

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ *DHAD1* И *DHAD2* В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.*) ПРИ ГИПОКСИИ**Г. Б. Анохина, Е. Л. Автореева, А. Т. Епринцев**

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 10.09 2021г.

Аннотация. Растения - организмы, в жизнедеятельности которых кислород играет значительную, ключевую роль. Гипоксический стресс возникает в тот момент, когда концентрация кислорода в среде произрастания растительного организма существенно снижается в результате чрезмерного выпадения осадков или же переувлажнения почвы вследствие разлива водоёмов. Переувлажнение приводит к снижению уровня кислорода в корневой зоне растений из-за низкой скорости диффузии молекулярного кислорода в воде. Последствия гипоксии, такие как снижение энергетического заряда клеток, снижение рН цитоплазмы и накопление токсичных конечных продуктов анаэробного дыхания и активных форм кислорода (АФК) во время восстановления, ответственны за наблюдаемое снижение роста и урожайности многих важных сельскохозяйственных культур. У растений, подвергшихся гипоксии, происходят резкие метаболические изменения. Защитные механизмы вынуждены справляться с потенциальным повреждением. За время эволюционных преобразований растительный организм выработал множество приспособлений, обеспечивающих защиту от гипоксического стресса, одним из которых является перестройка метаболических путей посредством изменения энзиматической активности.

Метаболизм оксидитрата (гидроксицитрат, ОЦ) до недавнего времени практически не изучался. ОЦ способен регулировать углеводный и липидный обмен, что было показано на животных объектах. Гидроксицитрат является сильным ингибитором АТФ-цитратлиазы, который может иметь важное значение для подавления биосинтеза липидов.

В ходе работы нами исследована динамика активности дегидратазы дигидроксикислот при гипоксии в зеленых листьях кукурузы (*Zea mays L.*).

Установлено, что низкие концентрации кислорода вызывают первичное ингибирование ферментативной активности дегидратазы дигидроксикислот, которое в дальнейшем сменяется активацией. С помощью метода ПЦР - Real time исследована транскрипционная активность генов, кодирующих дегидратазу дигидроксикислот кукурузы: *dhad-1* и *dhad-2*.

Показано, что экспрессия гена *dhad-1* в первые часы инкубации растений в гипоксической среде вызывает снижение транскрипционной активности гена, но к 12 часу достигает максимальной величины. Гипоксия также стимулирует работу гена *dhad-2*, однако увеличение относительного уровня транскриптов было незначительным.

Ключевые слова: дегидратаза дигидроксикислот, кукуруза, *Zea mays L.*, зеленые листья, гипоксия, ПЦР, гены, экспрессия

Дегидратаза дигидроксикислот, названная Землянухиным с соавт. [1] оксидитратдегидратазой декарбоксилирующей (ОД, КФ 4.2.1.9.) - фермент класса лиаз, который принимает участие в биосинтезе аминокислот, имеющих короткие разветвленные цепи, такие как лейцин, валин и изолейцин. Энзим участвует в превращении 2,3-дигидрокси-3-метилбутаноат в 3-метил-2-оксобутаноат, а так-

же, ко всему прочему выполняющий взаимопревращение гидроксицитрата в 2-оксоглутарат [2-4]. Реакция образования 3-метил-2-оксобутаноата была широко изучена в отношении метаболизма аминокислот, где она представляет собой этап биосинтетического пути, образующего аминокислоты, имеющие короткие разветвленные боковые цепи: валин, лейцин и изолейцин, а также биосинтез пантотената, приводящий к образованию кофермента А [5-7]. Реакция превращения (дегидрата-

ции) 2,3-дигидрокси-3-метилвалерата в 2-кето-3-метилвалерат, катализируемая тем же ферментом, представляет собой другую ветвь биосинтеза валина, лейцина и изолейцина [8, 9].

Метаболизм оксидитрата (гидроксидитрата, ОЦ) до недавнего времени практически не изучался. ОЦ способен регулировать углеводный и липидный обмен, что было показано на животных объектах [10, 11]. Гидроксидитрат является сильным ингибитором АТФ-цитратлиазы, который может иметь важное значение для подавления биосинтеза липидов [12].

В геноме кукурузы в настоящий момент аннотированы два гена - *dhad-1* и *dhad-2*, кодирующие хлоропластную форму фермента. Ген *dhad-1* (LOC100273676, Gene ID: 100273676) локализован в 1 хромосоме и включает в свой состав 14 экзонов. Полипептид, состоящий из 591 азотистого основания и имеющий молекулярную массу 63,3 Да, локализован в хлоропластах, имеет в активном центре 4 железо-серных кластера [13].

Ген *dhad-2* (LOC100384514, Gene ID: 100384514), кодирующий также хлоропластную форму фермента, локализован в 4 хромосоме и включает в свой состав 15 экзонов. Полипептид, кодируемый данным геном, также имеет 4 железо-серных кластера [13].

Целью работы являлось исследование влияния низких концентраций кислорода на транскрипцию генов *dhad-1* и *dhad-2* в зеленых листьях кукурузы.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались семена кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным способом при 10 часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м². Температура выращивания составляла 25°С.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Выделение хлоропластной фракции. Для получения ферментного препарата навеску листьев кукурузы растирали со средой выделения: 50 мМ трис-НСl (рН 8.0), 0.3 М сахарозы, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и свежеприготовленный 0.2% бычий сывороточный альбумин. Гомогенат фильтровали через фильтр с нейлоновой сеткой 100 (Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали при 1000g в течение 7 мин при 4°С. Супернатант отбрасывали, осадок осторожно ресуспендировали в 7 мл буфера для экстракции и снова центрифугировали. После центрифугирования супернатант удаляли, осадок пластид собирали и ресуспендировали в 1 мл буфера для

экстракции. Полученную фракцию хлоропластов использовали для определения активности ОД. Все операции проводили при температуре +4°С [14].

Определение активности дегидратазы дигидроксикислот. Активность дегидратазы дигидроксикислот в зеленых листьях кукурузы определяли спектрофотометрическим методом путём измерения оптической плотности раствора, содержащего 1 мМ оксидитрата, 0.4 мМ НАДН, 50 мМ хлорида аммония, 1 мМ ДТТ, 0.2 Е фермента ГДГ, 100 мМ Tris-НСl буфер рН 8.0. Температура окружающей среды составляла 25°С. Расчёт активности дегидратазы дигидроксикислот проводился по падению оптической плотности среды спектрофотометрирования при 340 нм [1].

Постановка эксперимента по действию гипоксии на растительный организм. До начала эксперимента проростки кукурузы инкубировались в темноте в течение суток. Растения, с предварительно удалённой корневой системой, делили на 2 группы. Контрольная группа помещалась в вакуум-эксикатор объёмом 5 литров, куда непрерывно осуществлялся приток воздуха. Растения из опытной группы №2 инкубировались в вакуум-эксикаторе, куда в течение суток подавался азот из коммерческого баллона. Исходя из этого, можно утверждать, что условия инкубации являлись гипоксическими [15].

Выделение РНК. Выделение тотальной РНК из растительных образцов осуществляли методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [16]. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV ("Евроген", Россия) согласно инструкции производителя. Подбор праймеров осуществлялся на основе нуклеотидных последовательностей, представленных в международной базе GeneBank, с помощью программы Primer-BLAST (табл.1.). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием специфичных праймеров на приборе LightCycler96 (Roche, Швеция), используя SybrGreen I в качестве красителя. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации ef-1α с ген-специфичными праймерами [17]. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали с применением 2^{-ΔΔCt}-метода [18].

Опыты проводили в 3-4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Предварительная оценка характера распределения проводилась по асимметрии и эксцессу (Excel, Microsoft Office), а также с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Полученные значения позволили

оценить характер распределения как нормальный. Критерий Стьюдента использовался с применением поправки Бонферрони на множественные сравнения [19]. Дополнительно применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, который показал, что исследуемый в работе фактор действительно оказывал влияние (влияние фактора достоверно при $p < 0.05$)[20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Исследовано влияние гипоксии на функционирование дегидратазы дигидроксикислот. Установлено, что низкие концентрации кислорода вызывают первичное ингибирование ферментативной активности, которое на третий час инкубации в гипоксических условиях сменяется активацией. Отмечено, что максимум общей ферментативной активности дегидратазы дигидроксикислот в листьях кукурузы отмечался на 6 час инкубации и превышает контрольные значения более чем в 6.5 раз (рис. 1).

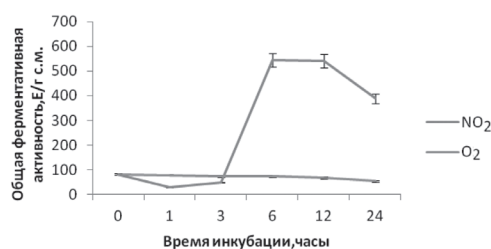


Рис. 1. Изменения общей ферментативной активности дегидратазы дигидроксикислот в условиях действия гипоксии в листьях кукурузы.

Исследование транскрипционной активности генов *dhad-1* и *dhad-2*, кодирующих дегидратазу дигидроксикислот кукурузы при действии гипоксии, показало, что гипоксия стимулирует увеличение активности обоих генов (рис. 2).

Установлено, что экспрессия гена *dhad-1* в первые часы инкубации растений в гипоксической среде вызывает снижение транскрипционной активности гена в 0.5 раз, однако к третьему часу эксперимента относительный уровень транскриптов исследуемого гена выше контроля в 1.5 раз, а к 12 часу достигает максимума. К 24 часу эксперимента концентрация мРНК в образцах, полученных из растений, находящихся в течение всего времени эксперимента в условиях низких концентраций кислорода, снизи-

лась, однако всё равно была выше значений, зарегистрированных в контрольной группе растений. Стоит отметить, что изменения относительного уровня транскриптов гена *dhad-1* в контрольной группе растений оставались на постоянном уровне.

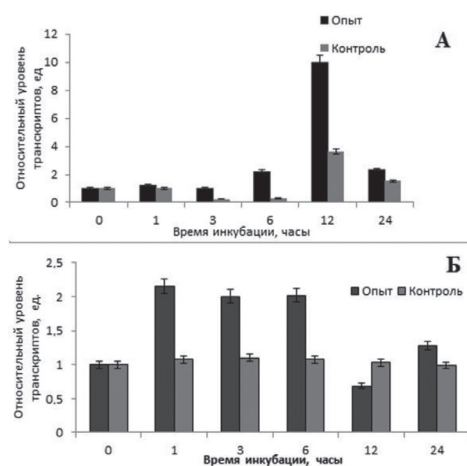


Рис. 2. Изменения относительного уровня транскриптов генов *dhad-1*(а) и *dhad-2*(б) кукурузы в условиях действия гипоксии. Черные столбцы- опытная группа, серые столбцы-контрольная группа.

Исследование относительного уровня транскриптов гена *dhad-2* показало, что гипоксия также стимулирует работу гена, однако увеличение относительного уровня транскриптов не так велико (максимум на 1 час инкубации, увеличение более чем в 2 раза) (Рис 2б). На 12 час эксперимента в опытной группе растений наблюдался спад концентрации мРНК исследуемого гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами было установлено, что низкие концентрации кислорода вызывают первичное ингибирование ферментативной активности дегидратазы дигидроксикислот, которое в дальнейшем при инкубации в гипоксических условиях сменяется активацией.

Установлено, что экспрессия гена *dhad-1* в первые часы инкубации растений в гипоксической среде вызывает снижение транскрипционной активности гена в 0.5 раз, но при этом к третьему часу эксперимента значение относительного уровня транскриптов исследуемого гена выше контро-

Таблица 1.

Праймеры к генам дегидратазы дигидроксикислот для проведения ПЦР в реальном времени

Название	Последовательность олигонуклеотидов	Размер продукта, п.н.	$t_{отжиг}$, °C	
dhad-1	Прямой	AAGACGGAGGAAATGGACCC	223	60
	Обратный	TGCCACATGCAAAACCGAAC		
dhad-2	Прямой	TATGCCCTGAAGCACAGGAA	290	61
	Обратный	CCTGGCAAACAGCCTTTGAT		

ля в 1.5 раз, и к 12 часу достигает максимальной величины. Гипоксия также стимулирует работу гена *dhad-2*, однако увеличение относительного уровня транскриптов было незначительным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Метаболизм органических кислот растений. Воронеж, 1995. 152 с.
2. Землянухин Л.А., Землянухин А.А. // Физиология растений. 1996. Т. 43. №4. С. 124-126.
3. Солдатенков С.В., Щипарёв С.М. // Вестн. Ленингр. ун-та. 1970. № 9. С. 155–159.
4. Щипарёв С.М., Сазанова К.В., Григорьев С.В. // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2013. Вып.2. С. 41.
5. Kanamori M., Wixom R.L. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 998–1005. PMID: 13962154;
6. Kochevenko A., Fernie A.R. // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 3895–3906.
7. Lu J., Brigham C.J., Plassmeier J.K., Sinskey A.J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99, P. 761–774.
8. Oliver J.D., Kaye S.J., Tuckwell D., Johns A.E., Macdonald D.A., Livermore J., Warn P.A., Birch M., Bromley M.J. // PloS One. 2012. V. 7, e43559.
9. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с англ. М.: Мир. 1997, 624 с.
10. Jena B.S., Jayaprakash G.K., Singh R.P.,

Воронежский государственный университет
Анохина Г. Б., аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки

E-mail: dowi2009@mail.ru

Авторева Е. Л. Студент кафедры биохимии и физиологии клетки

Епринцев А. Т., профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки

E-mail: bc366@bio.vsu.ru

Sakariah K.K. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50, P. 10–22.

11. Stallings W.C., Blount J.F., Srere P.A., Glusker J.P. // Arch. Biochem. Biophys. 1979. V. 193. P. 431–448.

12. Балнокин Ю.В. Растения в условиях стресса // Физиология растений под ред. Ермакова И.П. / М: Издательский центр «Академия». 2005. С. 640.

13. Анохина Г.Б., Авторева Е.Л., Вахрушева А.А. // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. ВГУ. 2021. №23. С.23-28.

14. Grabsztunowicz, M., Jackowski, G. // Acta Soc. Bot. Pol. 2013. V. 82. P. 91–95.

15. Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M. // Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1996. V. 47. P. 569-593

16. Chomeczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.

17. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. V. 25. P. 402-408.

18. Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 2907-2914.

19. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990, 351с.

20. Чернышев Г.А., Стариков В.Н. Вероятность и статистика в биологии и химии // Воронеж: Изд-во ВГУ, 1998.

Voronezh State University
Анохина Г. Б., post-graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology

E-mail: dowi2009@mail.ru

Avtoreeva E. L., Student of Biochemistry and Cell Physiology Department

Eprintsev A. T., PhD., DSci., Full Professor, head of the Biochemistry and Cell Physiology Department

E-mail: bc366@bio.vsu.ru

CHANGES IN TRANSCRIPTION OF *DHAD1* AND *DHAD2* IN GREEN LEAVES OF CORN (*ZEA MAYS* L.) UNDER HYPOXIA

G. B. Anokhina, E. L. Avtoreeva, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. Plants are organisms in whose vital activity oxygen plays a significant, key role. Hypoxic stress occurs when the oxygen concentration in the growing environment of the plant organism is significantly reduced as a result of excessive precipitation or waterlogging of the soil due to the flooding of water bodies. Waterlogging leads to a decrease in the oxygen level in the root zone of plants due to the low diffusion rate

of molecular oxygen in water. The consequences of hypoxia, such as a decrease in the energy charge of cells, a decrease in cytoplasmic pH, and the accumulation of toxic end products of anaerobic respiration and reactive oxygen species (ROS) during recovery, are responsible for the observed decrease in the growth and yield of many important crops. Plants subjected to hypoxia undergo drastic metabolic changes. Defense mechanisms are forced to cope with potential damage. During evolutionary transformations, the plant organism has developed many adaptations that provide protection against hypoxic stress, one of which is the restructuring of metabolic pathways by changing enzymatic activity. The metabolism of hydroxycitrate (HC) has not been practically studied until recently. HC is able to regulate carbohydrate and lipid metabolism, which has been shown in animal objects. Hydroxycitrate is a potent inhibitor of ATP citrate lyase, which may be important in inhibiting lipid biosynthesis. In the course of this work, we investigated the dynamics of the activity of dihydroxyacid dehydratase during hypoxia in green leaves of maize (*Zea mays* L.). It was found that low oxygen concentrations cause primary inhibition of the enzymatic activity dehydratase of dihydroxyacid, which is subsequently replaced by activation. The transcriptional activity of genes encoding maize dihydroxyacid dehydratase: *dhad-1* and *dhad-2* was studied using the PCR - real time method. It was shown that the expression of the *dhad-1* in the first hours of incubation of plants in a hypoxic environment causes a decrease in the transcriptional activity of the gene, but reaches its maximum value by 12 hours. Hypoxia also stimulates the *dhad-2*, but the increase in the relative level of transcripts was insignificant.

Keywords: dihydroxyacid dehydratase, corn, *Zea mays* L., green leaves, hypoxia, PCR, genes, expression

REFERENCES

- Zemlyanukhin A.A., Zemlyanukhin L.A. Metabolism of organic acids in plants. Voronezh, 1995, p. 152.
- Zemlyanukhin L.A., Zemlyanukhin A.A. Plant Physiology, 1996, V. 43, No. 4, pp. 124-126.
- Soldatenkov S.V., Shchiparev S.M., Vestn. Leningrad. un-that., 1970, No. 9, pp. 155–159.
- Shchiparev S.M., Sazanova K.V., Grigoriev S.V., Bulletin of St. Petersburg State University, Ser. 3, 2013, Issue 2, p.41.
- Kanamori M., Wixom R.L., J. Biol. Chem., 1963, V. 238, pp. 998–1005. PMID: 13962154
- Kochevenko A., Fernie A.R., J. Exp. Bot., 2011, V. 62, P. 3895–3906. <https://doi.org/10.1093/jxb/err09>.
- Lu J., Brigham C.J., Plassmeier J.K., Sinskey A.J., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2015, V. 99, pp. 761–774.
- Oliver J.D., Kaye S.J., Tuckwell D., Johns A.E., Macdonald D.A., Livermore J., Warn P.A., Birch M., Bromley M.J., PloS One, 2012, V. 7, e43559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043559>
- Gennis R. Biomembranes: Molecular structure and functions: Per. from English M.: Mir. 1997. P. 624.
- Jena B.S., Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K., J. Agric. Food Chem., 2002, V. 50, pp. 10–22. <https://doi.org/10.1021/jf01075>.
- Stallings W.C., Blount J.F., Srere P.A., Glusker J.P. Structural studies of hydroxycitrates and their relevance to certain enzymatic mechanisms, Arch. Biochem. Biophys., 1979, V. 193, pp. 431–448. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90050-X).
- Balnokin Yu.V. Plants under Stress // Plant Physiology, ed. Ermakova I.P. / M: Publishing Center "Academy". 2005. P. 640.
- Anokhina G.B., Avtoreeva E.L., Vakhrusheva A.A., Organization and regulation of physiological and biochemical processes. VSU, 2021, No. 23, pp. 23-28.
- Grabsztunowicz M., Jackowski G., Acta Soc. Bot. Pol., 2013, V. 82, pp. 91-95.
- Lam H.M., Coschigano K.T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M., Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., 1996, V. 47, pp. 569-593.
- Chomczynski P., Sacchi N., Anal. Biochem., 1987, V. 162, P. 156–159.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., Methods, 2001, V. 25, pp. 402-408.
- Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D., J. Exp. Bot., 2005, V. 56, pp. 2907-2914.
- Lakin G.F. Biometrics / G.F. Lakin. M.: Higher. shk., 1990. P. 351.
- Chernyshev G.A., Starikov V.N. Probability and statistics in biology and chemistry, Voronezh: Voronezh State University, 1998.