DOI: 10.58168/CCTIBSPC2026_23-30
УДК 577*12

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТИЛЬНОГО СТАТУСА ПРОМОТОРА ГЕНА *PDH-E1* ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИСТЬЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ ЗАСОЛЕНИИ

Гомрани Саид Джамел-эддине, аспирант каф. биохимии и физиологии клетки ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Россия, Воронеж

Федорин Д.Н., к.б.н., доцент каф. биохимии и физиологии клетки ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Россия, Воронеж

Аннотация. В данной работе показано изменение метильного статуса промотора гена пируватдегидрогеназы (ПДГ) в листьях кукурузы в условиях острого солевого стресса. Применение метода бисульфитного секвенирования позволило провести оценку изменения метилирования цитозина сайтах CG, что может обуславливать регуляцию транскрипционной активности исследуемого гена. Для оценки метилного статуса проведена амплификация и секвенирование фрагмента промотора гена *PDH-E1* после предварительной бисульфитной конверсии ДНК. Показано, что уровень метилирования CpG-сайтов в исследуемом фрагменте достоверно возрастает с 66,7 % в контроле до 77,8 % через 6 ч и 88,9 % через 12 и 24 ч стресса. Анализ экспрессии данного гена методом ПЦР в реальном времени показал уменьшение его транскриптов в данный период эксперимента, достигающее ~10 % от контрольного уровня к 24 ч. Установлена выраженная отрицательная корреляция (r = -0,98) между уровнем метилирования промотора и экспрессией гена *PDH-E1*. Полученные данные свидетельствуют, что эпигенетическим механизмом, участвующим в регуляции транскрипции *PDH-E1* в листьях кукурузы в условиях солевого стресса, может выступать метилирование его промоторной области по цитозину.

Ключевые слова: *Zea mays*, пируватдегидрогеназа, метилирование ДНК, солевой стресс, промотор, экспрессия гена

© Гомрани Саид Джамел-эддине, Федорин Д. Н., 2026

CHANGES IN THE METHYL STATUS OF THE PYRUVATE DEHYDROGENASE GENE PROMOTER IN CORN LEAVES UNDER SALINITY

Ghomrani Said Djamel-eddine, postgraduate student, department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Russia, Voronezh
Fedorin D.N., PhD, associate professor, department of biochemistry and cell physiology, Voronezh State University, Russia, Voronezh

Abstract: This study demonstrates changes in the methylation status of the pyruvate dehydrogenase (PDH) gene promoter in corn leaves under acute salt stress. Using bisulfite sequencing, we assessed changes in cytosine methylation at CG sites, which may regulate the transcriptional activity of the gene under study. To assess the methylation status, a fragment of the *PDH-E1* gene promoter was amplified and sequenced after preliminary bisulfite conversion of DNA. The methylation level of CpG sites in the studied fragment was shown to increase significantly from 66.7 % in the control to 77.8 % after 6 hours and 88.9 % after 12 and 24 hours of stress. Real-time PCR analysis of the gene's expression revealed a decrease in its transcripts during this period of the experiment, reaching ~10% of the control level by 24 hours. A significant negative correlation (r = -0.98) was established between the promoter methylation level and *PDH-E1* gene expression. These data indicate that cytosine methylation of the promoter region may be an epigenetic mechanism involved in the regulation of *PDH-E1* transcription in maize leaves under salt stress.

Keywords: Zea mays, pyruvate dehydrogenase, DNA methylation, salt stress, promoter, gene expression.

Введение. Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК, КФ 1.2.4.1) катализирует необратимое окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-КоА, НАДН и CO_2, обеспечивая взаимосвязь гликолиза, цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и липидного обмена [1]. При наличии абиотического стресса, включая засоление почвы, растения вынуждены перестраивать первичный метаболизм для поддержания клеточного гомеостаза. Подавление активности ПДК рассматривается как адаптивная схема, позволяющая перенаправлять пируват для синтеза совместимых осмолитов (пролина, глицина бетаина) и снижения генерации активных форм кислорода в

митохондриальной дыхательной цепи [2, 3]. Регуляция активности ПДК осуществляется на нескольких уровнях: посттрансляционном (фосфорилирование/дефосфорилирование субъединиц) и транскрипционном (экспрессия генов, кодирующих E1, E2 и E3 энзимы комплекса) [4]. Фермент E1 (пируватдегидрогеназа) катализирует декарбоксилирование пирувата и перенос ацетильной группы на липоил-содержащую субъединицу E2 [5]. В последнее время все более актуальной становится роль эпигенетических механизмов, в частности ДНК-метилирования в промоторных областях, как способа регуляции экспрессии стресс-чувствительных генов у растений [6, 7]. Метилирование цитозинов в контексте CpG в промоторах часто ассоциировано с транскрипционной репрессией [8].

Цель исследования. Целью настоящей работы явилось исследование динамики метилирования промотора гена *PDH-E1* у кукурузы в условиях острого солевого стресса и установление корреляции с уровнем экспрессии данного гена.

Материалы и методы исследования.

В качестве объектной группы исследовались листья кукурузы (Zea mays L., сорта Воронежская 76). Растения 14 дней осуществляли гидропонным способом в условиях 12-часового фотопериода и температуре 25°C.

Солевой стресс вызывался переносом растений в раствор, содержащий 150 мМ NaCl. Контрольная группа помещалась в дистиллированную воду. Образцы для анализа отбирались через 0 (контроль), 6, 12 и 24 часа после начала стресса.

Геномная ДНК была выделена из 100 мг свежих листьев с помощью коммерческого набора S-ОРБ (ООО «С-Синтол», Россия), после чего подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора ConverGen (ООО «Райсол Био», Россия). Эффективность конверсии контролировалась по степени дезаминирования неметилированных цитозинов вне CpG-контекста (>90 %). После бисульфитной конвертации ДНК амплифицировали с использованием праймеров Прямой праймер: 5'-tttttagaggggtaagattatagggt-3', обратный праймер: 5'-cctaaaaacaaacaaaacattctcc-3'. Полученные ампликоны очищали и отправляли на секвенирование по Сэнгеру в компанию Евроген (ЗАО «Евроген», Россия). Процент метилирования рассчитывали по формуле: (число метилированных CpG / общее число CpG) × 100 %.

Относительный уровень экспрессии гена *PDH-E1* определялся методом ПЦР в реальном времени. В качестве нормализатора использовали ген фактора элонгации EF-1A. Нуклеотидные последовательности специфичных праймеров к гену *PDH-E1* кукурузы: прямой: cctatggctggagagcttcg, обратный: gtcaagcctgcccatacagt.

Каждый экспериментальный образец анализировался в 4 повторностях.

Результаты исследования и обсуждение. Секвенирование ампликона промотора *PDH-E1* после бисульфитной конверсии позволило выявить участок, обладающий 9 CpG-сайтами. Анализ исследуемого показателя в течение 24 часов эксперимента продемонстрировал достоверное увеличение уровня метилирования: с 66,66 % в контроле, до 77,77 % через 6 ч и 88,88 % через 12 и 24 ч солевого стресса (таблица 1). Эффективность бисульфитной конверсии во всех образцах составляла более 90 %, что также послужило показателем достоверности полученных данных.

Таблица 1 - Статус метилирования CpG-сайтов в промоторе *PDH-E1* при солевом стрессе

Время (ч)	Количество CpG-сайтов	Количество метилированных CpG	Процент метилирования	Процент бисульфитной конверсии
0 (контроль)	9	6	66,66 %	91,5 %
6	9	7	77,77 %	90,3 %
12	9	8	88,88 %	98,4 %
24	9	8	88,88 %	98,6 %

Изучение экспрессии гена *PDH-E1* выявило снижение содержания транскриптов данного и к 24 часам уровень анализируемого показателя уменьшился на 10 % от контрольного.

Оценка корреляции уровня метилирования промотора гена *PDH-E1* и его экспрессии, показала статистическую значимость, при этом коэффициент корреляции Пирсона составил r = -0,98. Следовательно, снижение транскрипционной активности исследуемого гена в листьях кукурузы при засолении является результатом увеличение метильного статуса его промотора, что, вероятно, может обуславливать перестройку дыхательного метаболизма у растений через подавление активности ключевых ферментов митохондрий, в том числе и комплекса пируватдегидрогеназы [3, 9]. Подобный механизм позволяет растению в случае необходимости быстро и обратимо модулировать

экспрессию стресс-чувствительных генов без изменения нуклеотидной последовательности [6, 7].

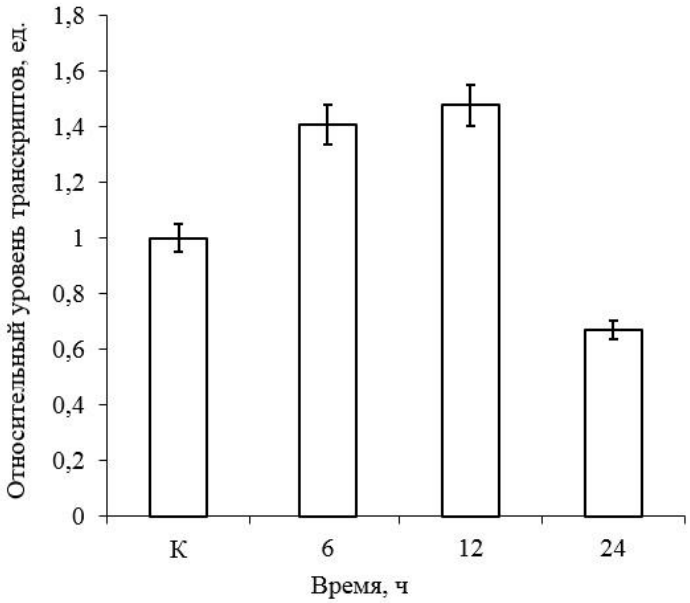


Рисунок 1 - Относительный уровень транскриптов гена *PDH-E1* в листьях кукурузы при засолении.

Применение бисульфитного секвенирования [10], позволило получить количественные данные о динамике эпигенетических модификаций на уровне отдельных цитозинов промотора гена *PDH-E1*, что может вносить вклад в регуляцию его транскрипции [11]. Обнаруженная сильная отрицательная корреляция (r = -0,98) подтверждает функциональную значимость метилирования промотора *PDH-E1*, как механизма транскрипционной репрессии при солевом стрессе [12].

Заключение.

Проведенные исследования с применением бисульфитного секвенирования показали показало, что солевой стресс вызывает быстрое гиперметилирование промотора *PDH-E1* в листьях кукурузы, которое в свою очередь коррелирует со снижением содержания транскриптов этого гена. По всей видимости, этот эпигенетический механизм является ранним адаптивным ответом на стресс, помогающим перестраивать дыхательный метаболизм растения для нивелирования негативного эффекта. Полученные результаты, позволяют предположить механизмы адаптации клеточного метаболизма растений, опосредованные эпигенетической модификацией регуляторных участков генов, ответственных за ключевые метаболические потоки.

Понимание этих механизмов позволит разрабатывать более устойчивые к стрессу сорта культурных растений при помощи целенаправленной селекции или биотехнологических подходов.

Список литературы

1. Budde, R.J., Randall, D.D. Pea leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex is inactivated in vivo in a light-dependent manner // Proc Natl Acad Sci USA. - 1990. - V. 87. - P. 673–676. doi: 10.1073/pnas.87.2.673.
2. Che-Othman, M.H., Millar, A.H., Taylor, N L. Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C3 plants // Plant Cell Environ. - 2017. - V. 40. - P. 2875-2905. doi: 10.1111/pce.13034.
3. Saha, P., Kunda, P., Biswas, A.K. I nfluence of sodium chloride on the regulation of Krebs cycle intermediates and enzymes of respiratory chain in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seedlings // Plant Physiol Biochem. - 2012. - V. 60. - P. 214–222. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.08.008.
4. Tovar-Mendez, A., Miernyk, J.A., Randall D.D. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells // Eur J Biochem. - 2003. - V. 270. - -P. 1043–1049. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03469.x.
5. Plant pyruvate dehydrogenase complexes. in Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes / M.S. Patel, T.E. Roche, R.A. Harris, Eds., Basel: Birkhäuser Basel, 1996. - P. 71–92. doi: 10.1007/978-3-0348-8981-0_5.
6. Chinnusamy, V., Zhu, J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants // Current Opinion in Plant Biology. - 2009. 1- V. 2. - P. 133–139. doi: 10.1016/j.pbi.2008.12.006.
7. Liu, J., He, Z. Small DNA Methylation, Big Player in Plant Abiotic Stress Responses and Memory // Front. Plant Sci. - 2020. - V. 11: 595603. doi: 10.3389/fpls.2020.595603.
8. Law, J.A., Jacobsen, S.E.E stablishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // Nat Rev Genet. - 2010 - V. 11. - P. 204–220. doi: 10.1038/nrg2719.
9. Che-Othman, M.H., Jacoby, R.P., Millar, A.H. et al. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress // New Phytol. - 2020. V. 225. - P. 1166-1180. doi: 10.1111/nph.15713.

10. Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992. - V. 89. - P. 1827–1831. doi: 10.1073/pnas.89.5.1827.

11. Sun, M., Yang, Z., Liu, L., et al. DNA Methylation in Plant Responses and Adaption to Abiotic Stresses // *I*nternational Journal of Molecular Sciences. - 2022. - V. 23: 6910. doi: 10.3390/ijms23136910.

12. Pandey, G., Sharma, N., Sahu, P.P., et al. Chromatin-Based Epigenetic Regulation of Plant Abiotic Stress Response // Curr Genomics. - 2016. - V. 17. - P. 490–498. doi: 10.2174/1389202917666160520103914.

References

1. Budde, R.J., Randall, D.D. Pea leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex is inactivated in vivo in a light-dependent manner // Proc Natl Acad Sci USA. - 1990. - V. 87. - P. 673–676. doi: 10.1073/pnas.87.2.673.

2. Che-Othman, M.H., Millar, A.H., Taylor, N L. Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C3 plants // Plant Cell Environ. - 2017. - V. 40. - P. 2875-2905. doi: 10.1111/pce.13034.

3. Saha, P., Kunda, P., Biswas, A.K. I nfluence of sodium chloride on the regulation of Krebs cycle intermediates and enzymes of respiratory chain in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seedlings // Plant Physiol Biochem. - 2012. - V. 60. - P. 214–222. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.08.008.

4. Tovar-Mendez, A., Miernyk, J.A., Randall D.D. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells // Eur J Biochem. - 2003. - V. 270. - -P. 1043–1049. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03469.x.

5. Plant pyruvate dehydrogenase complexes. in Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes / M.S. Patel, T.E. Roche, R.A. Harris, Eds., Basel: Birkhäuser Basel, 1996. - P. 71–92. doi: 10.1007/978-3-0348-8981-0_5.

6. Chinnusamy, V., Zhu, J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants // Current Opinion in Plant Biology. - 2009. 1- V. 2. - P. 133–139. doi: 10.1016/j.pbi.2008.12.006.

7. Liu, J., He, Z. Small DNA Methylation, Big Player in Plant Abiotic Stress Responses and Memory // Front. Plant Sci. - 2020. - V. 11: 595603. doi: 10.3389/fpls.2020.595603.

8. Law, J.A., Jacobsen, S.E.E stablishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals // Nat Rev Genet. - 2010 - V. 11. - P. 204–220. doi: 10.1038/nrg2719.

9. Che-Othman, M.H., Jacoby, R.P., Millar, A.H. et al. Wheat mitochondrial respiration shifts from the tricarboxylic acid cycle to the GABA shunt under salt stress // New Phytol. - 2020. V. 225. - P. 1166-1180. doi: 10.1111/nph.15713.

10. Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992. - V. 89. - P. 1827–1831. doi: 10.1073/pnas.89.5.1827.

11. Sun, M., Yang, Z., Liu, L., et al. DNA Methylation in Plant Responses and Adaption to Abiotic Stresses // *I*nternational Journal of Molecular Sciences. - 2022. - V. 23: 6910. doi: 10.3390/ijms23136910.

12. Pandey, G., Sharma, N., Sahu, P.P., et al. Chromatin-Based Epigenetic Regulation of Plant Abiotic Stress Response // Curr Genomics. - 2016. - V. 17. - P. 490–498. doi: 10.2174/1389202917666160520103914.