

ORIGINAL ARTICLE

The Role of Sugar-related Regulation in the Light-dependent Alterations of *Arabidopsis* Glutamate Dehydrogenase Genes Expression

E.Yu. Garnik, V.I. Belkov, V.I. Tarasenko, Yu.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, PO 317, Irkutsk, 664033, Russia

*E-Mail: elga74@yandex.ru

Received November 6, 2014

Expression of *gdh1* and *gdh2* genes of *Arabidopsis thaliana* increases in the dark and decreases in the light. The reason of such alteration seems to be a glucose rising in photosynthetic cell in the light, but this hypothesis needs to be confirmed. In this work we investigate the role of glucose and hexokinase 1 in the light-dependent regulation of the *gdh1* and *gdh2* expression. A comparison of expression profiles of *apl3*, *gdh1*, *gdh2* genes in presence of exogenous sucrose in the dark and in the light has demonstrated that sugar-related repression of *gdh1* and *gdh2* genes is insufficient to provide the high decrease of their transcripts in the light. Using *Arabidopsis* mutant *gin2-1* with a defect in *hvk1* gene we demonstrated that such a decrease is not depended on the regulatory function of hexokinase 1. We presume that light-dependent alterations of *gdh1* and *gdh2* expression are mediated by some chloroplast-to-nucleus regulatory signals.

Key words: Arabidopsis thaliana, Arabidopsis mutants, glutamate dehydrogenase, hexokinase 1, sugar sensing and signaling

ORIGINAL ARTICLE

Роль сахарозависимой регуляции в светозависимых изменениях экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* арабидопсиса

Е.Ю. Гарник, В.И. Бельков, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия

*E-Mail: elga74@yandex.ru

Поступила в редакцию 6 Ноября 2014 г.

Уровень транскриптов генов арабидопсиса *gdh1* и *gdh2* возрастает в темноте и снижается на свету. Считается, что репрессия этих генов на свету происходит вследствие повышения уровня глюкозы в фотосинтезирующей клетке, однако механизмы этой репрессии до сих пор не изучались. В данной работе исследована роль глюкозы и гексокиназы 1 в светозависимой регуляции экспрессии генов *gdh1* и *gdh2*. Соотнесение профилей экспрессии генов *apl3*, *gdh1*, *gdh2* в присутствии экзогенной сахарозы в темноте и на свету показало, что сахарозависимая репрессия генов *gdh1* и *gdh2* не достигает уровней, наблюдаемых на свету. С использованием мутанта по гену *hvk1* показано, что это снижение не зависит от регуляторной функции гексокиназы 1 – наиболее известного посредника глюкозозависимых путей регуляции генной экспрессии. По-видимому, светозависимые изменения экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* опосредуются хлоропластно-ядерными сигналами.

Key words: гексокиназа 1, глутаматдегидрогеназа, мутанты арабидопсиса, сахарозависимая регуляция экспрессии генов, *Arabidopsis thaliana*

Ядерные гены *gdh1* и *gdh2*, кодирующие у арабидопсиса фермент митохондриальной локализации NAD-зависимую глутаматдегидрогеназу (GDH, EC 1.4.1.2), относятся к генам с циркадным типом регуляции. Количество их

транскриптов возрастает в десятки раз в темное время суток и снижается в светлое (Turano *et al.*, 2006). Механизмы, обуславливающие такой тип регуляции генов *gdh1* и *gdh2*, не исследованы. В 2008 г. Miyashita с соавторами выдвинули версию,

что GDH в растительной клетке играет роль «страховки» на случай углеводного голодания (Miyashita, Good, 2008). При этом предполагается, что посредником, обуславливающим репрессию данных генов на свету, является глюкоза, образующаяся в ходе фотосинтеза (Miyashita, Good, 2008). Единственным хорошо изученным посредником, передающим сигналы, возникающие при изменении уровня глюкозы в клетке растений, на сегодняшний день является гексокиназа 1 (НХК1). Однако ни роль НХК1, ни участие каких-либо иных известных регуляторных и сигнальных механизмов в регуляции экспрессии генов семейства *gdh* до сегодняшнего дня не исследовались.

Ранее нами было показано, что снижение уровня транскриптов генов *gdh1* и *gdh2* на свету требует присутствия функционально активных хлоропластов (Garnik et al., 2013). Это может указывать на существование хлоропластно-ядерной регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы, однако не исключает и регуляторного влияния глюкозы как продукта фотосинтеза. В данной работе мы исследуем участие глюкозозависимой регуляции и роль НХК1 в светозависимых колебаниях экспрессии генов глутаматдегидрогеназы арабидопсиса.

MATERIALS AND METHODS

Растительный материал и условия выращивания. Семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia-0 (далее Col-0), экотип *Landsberg erecta* (далее *Ler*), а также мутантной линии *gin2-1* (CS6383) на основе экотипа

Landsberg erecta были получены из Arabidopsis Biological Resource Center (The Ohio State University, USA). Семена стерилизовали в растворе, содержащем 70 % этанола и 0,05% Triton X 100, в течение восьми минут, трижды промывали стерильной водой и раскладывали на стерильную плотную среду в чашках Петри, равномерно по всей поверхности среды либо только вдоль диаметра чашки (вертикальное выращивание). Среда для выращивания растений содержала: минеральные соли по Murasige, Skoog (Murasige, Skoog, 1962) – половинный состав, фитогель («Sigma-Aldrich», США) – 0,8%. В ряде экспериментов в среде присутствовала сахароза («Helicon», Россия) – 2%. После стратификации при +4 °C в течение трех суток чашки устанавливали в горизонтальном либо в вертикальном положении в ростовой камере, где проростки выращивали в течение 7 (горизонтальное выращивание) или 14 суток (вертикальное выращивание) при температуре 23 °C, освещенности 150 мкЕ и длине светового дня 16 ч.

Обработку растений 3% растворами маннитола («Sigma-Aldrich», США) и сахарозы («Helicon», Россия) проводили на 14-е сутки после окончания стратификации. Корни 14-суточных проростков, выращенных описанным способом и выдержанных в темноте в течение 24 ч до начала обработки, орошали 3% растворами сахарозы либо маннитола (контроль осмотических условий) и экспонировали на свету либо в темноте в течение четырех часов, после чего выделяли РНК из листовых пластинок.

Экстракция РНК. РНК экстрагировали из растительного материала при помощи TRI-Reagent («Sigma-Aldrich», США) согласно протоколу производителя. Гомогенизацию материала с TRI-Reagent проводили в гомогенизаторе TissueLyser («QIAGEN», США) в течение 2 мин при частоте 30 колебаний в секунду. Для денатурации белков использовали бромхлорпропанол («Sigma-Aldrich», США). Осаждение нуклеиновых кислот, растворение осадка РНК и анализ в агарозном геле проводили, как описано ранее (Tarasenko *et al.*, 2009).

Синтез первой цепи кДНК. Для удаления возможных примесей ДНК к 8 мкл препарата РНК добавляли 1 мкл 10х буфера ДНКазы («Fermentas», Литва) и 0.5 мкл (0.5 единиц) ДНКазы. Инкубировали 30 мин при 37 °С. Для инактивации ДНКазы добавляли в реакционную смесь 1 мкл ЭДТА (25 мМ) и прогревали 10 мин при 65 °С. Добавляли 1 мкл праймера oligo-dT (80 рМ) и прогревали 5 мин при 70 °С, инкубировали 5 минут на льду. К смеси добавляли 4 мкл 5х буфера обратной транскриптазы («Fermentas», Литва), 0.5 мкл (20 единиц) ингибитора РНКаз («Fermentas», Литва), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP. Инкубировали 5 мин при 37 °С. Добавляли 0.7 мкл (140 единиц) обратной транскриптазы Rever Aid H Minus M-MuV («Fermentas», Литва). Инкубировали 60 мин при 42 °С. Инактивировали фермент инкубацией 10 мин при 70 °С.

Обратно-транскриптазная ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). ОТ-ПЦР-РВ проводили с использованием готовой смеси реагентов SYBR

Select MasterMix («Applied Biosystems», США) и оборудования C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System («Bio-Rad», США). Объем реакционной смеси составлял 10 мкл. ПЦР проводили по следующему протоколу: прогревание до 50 °С, 2 мин (согласно рекомендации производителя), один цикл денатурации (95 °С, 3 мин), 36 циклов амплификации (95 °С, 20 с - 60 °С, 30 с - 72 °С, 30 с), после чего образцы подвергались нагреву до 95 °С для последующего анализа кривых плавления. Ген *yls8* (AT5g08290) был использован как референсный (Hong *et al.*, 2010). Список всех использованных праймеров приведен в таблице 1 (табл. 1). Все праймеры были предварительно проверены путем анализа продуктов ПЦР-реакции в агарозном геле, каждая пара давала единственный продукт требуемого размера. Анализ результатов и построение графиков проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ Software Version 1.6 («Bio-Rad», США).

RESULTS

В первой серии экспериментов корни растений арабидопсиса линии дикого типа *Col-0* обрабатывали 3% растворами сахарозы либо маннитола (контроль осмотических условий) на свету либо в темноте. Методом ОТ-ПЦР-РВ оценивали изменения экспрессии генов *ap13* и *gdh2*. Выдерживание 14-суточных проростков в темноте в течение 24 ч приводило к снижению уровня транскриптов гена *ap13* в 40-50 раз. Обработка корней выдержанных в темноте проростков 3% раствором сахарозы приводила к

тому, что уровень транскриптов *apl3* поднимался до уровня в необработанных растениях на свету и выше. Обработка раствором сахарозы корней проростков, экспонируемых на свету, приводила к повышению экспрессии *apl3* в 20 раз и более (рис. 1А). Экспрессия гена *gdh2* была наиболее низкой в проростках, экспонированных на свету. После выдерживания проростков в темноте уровень транскриптов *gdh2* возрастал в 8-9 раз. Обработка корней таких проростков 3% раствором сахарозы приводила к снижению уровня транскриптов, оставаясь, однако, значительно выше уровня в необработанных проростках на свету (рис. 1Б).

Для следующей серии экспериментов использовали линию растений арабидопсиса *gin2-1*, мутантную по гену гексокиназы 1 *hvk1*. Уровень

транскриптов гена *hvk1* у 14-суточных проростков линии дикого типа *Ler* был выше на свету, чем в темноте (рис. 2). Выращивание проростков линии *Ler* в течение 7 суток на среде, содержащей 2% сахарозы, приводило к повышению уровня транскриптов гена *hvk1* вдвое (рис. 3). У 14-суточных проростков линии *gin2-1* не отмечали значимых изменений в экспрессии гена *hvk1* при выдерживании в темноте и на свету. Присутствие в среде 2% сахарозы также не приводило к значимому изменению уровня экспрессии гена *hvk1* у 7-суточных проростков линии *gin2-1* (рис. 3).

Уровень транскриптов генов *gdh1* и *gdh2* у 14-суточных проростков обеих линий в темноте повышался в 10 и более раз по сравнению с образцами, экспонированными на свету (рис. 4).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе.

Ген	Локус	Продукт	Последовательность праймеров
<i>apl3</i>	At4g39210	Большая субъединица АДФ-глюкозофосфорилазы	Л: CGTGCGTCCGAGTATGGACTG П: AGATTTTGCTGCTTCTTGATGAGAC
<i>gdh1</i>	At5g18170	альфа-субъединица NAD(H)-зависимой глутаматдегидрогеназы	Л: CAGGGCAGCGTTTTGTCATCCA П: CGATACCATCCTTGTTCTTGATTGCT
<i>gdh2</i>	At5g07440	бета-субъединица NAD(H)-зависимой глутаматдегидрогеназы	Л: CGCTCTTGGTGGTGTCTGAA П: CTCCTCCTGCGTTTGCGTAGA
<i>hvk1</i>	At4g29130	гексокиназа 1	Л: ATGGATGGTGGATTGTTTGAGCAT П: AAGGTAGAGAGAGTGAGAAGCAGCA
<i>yls8</i>	At5g08290	yellow-leaf-specific gene 8 (референсный ген)	Л: GAGGTGCTTGCGTCTGTTGCT П: TGTCTTGAGAGCCCAGTTGAT

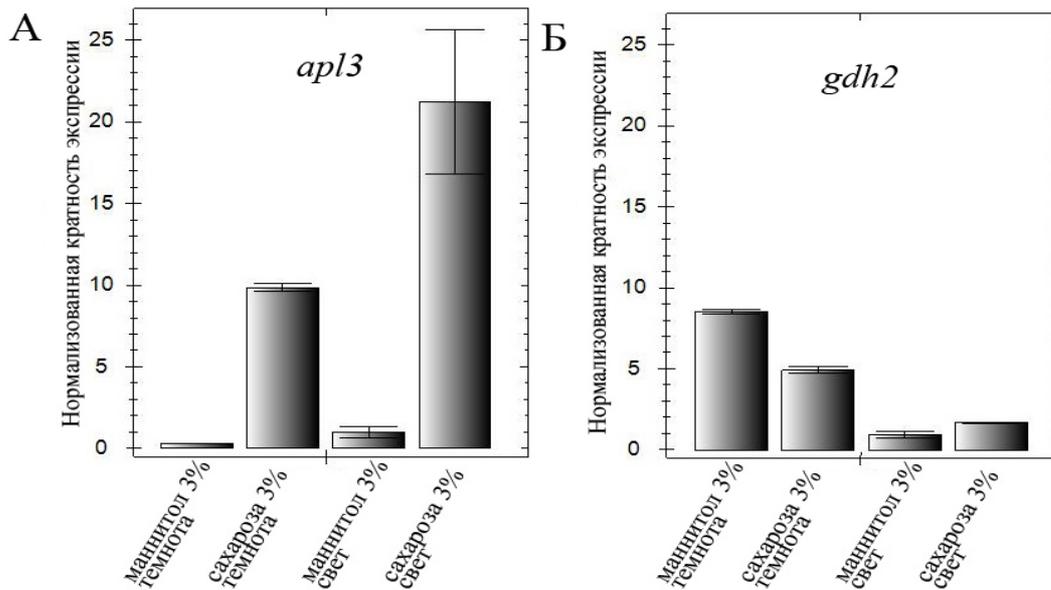


Рисунок 1 (А, Б). Уровень транскриптов генов *apl3* и *gdh2* в растениях линии дикого типа Col-0 в зависимости от условий освещения и присутствия экзогенной сахарозы.

Показаны результаты ОТ-ПЦР-РВ. Маннитол 3%, сахароза 3% - корни растений обработаны 3% раствором маннитола либо сахарозы за 4 часа до выделения РНК; темнота - в течение обработки маннитолом либо сахарозой растения экспонировали в темноте; свет - в течение обработки маннитолом либо сахарозой растения экспонировали на свету (освещенность 150 мкЕ). **А** - транскрипты гена *apl3*, **Б** - транскрипты гена *gdh2*.

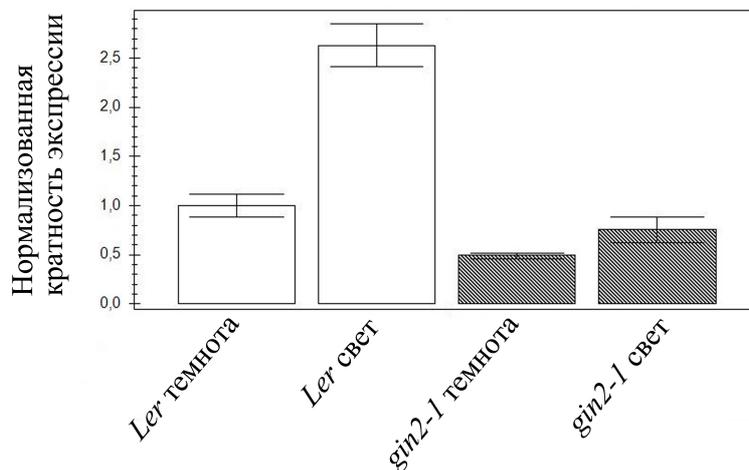


Рисунок 2. Уровень транскриптов гена *hsk1* у растений линии дикого типа *Ler* и мутанта *gin2-1* на свету и в темноте.

Показаны результаты ОТ-ПЦР-РВ. Время экспозиции на свету (освещенность 150 мкЕ) либо в темноте перед выделением РНК - 4 ч.

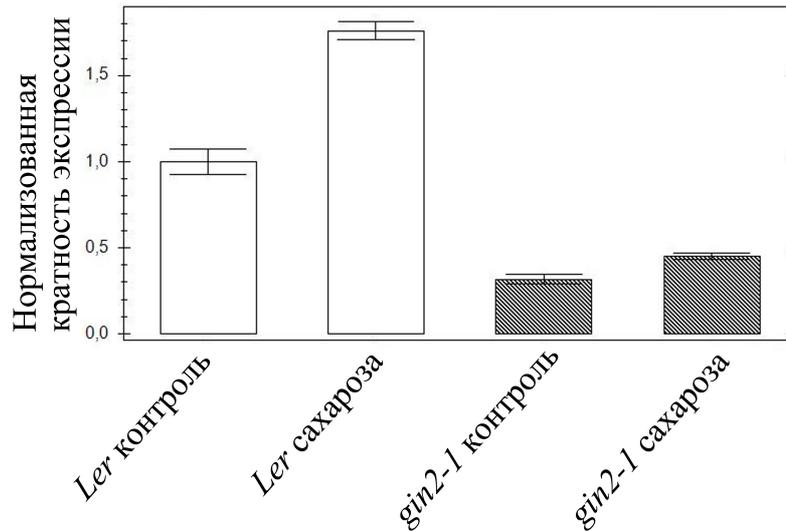


Рисунок 3. Уровень транскриптов гена *hxk1* у растений линии дикого типа *Ler* и мутанта *gin2-1* в отсутствие и в присутствии экзогенной сахарозы.

Показаны результаты ОТ-ПЦР-РВ. Растения выращивали на плотных питательных средах. Контроль – сахароза в среде отсутствовала, сахароза 2% - среда содержала 2% сахарозы.

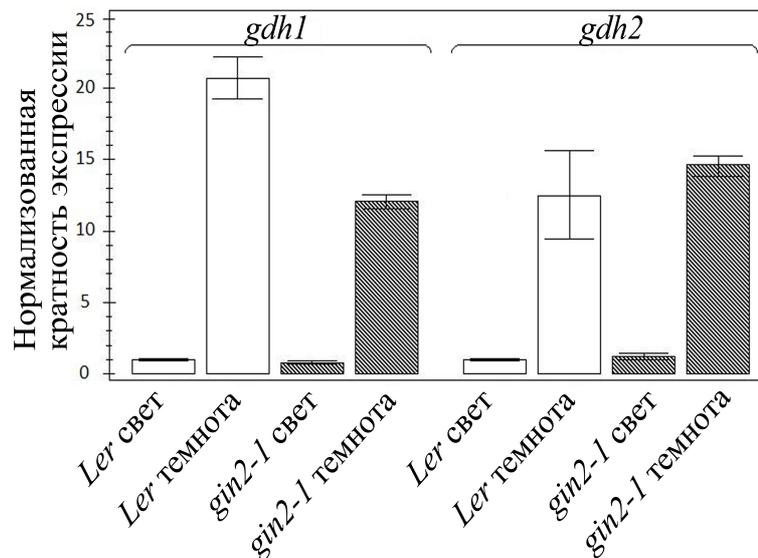


Рисунок 4. Уровень транскриптов генов *gdh1*, *gdh2* у растений линии дикого типа *Ler* и мутанта *gin2-1* на свету и в темноте.

Показаны результаты ОТ-ПЦР-РВ. Растения экспонировали на свету (освещенность 150 мкЕ) либо в темноте в течение 4 ч перед выделением РНК.

DISCUSSION

На сегодняшний день единственным и общепринятым объяснением суточных изменений уровня транскриптов генов глутаматдегидрогеназы

арабидопсиса является гипотеза сахарозависимой регуляции экспрессии этих генов. Хорошо известно, что причиной колебаний экспрессии этих генов в течение суток являются изменения

освещенности (Turano *et al.*, 1997). В 2008 г. Miyashita с соавторами провели серию экспериментов с нокаут-мутантами по генам *gdh1* и *gdh2* и установили, что двойной мутант *gdh1-2/gdh2-1* значительно хуже переносил длительное выдерживание растений в темноте (6-12 суток) (Miyashita, Good, 2008). На этом основании, а также с учетом того, что продукт реакции, катализируемой GDH – 2-оксоглутарат – может быть введен в цикл трикарбоновых кислот и использован для получения энергии (Robinson *et al.*, 1992), авторы выдвинули следующую версию: в темноте, при снижении уровня глюкозы в клетке гены GDH дерепрессируются (*gdh2* в большей степени, *gdh1* в меньшей), и повышение количества активного фермента GDH позволяет клетке использовать глутамат в катаболических реакциях (Miyashita, Good, 2008). Насколько нам известно, экспериментальная проверка этой гипотезы никогда не производилась. Единственным аргументом в пользу существования сахарозависимой репрессии генов глутаматдегидрогеназы арабидопсиса являются данные Li с соавторами, полученные при помощи ДНК-микрочипирования: в течение 2-6 часов после обработки 7-суточных проростков арабидопсиса 3% раствором глюкозы уровень транскриптов генов *gdh1* и *gdh2* снижался соответственно в 2 и 2,5 раза (Li *et al.*, 2006).

В нашей работе обработка проростков арабидопсиса экзогенной сахарозой также приводила к некоторой репрессии генов *gdh1* и *gdh2*. Однако достичь глубокой репрессии,

сравнимой с репрессией этих генов на свету, не удалось. В качестве маркера уровня глюкозы в клетках растений мы использовали ген *apl3*. Он кодирует большую субъединицу АДФ-глюкозофосфорилазы, первого фермента пути биосинтеза крахмала, и его экспрессия индуцируется при повышении в клетке уровня глюкозы (Rook *et al.*, 2006). Соотнесение профилей экспрессии генов *apl3* и *gdh2* показало, что при обработке корней двухнедельных проростков линии дикого типа *Col-0* 3% раствором сахарозы сахарозависимая репрессия гена *gdh2* действительно происходит, однако ее, по всей видимости, недостаточно для обеспечения колебаний уровня транскриптов генов глутаматдегидрогеназы в том масштабе, который имеет место при естественной смене светлого и темного времени суток (рис. 1А, 1Б).

Единственным хорошо изученным посредником, передающим сигналы, возникающие при изменении уровня глюкозы в клетке растений, на сегодняшний день является гексокиназа 1 (НХК1) (Hausler *et al.*, 2014). После активирования глюкозой молекула НХК1 входит в состав высокомолекулярного ядерного комплекса, регулирующего транскрипцию через прямое связывание с промоторами соответствующих генов (Ramon *et al.*, 2008). У растений арабидопсиса линии *gin2-1* в результате мутации по гену *hvk1* в большой степени или полностью отсутствует регуляторная функция НХК1. Это приводит к таким особенностям мутанта, как нечувствительность к высоким концентрациям глюкозы при прорастании

семян и ослабленная репрессия ядерных генов, связанных с фотосинтезом, в присутствии экзогенной глюкозы (Moore *et al.*, 2003). Поскольку НХК1 регулирует в том числе и транскрипцию своего собственного гена *hvk1*, активируя его при повышении уровня глюкозы в клетке (Price *et al.*, 2004), отсутствие изменений уровня транскриптов *hvk1* в присутствии сахарозы у растений *gin2-1* в наших экспериментах подтверждает отсутствие у них регуляторной функции белка НХК1 (рис. 3). При этом совпадение профилей экспрессии генов глутаматдегидрогеназы у мутанта *gin2-1* и растений дикого типа *Ler* на свету и в темноте свидетельствует о том, что светозависимые изменения экспрессии генов *gdh1* и *gdh2* происходят независимо от регуляторной активности НХК1. Поскольку в присутствии экзогенной сахарозы мы все же наблюдали частичное снижение уровня транскриптов *gdh2* (рис. 1Б), нельзя исключить участие не связанных с НХК1 сахарозависимых регуляторных путей. Существование последних для растений известно (Price *et al.*, 2004), однако механизмы подобной регуляции на сегодняшний день изучены слабо (Hausler *et al.*, 2014).

Ранее нами было показано, что обработка клеток гетеротрофной суспензионной культуры либо растений арабидопсиса в темноте ингибитором митохондриального транспорта электронов антимицином А приводит к значительному повышению уровня транскриптов гена *gdh2* (Tarasenko *et al.*, 2009; Garnik *et al.*, 2013). Из этого следует, что в регуляции

экспрессии данного гена могут принимать участие ретроградные (в данном случае митохондриально-ядерные) сигналы, однако пока нельзя сказать, имеет ли отношение обнаруженный нами ранее феномен митохондриально-ядерной регуляции гена *gdh2* к регуляции светозависимых колебаний экспрессии генов глутаматдегидрогеназы.

Таким образом, в данной работе нами впервые показано, что светозависимая регуляция колебаний уровня транскриптов генов *gdh1* и *gdh2* арабидопсиса не опосредуется гексокиназой 1. Сахарозависимая репрессия данных генов, не связанная с НХК1, возможна, однако ее недостаточно для многократного снижения экспрессии, наблюдаемого при переносе растений из темноты на свет. Учитывая показанную нами ранее необходимость присутствия функциональных хлоропластов для снижения уровня транскриптов гена *gdh2* на свету (Garnik *et al.*, 2013), можно предполагать, что главную роль в обеспечении светозависимых изменений экспрессии данных генов играют регуляторные сигналы хлоропластно-ядерной природы.

ACKNOWLEDGMENT

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 12-04-01148-а и 14-44-04001 р_сибирь_а. В работе использовано оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) СО РАН при президиуме ИНЦ СО РАН.

REFERENCES

Garnik E.Yu., Belkov V.I., Tarasenko V.I., Potapova T.V., Korzun M.A., Konstantinov Yu.M. (2013)

- The expression of *Arabidopsis* glutamate dehydrogenase gene *gdh2* is induced under the influence of tetrapyrrole synthesis inhibitor norflurazon. *J. Stress Physiol. Biochem.*, **4**, 299-309.
- Hausler R., Heinrich L., Schmitz J., Flugge U.-I. (2014) How sugars might coordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities. *Molecular Plant*, **7**, 1121-1137.
- Hong S.M., Bahn S.C., Lyu A., Jung H.S., Ahn J.H. (2010) Identification and testing of superior reference genes for starting pool of transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1694-1706.
- Miyashita Y., Good A.G. (2008) NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *J. Exp. Bot.*, **59**, 667-680.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J. (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, **300(5617)**, 332-336.
- Murashige T., Skoog F. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Price J., Laxmi A., St. Martin S.K., Jang J.-C. (2004) Global transcription profiling reveals multiplier sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2128-2150.
- Ramon M., Rolland F., Sheen J. (2008) Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis Book*, **6:e0117** (doi: 10.1199/tab.0117).
- Rook F., Handingham A., Li Y., Bevan M.W. (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ.*, **29**, 426-434.
- Tarasenko V.I., Garnik E.Yu., Shmakov V.N., Konstantinov Yu.M. (2009) Induction of *Arabidopsis gdh2* gene expression during changes in redox state of the mitochondrial respiratory chain. *Biochemistry (Mosc.)*, **74(1)**, 47-53.
- Turano F., Thakkar S., Fang T., Weisemann J. (1997) Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **113**, 1329-1341.