

РОЛЬ МЕТИЛЬНОГО СТАТУСА ПРОМОТОРА ГЕНА SSADH1 В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СУКЦИНАТСЕМИАЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ (*ZEA MAYS L.*) ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

Г. Б. Анохина, З. Н. Шахов, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 22.06.2022 г.

Аннотация. Солевой стресс – один из наиболее актуальных для изучения стрессовых факторов растений, т.к. согласно прогнозам, к 2050 году будет потеряна половина доступных земель для сельского хозяйства. Чтобы избежать значительных потерь в будущем, необходимо уже сейчас активно двигаться в направлении поиска ключевых регуляторов адаптации к стрессовым условиям, исследовать происходящие изменения на молекулярном уровне. Одним из таких регуляторов является дегидрогеназа сукцинилового семиальдегида (КФ 1.2.1.16), осуществляющая превращение янтарного полуальдегида в сукцинат и являющаяся одним из ферментов ГАМК-шунта, обходного пути ЦТК, активизирующегося при солевом стрессе. В связи с тем, что нарушение работы данного фермента приводит к неспособности растения нейтрализовать активные формы кислорода, которые дестабилизируют процессы жизнеобеспечения клетки, что приводит к задержкам в росте, некрозу и прочим существенным патологиям развития, изучение экспрессии гена ССАДГ поможет, во-первых, определить долю вклада работы фермента в общий процесс противодействия клетки солевому стрессу, во-вторых, знание динамики работы ГАМК-шунта необходимо для возможного дальнейшего создания устойчивых генно-модифицированных культур.

Метилирование ДНК – распространенный среди всех живых организмов способ регуляции жизнедеятельности посредством эпигенетической модификации на молекулярном уровне, помимо растений он обнаружен у животных и грибов и играет важную роль в регуляции генов, программировании этапов развития организма, ответной реакции на абиотический и биотический стрессы, в том числе на солевой стресс.

Установлено, что ключевая роль в адаптивной реакции клетки при ответе на действие солевого стресса принадлежит гену *SSADH1* сукцинилового полуальдегид дегидрогеназы. Проведен анализ промоторных областей генов *SSADH1* и *SSADH2* исследуемого фермента на наличие CpG-островков. Показано, что регуляция работы данного гена в листьях кукурузы при солевом стрессе осуществляется посредством изменения степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в составе промотора гена *SSADH1* сукцинилового полуальдегид дегидрогеназы.

Ключевые слова: солевой стресс, метилирование, ГАМК-шунт, семиальдегиддегидрогеназа, растения

Известно, что у *Zea mays L.* засоление снижает рост побегов [1] за счет подавления зарождения и разрастания листьев [2, 3], а также роста междоузлий и ускорения опадания листьев [4]. Кроме того, солевой стресс снижает скорость роста листовых пластинок [5], способен привести к повреждению

мембран растительных клеток [6], способствует денатурации белков, накоплению окисляющих веществ [7], инактивации ферментов и снижению интенсивности фотосинтеза [8].

Шунт γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) — это метаболический путь, который обходит две стадии ЦТК и присутствует как у про-, так и у эукариот [9]. У растений он состоит из регулируемой Ca^{+}

кальмодулином системой цитозольного фермента глутаматдекарбоксилазы (ГДК, КФ 4.1.1.15), митохондриального фермента ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т, КФ 2.6.1.19) и дегидрогеназы сукцинилового полуальдегида (сукцинат-семиальдегиддегидрогеназы (ССАДГ, КФ 1.2.1.16) [10]. Активность ГАМК-шунта в растениях быстро усиливается в ответ на различные биотические и абиотические стрессы [11]. Также, шунт γ -аминомасляной кислоты необходим растению для нормального роста [12], поддержания определенного уровня различных метаболитов [13]. Потенциальное накопление ГАМК, вызванное биотическими или абиотическими (гипоксия, засоление, холод, обезвоживание) стрессорами могут вызывать накопление АФК и дальнейшую гибель клетки [14, 15].

В настоящее время в геноме кукурузы обнаружено два гена, кодирующих ССАДГ. Ген *SSADH1* (LOC100284047) локализован в 4 хромосоме и несет в своем составе 24 экзона, кодируя митохондриальную форму фермента [16]. Ген *SSADH2* (LOC100280779) локализован в 5 хромосоме и включает 20 экзонов [17]. Нуклеотидные последовательности идентичны между собой на 83.68%.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали листья 14-дневных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта «Воронежская 76», выращенные гидропонным методом с интенсивностью света 25 Дж/(м²·с) при температуре 25°C и 10-часовом световом дне.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Постановка эксперимента по созданию солевого стресса. Солевой стресс моделировали путем помещения проростков, с предварительно удаленной корневой системой, в 150 мМ солевой раствор NaCl на 24 часа. Контрольная группа не подвергалась солевому стрессу, проростки хранились при -80 °С.

Экстракция суммарной РНК. Суммарная клеточная РНК выделялась методом фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве основного компонента лизирующего буфера додецилсульфата натрия. Для очистки от примесей ДНК проводили осаждение РНК 12 М хлоридом лития [18].

Выделение ДНК. Выделение ДНК осуществлялось путем лизиса растительной ткани в буфере, содержащем: 2% ЦТАБ, 1.4 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 0.1 М Трис-HCl (pH 8.0) [19].

Конверсия ДНК бисульфитом натрия. Конверсия ДНК проводилась в три этапа с использо-

ванием бисульфита натрия в качестве основного модифицирующего агента [20].

Электрофорез нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты и ампликоны разделяли в 1% и 2% агарозном геле (Helicon, Россия), соответственно, содержащем в качестве интеркалирующего красителя бромистый этидий. Электрофорез проводился в горизонтальной электрофоретической камере (Helicon, Россия) в буфере 1xTAE (pH 8.5) при напряжении 70В в течение 40 минут.

Реакция обратной транскрипции для синтеза кДНК. Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия) согласно рекомендациям производителя.

Анализ промоторной области генов на наличие CpG-островков. Анализ промоторов исследуемых генов на наличие CpG-островков осуществляли с помощью онлайн-сервиса MethPrimer.

Проведение полимеразной цепной реакции с метилспецифичными праймерами. Полимеразную цепную реакцию с метил-специфичными праймерами проводили с помощью набора реактивов qPCRmix (Евроген, Россия). Реакция ПЦР проводилась 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, 54°C – 20 с, 72°C – 30 с, и, наконец, 72°C – 4 мин.

ПЦР в реальном времени. Real time – ПЦР проводили на приборе LightCycler96 («Roche», Швеция) с использованием разработанных праймеров, с набором qPCR (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции производителя, применяя SYBR Green I в качестве интеркалирующего красителя.

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 3-4-кратных повторностях, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы STATISTICA 12.0. Для оценки достоверности полученных результатов использовался критерий Стьюдента, так как распределение данных было нормальным. Представленные в работе различия статистически достоверны ($p < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования по влиянию хлорида натрия на экспрессию генов, кодирующих ССАДГ в геноме кукурузы, было установлено, что засоление вызывает дифференциальные изменения в работе обоих генов (Рис 1.).

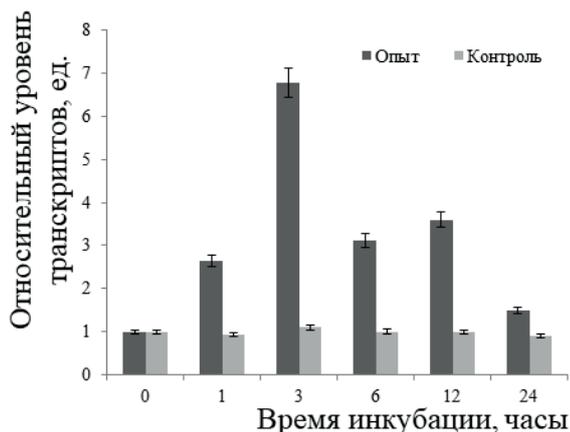


Рис. 1. Изменение относительного уровня транскриптов гена *SSADH1* в листьях кукурузы при действии солевого стресса

Уже в первые часы эксперимента транскрипционная активность гена *SSADH1* увеличивается более чем в 2.6 раз, достигая максимального значения к 3 часу инкубации, превышая контрольные значения почти в 7 раз. В дальнейшем, уровень мРНК исследуемого гена снижался. К 24 часу эксперимента значения относительного уровня транскриптов в опытной группе лишь в 1.5 раза превышают контроль.

Кардинально отличное действие солевой стресс оказывает на транскрипцию гена *SSADH2* (Рис. 2). Уже с первого часа эксперимента заметно инактивирующее действие хлорида натрия на экспрессию исследуемого гена, которое сохраняется в течение всего

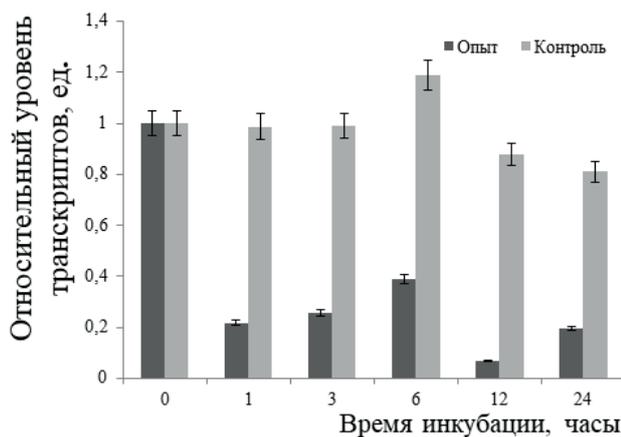


Рис. 2. Изменение относительного уровня транскриптов гена *SSADH2* в листьях кукурузы при действии солевого стресса

Изменение степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в промоторе гена *SSADH1* в зеленых листьях кукурузы при действии солевого стресса

	0	1	3	6	12	24	К
M1	±	±	±	±	±	±	±
M2	±	±	-	±	±	±	±
M3	+	+	+	+	+	+	+
%	75	75	50	75	75	75	75

времени инкубации. При этом, значения относительного уровня транскриптов у опытной группы растений более чем в 4.5 раз меньше, чем у контрольной.

Проведенный анализ промоторных областей генов, кодирующих в геноме кукурузы CCAДГ позволил выявить, что в промоторе гена *SSADH1* (LOC100284047) не содержится ни одного CpG – островка (Рис. 3), однако в его составе присутствует порядка 32.4% сайтов CpNpN и 8.4% сайтов CpNpG. При этом, установлено, что ген *SSADH2* (LOC100280779) имеет в своем составе два CpG-островка, 195 пн (548 – 742) и 117 пн (830 – 946).

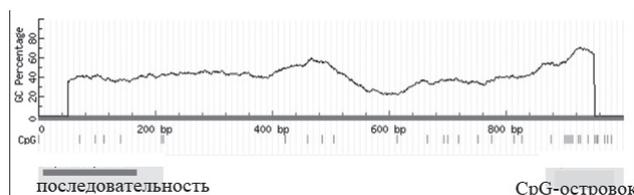


Рис. 3. Анализ промотора гена *SSADH1* на наличие CpG-островков

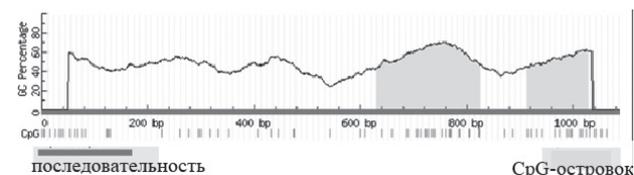


Рис. 4. Анализ промотора гена *SSADH2* на наличие CpG-островков

Проведенный анализ результатов МС-ПЦР позволил выявить изменения степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в составе промотора гена *SSADH1* CCAДГ, которые коррелировали с динамикой транскрипционной активности данного гена (Табл. 1).

До начала эксперимента степень метилирования промотора гена *SSADH1* составляла 75%. Трёх-часовое воздействие на проростки кукурузы привело к снижению степени метилирования до 50%, что сопровождалось увеличением относительного уровня транскриптов. Однако, после 6 часов засоления происходило увеличение доли метилированных цитозинов до 75%, что коррелировало со снижением экспрессионной активности гена *SSADH1*. В последующие часы эксперимента степень метилирования оставалась на постоянном уровне.

Таблица 1

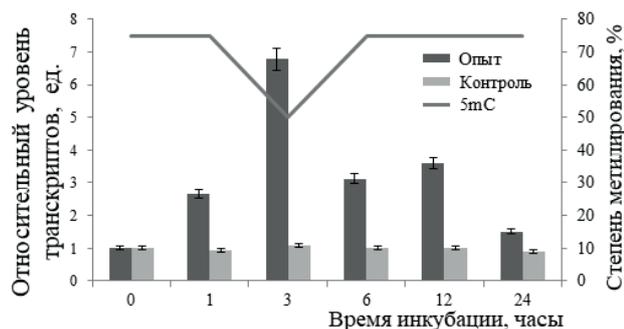


Рис. 5. Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *SSADH1* и степени метилирования (5mC) отдельных CpG-динуклеотидов его промотора при действии солевого стресса

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что солевой стресс приводит к изменению транскрипционной активности генов *SSADH1* и *SSADH2* ССАДГ. При этом, показано, в условиях солевого стресса индуцируется ген *SSADH1*, в то время как *SSADH2* инактивируется уже с первого часа эксперимента. Анализ промоторных областей генов *SSADH1* и *SSADH2* сукцинатсемидегидрогеназы показал, что промотор гена *SSADH1* не содержит ни одного CpG-островка, но содержит 32.4% сайтов CpNpN и 8.4% сайтов CpNpG. В то же время, промотор гена *SSADH2* содержит два CpG-островка. Подобранные МС-праймеры позволили проанализировать метильный статус CpG-динуклеотидов в составе промотора гена *SSADH1* ССАДГ. Было показано, что регуляция работы данного гена в листьях кукурузы при засолении осуществляется на эпигенетическом уровне за счёт изменения степени метилирования промотора.

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. Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A. R. // Trends in plant science. 2008. Vol. 13. P. 14-19.
2. Sun C., Gao X., Fu J., Zhou J., Wu X. // Plant and soil. 2015. Vol. 388. P. 99-117.
3. Wang W., Vinocur B., Altman A. // Planta. 2003. Vol. 218. P. 1-14.

Воронежский государственный университет
Анохина Г. Б., ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки
E-mail: dowi2009@mail.ru

4. Shahzad H., Ullah S., Iqbal M., Bilal H. M., Shah G. M., Ahmad S., Zakir A., Ditta A., Farooqi M. A., Ahmad I. // Italian Journal of Agronomy. 2019. Vol. 14. P. 199-207.
5. Munns R. // Plant, Cell & Environment. 1993. Vol. 16. P. 15-24.
6. Teyssier, E., Bernacchia, G., Maury, S., How Kit, A., Stammitti-Bert, L., Rolin, D., Gallusci, P. // Planta. 2008. Vol. 228. P. 391-399.
7. Fadzilla N. M., Finch R. P., Burdon R. H. // Journal of Experimental Botany. 1997. Vol. 48. P. 325-331.
8. Hichem H., Mounir, D. // Industrial crops and Products. 2009. Vol. 30. P. 144-151.
9. Feehily C., Karatzas K. A. G. // Journal of applied microbiology. 2013. Vol. 114. P. 11-24.
10. Deng X., Xu X., Liu Y., Zhang Y., Yang L., Zhang, S. Xu, J. // Journal of integrative plant biology. 2020. Vol. 62. P. 1797-1812.
11. Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S. G., Fromm, H. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. Vol. 100. P. 6843-6848.
12. Menezes-Benavente L., Kernodle S. P., Margis-Pinheiro M., Scandalios J. G. // Redox report. 2004. Vol. 9. P. 29-36.
13. Busch K. B., Fromm H. // Plant physiology. 1999. Vol. 121. P. 589-598.
14. Bown A. W., Shelp B. J. // Plant Physiology. 1997. Vol. 115. P. 1.
15. Kinnersley A. M., Turano F. J. // Critical Reviews in Plant Sciences. 2000. Vol. 19. P. 479-509.
16. Soderlund C., Descour A., Kudrna D., Bomhoff M., Boyd L., Currie J., Angelova A., Collura K., Wissotski M., Ashley E., Morrow D., Fernandes J., Walbot V., Yu Y. // PloS genetics. 2009. Vol. 5. C. 740.
17. Schnable P. S., Ware D., Fulton R. S., Stein J. C., Wei F., Pasternak S., Presting G. G. // Science. 2009. Vol. 326. P. 1112-1115.
18. Matz M. V. // Green Fluorescent Protein. Humana Press. 2002. P. 3-18.
19. Štorchová H., Hrdličková R., Chrtek Jr, J., Tetera M., Fitze D., Fehrer J. // Taxon. 2000. Vol. 49. P. 79-84.
20. Zhang Y., Rohde C., Tierling S., Stamerjohanns H., Reinhardt R., Walter J., Jeltsch A. // DNA methylation. Humana Press. 2009. P. 177-187.

Voronezh State University
Anokhina G. B., Assistant Professor of Biochemistry and Cell Physiology Department
E-mail: dowi2009@mail.ru

THE ROLE OF THE METHYL STATUS OF THE PROMOTER *SSADH1* GENE IN THE REGULATION OF THE FUNCTIONING OF SUCCINIC SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE IN CORN LEAVES (*ZEA MAYS* L.) UNDER SALT STRESS

G. B. Anokhina, Z. N. Shakhov, A. T. Eprintsev

Abstract. Salt stress is one of the most relevant for the study of plant stress factors, because it is projected that by 2050 half of the available land for agriculture will be lost. To avoid significant losses in the future, it is necessary now to actively move towards the search for key regulators of adaptation to stressful conditions, to study the ongoing changes at the molecular level. One of these regulators is succinic semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.16), which converts succinic semialdehyde to succinate and is one of the enzymes of the GABA shunt, a TCA bypass pathway activated by salt stress. Due to the fact that the disruption of this enzyme leads to the inability of the plant to neutralize reactive oxygen species, which destabilize the life support processes of the cell, which leads to growth retardation, necrosis and other significant developmental pathologies, studying the expression of the *SSADH* gene will help, firstly, to determine the contribution of the enzyme to the overall process of cell counteraction to salt stress;

DNA methylation is a common method of life regulation among all living organisms through epigenetic modification at the molecular level; in addition to plants, it is found in animals and fungi and plays an important role in gene regulation, programming of the stages of organism development, response to abiotic and biotic stresses, including to salt stress. It has been established that the key role in the adaptive reaction of the cell in response to salt stress belongs to the *SSADH1* gene of succinic semialdehyde dehydrogenase. The promoter regions of the *SSADH1* and *SSADH2* genes of the studied enzyme were analyzed for the presence of CpG-islands. It has been shown that the regulation of this gene in maize leaves under salt stress is carried out by changing the degree of methylation of individual CpG-dinucleotides in the promoter of the *SSADH1* gene of succinic semialdehyde dehydrogenase.

Keywords: salt stress, methylation, GABA shunt, succinic semialdehyde dehydrogenase, plants

REFERENCES

1. Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A. R., Trends in plant science, 2008, Vol. 13, pp. 14-19.
2. Sun C., Gao X., Fu J., Zhou J., Wu X. Plant and soil, 2015, Vol. 388, pp. 99-117.
3. Wang W., Vinocur B., Altman A., Planta, 2003, Vol. 218, pp. 1-14.
4. Shahzad H., Ullah S., Iqbal M., Bilal H. M., Shah G. M., Ahmad S., Zakir A., Ditta A., Farooqi M. A., Ahmad I., Italian Journal of Agronomy, 2019, Vol. 14, pp. 199-207.
5. Munns R., Plant, Cell & Environment, 1993, Vol. 16, pp. 15-24.
6. Teyssier E., Bernacchia G., Maury S., How Kit A., Stammitti-Bert L., Rolin D., Gallusci P., Planta, 2008, Vol. 228, pp. 391-399.
7. Fadzilla N. M., Finch R. P., Burdon R. H., Journal of Experimental Botany, 1997, Vol. 48, pp. 325-331.
8. Hichem H., Mounir, D., Industrial crops and Products, 2009, Vol. 30, pp. 144-151.
9. Feehily C., Karatzas K. A. G., Journal of applied microbiology, 2013, Vol. 114, pp. 11-24.
10. Deng X., Xu X., Liu Y., Zhang Y., Yang L., Zhang S., Xu J., Journal of integrative plant biology, 2020, Vol. 62, pp. 1797-1812.
11. Bouché N., Fait A., Bouchez D., Møller S. G., Fromm H., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, Vol. 100, pp. 6843-6848.
12. Menezes-Benavente, L., Kernodle, S. P., Margis-Pinheiro M., Scandalios J. G., Redox report, 2004, Vol. 9, pp. 29-36.
- 13) Busch K. B., Fromm H., Plant physiology, 1999, Vol. 121, pp. 589-598.

14. Bown A. W., Shelp B. J., Plant Physiology, 1997, Vol. 115, p. 1.
15. Kinnersley A. M., Turano F. J., Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, Vol. 19, pp. 479-509.
16. Soderlund C., Descour A., Kudrna D., Bomhoff M., Boyd L., Currie J., Angelova A., Collura K., Wissotski M., Ashley E., Morrow D., Fernandes J., Walbot V., Yu Y., PloS genetics, 2009, Vol. 5, pC. 740.
17. Schnable P. S., Ware D., Fulton R. S., Stein J. C., Wei F., Pasternak S., Presting G. G., Science, 2009, Vol. 326, pp. 1112-1115.
18. Matz M. V., Green Fluorescent Protein, Humana Press, 2002, pp. 3-18.
19. Štorchová H., Hrdličková R., Chrtěk Jr J., Tetera M., Fitze D., Fehrer J., Taxon, 2000, Vol. 49, pp. 79-84.
20. Zhang Y., Rohde C., Tierling S., Stamerjohanns H., Reinhardt R., Walter J., Jeltsch A., DNA methylation, Humana Press, 2009, pp. 177-187.