

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОМОТОРА ГЕНА ЦИТОЗОЛЬНОЙ НАДФ-ЗАВИСИМОЙ
ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЯЧМЕНЯ

Р.А. Шестаков, А.Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Аннотация. В базе данных NCBI найден аннотированный ген цитозольной НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы *Hordeum vulgare*. Данный ген локализуется в третьей хромосоме и содержит 15 экзонов и 14 интронов. Полученную после удаления интронов и соединения экзонов последовательность, использовали для подбора Real-time PCR праймеров. Оптимизация праймеров показала, что оптимальная температура для отжига равна 60°C. Исследование промотора данного гена выявило наличие различных регуляторных элементов, таких как G-бокс, W-бокс, DRE, что свидетельствует о важной роли цИДГ при адаптации растения к стрессу и возможной световой регуляции экспрессии гена фермента. С помощью программы Methprimer в промоторе обнаружен CpG островок, что предполагает возможную эпигенетическую регуляцию экспрессии через метилирование/демети́лирование.

Ключевые слова: изоцитратдегидрогеназа, промотор, цис-элементы, праймеры, ПЦР.

ANALYSIS OF THE BARLEY CYTOSOLIC NADP-DEPENDENT ISOCITRATE
DEHYDROGENASE GENE PROMOTER*R.A. Shestakov, A.T. Eprintsev**Voronezh State University, Voronezh, Russia*

Abstract: an annotated gene of cytosolic NADP-dependent IDH of *Hordeum vulgare* was found in the NCBI database. This gene is localized in chromosome 8 and contains 15 exons and 14 introns. The sequence obtained after intron removal and exon fusion was used to select Real-time PCR primers. Optimization of primers showed that the optimal temperature for annealing is 60°C. A study of the promoter of this gene revealed the presence of various regulatory elements, such as a G-box, W-box, DRE, which indicates an important role of cIDH in plant adaptation to stress and possible light regulation of enzyme gene expression. Using the Methprimer program, a CpG island was found in the promoter, which suggests possible epigenetic regulation of expression through methylation/demethylation.

Keywords: isocitrate dehydrogenase, promoter, cis-elements, primers, PCR.

Введение.

В клетках живых организмов обнаружены два типа изоцитратдегидрогеназ. Одна из них, НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (1.1.1.41), присутствует исключительно в митохондриях, где, являясь одним из ферментов цикла Кребса, осуществляет окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата с одновременным восстановлением НАД до НАДН [5]. Другой фермент, НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа, 1.1.1.42 (далее НАДФ-ИДГ), катализирует ту же реакцию, но при этом использует другой кофермент - НАДФ [5]. НАД и НАДФ зависимые ИДГ - разные по структуре и составу субъединиц ферменты, кодируются разными генами [5]. НАДФ-ИДГ обнаружена в клетках у всех доменов живой природы: археев, бактерий, эукариот [2,4]. В отличие от НАД-ИДГ, НАДФ-зависимый фермент присутствует, помимо митохондрий, также в цитоплазме, пероксисомах и пластидах [2,4,8]. Четвертичная структура молекулы НАДФ-ИДГ представляет собой димер, состоящий из нековалентно связанных идентичных, но функционально различающихся субъединиц, одна из которых – каталитическая, другая выполняет вспомогательную роль [10]. В качестве кофактора с молекулой ИДГ связывается ион двухвалентного металла – магния или марганца, который необходим для стабилизации молекулы субстрата при декарбоксилировании [10]. Точная роль НАДФ-ИДГ в клетке пока не ясна. Мутантные растения, лишенные активности этого фермента (или со сниженной активностью), не обладают признаками нарушения метаболизма [5]. Предполагается, что НАДФ-ИДГ в числе других ферментов, поставляющих НАДФН, участвует в сопротивлении растения различным видам биотического и абиотического стресса, когда в клетке повышается концентрация АФК и, как следствие, возрастает потребность в поставке восстановленного НАДФ для поддержания активного состояния антиоксидантных систем [7,9]. Помимо этого, потребность в восстановленном НАДФ повышается ночью, когда прекращается синтез НАДФН ферредоксин-НАДФ(+)-редуктазой [7,9]. Показано также, что НАДФ-ИДГ участвует в метаболизме азота, поставляя углеродный скелет в виде 2-оксоглутарата для синтеза глутамата, и, совместно с НАД-ИДГ, регулирует уровень пиридиновых нуклеотидов. Активность НАДФ-ИДГ повышается также при старении листьев и созревании плодов [5,6]. В связи с тем, что НАДФ-ИДГ участвует в защите растения от различных видов стресса, исследование роли этого фермента при солевом стрессе представляется актуальным. В данной работе будет рассмотрен подбор праймеров для гена цитозольной НАДФ-ИДГ из листьев проростков ячменя, для исследования экспрессии этого гена при солевом стрессе.

Целью исследования являлся анализ промотора гена цитозольной НАДФ-ИДГ *Hordeum vulgare* на наличие цис-регуляторных элементов, а также подбор и оптимизация праймеров для Real-time PCR.

Материалы и методы исследования. Нуклеотидная последовательность гена цитозольной НАДФ-ИДГ была найдена в базе данных NCBI. Подбор праймеров для ПЦР в реальном времени был осуществлён в программе Primer-Blast. Исследование праймеров на наличие вторичных структур проводилось в программах Oligoanalyzer и FastPCR. РНК выделяли фенол-хлороформным методом из листьев восьмидневных проростков кукурузы.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия). Оптимизацию праймеров проводили на приборе Терцик (ДНК-Технология, Россия).

Результаты и их обсуждение. В базе данных NCBI был найден аннотированный ген цитозольной НАДФ-ИДГ (цИДГ) *Hordeum vulgare* (Gene ID: 123443997). Этот ген локализуется в третьей хромосоме *Hordeum vulgare* и содержит 15 экзонов и 14 интронов. После удаления интронов и соединения экзонов, кодирующая последовательность гена длиной 1230 нуклеотидов была использована для подбора праймеров. В программе Primer-Blast были подобраны следующие праймеры для Real-timePCR:

F 5'-CATGGCACAGTCACTCGTCA -3'

R 5'-CCAGACTCCACAGTTCCGAC-3'

Длина продукта составила 185 пн. Оптимизация праймеров показала, что оптимальная температура отжига = 60 °C (Рис. 1).

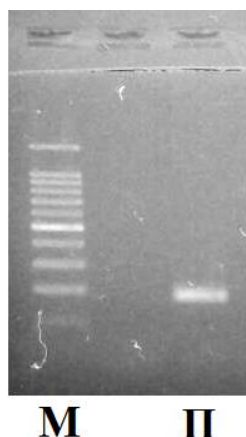


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продукта гена цитозольной цИДГ: П-ПЦР-продукт; М - маркер длин ДНК, 100-1000 п.н., шаг 100 п.н.

Исследование промотора гена НАДФ-ИДГ в программе Methprimer выявило наличие CpG островка, что может свидетельствовать о возможности регуляции экспрессии этого гена через метилирование/деметилирование (Рис. 2).

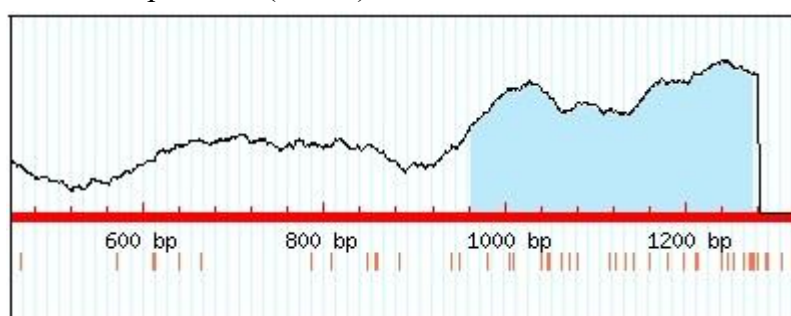


Рис. 2. CpG островок в промоторной области гена цИДГ *Hordeum vulgare*

Исследование промотора гена цИДГ показало наличие ряда регуляторных последовательностей (Рис. 3), таких как G-бокс (CACGTG), отвечающий за связывание транскрипционных факторов, управляющих ответом растения на свет и различные стрессовые факторы, W-бокс (TGAC), присутствующий в промоторах генов, чувствительных к окислительному стрессу, DRE (CCGAC, dehydration response element), отвечающий за экспрессию генов, активирующихся при засухе и холодовом стрессе [1].

CCTAATGAATGTTGTTGAATATTATTAGATTTTTCTTACTTGTGTGCCAAAAAATTCAGACTCATGTGAG
 TTACGGTAAAAAGCCGAAACTATTTGTACGGACGATGCATGTATGCATGACAACTATGGACAATCCAATC
 ACGTGTGCACTTTGATACACACTGATTCATATATGCTGCTGCATGAATCATGTACACAATGTCACGT
 ACTTCTCTCTTCTTAAATATAAGCATTTTTAAAGATTTCACTACCGACTATGTATAGAGTAAAAATAAT
 AAATTCATATTTCTAAAATATGTTTATATACATTTATATATAGTTCATATTATAATTTTTAAATTAACCTTA
 TATTTAGAAACGGATTGATTATATAGCAGTGCTAAAAAATAATAAAAAACGCGTAAATCAATCTGTGA
 TTGAATGGTTTCGAAAAATAGTGATATCTTTTGCCCGTCAGAGTTCAGTCAAGTCATAGGGCTTGACACATATGC
 TTATATTTTTCTGGATTTATTTTCATGCCTTCCAAGATGTGCTTAGTGAAAGGTGATGTTTTTGTATGAAG
 GTGTCTGAGATGATTTTCGTCAATTTTAAATGATGTATCGATAAGGCCTTTCAAAAAATGCTCCTAGGAT
 AGAATATACGTGCATACGTGCGTTTCATACAAATAAATGTATGTACGTATATCTGAGTATTTTTAAATAA
 TATCAATAATAAAAAATAAAAAAGTTCGGACTCTTCGAACACTTGCAAGCCAAAACTCCTTGGCC
 ACGGAGGTCCCAAGTCCCAACACCCGACGAGCATCCAAAGTCCAAATACCCACCCCGCCCCACG
 CGCAGTCTGATCCGATCCCATCGGCCACTGACGCGAGATTTAAATGTTTTTTCTAAATATACCTACCGCA
 AACGGGCCCTACTCGCCCCCTCCGGCTGGTCTTTAAATGCGCTGGCAAAGCTGCTCACTCCGTTCTCTC
 TCCTTCCGTGCCACCACAGCCGCCCTCCCCACCAACCTGCCCTCCCGCTCCCGACATCCGAGGCA
 GGCAGCGCCTCCGCCGCGACCGCCATG

Рис. 3. Расположение найденных регуляторных элементов в промоторной области гена цИДГ

Наличие этих регуляторных последовательностей свидетельствует о сложной регуляции экспрессии данного гена и важной роли цИДГ в адаптации к стрессовым факторам [1,3].

Заключение

На основе последовательности гена цИДГ *Hordeum vulgare*, найденной в базе данных NCBI, подобраны и оптимизированы праймеры для ПЦР РВ, что позволит в дальнейшем провести анализ динамики экспрессии гена цИДГ *Hordeum vulgare* при воздействии на растение стрессовых факторов. Исследование промотора гена цИДГ в программе Methprimer выявило наличие CpG островка, что дает возможность предположить эпигенетическую регуляцию активности данного гена через метилирование/деметиляцию. Показано наличие cis-регуляторных последовательностей (G-бокс, W-бокс, DRE), отвечающих за активацию гена при воздействии на растение стрессовых факторов и световую регуляцию.

Список литературы

1. Галкин А. П. Регуляторные области промоторов генов растений и белки— регуляторы промоторной активности / А. П. Галкин // Биополимеры и клетка. – 2004. – Т. 20. – №. 5. – С. 363.
2. Chen R. D. Chromatographic and immunological evidence that chloroplastic and cytosolic pea (*Pisum sativum* L.) NADP-isocitrate dehydrogenases are distinct isoenzymes / R.D. Chen et al. // Planta. – 1989. – V. 178. – P. 157-163.
3. Corpas F. J. NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions / F. J. Corpas, J.B. Barroso // Frontiers in Environmental Science. – 2014. – V. 2. – P. 55.
4. Corpas F. J. Peroxisomal plant metabolism—an update on nitric oxide, Ca²⁺ and the NADPH recycling network / F. J. Corpas, J. B. Barroso // Journal of Cell Science. – 2018. – V. 131. – №. 2. – P. jcs202978.
5. Hodges M. Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production / M. Hodges et al. // Plant Physiology and Biochemistry. – 2003. – V. 41. – №. 6-7. – P. 577-585.

6. Igamberdiev A. U. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves / A.U. Igamberdiev, P. Gardeström // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
7. Leterrier M. Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions / M. Leterrier et al. // *Free Radical Research*. – 2007. – V. 41. – №. 2. – P. 191-199.
8. McKinnon J. D. Dual-Targeting of NADP⁺ - Isocitrate Dehydrogenase : dis. – University of Saskatchewan, 2009.
9. Valderrama R. et al. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants / R. Valderrama et al. // *Plant, Cell & Environment*. – 2006. – V. 29. – №. 7. – P. 1449-1459
10. Xu X. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity / X. Xu et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279, №. 32. – P. 33946-33957.

References

1. Galkin A. P. Regulatory regions of plant gene promoters and proteins—regulators of promoter activity / A. P. Galkin // *Biopolymers and Cell*. – 2004. – V. 20. – No. 5. – P. 363
2. Chen R. D. Chromatographic and immunological evidence that chloroplastic and cytosolic pea (*Pisum sativum* L.) NADP-isocitrate dehydrogenases are distinct isoenzymes / R.D. Chen et al. // *Planta*. – 1989. – V. 178. – P. 157-163.
3. Corpas F. J. NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions / F. J. Corpas, J.B. Barroso // *Frontiers in Environmental Science*. – 2014. – V. 2. – P. 55.
4. Corpas F. J. Peroxisomal plant metabolism—an update on nitric oxide, Ca²⁺ and the NADPH recycling network / F. J. Corpas, J. B. Barroso // *Journal of Cell Science*. – 2018. – V. 131. – №. 2. – P. jcs202978.
5. Hodges M. Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production / M. Hodges et al. // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2003. – V. 41. – №. 6-7. – P. 577-585.
6. Igamberdiev A. U. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves / A.U. Igamberdiev, P. Gardeström // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
7. Leterrier M. Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase of pea plants: genomic clone characterization and functional analysis under abiotic stress conditions / M. Leterrier et al. // *Free Radical Research*. – 2007. – V. 41. – №. 2. – P. 191-199.
8. McKinnon J. D. Dual-Targeting of NADP⁺ - Isocitrate Dehydrogenase : dis. – University of Saskatchewan, 2009.
9. Valderrama R. et al. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants / R. Valderrama et al. // *Plant, Cell & Environment*. – 2006. – V. 29. – №. 7. – P. 1449-1459
10. Xu X. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity / X. Xu et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279, №. 32. – P. 33946-33957.