

СТРУКТУРА ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДИМЕРА СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* И РАЗРАБОТКА МЕТИЛСПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ

Д. Н. Федорин, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 19.01.2021 г.

Аннотация. Функционирование сукцинатдегидрогеназы (СДГ) обеспечивает организацию метаболизма клетки как на уровне регуляции цикла трикарбоновых кислот, но и электрон-транспортной цепи митохондрий. Важное значение в данном процессе играет каталитический димер изучаемого фермента, поскольку он осуществляет окисление сукцината, а электроны направляются в ЭТЦ посредством мембраносвязанных субъединиц. Скорость функционирования сукцинатдегидрогеназы может регулироваться на уровне экспрессии генов, в том числе и на уровне изменения статуса метилирования их промоторов. Анализ базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank показал, что в геноме *Arabidopsis thaliana* аннотировано пять генов, кодирующих субъединицы А и В каталитического димера сукцинатдегидрогеназы. Эти гены расположены в разных хромосомах, что позволяет предположить разные механизмы в регуляции их экспрессии. Изучение нуклеотидного состава промоторных областей анализируемых генов сукцинатдегидрогеназы позволило установить их неоднородность по содержанию и распределению по последовательности цитозина и гуанина. Применение методов биоинформатики показано различие в нуклеотидном составе промоторов генов субъединицы А СДГ, в частности только в промоторе гена *sdh1-2* показано наличие CpG-островка. Кроме того, для промоторов генов субъединицы В СДГ также показано различие в их организации. Для промоторов генов *sdh2-1* и *sdh2-2* установлено наличие одного CpG-островка в каждом из них с размерами 156 и 155 нуклеотидов, соответственно. В составе промотора гена *sdh2-3* островки не определены. Отсутствие CpG-островков в составе промоторов генов *sdh1-1* и *sdh2-3* свидетельствует, что их метилирование не всегда проявляется и характеризуется определенной зависимостью со скоростью их экспрессии. Однако, наличие CpG-островка в составе промотора гена, что характерно для промоторов генов *sdh1-2*, *sdh2-1* и *sdh2-2* указывает на эпигенетический механизм их регуляции путем изменения метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов в их составе. Результаты исследования нуклеотидного состава промоторов исследуемых генов каталитического димера СДГ позволили разработать праймеры для проведения метилспецифичной ПЦР для оценки метильного статуса отдельных CG-динуклеотидов промоторов анализируемых генов сукцинатдегидрогеназы при различных экспериментальных условиях.

Ключевые слова: сукцинатдегидрогеназа, субъединица, промотор, метилирование, CpG-островок, метилспецифичный праймер

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) представляет собой мультифункциональный фермент и по этой причине имеет практически универсальное распространение среди живых организмов. Этот фермент играет ключевую роль в регуляции аэробного дыхания [1]. Кроме того, СДГ является мембраносвязанным ферментом, что обуславливает его полифункциональность – участие в функционировании ЦТК и работе электронтранспортной цепи (комплекс II) [2, 3].

Несмотря на большое количество экспериментального материала по физико-химическим и регуляторным характеристикам сукцинатдегидрогеназы из объектов различного происхождения остаются неизвестными или плохо изученными способы регуляции активности этой ферментной системы в растениях в условиях меняющихся факторов внешней среды.

В последнее время усилился интерес к изучению роли эпигенетических факторов в регуляции экспрессии генов [4]. Данные о влиянии метили-

рования промоторов на инактивацию сукцинатдегидрогеназы человека и животных весьма многочисленны [5, 6].

В эукариотическом геноме встречаются так называемые CpG-островки, в этих участках CG-динуклеотиды расположены особенно часто, размер таких областей не превышает 4000 п.н. [7]. Нуклеотидную последовательность в гене, в которой цитозин и гуанин составляют более 60% всех азотистых оснований, принято называть CpG-островком [8]. В большинстве случаев такие области локализуются на 5'-регуляторных участках генов. То, что эти островки остались в основном в регуляторных областях генов, может быть связано с активностью данных участков и, как следствие, меньшей степенью метилирования, что защитило их от трансформаций в ходе эволюции [9]. Гены, содержащие в составе своих регуляторных участков CpG-островки, могут регулироваться за счет ковалентных модификаций данных областей [10, 11, 4]. Необходимо отметить, что если CpG-островок неметилирован, то это не значит, что ген транскрибируется, скорее это значит то, что отсутствие метилирования является обязательным для транскрипции генов [7, 12, 13]. При этом, работ, посвященных выяснению механизмов эпигенетической регуляции функционирования генов ферментов, обеспечивающих энергетический метаболизм (в том числе и сукцинатдегидрогеназных генов) в растительных организмах, мало. В связи с этим, целью работы было изучение роли изменения степени метилирования генов субъединиц каталитического димера сукцинатдегидрогеназы в регуляции их работы при воздействии стрессовых факторов различной природы на растения арабидопсиса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовали нуклеотидные последовательности генов и их промоторов субъединиц каталитического димера сукцинатдегидрогеназы *Arabidopsis thaliana* L. Последовательности были получены из базы данных GenBank: субъединица А - ген *sdh1-1* (At5g66760) хромосома 5 и *sdh1-2* (At2g18450) хромосома 2, субъединица В – *sdh2-1* (At3g27380) хромосома 3, *sdh2-2* (At5g40650) хромосома 5 и *sdh2-3* (At5g65165) хромосома 5.

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'.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значительную роль в регуляции работы генов СДГ-комплекса может играть эпигенетический механизм, имеющий важное значение при переключении метаболизма растительной клетки. Важным моментом исследования был анализ нуклеотидного состава промоторов генов, кодирующих субъединицы каталитического димера исследуемого фермента, на наличие в их составе CpG-островков.

Для анализа промоторов генов каталитического димера СДГ на наличие CpG-островков и подбора праймеров для метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) использовали программу MethPrimer.

Интересно отметить, что анализ промоторов генов, кодирующих субъединицу А СДГ арабидопсиса, выявил наличие CpG-островка только в промоторе гена *sdh1-2*, тогда как в промоторе гена *sdh1-1* CpG-островка не обнаружено (рис. 1). Сравнительный анализ полученных данных с ранее проведенными исследованиями показал, что аналогичные результаты были получены для промоторов генов субъединиц А и В сукцинатдегидрогеназы кукурузы [14].

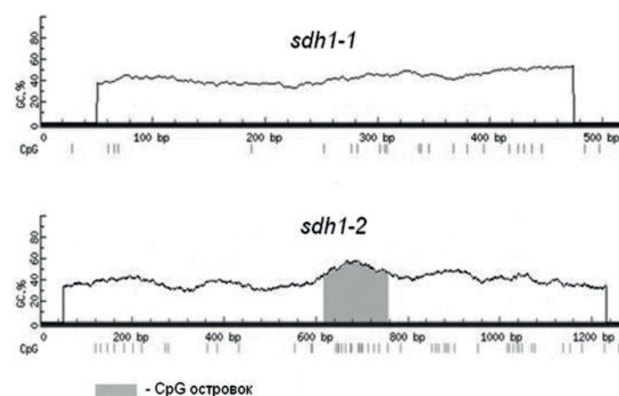


Рис. 1. Анализ CG-динуклеотидов в составе промоторов генов субъединицы А сукцинатдегидрогеназы *A. thaliana*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

Анализ генов *sdh2-1* и *sdh2-2* арабидопсиса показал наличие CpG-островков размером 156 п.н. и 155 п.н., соответственно (рис. 2). В промоторе гена *sdh2-3* CpG-островка не выявлено. Для анализа нуклеотидного состава промоторов генов субъединицы В сукцинатдегидрогеназы использовали известные последовательности, аннотированные в международной базе данных GenBank.

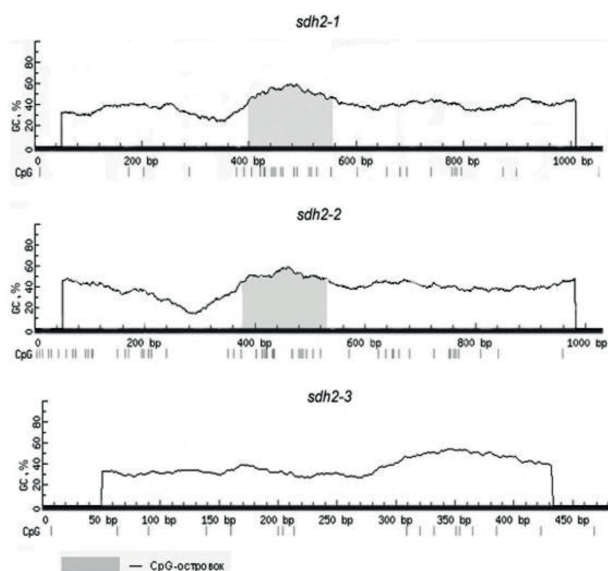


Рис. 2. Анализ CG-динуклеотидов в составе промоторов генов субъединицы В сукцинатдегидрогеназы *A. thaliana*. Вертикальными линиями указаны положения CG-динуклеотидов.

Поскольку CpG-островки обнаружены в составе промоторов генов, кодирующих как субъединицу А, так и субъединицу В, это обуславливает возможность его регуляции за счет изменение статуса метилирования CG-динуклеотидов в их составе. CpG-островки представляют собой короткие фрагменты последовательности ДНК, которые значительно отклоняются от среднего геномного паттерна, будучи GC-богатыми и преимущественно неметилированными. Большинство, а возможно, и все CpG-островки являются сайтами инициации транскрипции, удалены от промоторов. Взаимодействие последовательности ДНК и CpG-островки обеспечивают функции промотора, дестабилизируя нуклеосомы и привлекая белки, которые создают транскрипционно перmissive состояние хроматина. Неактивность промоторов достигается за счет плотного метилирования CpG. Таким образом, CpG-островки обычно способны влиять на локальную структуру хроматина и упрощать регуляцию активности генов [15]. Результаты проведенного исследования

по анализу нуклеотидного состава промоторов исследуемых генов, позволили разработать праймеры для метилспецифичной полимеразной цепной реакции [16, 17].

Для установления метильного статуса конкретного CG-сайта по 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) [18, 19].

В идеале, на однородной матрице, «неметилированный», и «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 [20]. 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 клетками разных типов, или даже одного типа; и между тканями разного типа в гистологически неоднородном образце. Поэтому сработать могут оба варианта праймера, и «неметилированный», и «метилированный». Поэтому следующим этапом нашей работы была разработка праймеров для метилспецифичной ПЦР (табл. 1).

Численные расчеты степени метилирования отдельных CG-динуклеотидов производится на основе анализа результатов МС-ПЦР по электрофореграммам ампликонов. Значения степени метилирования промотора являются суммарным показателем результатов ПЦР анализа исследуемых CG-динуклеотидов в промоторе конкретного гена: 0% метилирования – все три исследуемых CG-динуклеотида неметилированные; 25% частично метилирован 1 или 2 CG-динуклеотида; 50% метилированы 1 или 2 CG-динуклеотида; 75% 1 или 2 CG-динуклеотида частично метилированные, а остальные полностью метилированные; 100% все три CG-динуклеотида метилированные [21].

Работа выполнена при финансовой 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. Попов В.Н., Федорин Д.Н., Епринцев А.Т. // Физиология растений. 2007. №3. С. 409-415.
2. Федорин Д.Н., Карабутова Л.А., Покусина Т.А., Епринцев А.Т. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. С. 280-285.

Таблица 1.

Олигонуклеотиды к промоторам генов каталитического димера сукцинатдегидрогеназы *A. thaliana* для проведения метилспецифичной ПЦР

ген	название	последовательность	
<i>sdh1-1</i>	I	прямой М	5'-TATCGAAGAAATTGATTCGT-3'
		обратный М	5'-TAAAAAAACGAAATCCAA-3'
		прямой U	5'-TATTGAAGAAATTGATTTGT-3'
		обратный U	5'-TAAAAAAACAAAATCCAA-3'
	II	прямой М	5'-CTCTCATTCTTCTACGG-3'
		обратный М	5'-TAAAAAAACGAAATCCAA-3'
		прямой U	5'-TTTTTATTTTTTTTATGG-3'
		обратный U	5'-TAAAAAAACAAAATCCAA-3'
	III	прямой М	5'-GCTATCTCTCACTCCCGT-3'
		обратный М	5'-TAAAAAAACGAAATCCAA-3'
		прямой U	5'-GTTATTTTTTATTTTTGT-3'
		обратный U	5'-TAAAAAAACAAAATCCAA-3'
<i>sdh1-2</i>	I	прямой М	5'-TATCGAAGAAATTGATTCGT-3'
		обратный М	5'-TAAAAAAACGAAATCCAA-3'
		прямой U	5'-TATTGAAGAAATTGATTTGT-3'
		обратный U	5'-TAAAAAAACAAAATCCAA-3'
	II	прямой М	5'-GATATACCTTTTGCCGG-3'
		обратный М	5'-ATAGCAATTTTCTCAGT-3'
		прямой U	5'-GATATATTTTTTGTGG-3'
		обратный U	5'-ATAACAATTTTCTCTAT-3'
	III	прямой М	5'-GCTATCTCTCACTCCCGT-3'
		обратный М	5'-TAAAAAAACGAAATCCAA-3'
		прямой U	5'-GTTATTTTTTATTTTTGT-3'
		обратный U	5'-TAAAAAAACAAAATCCAA-3'
<i>sdh2-1</i>	прямой М	5'-AATCGTCGAAATTAGTTACGGC-3'	
	обратный М	5'-CAACCAAATCCTTAATCACAAAC-3'	
	прямой U	5'-AATTGTTGAAATTAGTTATGGTGG-3';	
	обратный U	5'-CAACCAAATCCTTAATCACAAAC-3'	
<i>sdh2-2</i>	прямой М	5'-ATTATTACGATTATTACGGCGG-3'	
	обратный М	5'-TATCCACAACCAAATCCTTAATC-3'	
	прямой U	5'-TAAATATTATGATTATTATGGTGG-3'	
	обратный U	5'-TATCCACAACCAAATCCTTAATC-3'	
<i>sdh2-3</i>	прямой М	5'-TTTTATACGATCGAGTTAGTACG-3'	
	обратный М	5'-AAAATATCTTTAAATAAATCTTAAACC-3'	
	прямой U	5'-TTTTTTTATATGATTGAGTTAGTATG-3'	
	обратный U	5'-AAAATATCTTTAAATAAATCTTAAACC-3'	

3. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N. // Plant Cell Environ. 2014. Vol. 37. pp. 290-299.

4. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ву Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н. // Физиология растений. 2012. № 3. С. 332-340.

5. Astuti D., Douglas F., Lennard T.W., Aligianis I.A., Woodward E.R., Evans D.G., Eng C., Latif F., Maher E.R. // Lancet. 2001. Vol. 357. pp. 1181-1182.

6. Cervera A.M., Bayley J.P., Devilee P., McCreath K.J. // Molecular Cancer. 2009. Vol. 8. pp. 89-96.

7. Law J.A., Jacobsen S.E. // Nature Reviews Genetics. 2010. Vol. 11. pp. 204-220.

8. Leonhardt H., Page A.W., Weier H.U., Bestor T.H. // Cell. 1992. Vol. 71. pp. 865-873.

9. Antequera F., Bird A. // PNAS. 1993. Vol. 90. pp. 11995-11999.

10. Finnegan E.J., Genger R.K., Peacock W.J., Dennis E.S. // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1998. Vol. 49. pp. 223-247.

11. Vanyushin B.F. // Current Topics in Microbiology and Immunology. 2006. Vol. 301. pp. 67-122.

12. Pfluger J., Wagner D. // Current Opinion in Plant Biology. 2007. Vol. 10. pp. 645-652.

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

14. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U. // Journal of Plant Physiology. 2016. Vol. 205. pp. 33-40.

15. Deaton A.M., Bird A. // Genes Dev. 2011. Vol. 25. pp. 1010-1022.

16. Licchesi J.D.F., Herman J.G. // Methods Mol. Biol. 2009. Vol. 507. pp. 305-323.

Федорин Д. Н., Епринцев А. Т.

17. Galm O., Herman J.G. // *Methods Mol. Med.* 2005. Vol. 113. pp. 279-291.

18. Li L.C., Dahiya R. // *Bioinformatics.* 2002. Vol. 18. pp. 1427-1431.

19. Davidovic R.S., Bozovic A.M., Mandusic V.Lj., Krajnovic M.M. // 2014. *Central European Journal of Biology.* Vol. 9. pp. 1127–1139.

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

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

Воронежский государственный университет
Федорин Д. Н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки

E-mail: rybolov@mail.ru

Voronezh State University
Fedorin D. N., PhD., Associate Professor, dept. of biochemistry and cell physiology

E-mail: rybolov@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

STRUCTURE OF GENES PROMOTORS OF THE CATALYTIC DIMER SUCCINATE DEHYDROGENASE OF ARABIDOPSIS THALIANA AND DEVELOPMENT OF METHYL-SPECIFIC PRIMERS

A. T. Eprintsev, D. N. Fedorin

Voronezh State University

Abstract. The functioning of succinate dehydrogenase (SDH) ensures the organization of cell metabolism both at the level of regulation of the tricarboxylic acid cycle, but also at the mitochondrial electron transport chain. The catalytic dimer of the studied enzyme plays an important role in this process, since it oxidizes succinate, and electrons are directed to the ETC through membrane-bound subunits. The rate of functioning of succinate dehydrogenase can be regulated at the level of gene expression, including at the level of changes in the methylation status of their promoters. Analysis of the GenBank nucleotide sequence database showed that five genes encoding subunits A and B of the catalytic dimer of succinate dehydrogenase are annotated in the *Arabidopsis thaliana* genome. These genes are located on different chromosomes, which suggests different mechanisms in the regulation of their expression. The study of the nucleotide composition of the promoter regions of the analyzed succinate dehydrogenase genes made it possible to establish their heterogeneity in the content and distribution of cytosine and guanine over the sequence. The use of bioinformatics methods showed the difference in the nucleotide composition of the promoters of the genes of the subunit A of SDH, in particular, only in the promoter of the *sdh1-2* gene showed the presence of a CpG-island. In addition, for the promoters of genes of subunit B of SDH, a difference in their organization was also shown. For the promoters of the *sdh2-1* and *sdh2-2* genes, the presence of one CpG-island in each of them with sizes of 156 and 155 nucleotides, respectively, was established. Islets were not identified in the *sdh2-3* promoter. The absence of CpG-islands in the promoters of the *sdh1-1* and *sdh2-3* genes indicates that their methylation is not always manifested and is characterized by a certain dependence on the rate of their expression. However, the presence of a CpG-island in the gene promoter, which is characteristic of the *sdh1-2*, *sdh2-1*, and *sdh2-2* gene promoters, indicates an epigenetic mechanism of their regulation by changing the methyl status of individual CG dinucleotides in their composition. The results of studying the nucleotide composition of the promoters of the studied genes of the catalytic dimer SDH made it possible to develop primers for methyl-specific PCR to assess the methyl status of individual CG dinucleotides of the promoters of the analyzed succinate dehydrogenase genes under various experimental conditions.

Keywords: succinate dehydrogenase, subunit, promoter, methylation, CpG-island, methyl-specific primer

REFERENCES

1. Popov V.N., Fedorin D.N., Eprintsev A.T., *Plant physiology*, 2007, Vol. 54, pp. 409-415.
2. Fedorin D.N., Karabutova L.A., Pokusina T.A., Eprintsev A.T., *Sorption and chromatographic processes*, 2016, Vol. 16, pp. 280-285.
3. Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Popov V.N. // *Plant Cell Environ.* 2014. Vol. 37. pp. 290-299. DOI: 10.1111/pce.12155
4. 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.
5. Astuti D., Douglas F., Lennard T.W., Aligianis I.A., Woodward E.R., Evans D.G., Eng C., Latif F., Maher E.R., *Lancet*, 2001, Vol. 357, pp. 1181–1182. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04378-6.
6. Cervera A.M., Bayley J.P., Devilee P., McCreath K.J., *Molecular Cancer*, 2009, Vol. 8, pp. 89-96. DOI: 10.1186/1476-4598-8-89
7. Law J.A., Jacobsen S.E., *Nature Reviews Genetics*, 2010, Vol. 11, pp. 204–220. DOI: 10.1038/nrg2719
8. Leonhardt H., Page A.W., Weier H.U., Bestor T.H., *Cell*, 1992, Vol. 71, pp. 865–873. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90561-P
9. Antequera F., Bird A., *PNAS USA*, 1993, Vol. 90, No. 24, pp. 11995-11999. DOI: 10.1073/pnas.90.24.11995
10. Finnegan E.J., Genger R.K., Peacock W.J., Dennis E.S., *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, Vol. 49, pp. 223–247. DOI: 10.1007/s11738-001-0060-7
11. Vanyushin B.F., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2006, Vol. 301, pp. 67-122. DOI: 10.1007/3-540-31390-7_4
12. Pfluger J., Wagner D., *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, Vol. 10. pp. 645–652. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.07.013.
13. Comb M., Goodman H.M., *Nucleic Acids Research*, 1990, Vol. 18, No. 13, pp. 3975-3982. DOI: 10.1093/nar/18.13.3975
14. Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Igamberdiev A.U., *Journal of Plant Physiology*, 2016, Vol. 205, pp. 33–40. DOI: 10.1016/j.jplph.2016.08.008
15. Deaton A.M., Bird A., *Genes Dev*, 2011, Vol. 25, pp. 1010–1022. DOI: 10.1101/gad.2037511.
16. Licchesi J.D.F., Herman J.G., *Methods Mol. Biol*, 2009, Vol. 507, pp. 305-23. DOI: 10.1007/978-1-59745-522-0_22.
17. Galm O., Herman J.G., *Methods Mol. Med.*, 2005, Vol. 113. pp. 279-291. DOI: 10.1385/1-59259-916-8:279.
18. Li L.C., Dahiya R., *Bioinformatics*, 2002, Vol. 18, pp. 1427-1431. DOI: 10.1093/bioinformatics/18.11.1427.
19. Davidovic R.S., Bozovic A.M., Mandusic V.Lj., Krajnovic M.M. // 2014. *Central European Journal of Biology*. Vol. 9. pp. 1127–1139. DOI: 10.2478/s11535-014-0324-z.
20. 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
21. 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.