

АНАЛИЗ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ СУБЪЕДИНИЦ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ МЕТИЛЬНОГО СТАТУСА

Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 20.04.2020 г.

Аннотация. Исследование механизмов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы (СДГ) играет важную роль в понимании функционирования не только цикла трикарбоновых кислот, но и электрон-транспортной цепи митохондрий. Экспрессия генов исследуемых субъединиц СДГ может регулироваться разными механизмами, в том числе и на уровне изменения статуса метилирования ДНК. Анализ базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank показал, что в геноме кукурузы аннотировано два гена, кодирующих субъединицу С (*sdh3-1* и *sdh3-2*), и один ген, кодирующий субъединицу D (*sdh4*) сукцинатдегидрогеназы. Эти гены расположены в разных хромосомах, что позволяет предположить разные механизмы в регуляции их экспрессии. Сравнение генов мембраносвязанной субъединицы С СДГ показало, что у них низкий уровень гомологии, который составляет 45.11%. При этом, максимальное сходство характерно для 3'-области генов *sdh3-1* и *sdh3-2*. Для каждого гена мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы выявлены промоторные области. С применением методов биоинформатики показано различие в распределении СG-динуклеотидов в составе промоторов генов субъединицы С и субъединицы D сукцинатдегидрогеназы. Исследование нуклеотидного состава промотора гена *sdh3-1* показало отсутствие в его составе CpG-островков. Отсутствие CpG-островка в составе промотора гена *sdh3-1* свидетельствует, что его метилирование не всегда носит закономерный характер со скоростью экспрессии и, как правило, носит тканеспецифический характер. Однако, для промоторов генов *sdh3-2* и *sdh4* обнаружена иная модель их организации. В составе гена *sdh3-2* имеется 2 CpG-островка размером 388 и 285 нуклеотидов. Для промотора гена *sdh4* также установлено наличие одного CpG-островка размером 132 нуклеотида. Наличие CpG-островка в составе промотора гена определяет возможность регуляции за счет изменения его статуса метилирования. Праймеры для проведения метилспецифичной ПЦР разработаны на основе нуклеотидных последовательностей промоторов генов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы. Наборы праймеров для отдельных СG-динуклеотидов промоторов генов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы позволяют определить их метильный статус при различных экспериментальных условиях.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, субъединица, ген, промотор, метилспецифичная ПЦР, CpG-островок

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) - ключевой фермент, который принимает участие одновременно в ЦТК и ЭТЦ митохондрий. Этот фермент представляет чрезвычайный интерес для изучения, так как обеспечивает протекание как энергетического, так и конструктивного метаболизма в клетке. СДГ-комплекс состоит из четырех субъединиц. При этом СДГ-система имеет сложную генетическую детерминацию: СДГА кодируется двумя генами, СДГВ - тремя, СДГС - двумя

и СДГД - одним геном. Мембранный якорь СДГ состоит из гетеродимера СДГ3-СДГ4 и внедренного фрагмента гема b (рис. 1). Структура СДГ млекопитающих показывает, что СДГС содержит четыре общих спирали, в то время как СДГД содержит пять [1, 2]. N-концевой спиралью СДГД локализуется в митохондриях и взаимодействует с СДГВ, способствуя мембранной локализации гидрофильного димера. Каждая субъединица имеет две трансмембранные спирали, которые образуют ядро мембранного якоря, в то время как оставшиеся трансмембранные спирали каждой субъединицы

фланкируют его. В дополнение к спиральной организации этого домена, структура показывает, что СДГС и СДГD располагают гем b - кофактор, который взаимодействует с порфириновым кольцом [3]. 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 [1].

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 [4, 5]. Сайт с высоким сродством (QR-проксимальный) располагается ближе к внутренней митохондриальной мембране и является главным убихинон-связывающим сайтом (рис. 1).

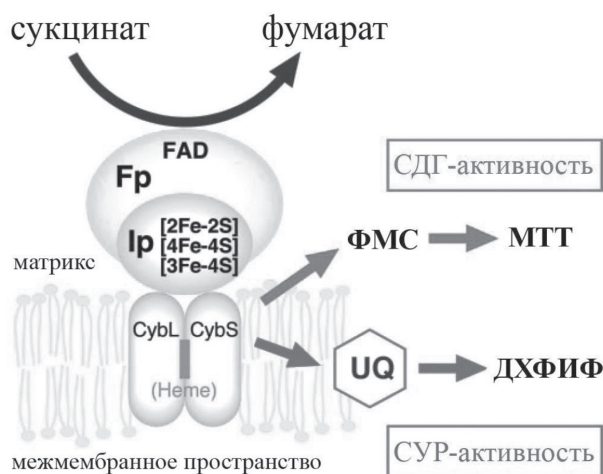


Рис. 1. Комплекс II митохондрий. Субъединичное строение и механизм действия. Fp - субъединица А, Ip – субъединица В, CybL и CybS – комплекс субъединиц С и D. ФМС – феназинметасульфат, МТТ – метилтиазоллитетразолия, UQ – убихинон, ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол.

Ранее 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 [6].

Установлено, что гены каталитического димера имеют дифференциальную экспрессию в раз-

личные периоды развития растительного организма, что отражается на изменении изоферментного состава [7]. Изменение уровня экспрессии генов каталитического димера СДГ связано с изменением метильного статуса их промоторов. Но, в тоже время, практически нет данных о вкладе мембраносвязанных субъединиц в регуляцию функционирования сукцинатдегидрогеназы. Поэтому целью работы было изучение роли изменения степени метилирования генов субъединиц С и D в регуляции их работы в разные периоды развития растения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали нуклеотидные последовательности генов и их промоторов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы кукурузы. Последовательности были получены из базы данных GenBank: ген *sdh3-1* (LOC100283351), ген *sdh3-2* (LOC100281355) и ген *sdh4* (LOC100280324).

Для анализа нуклеотидного состава промоторов исследуемых генов использовали аннотированные последовательности в базе данных GenBank.

Для анализа нуклеотидной последовательности промоторов исследуемых генов на распределение в них CG-динуклеотидов применяли программное обеспечение MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>).

В качестве праймеров для проведения метилспецифичной полимеразной цепной реакции и оценки степени метилирования промоторов подбирались нуклеотидные последовательности в направлении 5'→3'. Чтобы определить статус конкретного CG-сайта с использованием метилспецифичной ПЦР, нужны, соответственно, 2 варианта прямого праймера, которые отличаются между собой только по CG-сайту (в «неметилированном» (U) варианте цитозин замещен на тимин, а в «метилированном» (M) - цитозин остается цитозином).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное ранее исследование экспрессии генов *sdh3-1*, *sdh3-2* и *sdh4* сукцинатдегидрогеназы позволило выявить неоднородность их экспрессии в разные периоды развития кукурузы. Выявленное изменение интенсивности экспрессии генов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы при прорастании семян кукурузы может свидетельствовать о переключении энергетического метаболизма растительной клетки при переходе к фотосинтетической активности [8].

Дифференциальная экспрессия генов мембраносвязанных субъединиц сукцинатдегидрогеназы может быть обусловлена наличием регулирующих механизмов экспрессии генов. Таким механизмом может быть метилирование промоторов *sdh3* и *sdh4*. Так, для генов *sdh1-1* и *sdh1-2 Arabidopsis thaliana* была обнаружена корреляция между уровнем транскрипции и степенью метилирования промоторов этих генов [9]. Подобные результаты были получены и для генов субъединицы В сукцинатдегидрогеназы и нитратредуктазы [10, 11].

Исследование нуклеотидного состава генов *sdh3-1* и *sdh3-2* кукурузы показало, что оба гена, кодирующих субъединицу С сукцинатдегидрогеназы, имеют невысокую гомологию, которая составляет 45.11%. Анализ результатов понуклеотидного сравнения последовательностей генов *sdh3-1* и *sdh3-2* показал, что они эти гены имеют высокую гомологию только на 3'-конце. Различие в структуре нуклеотидных последовательностей исследуемых генов, вероятно, обуславливает отличие в их регуляции.

Важным моментом исследования, позволяющим оценить возможность регуляции экспрессии исследуемых генов за счет изменения метильного статуса их промоторов, является анализ нуклеотидного состава промоторов генов, кодирующих мембраносвязанные субъединицы сукцинатдегидрогеназы на характер распределения CG-динуклеотидов в их составе (рис. 2, 3

и 4). Показано, что CpG-островки обнаружены только в составе промоторов генов *sdh3-2* и *sdh4*, что обуславливает возможность их регуляции за счет изменение статуса метилирования CG-динуклеотидов в их составе [12, 13]. Эти результаты позволили разработать праймеры для метилспецифичной полимеразной цепной реакции.

Промотор гена *sdh3-1* имеет невысокий уровень содержания CG-динуклеотидов в своем составе. В тех промоторах, где не обнаружены CpG-островки, метилирование не всегда носит закономерный характер со скоростью их экспрессии и, как, правило, носит тканеспецифический характер. Чаще всего активность гена наблюдается при низкой степени метилирования CG-динуклеотидов и, наоборот, высокая степень метилирования приводит в инактивации генов-мишеней [14].

Однако, для промотора гена *sdh3-2* обнаружена иная модель организации. В его составе имеется 2 CpG-островка размером 388 и 285 нуклеотидов. Результаты проведенного анализа позволили разработать праймеры для метилспецифичной полимеразной цепной реакции для оценки метильного статуса исследуемых промоторов.

Для промотора гена *sdh4* также установлено наличие CpG-островка размером 132 нуклеотида. Праймеры для проведения метилспецифичной ПЦР на основе нуклеотидных последовательностей промоторов генов мембраносвязанных субъединиц сук-

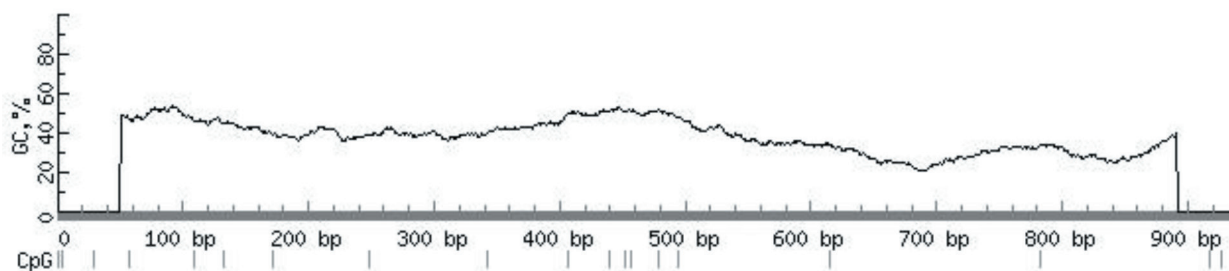


Рис. 2. Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора гена *sdh3-1* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы *Zea mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

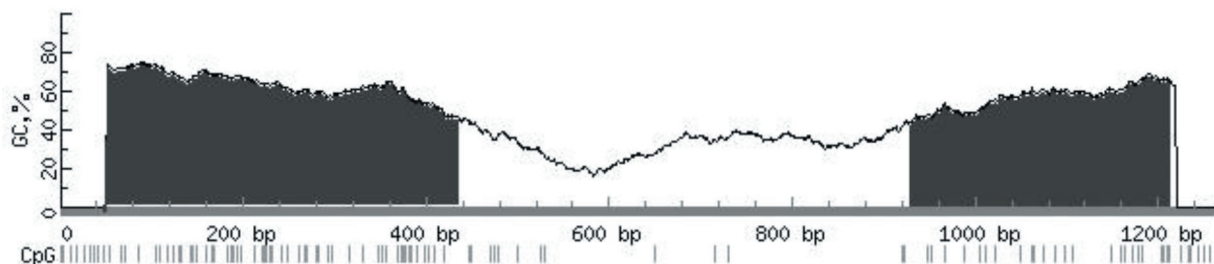


Рис. 3. Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора гена *sdh3-2* субъединицы С сукцинатдегидрогеназы *Zea mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

цинтадегидрогеназы представлены в таблице 1.

Таким образом, метилспецифичная ПЦР позволяет анализировать метильный статус исследуемого цитозина и результат исследования может быть неоднородным, «неметилированный», «метилированный» и «частично метилированный». Праймеры к одному и тому же CG-сайту должны работать в

противофазе – т.е., если «неметилированный» праймер на данном образце срабатывает – «метилированный» на нем молчит, или – наоборот [15]. Но на практике матрица часто может быть смешанной, – поскольку разница по метилированию может быть и в пределах одной клетки – между разными аллелями одного гена, и в пределах одной ткани - между

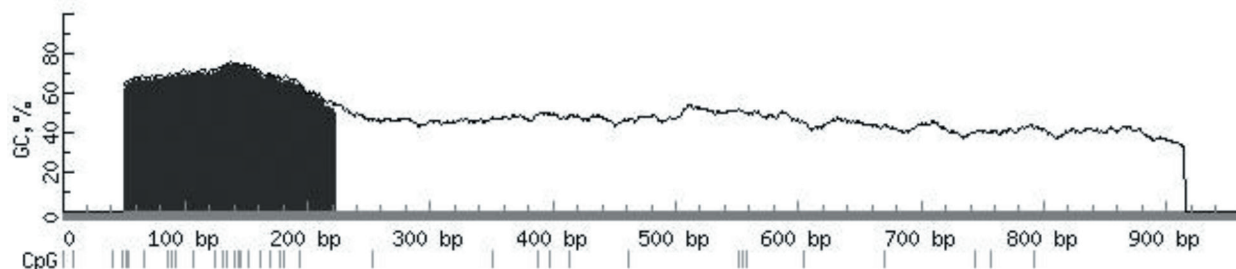


Рис. 4. Анализ CG-динуклеотидов в составе промотора гена *sdh4* субъединицы D сукцинатдегидрогеназы *Zea mays*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

Таблица 1.

Праймеры к генам *sdh3-1*, *sdh3-2* и *sdh4* для метилспецифичной ПЦР

Ген	Положение исследуемого цитозина	Название	Последовательность
<i>sdh3-1</i>	-506 нукл.	прямой М	5'-tattttatgtttttattttgcgg-3'
		обратный М	5'-tcaagggaacgagtatatcctaac-3'
		прямой U	5'-tattttatgtttttattttgtgg-3'
		обратный U	5'-ttaagggaatgagtatatttaaat-3'
	-454 нукл.	прямой М	5'-tataataagggttaagtgaagtcgt-3'
		обратный М	5'-tcaagggaacgagtatatcctaac-3'
		прямой U	5'-tataataagggttaagtgaagttgt-3'
		обратный U	5'-ttaagggaatgagtatatttaaat-3'
	-431 нукл.	прямой М	5'-ttagaggggagggtgaataggcga-3'
		обратный М	5'-tcaagggaacgagtatatcctaac-3'
		прямой U	5'-ttagaggggagggtgaataggta-3'
		обратный U	5'-ttaagggaatgagtatatttaaat-3'
<i>sdh3-2</i>	-225 нукл.	прямой М	5'-atgggccatgtcaaccgggc
		обратный М	5'-acgctcgtacctctatcgac-3'
		прямой U	5'-atgggttatgtaattcgggt-3'
		обратный U	5'-aaaaaacactcatacctctatcaac-3'
	-265 нукл.	прямой М	5'-aagcaaacgtttgtgtcatgcc-3'
		обратный М	5'-acgctcgtacctctatcgac-3'
		прямой U	5'-aagtaaacgtttgtgttatgtt-3'
		обратный U	5'-aaaaaacactcatacctctatcaac-3'
	-280 нукл.	прямой М	5'-aataatctgaagtttatgct-3'
		обратный М	5'-acgctcgtacctctatcgac-3'
		прямой U	5'-aataattgaagtttatgct-3'
		обратный U	5'-aaaaaacactcatacctctatcaac
<i>sdh4</i>	-57 нукл.	прямой М	5'-gatgttttcgctgtatttttc-3'
		обратный М	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
		прямой U	5'-tgttttttgtgtattttttga-3'
		обратный U	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
	-115 нукл.	прямой М	5'-ttttaaagttttattttttcga-3'
		обратный М	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
		прямой U	5'-ttttaaagttttattttttga-3'
		обратный U	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
	-307 нукл.	прямой М	5'-aaattagatttaattaattcgt-3'
		обратный М	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'
		прямой U	5'-aaattagatttaattaatttgt-3'
		обратный U	5'-gtattaggcggtttagagaagg-3'

клетками разных типов, или даже одного типа; и между тканями разного типа в гистологически однородном образце. Поэтому сработать могут оба варианта праймера, и «неметилированный», и «метилированный». Для идентификации результатов, полученных с помощью метода метилспецифичной ПЦР, необходимо проводить электрофоретические исследования результатов амплификации с метилспецифичными праймерами.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J., Su D., Bartlam M., Rao Z. // *Cell*. 2005. Vol. 121. No. 7, pp. 1043-1057.
2. Figueroa P., Leon G., Elorza A., Holuigue L., Araya A., Jordana X. // *Plant Mol. Biol.* 2002. Vol. 50, pp. 725-734.
3. Van Vranken J.G., Na U., Winge D.R., Rutter J. // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2015. Vol. 50. No. 2, pp. 168-180.
4. Lemire B.D., Oyedotun K.S. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2002. Vol. 1553. No. 1, pp. 102-116.
5. Oyedotun K.S., Sit C.S., Lemire B.D. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2007. Vol. 1767. No. 12, pp. 1436-1445.
6. Adams K.L., Rosenblueth M., Qiu Y.L.,

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

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

Palmer J.D. // *Genetics*. 2001. Vol. 158. No. 3, pp. 1289-1300.

7. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ахмад Дж. А., Попов В.Н. // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2010. № 3. С. 324-332.

8. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В. Молекулярные аспекты формирования олигомерной структуры сукцинатдегидрогеназы. Воронеж, Центрально-Черноземное книжное Издательство, 2016. 264 с.

9. 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.

10. Elorza A., Roschztardt H., Gomez I., Mouras A., Holuigue L., Araya A., Jordana X. // *Plant Cell Physiology*. 2006. Vol. 47, pp. 14-21.

11. Escobar M.A., Franklin K.A., Svensson A.S., Salter M.G., Whitlam G.C., Rasmusson A.G. // *Plant Physiology*. 2004. Vol. 136, pp. 2710-2721.

12. 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. // *Epigenetics*. 2011. Vol. 6. No. 3, pp. 344-354.

13. Antequera F., Bird A. // *PNAS USA*. 1993. Vol. 90. No. 24, pp. 11995-11999.

14. Comb M., Goodman H.M. // *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18. No. 13, pp. 3975-3982.

15. Ku J.L., Jeon Y.K., Park J.G. // *Methods Mol Biol*. 2011. Vol. 791, pp. 23-32.

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

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

ANALYSIS OF PROMOTORS OF MEMBRANE- BOUND SUBUNITS OF SUCCINATE DEHYDROGENASE AND DEVELOPMENT OF PRIMERS FOR THE EVALUATION OF METHYLATION STATUS

D. N. Fedorin, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. The study of the mechanisms of membrane-bound subunits of succinate dehydrogenase (SDH) plays an important role in understanding the functioning of not only the tricarboxylic acid cycle, but also the electron transport chain of mitochondria. Expression of the genes of the SDH subunits under study can be regulated by various mechanisms, including the level of DNA methylation status changes. An

analysis of the GenBank nucleotide sequence database showed that two genes encoding the C subunit (sdh3-1 and sdh3-2) and one gene encoding the D (sdh4) succinate dehydrogenase subunit were annotated in the maize genome. These genes are located on different chromosomes, which suggests different mechanisms in the regulation of their expression. Comparison of the genes of the membrane-bound subunit With SDH showed that they have a low level of homology, which is 45.11%. Moreover, the maximum similarity is characteristic of the 3'-region of the sdh3-1 and sdh3-2 genes. For each gene of membrane-bound subunits of succinate dehydrogenase, promoter regions were identified. Using bioinformatics methods, a difference was shown in the distribution of CG-dinucleotides in the composition of the promoters of the genes of subunit C and subunit D of succinate dehydrogenase. A study of the nucleotide composition of the sdh3-1 gene promoter showed the absence of CpG islands in its composition. The absence of the CpG island in the promoter of the sdh3-1 gene indicates that its methylation is not always consistent with the rate of expression and, as a rule, is tissue-specific. However, a different model of their organization was found for promoters of the sdh3-2 and sdh4 genes. The sdh3-2 gene contains 2 CpG islands of 388 and 285 nucleotides in size. For the sdh4 gene promoter, the presence of one CpG island of 132 nucleotides in size was also established. The presence of a CpG island in the composition of the gene promoter determines the possibility of regulation by changing its methylation status. Primers for carrying out methyl-specific PCR are designed based on the nucleotide sequences of the promoters of the genes of membrane-bound subunits of succinate dehydrogenase. Primer sets for individual CG-dinucleotides of gene promoters of membrane-bound succinate dehydrogenase subunits allow their methyl status to be determined under various experimental conditions.

Keywords: succinate dehydrogenase, subunit, gene, promoter, methyl-specific PCR, CpG island

REFERENCES

1. Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J., Su D., Bartlam M., Rao Z., *Cell*, 2005, Vol. 121, No. 7, pp. 1043-1057. DOI: 10.1016/j.cell.2005.05.025
2. Figueroa P., Leon G., Elorza A., Holuigue L., Araya A., Jordana X., *Plant Molecular Biology*, 2002, Vol. 50, pp. 725-734. DOI: 10.1023/a:1019926301981
3. Van Vranken J.G., Na U., Winge D.R., Rutter J., *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2015, Vol. 50, No. 2, pp. 168-180. DOI: 10.3109/10409238.2014.990556
4. Lemire B.D., Oyedotun K.S., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2002, Vol. 1553, No. 1, pp. 102-116. DOI: 10.1016/s0005-2728(01)00229-8
5. Oyedotun K.S., Sit C.S., Lemire B.D., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2007, Vol. 1767, No. 12, pp. 1436-1445. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.09.008
6. Adams K.L., Rosenblueth M., Qiu Y.L., Palmer J.D., *Genetics*, 2001, Vol. 158, No. 3, pp. 1289-1300. PMID: PMC1461739
7. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Akhmad J.A., Popov V.N., *Bulletin biology. Biological Series*, 2010, No. 3, pp. 324-332.
8. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V. Molecular aspects of the formation of the oligomeric structure of succinate dehydrogenase. Voronezh, Central Black Soil Publishing House, 2016, 264 p.
9. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Wu T.L., Makhmud A.S., Popov V.N., *Plant Physiology*, 2012, Vol. 59, pp. 332-340.
10. Elorza A., Roschztardt H., Gomez I., Mouras A., Holuigue L., Araya A., Jordana X., *Plant Cell Physiology*, 2006, Vol. 47, pp. 14-21. DOI: 10.1093/pcp/pci218
11. Escobar M.A., Franklin K.A., Svensson A.S., Salter M.G., Whitelam G.C., Rasmusson A.G., *Plant Physiology*, 2004, Vol. 136, pp. 2710-2721. DOI: 10.1104/pp.104.046698
12. 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., *Epigenetics*, 2011, Vol. 6, No. 3, pp. 344-354. DOI: 10.4161/epi.6.3.14242
13. Antequera F., Bird A., *PNAS USA*, 1993, Vol. 90, No. 24, pp. 11995-11999. DOI: 10.1073/pnas.90.24.11995
14. Comb M., Goodman H.M., *Nucleic Acids Research*, 1990, Vol. 18, No. 13, pp. 3975-3982. DOI: 10.1093/nar/18.13.3975
15. Ku J.L., Jeon Y.K., Park J.G., *Methods Mol Biology*, 2011, Vol. 791, pp. 23-32. DOI: 10.1007/978-1-61779-316-5_3