

**АНАЛИЗ МЕТИЛЬНОГО СТАТУСА ОТДЕЛЬНЫХ  
CG-ДИНУКЛЕОТИДОВ ПРОМОТОРА ГЕНА *SDH3-1*  
СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ПРОРАСТАНИИ  
СЕМЯН КУКУРУЗЫ**

Д. Н. Федорин, А. П. Пельтихина, С. Д. Крылова, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 20.12.2019 г.

**Аннотация.** Анализ нуклеотидного состава промотора гена *sdh3-1* сукцинатдегидрогеназы показал равномерное распределение цитозинов в анализируемой последовательности и отсутствие CpG-островков. Отсутствие в составе промотора исследуемого гена CpG-островка предполагает возможность его регуляции за счет конформационного состояния анализируемой молекулы ДНК при изменении метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов. Изменение уровня компактизации молекулы ДНК обусловлено изменением метильного статуса регуляторного элемента гена *sdh3-1* - промотора, что может играть важную роль в обеспечении контроля взаимодействия с транскрипционными факторами. На основе нуклеотидной последовательности разработаны праймеры для бисульфитного секвенирования с целью анализа уровня метилирования 20-ти CG-динуклеотидов, входящих в состав промотора гена субъединицы С сукцинатдегидрогеназы. Получен специфический продукт ампликации и разработанными праймерами и проведено его секвенирование. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности ампликона с метилированной и неметилированной ДНК исследуемого промотора позволил установить его общий уровень метилирования, а также метильный статус всех анализируемых CG-динуклеотидов, входящих в состав исследуемого промотора, в разные периоды прорастания семян кукурузы. Результаты исследования, с применением методы сравнительного анализа специализированным программным обеспечением, показали, что в первый день прорастания семян кукурузы общая степень метилирования исследуемого промотора составляет 75%, что может свидетельствовать о слабой компактизации ДНК и низком уровне транскрипции исследуемого гена. Однако, по мере развития семян кукурузы, происходит изменение как общего метильного статуса промотора гена *sdh3-1* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы, так и метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов, входящих в его состав. Было установлено, что на 4 день прорастания семян кукурузы общая степень метилирования CG-динуклеотидов промотора гена *sdh3-1* составляет 37.5%. При этом показано, что ряд анализируемых CG-динуклеотидов деметилируются. Однако, установлено, что цитозины в положении -451 и -517 не изменяют свой метильный статус на протяжении эксперимента и остаются неметилированными на протяжении всего эксперимента.

**Ключевые слова:** сукцинатдегидрогеназа, метилирование ДНК, бисульфитное секвенирование, промотор, праймер, ампликон

Одной из ключевых реакций цикла трикарбоновых кислот является реакция, катализируемая сукцинатдегидрогеназой (СДГ, КФ 1.3.99.1) [1]. Ранее было установлено, что данный фермент представлен множественными формами, локализуемыми в митохондриях [2]. Кроме того, показана сложная генетическая детерминация

СДГ-системы, что обеспечивает возможность формирования набора изоферментов, участвующих в различных метаболических процессах клетки [3, 4]. В связи с этим, важное значение имеет выяснение механизмов регуляции данного фермента, в том числе эпигенетического. Установлено, что в разные периоды развития семян кукурузы и арабидопсиса наблюдается изменение в функционировании сукцинатдегидрогеназы, проявляющееся

в контроле набора изоферментов данного энзима [5, 6]. Отличие набора изоферментов в разные периоды прорастания семян связано с дифференциальной экспрессией генов, кодирующих сукцинатдегидрогеназу. Важное значение в формировании множественных молекулярных форм СДГ играют мембраносвязанные субъединицы С и D, обеспечивающие формирование гидрофобной части фермента и его участие в работе электрон-транспортной цепи митохондрий. Установлено, что в регуляции экспрессии генов субъединиц С и D не принимают участие фоторецепторные системы растительной клетки [7], однако данный механизм может быть связан с изменением метильного статуса промоторов генов исследуемого энзима.

Одним из методов анализа статуса метилирования ДНК является бисульфитное секвенирование. В его основе лежит бисульфитная обработка ДНК [8]. Далее проводится амплификация интересующей области с использованием праймеров, после чего амплификаты должны быть клонированы с последующим секвенированием [9, 10]. Этот метод позволяет проводить исследование аллель-специфичного метилирования. Бисульфитное пиросеквенирование основано на последовательном добавлении нуклеотидов к ДНК с высвобождением пирофосфатов, которые под воздействием сульфурилазы, аденозинфосфосульфата и люциферазы индуцируют биoluminesценцию. Люминесценция регистрируется камерой и далее анализируется специальной компьютерной программой [11]. Данный метод обеспечивает надежное и быстрое определение метилирования ДНК принципиально любой последовательности. Бисульфитное секвенирование может использоваться для анализа как глобального статуса метилирования ДНК, так и отдельных ДНК-элементов, в частности мобильных генетических элементов [12, 13]. Изучение статуса метилирования всей ДНК особенно актуально для онкологии, поскольку опухолевые клетки характеризуются глобальным гипометилированием ДНК [14]. Наиболее перспективным методом оценки полногеномного статуса метилирования ДНК является секвенирование следующего поколения. Под ним понимаются различные варианты циклического матричного секвенирования [15]. Данный метод позволяет достаточно быстро определить статус метилирования каждого CpG локуса в геноме. Несмотря на существование некоторых ограничений, этот метод является перспективным в анализе метильного статуса ДНК, в том числе и регуляторных элементов генов - промоторов.

В связи с этим целью данной работы являлось изучение уровня метилирования CG-динуклеотидов промотора гена *sdh3-1* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы в щитках при прорастании семян кукурузы с использованием метода бисульфитного секвенирования.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объектов исследования использовали щитки семян кукурузы (*Zea mays* L.) 1 и 4 дней прорастания, выращенные гидропонным способом при температуре 25°C и 12-часовом световом дне.

ДНК выделяли из щитков кукурузы с помощью комплекта реагентов для выделения ДНК Проба-ГС согласно рекомендациям производителя.

Для визуализации и анализа качества выделенной ДНК использовался электрофорез в агарозном геле.

Модификацию ДНК бисульфитом натрия проводили по методике, описанной ранее [8, 16]. Обессоливание. Очистку ДНК из солевого раствора проводили с помощью набора QIAEX II GelExtraction ("Qiaex", Германия), в соответствии с рекомендациями производителя.

Десульфитирование. Очищенную пробу ДНК инкубировали в 0,3 М растворе NaOH при 37°C в течение 20 мин. Для этого к 100 мкл раствора ДНК добавляли 11 мкл свежеприготовленного 3 М раствора NaOH.

Для анализа промотора гена *sdh3-1* на наличие CpG-островков и подбора праймеров для бисульфитного секвенирования была использована программа MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>). Нуклеотидная последовательность промоторной области гена субъединицы С сукцинатдегидрогеназы кукурузы (LOC100283351) была взята из базы данных NCBI.

ПЦР проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия). Реакцию ПЦР проводили на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия) со следующими параметрами амплификации: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 35 циклов: 95°C, 20 с, 56°C, 20 с, 72°C, 30 с и 72°C, 4 мин [17].

Очищенный и экстрагированный ампликон секвенировали в ЗАО «Евроген» на платформе Illumina NovaSeq6000.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение нуклеотидного состава промотора гена *sdh3-1* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы

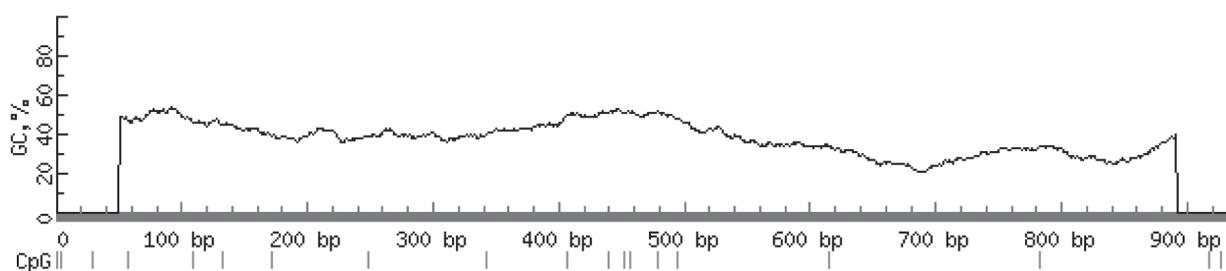
Рис. 1. Анализ нуклеотидной последовательности промотора гена *sdh3-1* на наличие CpG-островков.

Таблица 1.

Праймеры к гену *sdh3-1* для бисульфитного секвенирования

Ген	Праймер	Последовательность	Температура отжига
<i>Sdh3-1</i>	прямой	TTTGTTATGAGTTGTATAAATTA	56°C
	обратный	TTATAAAACTTACAAAAAACACCTAATGAT	

позволило установить присутствие регуляторных элементов в его составе. Результаты исследования с применением программы Methprimer указывают, что промотор гена *sdh3-1* имеет невысокий уровень содержания CG-динуклеотидов в своем составе. Результаты проведенного анализа позволили разработать праймеры для бисульфитного секвенирования, позволяющего провести оценку метильного статуса исследуемого промотора в различные периоды развития семян кукурузы (рис. 1).

На основе представленной в NCBI нуклеотидной последовательности промотора гена *sdh3-1* СДГ нами были разработаны праймеры для проведения бисульфитного секвенирования (табл. 1).

Праймеры были специфичны к модифицированной бисульфитом молекуле ДНК, то есть цитозины, входящие в состав промотора были заменены на тимины. Все сайты неметилированных цитозинов показаны в виде тиминов в полученной амплифицированной последовательности смысловой цепи и в виде аденинов в амплифицированной антисмысловой цепи [4]. Для праймеров использовались участки, близкие к центральной области промотора, что представляет собой важный момент в регуляции работы гена, поскольку данная область определяет взаимодействие гена с транскрипционными факторами.

С разработанными праймерами для бисульфитного секвенирования методом ПЦР были получены ампликоны на 1 и 4 дни прорастания семян кукурузы и проведено их секвенирование. Проведенный сравнительный анализ сиквенса, полученного на основе ДНК в 1 день прорастания семян, с теоретическими вариантами метилированной и неметилированной версии анализируемой последовательности, сконструированной программой Methprimer, позволил установить метильный статус CG-динуклеотидов (рис. 2).

Результаты анализа метильного статуса CG-динуклеотидов промотора исследуемого гена показали, что степень его метилирования в 1 день прорастания семян кукурузы составила 75% (табл. 2).

Таблица 2.

Процентное содержание метилированных и неметилированных CG-динуклеотидов

Метильный статус CG-динуклеотидов	Процентное содержание, %
Метилированные	75
Неметилированные	25

Ампликон, полученный с ДНК на 4 день прорастания семян кукурузы, также проанализировали путем сравнения с метилированной и неметилированной версией анализируемой последовательности. Результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 3.

Было установлено, что на 4 день прорастания семян кукурузы происходит изменение метильного статуса промотора гена *sdh3-1* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы. В данный период метилировано 37.5% CG-динуклеотидов исследуемого промотора (табл. 3).

Таблица 3.

Процентное содержание метилированных и неметилированных CG-динуклеотидов

Метильный статус CG-динуклеотидов	Процентное содержание, %
Метилированные	37.5
Неметилированные	62.5

В результате проведенного исследования установлено, что в процессе прорастания семян кукурузы наблюдается изменение степени метилирования отдельных CG-динуклеотидов промотора гена субъединицы С сукцинатдегидрогеназы. Цитозин -251 изменяет свой статус с неметилированного в 1 день прорастания на метилированный на 4 день



- C.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. pp. 1827–1831.
9. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. pp. 2990–2997.
10. Dikow N., Nygren A.O., Schouten J.P., Hartmann C., Krämer N., Janssen B., Zschocke J. // Mol. Cell Probes. 2007. Vol. 21. pp. 208–215.
11. Tost J., Gut I. // Nat. Protoc. 2007. Vol. 2. pp. 2265–2275.
12. Irahara N., Nosho K., Baba Y., Shima K., Lindeman N.I., Hazra A., Schernhammer E.S., Hunter D.J., Fuchs C.S., Ogino S. // J. Mol. Diagn. 2010. Vol. 12. pp. 177–183.
13. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N., Laktionov P.P. // CNAPS. Ed. P.B. Gahan. 2011. Vol. 6. pp. 41–45.
14. Goetz S.E., Vogelstein B., Hamilton S.R., Feinberg A.P. // Science. 1985. Vol. 228. pp. 187–190.
15. Warnecke, P.M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J.R., Clark, S.J. // Methods. 2002. Vol. 27. pp. 101–107.
16. Shendure J. // Nat. Biotechnol. 2008. Vol. 26. pp. 1135–1145.
17. Епринцев А.Т., Москалёв Е.А., Попов В.Н. // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2001. №1. С. 9–14.
18. Link D.C., Schuettpelz L.G., Shen D., Wang J., Walter M.J., Kulkarni S., Payton J.E., Ivanovich J., Goodfellow P.J., Le Beau M., Koboldt D.C., Dooling D.J., Fulton R.S., Bender R.H., Fulton L.L., Delehaunty K.D., Fronick C.C., Appelbaum E.L., Schmidt H., Abbott R., O’Laughlin M., Chen K., McLellan M.D., Varghese N., Nagarajan R., Heath S., Graubert T.A., Ding L., Ley T.J., Zambetti G.P., Wilson R.K., Mardis E.R. // JAMA. 2011. Vol. 305. pp. 1568–1576.
19. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ахмад Дж.А., Попов В.Н. // Известия РАН. Серия биологическая. 2010. № 3. С. 324–332.
20. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Сукцинатдегидрогеназа высших растений. Воронеж: ООО Центрально-Черноземное книжное изд-во, 2010, 184 с.

*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*

*Пельтихина А. П., магистр кафедры биохимии и физиологии клетки,  
E-mail: peltikhinaa@gmail.com*

*Peltikhina A. P., student of the department of biochemistry and cell physiology  
E-mail: peltikhinaa@gmail.com*

*Крылова С. Д., студент кафедры биохимии и физиологии клетки  
E-mail: krylovasima@yandex.ru*

*Krylova S. D., student of the department of biochemistry and cell physiology  
E-mail: krylovasima@yandex.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*

## ANALYSIS OF METHYLIC STATUS CG-DINUCLEOTIDE PROMOTER SDH3-1 GENE SUCCINATE DEHYDROGENASE IN GERMINATION OF MAIZE SEEDS

**D.N. Fedorin, A. P. Peltikhina, S. D. Krylova, A.T. Eprintsev**

*Voronezh State University*

**Abstract.** Analysis of the nucleotide composition of the promoter of the *sdh3-1* gene of succinate dehydrogenase showed a uniform distribution of cytosines in the analyzed sequence and the absence of CpG islands. The absence of the CpG island in the promoter of the studied gene suggests the possibility of its regulation due to the conformational state of the analyzed DNA molecule when the methyl status of individual CG-dinucleotides changes. The change in the level of compaction of the DNA molecule is due to a change in the methyl status of the regulatory element of the *sdh3-1* gene, the promoter, which can play an important role in controlling the interaction with transcription factors. Based on the nucleotide sequence,

primers for bisulfite sequencing were developed to analyze the methylation level of 20 CG-dinucleotides that make up the promoter of the succinate dehydrogenase C subunit gene. A specific amplification product was obtained with the developed primers and its sequencing was carried out. A comparative analysis of the nucleotide sequence of the amplicon with methylated and unmethylated DNA of the studied promoter made it possible to establish its general methylation level, as well as the methyl status of all analyzed CG-dinucleotides that make up the studied promoter, at different periods of germination of corn seeds. The results of the study, using comparative analysis methods with specialized software, showed that on the first day of corn seed germination, the total degree of methylation of the studied promoter is 75%, which may indicate poor DNA compaction and a low level of transcription of the studied gene. However, as maize seeds develop, both the general methyl status of the promoter of the *sdh3-1* gene of the C subunit of succinate dehydrogenase and the methyl status of individual CG-dinucleotides in its composition change. It was found that on the 4th day of germination of corn seeds, the total methylation degree of CG-dinucleotides of the *sdh3-1* gene promoter is 37.5%. It has been shown that a number of analyzed CG-dinucleotides are demethylated. However, it was found that the cytosines at position -451 and -517 do not change their methyl status throughout the experiment and remain unmethylated throughout the experiment.

**Keywords:** succinate dehydrogenase, DNA methylation, bisulfite sequencing, promoter, primer, amplicon

## REFERENCES

1. Krebs H.A., Lowenstein J.M., Greenberg D.M., NY: Academic Press, 1960, 175 p.
2. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Flores O., Pugla M., Applied biochemistry and microbiology, 2018, Vol. 54, No. 1, pp. 42-45. DOI:10.1134/S0003683818010039
3. Fedorin D.N., Karabutova L.A., O. Kh. Flores K., Eprintsev A.T., Sorption and chromatographic processes, 2017, Vol. 17, pp. 818-823.
4. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N., Plant Cell Environ, 2014, Vol. 37, No. 2, pp. 290-299. DOI: 10.1111/pce.12155.
5. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Wu T.L., Makhmud A.S., Popov V.N., Russian Journal of Plant Physiology, 2012, Vol. 59, No. 3, pp. 332-340. DOI:10.1134/S1021443712030053.
6. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U., J. of Plant Physiology, 2016, Vol. 205, pp. 33-40.
7. Fedorin D.N., Dobychnina M.A., Lopyreva G.B., Cherkassky M.V., Eprintsev A.T., Auditorium. Electronic scientific journal of Kursk State University, 2017, No. 2 (14).
8. Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L., PNAS. USA, 1992, Vol. 89, pp. 1827-1831. DOI: 10.1073/pnas.89.5.1827.
9. Clark S.J., Harrison J., Paul C. L., Frommer M., Nucleic Acids Res, 1994, Vol. 22, pp. 2990-2997. DOI: 10.1093/nar/22.15.2990.
10. Dikow N., Nygren A.O., Schouten J.P., Hartmann C., Krämer N., Janssen B., Zschocke J., Mol. Cell Probes, 2007, Vol. 21, pp. 208-215. DOI: 10.1016/j.mcp.2006.12.002.
11. Tost J., Gut I., Nat. Protoc, 2007, Vol. 2, pp. 2265-2275. DOI: 10.1038/nprot.2007.314.
12. Irahara N., Noshio K., Baba Y., Shima K., Lindeman N.I., Hazra A., Schernhammer E.S., Hunter D.J., Fuchs C.S., Ogino S., J. Mol. Diagn, 2010, Vol. 12, pp. 177-183. DOI: 10.2353/jmoldx.2010.090106.
13. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdynitseva N., Laktionov P.P., CNAPS. Ed. P.B. Gahan, 2011, Vol. 6, pp. 41-45.
14. Goetz S.E., Vogelstein B., Hamilton S.R., Feinberg A.P., Science, 1985, Vol. 228, pp. 187-190. DOI: 10.1126/science.2579435.
15. Warnecke P.M., Stirzaker C., Song, J., Grunau C., Melki J.R., Clark S.J., Methods, 2002, Vol. 27, pp. 101-107.
16. Shendure J., Nat. Biotechnol, 2008, Vol. 26, pp. 1135-1145. DOI: 10.1038/nbt1486.
17. Eprintsev A.T., Moskalev E.A., Popov V.N., System analysis and management in biomedical systems, 2001, No. 1, pp. 9-14.
18. Link D.C., Schuettelpelz L.G., Shen D., Wang J., Walter M.J., Kulkarni S., Payton J.E., Ivanovich J., Goodfellow P.J., Le Beau M., Koboldt D.C., Dooling D.J., Fulton R.S., Bender R.H., Fulton L.L., Delehaunty K.D., Fronick C.C., Appelbaum E.L., Schmidt H., Abbott R., O'Laughlin M., Chen K., McLellan M.D., Varghese N., Nagarajan R., Heath S., Graubert T.A., Ding L., Ley T.J., Zambetti G.P., Wilson R.K., Mardis E.R., JAMA, 2011, Vol. 305, pp. 1568-1576. DOI: 10.1001/jama.2011.473.
19. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Akhmad J.A., Popov V.N. // Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Biological Series, 2010, No. 3, pp. 324-332.
20. Eprintsev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. Succinate dehydrogenase of higher plants. Voronezh. Publishing House LLC, 2010, 184 p.