

Изменение степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов в составе промотора гена *Ssdh-1* семиальдегиддегидрогеназы в условиях солевого стресса в листьях кукурузы (*Zea mays* L.)

Научный руководитель – Епринцев Александр Трофимович

Шахов З.Н.¹, Анохина Г.Б.², Автореева Е.Л.³

1 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *E-mail: zakharshakhov@gmail.com*; 2 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *E-mail: dowi2009@mail.ru*; 3 - Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, *E-mail: evgeniaavtoreeva@mail.ru*

Активность ГАМК-шунта в растениях быстро увеличивается в ответ на различные биотические и абиотические стрессы [2].

Сукцинатсемиальдегиддегидрогеназа (ССАДГ; КФ 1.2.1.24) участвует в финальной стадии разложения гамма-аминомасляной кислоты в матриксе митохондрий [3].

В качестве объекта использовались листья 10 дневной кукурузы сорта Воронежская-76, выращенные гидропонно. Индукция солевого стресса осуществлялась путём помещения растений с предварительно удаленной корневой системой в 0.15 М раствор NaCl на 24 часа. Контрольная группа растений инкубировалась в воде. Конверсия ДНК NaHSO₃ проводилась в три этапа [4]. Анализ промоторов исследуемых генов на наличие CpG-островков и подбор праймеров для МС-ПЦР осуществляли с помощью онлайн-сервиса MethPrimer. Для исследования метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в промоторах исследуемых генов проводили метил-специфичную ПЦР с применением ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва).

В геноме кукурузы ССАДГ кодируется двумя генами: *ssadh-1* (LOC100284047) локализован в 4 хромосоме и *ssadh-2* (LOC100280779) локализован в 5 хромосоме.

В ходе проведенного исследования по влиянию раствора NaCl на изменение относительного уровня транскриптов генов ССАДГ было установлено, что уже в первые часы эксперимента транскрипционная активность гена *ssadh-1* 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.

Известно, что транскрипционная активность генов может регулироваться за счет изменения метильного статуса как отдельных CpG - динуклеотидов, так и CpG - динуклеотидов в составе CpG-островка [1]. Проведенный анализ нуклеотидной последовательности промотора гена *ssadh-1* показал, что в его составе не содержится ни одного CpG-островка (Рис. 2), что, однако, не исключает возможности контроля экспрессии гена посредством смены метильного статуса, поскольку у растительных организмов, в отличие от животных, метилирование цитозина возможно не только по сайтам CpG, но также по сайтам CpNpG и CpNpN, где N-A, T или C [1]. В рамках исследования было установлено, что в промоторе гена *ssadh-1* присутствуют порядка 32.4% сайтов CpNpN и 8.4% сайтов CpNpG. Проведенный анализ результатов, полученных в ходе метил-специфичной ПЦР, позволил установить, что увеличение экспрессионной активности гена *ssadh-1* на третий час солевого воздействия сопряжено с изменением метильного статуса отдельных CpG-динуклеотидов в составе его промотора с 75 до 50% (Рис. 1). В то же время, в контрольной группе растений степень метилирования промотора оставалась на уровне 75% на протяжении всего эксперимента.

Таким образом, показано, что регуляция экспрессии гена *ssadh-1* сукцинатсемиальдегиддегидрогеназы в условиях солевого стресса осуществляется посредством такого эпигенетического механизма как метилирование.

Источники и литература

- 1) Кирнос М. Д., Александрюшкина Н. И., Ванюшин Б. Ф. 5-метилцитозин в пиридиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования //Биохимия. – 1981. – Т. 46. – №. 12. – С. 1458-1474.
- 2) Bouché N. et al. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – №. 11. – P. 6843-6848.
- 3) Bouche N., Fromm H. GABA in plants: just a metabolite? //Trends in plant science. – 2004. – V. 9. – №. 3. – P. 110-115.
- 4) Hsieh C. L. Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation //Molecular and cellular biology. – 1999. – V. 19. – №. 1. – P. 46-56.

Иллюстрации

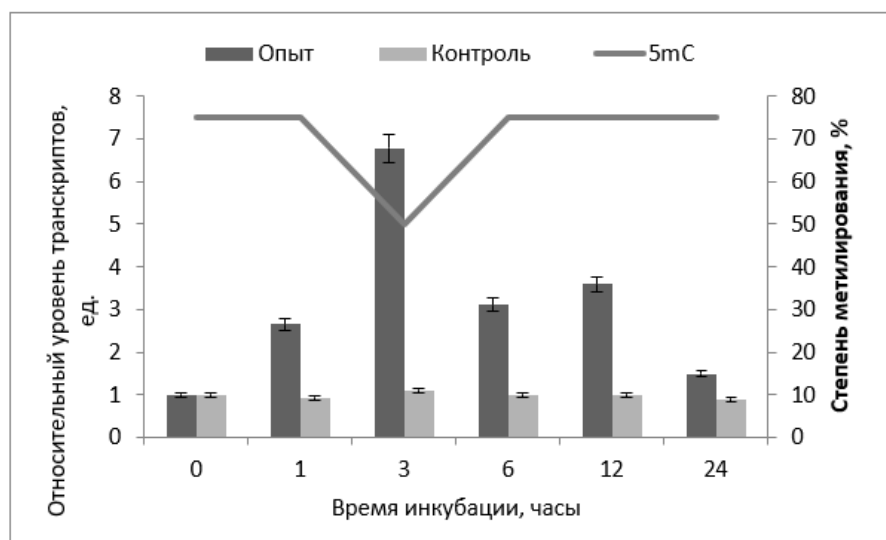


Рис. 1. Рис. 1 Динамика изменения относительного уровня транскриптов гена *ssadh-1* и степени метилирования отдельных CpG-динуклеотидов его промотора при действии солевого стресса

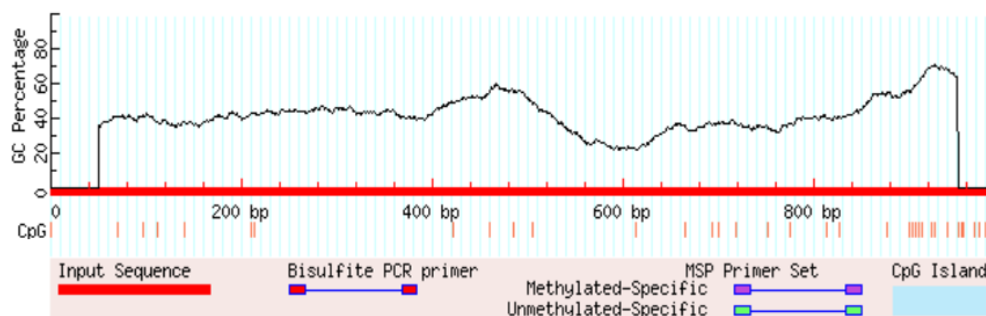


Рис. 2. Рис. 2 Анализ промотора гена *ssadh-1* на наличие CpG-островков