

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *FUM2* ФУМАРАТГИДРАТАЗЫ КУКУРУЗЫ *ZEA MAYS L.*

Д. Н. Федорин, М. А. Добычина, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 12.05.2017 г.

Аннотация. В результате анализа структуры промотора гена *fum2* фумаратгидратазы (ФГ, КФ 4.2.1.2) установлено, что в его составе отсутствуют CpG-островки, что может обуславливать его регуляцию за счет изменения статуса метилирования отдельных CG-динуклеотидов. Механизм регуляции гена *fum2* связан с зависимостью связывания транскрипционных факторов от наличия метилированных цитозинов в специфических сайтах их связывания. На основании данного анализа нами были разработаны праймеры для метилспецифичной ПЦР.

Ключевые слова: фумаратгидратаза, промотор, ген, метилирование ДНК, CpG-островок, метилспецифичная полимеразная цепная реакция

Abstract. As a result of the analysis of the structure of the promoter of the gene *fum2* fumarate hydratase (FH, EC 4.2.1.2), it was found that there are no CpG islands in its composition, which can cause its regulation by changing the methylation status of individual CG dinucleotides. The mechanism of regulation of the *fum2* gene is associated with the dependence of the binding of transcription factors on the presence of methylated cytosines in specific sites of their binding. Based on this analysis, we developed primers for methyl-specific PCR.

Keywords: fumarate hydratase, promoter, gene, DNA methylation, CpG-island, methyl-specific polymerase chain reaction

Одним из ферментов, играющих важную роль в окислительных процессах клетки является фумаратгидратаза. Данный фермент катализирует обратимую гидратацию фумарата в L-малат, обеспечивая протекание цикла трикарбоновых кислот. Скорость функционирования ФГ, в частности прямой реакции, является показателем интенсивности функционирования цикла Кребса [1]. Однако, более важным показателем работы фермента является содержание его транскриптов.

Анализ генетических баз данных и источников литературы показал, что в геноме кукурузы имеется два гена *fum1* и *fum2*, кодирующих ФГ [2]. При этом, ген *fum2* кодирует цитозольную форму фермента, участвующую в анаэробных реакциях и обеспечивающую адаптивную реакцию организма [3]. Ранее было показано, что в процессе прорастания семян в щитках кукурузы уровень экспрессии гена *fum1* снижается, что способствует ферменту поддерживать гомеостаз в стрессовых условиях. Одним из механизмов, из-

меняющих функционирование фермента, может выступать контроль скорости продукции мРНК гена за счет изменения метилирования промоторной области ДНК. Данная эпигенетическая модификация является уникальной, поскольку имеет динамический характер и наследуется, обеспечивая основу для регулирования экспрессии генов [4]. В соматических клетках метилирование ДНК путем ковалентного добавления метильной группы (-CH₃) к цитозину обнаруживается наиболее часто в контексте CpG-сайта [5]. В связи с этим целью данной работы являлся анализ промоторного участка гена *fum2* на наличие CpG-сайтов и разработка метил-специфичных праймеров для оценки статуса метилирования отдельных CG-динуклеотидов его промотора.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для анализа промотора гена *fum2* на наличие CpG-островков и подбора праймеров для метилспецифичной ПЦР была использована программа MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>). Нуклеотидная последовательность

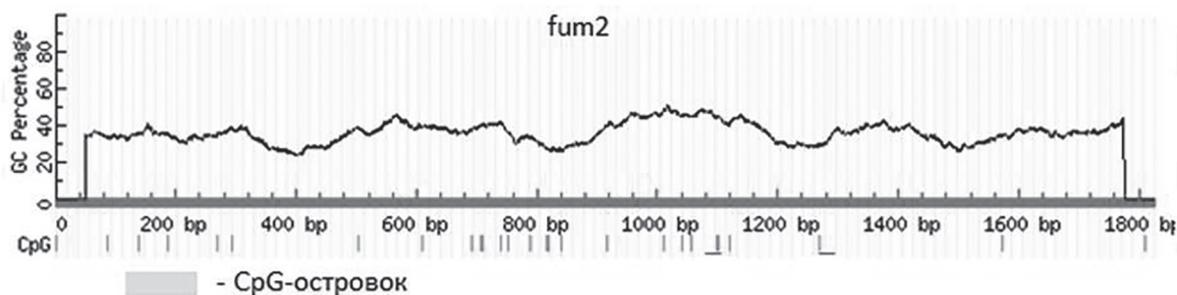


Рис. 2. Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора гена *fum2* *Z. mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов. Голубым выделен CpG-островок.

Таблица 1.

Олигонуклеотиды к промотору гена *fum2* для метилспецифичной ПЦР

Ген	Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
fum2	I -778 нукл.	прямой М	5'- TAATTTAAAATTCCAAATAGCTTGCA -3'
		обратный М	5'- TGAAAATTTATTTGTGGTGTGG -3'
		прямой U	5'- AAATTTCCAAATAGCTTGCA -3'
		обратный U	5'- AAAATTTATTTGTGGTGTGG -3'
	II -717 нукл.	прямой М	5'- TTCATTTTCATATACAATCCGCA -3'
		обратный М	5'- TGAAAATTTATTTGTGGTGTGG -3'
		прямой U	5'- TTCATTTTCATATACAATCCACA -3'
		обратный U	5'- AAAATTTATTTGTGGTGTGG -3'
	III -552 нукл.	прямой М	5'- AAAATATACCTTACACAAAAATAAGCA -3'
		обратный М	5'- TGAAAATTTATTTGTGGTGTGG -3'
		прямой U	5'- AAAATATACCTTACACAAAAATAAACA -3'
		обратный U	5'- AAAATTTATTTGTGGTGTGG -3'

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования методами биоинформатики были проанализированы мРНК, ген *fum2* кукурузы и его промотор, на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе данных GenBank. В составе промоторной области не обнаружено CpG-островков, что может обуславливать его регуляцию за счет изменения степени его метилирования отдельных CG-динуклеотидов, играющих важную роль в работе гена за счет контроля его взаимодействия с транскрипционными факторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ, грант №14-14-00721).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ленинджер А. Биохимия / А. Ленинджер, 1976. – 489 с.
2. Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in germinating maize seeds / А.Т. Епринцев [et al.] // *Physiologia Plantarum*. - 2014. - V. 152. - P. 231–240.
3. Dual localization of fumarase is dependent on the integrity of the glyoxylate shunt / N. Regev-Rudz-

ki [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2009. – V. 72, N. 2. – P. 297–306.

4. Scott V. Epigenetic Regulation of Gene Expression: Emerging Applications for Horses / V.Scott // *Journal of Equine Veterinary Science*. - 2013. - V.33. - Is.5. - P.288-294.

5. DNA cytosine methylation in plant development / M. Zhang [et al.] // *J Genet Genomics*. – 2010. – V. 37, N. 1. – P. 1-12.

6. Роль транскрипционных факторов в регуляции экспрессии фумаратгидратазной активности в кукурузе / Д.Н. Федорин [и др.] // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. - 2015. - № 4. - С. 80-84.

7. Monk M. Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X-chromosome activity and imprinting / M. Monk // *Philosophical transactions of the Royal Society of London B. Biological Science*. – 1990. – V.326. – P. 299–312.

8. Comb M. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2 / M. Comb, H.M. Goodman // *Nucleic Acids Research*. – 1990. – V.18. – P. 3975–3982.

9. Clark S.J. Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation / S.J. Clark, J. Harrison, P.L. Molloy // *Gene*. – 1997. – V.195. – P. 67–71.

10. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs / R.R. Meehan [et al.] // *Cell*. – 1989. – V.58 – P. 499–507.

*Воронежский государственный университет
Федорин Д. Н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки,
Тел.: +7 (473)22-88-77
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Voronezh State University
Fedorin Dmitry N., assistant professor of biochemistry and cell physiology,
Ph.: +7 (473) 22-88-77
E-mail: rybolov@mail.ru*

*Добычина М. А., магистрант кафедры биохимии и физиологии клетки,
Тел.: +7 (473)22-88-77
E-mail: mzenishheva@yandex.ru*

*Dobychina M. A., post-graduate student of the Department of Biochemistry and Cell Physiology
Ph.: +7 (473) 22-88-77
E-mail: mzenishheva@yandex.ru*

*Епринцев А. Т., заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки,
Тел.: +7 (473)22-88-77
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Eprintsev A. T., head of the department of biochemistry and cell physiology
Ph.: +7 (473) 22-88-77
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*