. *Plant Signal Behav.*, 5, 1077–1080.
335. Shadel G.S. (2005) Mitochondrial DNA, aconitase ‘wraps’ it up. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 30, 294–296.
336. Shen H., He H., Li J., Chen W., Wang X., Guo L., Peng Z., He G., Zhong S., Qi Y., Terzaghi W., Deng X.W. (2012) Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. *Plant Cell*, 24, 875–892.
337. Shen H., Khanna R., Carle C.M., Quail P.H. (2007) Phytochrome Induces Rapid PIF5 Phosphorylation and Degradation in Response to Red-Light Activation. *Plant Physiol.*, 145, 1043–1051.
338. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68, 850–858.
339. Shi J., Kim K.N., Ritz O., Albrecht V., Gupta R., Harter K., Luan S., Kudla J. (1999) Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11, 2393–2405.
340. Shin J., Park E., Choi G. (2007) PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 49, 981–994.
341. Shorning B.Yu., Vanyushin B.F. (2001) Putative DNA-(amino)methyltransferases in eukaryotes. *Biochemistry (Moscow)*, 66, 753–762.
342. Sibout R., Sukumar P., Hettiarachchi C., Holm M., Muday G.K., Hardtke C.S. (2006) Opposite root growth phenotypes of *hy5* versus *hy5 hyh* mutants correlate with increased constitutive auxin signaling. *PLoS Genet.*, 2, e202.

343. Singer-Sam J., Riggs A.D. (1993) X chromosome inactivation and DNA methylation. // *EXS.*, 64, 358-384.
344. Sistrunk M.L., Antosiewicz D.M., Purugganan M.M., Braam J. (1994) Arabidopsis TCH3 encodes a novel  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation. *Plant Cell.*, 6, 1553–1565.
345. Smith E.H., Janknecht R., Maher L.J. (2007) Succinate inhibition of  $\alpha$ -ketoglutaratedependent enzymes in a yeast model of paraganglioma. *Human Molecular Genetics*, 16, 3136-3148.
346. Snedden W.A., Fromm H. (2001) Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol.*, 151, 35–66.
347. Snedden W.A., Koutsia N., Baum G., Fromm H. (1996) Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem.*, 271, 4148–4153.
348. Song H.R., Noh Y.S. (2012) Rhythmic oscillation of histone acetylation and methylation at the Arabidopsis central clock loci. *Mol. Cells*, 34, 279–287.
349. Sopory S.K., Munshi M. (1998) Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signalling in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17, 245–318.
350. Srere P.A. (1965) Palmitoyl-coenzyme A inhibition of the citrate-condensing enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 106, 445–455.
351. Stevens F.J., Li A.D., Lateef S.S., Anderson L.E. (1997) Identification of potential inter-domain disulfides in three higher plant mitochondrial citrate synthases: paradoxical differences in redox-sensitivity as compared with the animal enzyme. *Photosynthesis Research*, 54, 185–197.
352. Stone J.M., Walker J.C. (1995) Protein kinase families and signal transduction. *Physiol. (Rockv.)*, 108, 451-457.
353. Sugita R., Mochizuki H., Ito T., Yokokura H., Kobayashi R., Hidaka H. (1994)  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent protein kinase kinase cascade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 694-701.

354. Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J., Su D., Bartlam M., Rao Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121, 1043-1057.
355. Sun T., Hayakawa K., Bateman K.S., Fraser M.E. (2010) Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.*, 285, 27418–27428.
356. Suzuki M.M., Bird A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.*, 9, 465-476.
357. Sweetlove L.J., Beard K.F., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Ratcliffe R.G. (2010) Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Science*, 15, 462–470.
358. Takezawa D., Ramachandiran S., Paranjape V., Poovaiah B.W. (1996) Dual regulation of a chimeric plant serine/threonine kinase by calcium and calcium/calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 271, 8126–8132.
359. Talbot D.A., Brand M.D. (2005) Uncoupling protein 3 protects aconitase against inactivation in isolated skeletal muscle mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1709, 150-156.
360. Terol J., Soler G., Talon M., Cercos M. (2010) The aconitate hydratase family from Citrus. *BMC Plant Biology.*, 10, e:222.
361. Thorsness P.E., Weber E.R. (1996) Escape and migration of nucleic acids between chloroplasts, mitochondria, and the nucleus. *International review of cytology*, 165, 207-234.
362. Toledo-Ortiz G., Johansson H., Lee K.P., Bou-Torrent J., Stewart K., Steel G., Rodriguez-Concepcion M., Halliday K.J. (2014) The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLoS Genet.*, 10: e1004416.
363. Tran Q.M., Rothery R.A., Maklashina E., Cecchini G., Weiner J.H. (2006) The quinone binding site in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase is required for

- electron transfer to the heme b. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 32310–32317.
364. Tretyn A. (1999) Calcium-dependent signal transduction pathways in plants-phytochrome mechanism of action as an example. *Polish Journal of Pharmacolog*, 51, 145-151.
365. Urbanczyk-Wochniak E., Usadel B., Thimm O., Nunes-Nesi A., Carrari F., Davy M., Bläsing O., Kowalczyk M., Weicht D., Polinceusz A., Meyer S. Stitt M., Fernie A.R. (2006) Conversion of MapMan to allow the analysis of transcript data from Solanaceous species: effects of genetic and environmental alterations in energy metabolism in the leaf. *Plant Mol Biol.*, 60, 773–792.
366. Valls-Lacalle L., Barba I., Miro-Casas E., Albuquerque-Bejar J.J., Ruiz-Meana M., Fuertes-Agudo M., Rodriguez-Sinovas A., Garcia-Dorado D. (2016) Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res.*, 109, 374-384.
367. Van Vranken J.G., Na U., Winge D.R., Rutter J. (2015) Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 50, 168-180.
368. Vanyushin B.F. (1984) Replicative DNA methylation in animals and higher plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 108, 99-114.
369. Vanyushin B.F. (2005) Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 488-499.
370. Vanyushin B.F., Alexandrushkina N.I., Kirnos M.D. (1988) N6-Methyladenine in mitochondrial DNA of higher plants. *FEBS Lett.*, 233, 397-399.
371. Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Kennedy M.C. (2000) Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.*, 275, 14064-14069.
372. Verhey S.A., Gaiser J.C., Lomax T.L. (1993) Protein kinases in zucchini: characterisation of calcium requiring plasma membrane kinase. *Plant Physiol.*, 103, 413-419.



373. Verniquet F., Gaillard J., Neuburger M., Douce R. (1991) Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 276, 643-648.
374. Viollier P.H., Minas W., Dale G.E., Folcher M., Thompson C.J. (2001) The studies of aconitase presented here, along with those of citrate synthase. *Bacteriol.*, 183, 3184–3192.
375. Viridi A.S., Singh S., Singh P. (2015) Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. *Front Plant Sci.*, 6, 809.
376. Volz K. (2008) The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18, 106–111.
377. von Arnim A.G. (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 114, 779–788.
378. von Arnim A.G., Deng X-W. (1994) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Cell*, 79, 1035–1045.
379. Von Heijne G. (1986) Why mitochondria need a genome. *FEBS letters.*, 198, 1-4.
380. Wang H., Deng X.W. (2003) Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci.*, 8, 172-178.
381. Wang H., Ma L.G., Li J.M., Zhao H.Y., Deng X.W. (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science*, 294, 154–158.
382. Wang X., Jing C., Selby C.P., Chiou Y.Y., Yang Y., Wu W., Sancar A., Wang J. (2018) Comparative properties and functions of type 2 and type 4 pigeon cryptochromes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 4629–4641.
383. Warnecke P.M., Stirzaker C., Song J., Grunau C., Melki J.R., Clark S.J. (2002) Identification and Resolution of Artifacts in Bisulfite Sequencing. *Methods*, 27, 101-107.
384. Watillon B., Kettmann R., Boxus P., Burny A. (1995) Structure of a CaM-binding protein kinase gene from apple. *Plant Physiol. (Rockv.)*, 108, 847-848.

385. Weigand G., Remington S.J. (1986) Citrate Synthase: Structure, Control, and Mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 15, 97-117.
386. Weitzman P.D., Dunmore P. (1969) Regulation of citrate synthase activity by alpha-ketoglutarate. Metabolic and taxonomic significance. *FEBS Lett.*, 3, 265-267.
387. Weller J.L., Hecht V., Vander Schoor J.K., Davidson S.E., Ross J.J. (2009) Light regulation of gibberellin biosynthesis in pea is mediated through the COP1/HY5 pathway. *Plant Cell*, 21, 800-813.
388. Wellmer F., Kircher S., Rügner A., Frohnmeier H., Schäfer E., Harter K. (1999) Phosphorylation of the Parsley bZIP Transcription Factor CPRF2 Is Regulated by Light. *J. Biol. Chem.*, 274, 29476-29482.
389. Westenberg D.J., Gunsalus R.P., Ackrell B.A., Sices H., Cecchini G. (1993) *Escherichia coli* fumarate reductase frdC and frdD mutants: Identification of amino acid residues involved in catalytic activity with quinines. *J. Biol. Chem.*, 268, 815–822.
390. Wieland O., Weiss L. (1963) Inhibition of citrate-synthase by palmityl-Coenzyme A. *Biochem Biophys Res Commun.*, 10, 26–31.
391. Wigler M., Levy D., Perucho M. (1981) The somatic replication of DNA methylation. *Cell*, 24, 33–40.
392. Wu G., Spalding E.P. (2007) Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *PNAS USA*, 104, 18813–18818.
393. Wu J.-Y., Yang J.T. (1970) Effects of salts and organic solvents on the activity of citrate synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245, 3561-3564.
394. Wu Y., Reece R.J., Ptashne M. (1996) Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J.*, 15, 3951-3963.
395. Xin J.C., Xiaowen W., Ronald A.B. (2005) Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *PNAS. USA.*, 104, 13738–13743.

396. Xiong T.C., Jauneau A., Ranjeva R., Mazars C. (2004) Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signaling. *Plant J.*, 40, 12–21.
397. Yamaguchi R., Nakamura M., Mochizuki N., Kay S.A., Nagatani A. (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol.*, 145, 437–445.
398. Yamamuro C., Zhu J-K., Yang Z. (2016) Epigenetic modifications and plant hormone action. *Mol Plant*, 9, 57–70.
399. Yang H.Q., Tang R.H., Cashmore A.R. (2001) The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell*, 13, 2573–2587.
400. Yang H.Q., Wu Y.J., Tang R.H., Liu D., Liu Y., Cashmore A.R. (2000) The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, 103, 815-827.
401. Yang J., Lin R., Sullivan J., Hoecker U., Liu B., Xu L., Deng X.W., Wang H. (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 804-821.
402. Yang T., Poovaiah B.W. (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *PNAS USA*, 99, 4097-4102.
403. Yang X., Liu B., Sang Y., Yuan Y., Pu J., Liu Y., Li Z., Feng J., Xie Y., Tang R., Yuan H., Liao F. (2010) Kinetic analysis of the lactate dehydrogenase coupled reaction process and measurement of alanine transaminase by an integration strategy. *Jpn. Soc. Anal. Chem.*, 26, 1193–1198.
404. Yankovskaya V., Horsefield R., Törnroth S., Luna-Chavez C., Miyoshi H., Léger C., Byrne B., Cecchini G., Iwata S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science.*, 299, 700-704.
405. Yankovskaya V., Sablin S.O., Ramsay R.R., Singer T.P., Ackrell B.A., Cecchini G., Miyoshi H. (1996) Inhibitor probes of the quinone binding sites of mammalian complex II and *Escherichia coli* fumarate reductase. *J. Biol. Chem.*, 271, 21020–21024.

406. Yu X., Klejnot J., Zhao X., Shalitin D., Maymon M., Yang H., Lee J., Liu X., Lopez J., Lin C. (2007) Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell*, 19, 3146–3156.
407. Yui R., Iketani S., Mikami T., Kubo T. (2003) Antisense inhibition of mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit in anther tapetum causes male sterility. *Plant J.*, 34, 57–66.
408. Zhang C., Fan L., Le B.H., Ye P., Mo B., Chen X. (2020) Regulation of ARGONAUTE10 expression enables temporal and spatial precision in axillary meristem initiation in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 55, 603-616.
409. Zhang H., He H., Wang X., Wang X., Yang X., Li L., Deng X.W. (2011) Genome-wide mapping of the HY5-mediated gene networks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J.*, 65, 346–358.
410. Zhu X., Feng Y., Liang G., Liu N., Zhu J.K. (2013) Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca<sup>2+</sup> dynamics in *Arabidopsis* plants. *Mol Plant.*, 6, 444–455.
411. Zuo Z., Liu H., Liu B., Liu X., Lin C. (2011) Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 21, 841–847.