

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ АТФ-ЦИТРАТЛИАЗЫ В ЩИТКАХ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН КУКУРУЗЫ

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

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 01.03.2019 г.

Аннотация. Установлено, что при прорастании семян кукурузы пик активности АТФ-зависимой цитратлиазы наблюдается на 4 день. Вероятно, увеличение активация АТФ-цитратлиазы на начальных этапах прорастания семян кукурузы обусловлена интенсификацией процессов мобилизации запасных веществ семени, в частности жирных кислот через глиоксилатный путь. Снижение интенсивности экспрессии гена АТФ-цитратлиазы после четвертого дня прорастания свидетельствует о переключении энергетического метаболизма растительной клетки при переходе к фотосинтетической активности. Изменение скорости функционирования исследуемого фермента может быть обусловлено как активацией имеющихся белковых молекул, так и синтезом новых. Анализ уровня транскриптов гена *csu3* АТФ-цитратлиазы свидетельствует, что увеличение ферментативной активности связано с увеличением синтеза белковых молекул исследуемого энзима. Показано, что относительный уровень транскриптов гена *csu3* значительно возрастает на 4 день прорастания семян кукурузы. Изменение скорости работы гена может быть связано с регуляцией его транскрипционной активности, в том числе и за счет эпигенетических механизмов. Анализ промоторной области гена *csu3* кукурузы показал наличие в его составе трех CpG-островков. Наличие в составе промотора исследуемого гена CpG-островков, является критерием, обеспечивающим возможность его регуляции за счет изменения метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов в его составе. Для выявления метильного статуса некоторых CG-динуклеотидов, входящих в состав CpG-островков промотора гена *csu3* были разработаны праймеры для метилспецифичной ПЦР. Установлено, что метильный статус отдельных CG-динуклеотидов промотора гена *csu3* АТФ-цитратлиазы меняется на протяжении всего периода прорастания семян. Однако, суммарный показатель степени метилирования промотора остается неизменным и составляет 25 %. Полученные результаты указывают на отсутствие корреляция между степенью метилирования промотора исследуемого гена и содержанием его мРНК в клетках щитков кукурузы при прорастании семян. Показано, что изменение экспрессии гена *csu3* АТФ-цитратлиазы не связано с метильным статусом CG-динуклеотидов его промотора и, вероятно, регулируется иным механизмом.

Ключевые слова: АТФ-цитратлиаза, ген, экспрессия, активность, регуляция, метилирование ДНК, промотор

При развитии растения на ранних этапах происходит смена типов питания, вначале растение питается гетеротрофно, после формирования фотосистем постепенно переходит на автотрофный тип питания. Возможность столь кардинальной смены типов питания обусловлено существованием различных метаболических путей, обеспечивающих процессы жизнедеятельности [1]. Ферменты и ферментативные комплексы, принимающие активное участие в этих процессах имеют очень важное значение для функционирования клетки в

нормальном режиме и поэтому исследование данных ферментов и их генов важно как в теоретическом и практическом аспектах.

Особую роль в данном процессе играет цитоплазматическая АТФ-цитратсинтаза, также обозначаемая как АТФ-цитратлиаза (АТФ-ЦЛ, КФ 4.1.3.8), которая катализирует образование ацетил-СоА и оксалоацетата из цитрата и СоА. Фермент представляет собой тетрамер (молекулярная масса 440 кДа, определяемая равновесным осаждением) четырех, по-видимому, идентичных субъединиц. Исследования этого фермента показали, что выделенный белок представляет собой фосфопротеин, содержащий обычно две

фосфатные группы на тетрамер [2]. Ацетил-СоА представляет собой субстрат для биосинтеза различного рода соединений в растительной клетке. Цитозольный пул ацетил-СоА, в накоплении которого принимает активное участие цитозольная АТФ-цитратлиаза, необходим для поддержки биосинтеза широкого диапазона биомолекул, которые важны для роста, развития и защиты растений. Эти биомолекулы включают масла, содержащие очень длинную цепь жирных кислот, воски [3, 4], флавоноиды, мевалоновую кислоту [5], изопреноиды [6].

Установлено, что ЦС модулируется многими факторами, занимая ключевое положение в регуляции пула цитоплазматического ацетил-СоА. Важными регуляторными метаболитами являются ацил-производные с разным количеством углеродных атомов [7]. Кроме того, фермента проявляет высокую чувствительность по отношению к энергетическим эквивалентам клетки [8]. Однако, мало работ, посвященных изучению молекулярных механизмов регуляции скорости функционирования данного фермента. В связи с этим, целью исследования явилось выяснение роль изменения статуса метилирования промотора гена цитратлиазы в регуляции в регуляции его экспрессии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали щитки семян кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенных гидропонным способом при 10-ти часовом световом дне и интенсивности света 25 Ватт/м² в течение 10 дней прорастания.

Активность цитратсинтазы определяли в среде спектрофотометрирования следующего состава: 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 0.2 мМ 5.5-дителибис (2-нитробензоат) (DTNB), 0.2 мМ оксалацетата, 0.2 мМ MnCl₂ и 0.2 мМ ацетил-СоА. Реакцию инициировали добавлением фермента и контролировали спектрофотометрически путем образования аниона тионитробензоата из DTNB и СоА при 412 нм [9].

При выделении РНК и ДНК из листьев кукурузы использовался метод гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформной экстракции [10]. Обратная транскрипция осуществлялась при помощи набора M-MuLV Reverse Transcriptase согласно инструкции производителя. Количественную полимеразную цепную реакцию проводилось на приборе LightCycler96 (Roche, Швейцария), краситель, применяемый в работе - SYBR Green. В

качестве праймеров, подобранных с помощью программного обеспечения Primer3, использовали нуклеотидные последовательности: к гену *csy3* (NC_024461.2): прямой – 5'-gagtgcctttggattgcgct-3', обратный 5'-tggcgagtcagtttgtag-3'.

Для анализа промотора гена *csy3* на наличие CpG-островков и подбора праймеров для метилспецифичной ПЦР была использована программа MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>). Нуклеотидную последовательность промоторной области гена ЦС кукурузы были взяты из базы данных NCBI (США, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

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 [11]. Полимеразную цепную реакцию с метил-специфичными праймерами проводили с помощью набора реактивов Thermo Scientific DremTaq PCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, Россия). Реакция ПЦР проводилась на приборе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) со следующими параметрами амплификации: предварительная денатурация при 95°C в течение 10 мин, затем 35 циклов: 95°C – 20 с, 54-60°C – 20 с, 72°C – 30 с, и, наконец, 72°C – 4 мин.

Расчет численных значений МС-ПЦР проводился на основании результатов электрофореграмм ПЦР-продуктов. Значения степени метилирования промотора являются суммарным показателем результатов ПЦР анализа исследуемых СГ-динуклеотидов в промоторе конкретного гена [12].

При математической обработке использовали статистический критерий Стьюдента [13].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследования активности АТФ-цитратлиазы в щитах при прорастании семян кукурузы показали, что данный показатель изменяется в течение 10 дней. Установлено, что на начальных этапах развития наблюдается увеличение скорости функционирования исследуемого фермента до 4 дня прорастания семян. Максимальное значение исследуемого показателя на 4 день составило 7.61 Е/г сырой массы (рис. 1). В дальнейшем, происходило снижение уровня ферментативной активности АТФ-цитратлиазы и к 10 дню прорастания составила 2.61 Е/г сырой массы.

Высокий уровень активности исследуемого фермента на 4 день развития семян, вероятно, обусловлено активацией глиоксилатного цикла,

как этапа мобилизации запасных липидов через глюконеогенез. В течение этого периода происходит согласованное увеличение активности ферментов распада триглицеридов, β -окисления жирных кислот, глиоксилатного цикла и глюконеогенеза, который уменьшается по мере снижения запасов триглицеридов, а проростки приобретает способность к фотосинтезу [14].

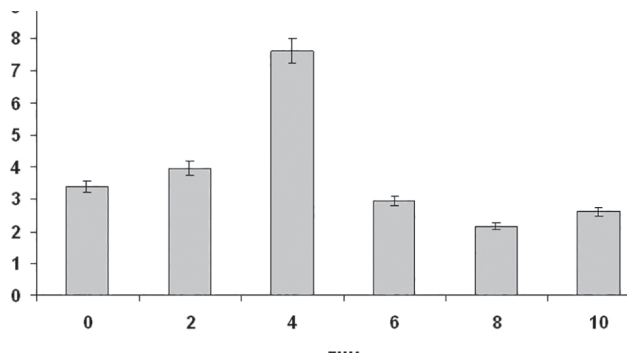


Рис. 1. Динамика активности АТФ-цитратлиазы в щитках кукурузы при прорастании семян.

Установлено, что в первые дни развития в щитках семян кукурузы происходит увеличение концентрации мРНК исследуемого гена и достигает максимального значения на 4 день. Далее наблюдается снижение величины данного показателя в 1,7 раза к 6 дню эксперимента (рис. 2). В дальнейшем не происходило существенных изменений в величине исследуемого показателя. Полученные данные по динамике содержания мРНК АТФ-цитратлиазы соотносятся с данными по активности фермента.

Снижение интенсивности экспрессии гена АТФ-цитратлиазы после четвертого дня прорастания свидетельствует о переключении энергетического метаболизма растительной клетки при переходе к фотосинтетической активности. На данном этапе развития снижается потребность уровень мобилизации запасных жиров, поскольку их запас к этому времени резко уменьшается.

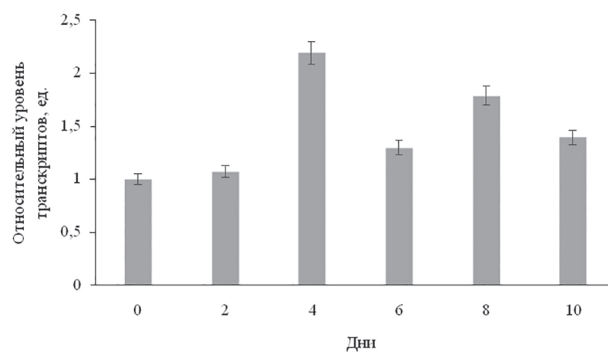


Рис. 2. Уровень транскриптов гена *cys3* АТФ-цитратлиазы в щитках кукурузы при прорастании семян.

Проведенный анализ промотора гена *cys3* АТФ-цитратлиазы содержит в своем составе три CpG-островка (рис. 3). На основе нуклеотидной последовательности промотора гена АТФ-цитратлиазы разработаны праймеры для проведения метил-специфичной ПЦР с применением программы MethPrimer (табл. 1).

Наличие CpG-островков в составе промотора гена *cys3* свидетельствует о возможности его регуляции за счет изменения метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов, входящих в их состав [15, 16].

Для гена АТФ-цитратлиазы наблюдалась следующая картина статуса метилирования исследу-

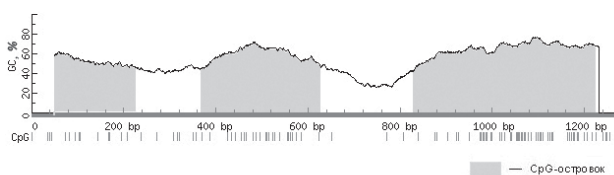


Рис. 3. Анализ нуклеотидной последовательности промотора гена *cys3* на наличие CpG-островков

Таблица 1.

Праймеры к CG-динуклеотидам промотора гена АТФ-цитратлиазы для метил-специфичной ПЦР

Ген	Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
<i>Cys3</i>	-806 нукл.	прямой М	attatcactccaatcaaaagca
		обратный М	tgtacgatctaacgatcgtgttcagag
		прямой U	attgtcactccgagatcgaggcgcg
		обратный U	tgtacgatctaacgatcgtgttcagag
	-843 нукл.	прямой М	agttttacgtatatgcggatttttc
		обратный М	tgtacgatctaacgatcgtgttcagag
		прямой U	gttttatgtatatgtggatttttgg
		обратный U	tgtacgatctaacgatcgtgttcagag
	-820 нукл.	прямой М	tccccgctccaggtccacggca
		обратный М	tgtacgatctaacgatcgtgttcagag
		прямой U	tccccgctccaatccacagca
		обратный U	tgtacgatctaacgatcgtgttcagag

емых CG-динуклеотидов промотора в процессе прорастания семян. Методом метил-специфичной ПЦР показано, что на протяжении всего периода прорастания семян кукурузы степень метилирования промотора гена *csu3* составляла 25% (табл. 2). Такой уровень метильного статуса исследуемых CG-динуклеотидов, входящих в состав CpG-островков, наблюдалась до конца эксперимента, вплоть до 10 дня прорастания семян.

Таблица 2.
Результаты метилспецифичной ПЦР с праймерами для промотора гена *csu3*

	0	2	4	6	8	10
I	-	±	-	±	±	-
II	±	±	±	-	±	±
III	±	±	±	±	±	±
%	25	25	25	25	25	25

Следует отметить, что для цитозина в положении -820 наблюдается стабильный уровень метилирования на протяжении всего периода прорастания семян кукурузы и остается на уровне частичного метилирования.

Анализ влияния степени метилирования на уровень транскрипции гена АТФ-цитратлиазы при прорастании семян кукурузы и при воздействии на растения стрессовых факторов свидетельствует, что данный показатель может являться важным фактором, регулирующим работу исследуемых генов.

На основе полученных данных, были построена диаграмма (рис. 4), из которой видно, что в щитках семян кукурузы во все дни прорастания семян промотор гена *csu3* имеет одинаковый уровень метилирования – 25%. В период максимального уровня экспрессии гена *csu3* также не наблюдается изменений в статусе метилирования исследуемых CG-динуклеотидов. На основе ре-

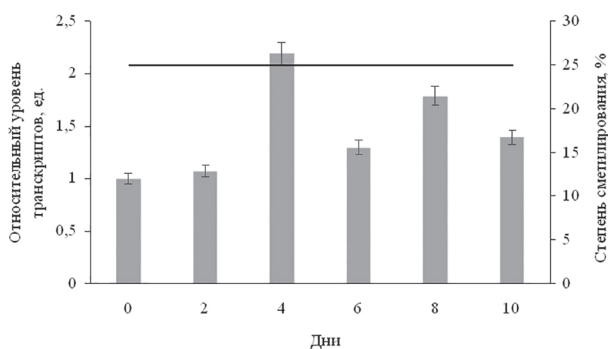


Рис. 4. Динамика уровня транскриптов гена *csu3* АТФ-цитратлиазы и степень метилирования его промотора в щитках кукурузы при прорастании семян.

зультатов исследования метильного статуса промотора гена АТФ-цитратлиазы и уровня его экспрессии можно заключить, что метилирование не является регулирующим фактором экспрессии гена АТФ-цитратлиазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты исследования показали, что в щитках кукурузы при прорастании семян пик активности АТФ-цитратлиазы наблюдается на 4 день. Динамика активности исследуемого фермента соотносится с индукцией глиоксилатного цикла, а также процессами мобилизации запасных веществ [1]. В щитке роль АТФ-цитратлиазы может быть особенно важна, поскольку основным источником углеводов в семенах зерновых является эндосперм. Окисление жирной кислоты в щитке может активно участвовать в подкислении эндосперма для гидролиза крахмала во время прорастания, а также являться необходимым этапом формирования углеродных скелетов для биосинтетических процессов [6, 17].

Полученные нами данные свидетельствуют, что экспрессия гена АТФ-цитратлиазы коррелирует с изменением ее активности. Максимальный уровень транскриптов гена *csu3* наблюдается на 4 день прорастания семян, что указывает на регуляцию активности исследуемого фермента за счет синтеза новых белковых молекул. Нами показано, что изменение экспрессии гена *csu3* АТФ-цитратлиазы не связано с метильным статусом CG-динуклеотидов промотора данного гена и регулирующим фактором выступает иной механизм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ грант № 17-04-01039).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Епринцев А.Т., Попов В.Н. Ферментативная регуляция метаболизма ди- и трикарбоновых кислот в растениях. Воронеж, Из-во Воронеж. ун-та., 1999, 192с.
2. Sun T., Hayakawa K., Bateman K.S., Fraser M.E. // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285, pp. 27418–27428.
3. Pollard M., Stumpf P.K. // Plant Physiol. 1980. Vol. 66, pp. 649–655.
4. Bao X., Pollard M., Ohlrogge J. // Plant Physiol. 1998. Vol. 118, pp. 183–190.
5. Fatland B.L., Ke J., Anderson M.D., Mentzen W.I., Cui L.W., Allred C.C., Johnston J.L., Nikolau B.J., Wurtele E.S. // Plant Physiol. 2002. Vol. 130, pp. 740-756.

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

6. Pütter K.M., van Deenen N., Unland K., Prüfer D., Schulze Gronover C. // BMC Plant Biol. 2017. Vol. 17, pp. 88.
7. Xing S., van Deenen N., Magliano P., Frahm L., Forestier E., Nawrath C., Schaller H., Gronover C.S., Prüfer D., Poirier Y. // Plant J. 2014. Vol. 79, pp. 270-284.
8. Pfitzner A., Kubicek C.P., Röhr M. // Archives of Microbiology March. 1987. V. 147, pp. 88–91.
9. Kim M., Le H., McInerney M.J., Buckel W. // J Bacteriol. 2013. Vol. 195, pp. 1689-1696.
10. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. Vol. 162, pp. 156–159.
11. Warnecke P.M., Stirzaker C., Song J., Grunau C., Melki J.R., Clark S.J. // Methods. 2002. Vol. 27, pp. 101-107.
12. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ву Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н. // Физиология растений. 2012. Т 59. № 3, С. 332–340.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. шк., 1990. - 351с.
14. Cornah J.E. Synthesis and function of glyoxylate cycled enzymes. In Plant Peroxisomes. London: Kluwer Academic Publishers, 2002, P. 57–101.
15. Antequera F., Bird A. // Proc Natl Acad Sci USA. 1993. Vol. 90, pp. 11995-11999.
16. Comb M., Goodman H.M. // Nucleic Acids Res. 1990. Vol. 18, pp. 3975-3982.
17. Ma Z., Marsolais F., Bernards M.A. // Plant Sci. 2016. Vol. 248, pp. 37-44.

Воронежский государственный университет
Федорин Д. Н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки,
E-mail: rybolov@mail.ru

Voronezh State University
Fedorin D. N., assistant professor of biochemistry and cell physiology,
E-mail: rybolov@mail.ru

Добычина М. А., магистр кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: mzenishheva@yandex.ru

Dobychina M. A., Master of the department of biochemistry and cell physiology,
E-mail: mzenishheva@yandex.ru

Уваров А. А., студент кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: andrey.uvarov.97@mail.ru

Uvarov A. A., student of the department of biochemistry and cell physiology
E-mail: andrey.uvarov.97@mail.ru

Епринцев А. Т., заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Eprintsev A. T., head of the department of biochemistry and cell physiology
E-mail: bc366@bio.vsu.ru

REGULATION OF ACTIVITY OF ATP-CITRATE LYASE IN SCUTELLUM DURING OF CORN SEED GERMINATION

D. N. Fedorin, M. A. Dobychina, A. A. Uvarov, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. It was established that during the germination of maize seeds, the peak of ATP-dependent citrate lyase activity is observed on day 4. Probably, the increase in ATP-citrate lyase activation at the initial stages of maize seed germination is due to the intensification of mobilization processes of seed storage substances, in particular fatty acids through the glyoxylate pathway. A decrease in the intensity of ATP-citrate lyase gene expression after the fourth day of germination indicates a shift in the energy metabolism of the plant cell during the transition to photosynthetic activity. The change in the rate of functioning of the enzyme under study may be due to both the activation of the existing protein molecules and the synthesis of new ones. Analysis of the transcript level of the *csy3* gene ATP-citrate lyase indicates that an increase in enzymatic activity is associated with an increase in the synthesis of protein molecules of the enzyme under

study. It is shown that the relative level of *csy3* gene transcripts increases significantly on the 4th day of the germination of maize seeds. Changes in the speed of a gene may be associated with the regulation of its transcriptional activity, including due to epigenetic mechanisms. Analysis of the promoter region of the *csy3* gene of maize revealed the presence of three CpG islands in its composition. The presence of the CpG islet gene in the promoter of the studied gene is a criterion that makes it possible to regulate it by changing the methyl status of individual CG dinucleotides in its composition. To identify the methyl status of some CG dinucleotides that are part of the CpG islands of the *csy3* gene promoter, primers were developed for methyl specific PCR. It has been established that the methyl status of individual CG dinucleotides of the promoter of the *csy3* gene ATP-citrate lyase changes throughout the entire period of seed germination. However, the total rate of promoter methylation rate remains unchanged at 25%. The results indicate that there is no correlation between the degree of methylation of the promoter of the gene under investigation and the content of its mRNA in maize flap cells during seed germination. It has been shown that a change in the expression of the *csy3* gene ATP-citrate lyase is not associated with the methyl status of its promoter CG dinucleotides and is probably regulated by a different mechanism.

Keywords: ATP-citrate lyase, gene, expression, activity, regulation, DNA methylation, promoter

REFERENCES

1. Eprintsev A.T., Popov V.N. Enzymatic regulation of the metabolism of di- and tricarboxylic acids in plants. Voronezh, from Voronezh. University, 1999, 192s.
2. Sun T., Hayakawa K., Bateman K.S., Fraser M.E., J. Biol. Chem., 2010, Vol. 285, pp. 27418-27428.
3. Pollard M., Stumpf P.K., Plant Physiol., 1980, Vol. 66, pp. 649–655.
4. Bao X., Pollard M., Ohlrogge J., Plant Physiol., 1998, Vol. 118, pp. 183–190.
5. Fatland B.L., Ke J., Anderson M.D., Mentzen W.I., Cui L.W., Allred C.C., Johnston J.L., Nikolau B.J., Wurtele E.S., Plant Physiol., 2002, Vol. 130, pp. 740-756.
6. Pütter K.M., van Deenen N., Unland K., Prüfer D., Schulze Gronover C., BMC Plant Biol., 2017, Vol. 17, pp. 88
7. Xing S., van Deenen N., Magliano P., Frahm L., Forestier E., Nawrath C., Schaller H., Gronover C. S., Prüfer D., Poirier Y., Plant J., 2014, Vol. 79, pp. 270-284.
8. Pfitzner A., Kubicek C.P., Röhr M., Archives of Microbiology March., 1987, V. 147, pp. 88–91.
9. Kim M., Le H., McInerney M.J., Buckel W., J Bacteriol., 2013, Vol. 195, pp. 1689-1696.
10. Chomczynski P., Sacchi N., Anal. Biochem., 1987, Vol. 162, pp. 156-159.
11. Warnecke, P.M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J.R., Clark, S.J., Methods, 2002, Vol. 27, pp. 101-107.
12. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Vu T.L., Makhmud A.S., Popov V.N., Plant Physiology, 2012, T 59, No. 3, C. 332–340.
13. Lakin G.F. Biometrics, M.: Higher. shk., 1990. 351s.
14. Cornah J.E. Synthesis and function of glyoxylate cycled enzymes. In Plant Peroxisomes. London: Kluwer Academic Publishers, 2002, P. 57–101.
15. Antequera F., Bird A., Proc Natl Acad Sci USA, 1993, Vol. 90, pp. 11995-11999.
16. Comb M., Goodman H.M., Nucleic Acids Res., 1990, Vol. 18, pp. 3975-3982.
17. Ma Z., Marsolais F., Bernards M.A., Plant Sci., 2016, Vol. 248, pp. 37-44.