

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ФУМАРАТГИДРАТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КУКУРУЗЕ

Д. Н. Федорин, О. В. Сазонова, М. В. Черкасских, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 02.09.2015 г.

Аннотация. Изучена динамика активности фумаразы в листьях кукурузы и показано, что увеличение данного показателя исследуемого фермента в темноте связано с активацией дыхательного метаболизма, как основного источника энергетических эквивалентов в отсутствии света. Показана зависимость скорости экспрессии гена *fum1* в листьях кукурузы в различных световых режимах. Изменение скорости экспрессии гена *pif3* и *pif1* в зависимости от состояния фитохромной системы проявляет корреляцию с функционированием гена *fum1*, что указывает на опосредованный фитохром-зависимый механизм регуляции данного гена при участии фактора PIF3.

Ключевые слова: фумаратгидратаза, ген, экспрессия, активность, регуляция, фитохром, транскрипционный фактор

Abstract. The dynamics of the activity in the leaves of maize fumarase shown that the increase of the rate of the enzyme under study in the dark due to the activation of the respiratory metabolism, as the main source of energy equivalents in the absence of light. The dependence of the rate of gene expression *fum1* in the leaves of maize in different lighting conditions. Changing the speed of gene expression *pif3* and *pif1* depending on the state of phytochrome shows a correlation with the functioning gene *fum1*, indicating that the indirect phytochrome-dependent mechanism of regulation of the gene with the participation factor PIF3.

Keywords: fumarate hydratase, gene expression, activity, regulation, phytochrome, transcription factor

В настоящее время известно, что цикл Кребса в листьях растений ингибируется на свету. Об этом сообщается в наших работах на примере маркерного фермента этого пути – сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [1]. Неоднозначна роль других ферментных систем в световой регуляции ЦТК. Экспрессия генов, кодирующих различные ферменты, участвующие в фотосинтетическом и дыхательном метаболизме, регулируется светом. Фумараза (фумаратгидратаза, КФ 4.2.1.2) катализирует обратимое превращение малата и фумарата. Для большинства организмов роль фумаратгидратазы (ФГ) сводилась к ее участию в работе цикла трикарбоновых кислот в митохондриях [2]. Однако, показано наличие цитозольной формы в

растениях *Arabidopsis*, где были обнаружены гены, кодирующие митохондриальную (At2g47510) и цитозольную фумаразу (At5g50950) [3]. Кроме того, выявлено нескольких метаболических функций этого фермента [4].

Сообщается о фоторегуляции фумаратгидратазной активности в листьях растений, однако неизвестен механизм трансдукции светового сигнала. Важную роль в этих процессах может играть фитохромная система, оказывающая свое влияние на функционирование ферментов через различные вторичные мессенджеры, такие как ионы Ca^{2+} , G-белки, цАМФ [5, 6]. Поэтому интересной проблемой представляется исследование роли фитохромной системы растений в работе ферментов цикла трикарбоновых кислот, в частности, фумаратгидратазы. Данные об активности энзима позволяют судить о скорости функциони-

рования цикла Кребса, причем характеризовать функционирование энзима можно не только по энзиматической активности, но и по экспрессии гена, кодирующего белковую молекулу фермента.

В связи с этим, целью данного исследования было выяснение роли транскрипционных факторов в экспрессионной регуляции фумаратгидратазной активности в зеленых листьях кукурузы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали листья 14-ти дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенных гидропонным способом при 10-ти часовом световом дне и интенсивности света 25 Вт/м².

Белый свет получали от ламп дневного света в установке «Флора-1». Красный и дальний красный свет получали с помощью светодиодов с областью испускания 640-680 нм (КИПД40М40-К-П6, Россия) и 710-750 нм (ЗЛ127А-5, Россия). Интенсивность света составляла 0.044 Вт/м².

Опыты по изучению влияния фитохромной системы на растения проводили по следующей схеме. Вариант «Свет» представляет собой растения, выращенные при стандартных условиях и 10-часовом фотопериоде. Вариант «Темнота» представляют растения, проинкубированные 24 ч в темноте. Третью группу растений после 24-часовой инкубации в темноте освещали светом с длиной волны 660 нм в течение 15 мин (вариант «КС»). Четвертую группу растений после 24-часовой инкубации в темноте освещали светом с длиной волны 730 нм в течение 15 мин (вариант «ДКС»). Пятую группу растений после 24-часовой инкубации в темноте последовательно облучали светом с длиной волны 660 нм в течение 15 мин, затем с длиной волны 730 нм в течение 15 мин (вариант «КС+ДКС»).

Активность ФГ определяли спектрофотометрически при длине волны 240 нм при 25°C [7].

Общее количество белка определяли по методу Лоури [8].

Для выделения суммарной клеточной РНК использовался метод набор «Рибосорб-С».

Обратная транскрипция РНК осуществлялась с использованием обратной транскриптазы вируса Moloney лейкоза мышей M-MULVRT (Fermentas, Литва) для синтеза первой цепи кДНК.

Для визуализации и анализа качества выделенной РНК, продуктов полимеразной цепной реакции использовался электрофорез в 1% агарозном геле.

ПЦР в реальном времени проводили на приборе Bio-Rad Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green. В качестве праймеров использовали нуклеотидные последовательности: к гену *fum1*: прямой 5' – gattactcgcattgaggt -3', обратный 5' – accagaactcgcggatgtggc -3'; к гену *pif3*: прямой – 5'-ggttactatctgccaccggcg-3', обратный – 5'-tgctaacaataaacaatacatc-3', к гену *pif1*: прямой – 5'-atccaacctcgggccagcct-3', обратный –5'-ttgggtcgggtggagaccgc-3'.

Параметры амплификации: предварительная денатурация 95 °С – 5 мин., затем цикл: 95 °С – 30 сек., 60 °С (для *fum1*) 54 °С (для *pif3*) 59 °С (для *pif1*) – 30 сек., 72 °С – 30 сек. (детекция), финальная элонгация - 72 °С – 10 мин. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* со специфическими праймерами [9]. В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции.

Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов проводили с применением 2^{-ΔΔCt}-метода с использованием программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (Biorad, США).

При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента [10].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее в опытах по изучению влияния интенсивности света на активность сукцинатдегидрогеназы показано, что в варианте «Темнота» скорость функционирования СДГ возрастала в 1,6-2 раза. Максимальное значение данного показателя приходилось на третьи сутки инкубации в темноте [11].

Торможение дыхания на свету, скорее всего, связано с тем, что энергозатраты, необходимые для протекания метаболизма растительной клетки, обеспечивает фотосинтетический аппарат. Однако полного ингибирования работы ЦТК не происходит, т.к. функционирование данного цикла необходимо для обеспечения формирования ди- и трикарбоновых кислот для пластического метаболизма [12].

При помещении растений кукурузы, подвергшихся двадцатичетырехчасовой инкубации в темноте, в условиях интенсивного освещения наблюдалась следующая картина. В первые 0,5 часа эксперимента происходило возрастание активности фумаратгидратазы в листьях кукурузы в 1,35 раза (рис. 1). Затем в течение следующих

двух часов наблюдалось резкое снижение активности исследуемого фермента. Далее активность фермента стабилизировалась, и после 9 часов интенсивного освещения составила 25 % и 27,5 % от контроля, соответственно.

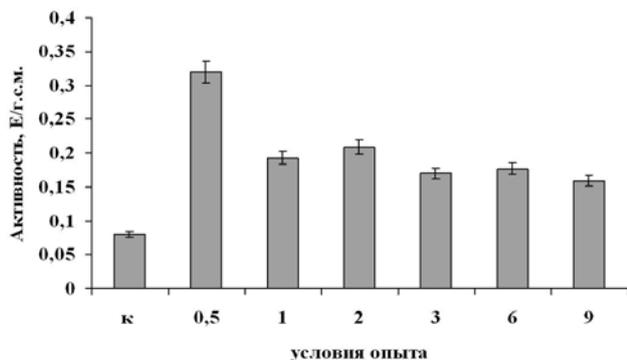


Рис. 1. Динамика активности фумаратгидратазы в листьях кукурузы при изменении светового режима. К – растения, экспонируемые на свету с интенсивностью 25 Дж/м²с. 0,5, 1, 2, 3, 6, 9 – время инкубации растений в темноте в часах.

Данные ОТ-ПЦР свидетельствуют о том, что в зеленых листьях кукурузы экспрессируется только ген *fum1*, кодирующий митохондриальную форму фумаразы [7].

Проведенный количественный анализ образцов кДНК из кукурузы с праймерами к гену *fum1* методом ПЦР в реальном времени в условиях разного освещения позволил установить, что в растениях на свету и после облучения красным светом с длиной волны 660 нм относительная концентрация мРНК исследуемого гена значительно меньше, чем данный показатель в растениях, находящихся в темноте. Аналогичная ситуация наблюдается при облучении кукурузы дальним красным светом. Так, уровень относительной транскрипции для вариантов опыта «темнота» и «ДКС», «КС+ДКС» была в 5,5-5,8 раза выше такового показателя варианта «свет» (рис. 2).

Полученные результаты по влиянию светового режима на уровень транскрипции гена фумаратгидратазы в листьях кукурузы свидетельствуют, что красный свет вызывает изменения в работе генетического аппарата клетки, приводящие к уменьшению количества мРНК *fum1* в клетке растений. Противоположный эффект вызывает действие дальнего красного света и последовательное действие красного и дальнего красного света.

Известно, что фитохром свое действие может оказывать через непосредственное взаимодействие с молекулой фермента, либо путем изменения структуры мембраны для мембранных бел-

ков, либо через изменение работы генетического аппарата клетки [6, 13].

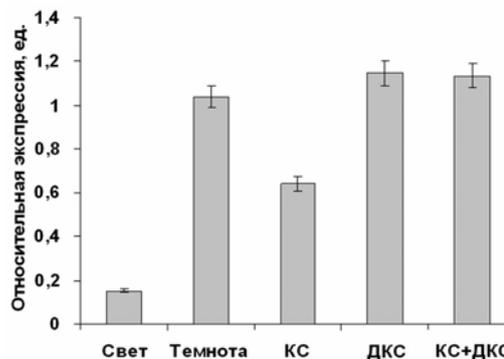


Рис. 2. Относительный уровень транскрипции гена *fum1* в листьях кукурузы при разных световых режимах. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм

С целью выявления участия фактора PIF3 в регуляции скорости экспрессии гена *fum1* была проведена количественная ПЦР-РВ. В результате анализа установлено, что скорость экспрессии гена *pif3* имеет характерную зависимость от состояния фитохромной системы. Под действием КС наблюдалось увеличение интенсивности экспрессии *pif3*, также как и в растениях в варианте «Свет». Однако, при воздействии на растения кукурузы ДКС и последовательным облучением красным и дальним красным светом показано изменение скорости синтеза мРНК исследуемого гена в сторону уменьшения на 30-35% (рис. 3).

На основании результатов исследования экспрессии *pif3* можно заключить, что фактор PIF3 является посредником фитохромного сигнала в ядре растительной клетки. Активная форма фитохрома вызывает увеличение скорости транскрипции гена *pif3*, что в свою очередь имеет определенную корреляцию с интенсивностью работы гена *fum1*, проявляющуюся в снижении данного показателя.

В отличие от PIF3 транскрипционный фактор PIF1 не взаимодействует непосредственно с фитохромами А и В, однако имеет важное значение в регуляции метаболизма в темноте. Эти данные свидетельствуют о том, что регуляция световых процессов в клетках растений может осуществляться путем удаления негативных регуляторов (например, PIF) путем светозависимого протеолиза [14].

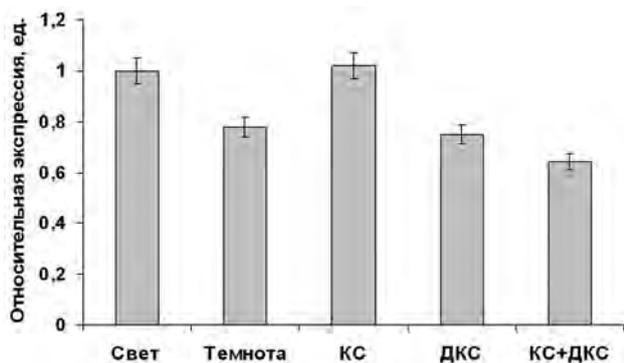


Рис. 3. Относительный уровень транскрипции фактора *pif3* в листьях кукурузы при разных световых режимах. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

Анализ уровня экспрессии гена *pif1* в зеленых листьях кукурузы показал, что колебания количества его продукта наблюдаются при изменении светового режима, но они незначительны (рис. 4).

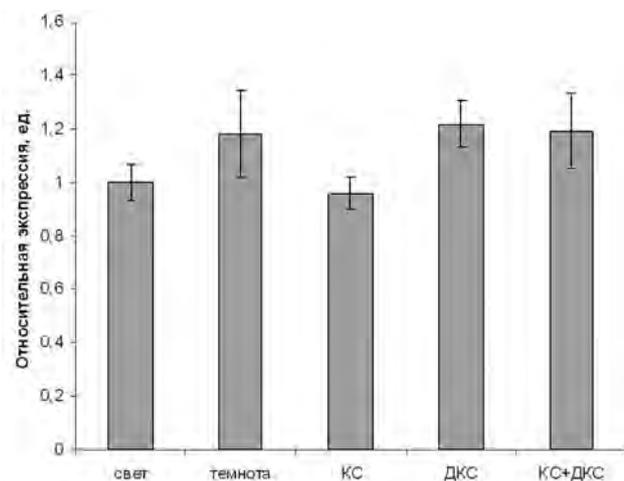


Рис. 4. Относительный уровень транскрипции фактора *pif1* в листьях кукурузы при разных световых режимах. Свет – растения, освещенные белым светом; Темнота – растения, выдержанные в темноте; КС – растения, освещенные светом с длиной волны 660 нм; КС+ДКС – растения, последовательно освещенные светом с длиной волны 660 нм и 730 нм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследования показали, что активность фумаратгидратазы и скорость экспрессии гена *fum1* находятся под контролем фитохромной системы. Активная форма

фитохрома А проявляет ингибирующее действие на интенсивность транскрипции гена *fum1*. В механизме внутриядерной трансдукции фитохромного сигнала принимает участие транскрипционный фактор PIF3, регулирующий активность фумаразы и экспрессию ее гена (*fum1*) в зеленых листьях кукурузы. В ходе исследования показано, что активная форма фитохрома вызывает увеличение скорости транскрипции гена *pif3* (рис. 3), что в свою очередь имеет определенную корреляцию с интенсивностью работы гена *fum1*, проявляющуюся в снижении данного показателя (рис. 2). Следовательно, можно предположить, что транскрипционный фактор PIF3 является посредником фитохромного сигнала в ядре растительной клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №14-14-00721

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов В.Н. Световая регуляция экспрессии сукцинатдегидрогеназы в листьях *Arabidopsis thaliana* / В.Н. Попов, А.Т. Епринцев, Д.Н. Федорин // Физиология растений. — 2007. — Т. 54, № 3. — С. 409-415.
2. Behal R.H. Biochemical and molecular characterization of fumarase from plants: purification and characterization of the enzyme – cloning, sequencing, and expression of the gene / R.H. Behal, D.J. Oliver // Arch. Biochem. Biophys. — 1997. — V. 348. — P. 65-74.
3. *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen / I. Pracharoenwattana [et al.] / Plant J. — 2010. — V. 62. — P. 785-795.
4. Araujo W.L. Fumarate: multiple functions of a simple metabolite / W.L. Araujo, A. Nunes-Nesi, A.R. Fernie // Phytochemistry. — 2011. — V. 72. — P. 838-843.
5. Eprintsev A.T. Ca²⁺ is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate dehydrogenase gene *sdh1-2* in *Arabidopsis* / A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin, A.U. Igamberdiev // J Plant Physiol. — 2013. — V. 170, N. 15. — P. 1349-1352.
6. Galon Y. Calcium-Regulated Transcription in Plants / Y. Galon, A. Finklerand, H. Fromm // Molecular Plant. — 2010. — V. 3, № 4. — P. 653-669.
7. Eprintsev A.T. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in germinating maize seeds / A.T. Eprintsev [et al.] // Physiol Plant. — 2014. V. 152. — P. 231-240.

8. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent / O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193. — P. 265-275.
9. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress / N. Nicot [et al.] // *J. of Exp. Bot.* — 2005. — V. 56. — P. 2907-2914.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 351 с.
11. Light influence on succinate dehydrogenase activity in maize leaves / Y.A. Leonova [et al.] // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.* — 2005. — V. 1, N. 1. — P. 30-36.
12. Епринцев А.Т. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях / А. Т. Епринцев, В. Н. Попов — Воронеж : Изд-во Воронеж, ун-та, 1999. — 192 с.
13. Low frequency of somatic mutations in the FH/multiple cutaneous leiomyomatosis gene in sporadic leiomyosarcomas and uterine leiomyomas / K. T. Barker [et al.] // *Brit. J. Cancer.* — 2002. — V. 87. — P. 446-448.
14. Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from Arabidopsis depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes / H. Shen [et al.] // *Plant Cell.* — 2008. — V. 20, N. 6. — P. 1586-1602.

Воронежский государственный университет
Федорин Д. Н., к.б.н., доцент, кафедра биохимии и физиологии клетки,
E-mail: rybolov@mail.ru
Тел.: (473) 22-88-77

Voronezh State University
Fedorin D. N., PhD (Biology), Associate Professor, Dept. of biochemistry and cell physiology
E-mail: rybolov@mail.ru
Ph.: (473) 22-88-77

Сазонова О. В., аспирантка кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: oksana_ragik@mail.ru
Тел.: (473) 22-88-77

Sazonova O. V., post-graduate student, Dept. of biochemistry and cell physiology
E-mail: oksana_ragik@mail.ru
Ph.: (473) 22-88-77

Черкасских М. В., магистрант кафедры биохимии и физиологии клетки,
E-mail: fess-ru@mail.ru
Тел.: (473) 22-88-77

Cherkassky M. V., graduate student, Dept. of biochemistry and cell physiology
E-mail: fess-ru@mail.ru
Ph.: (473) 22-88-77

Епринцев А. Т., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru
Тел.: (473) 22-88-77

Eprintsev A. T., PhD (Biology), D.Sci., Full Professor, head of the department of biochemistry and cell physiology
E-mail: bc366@bio.vsu.ru
Ph.: (473) 22-88-77