

ORIGINAL ARTICLE

Regulation of Fumarate Hydratase Gene Expression in Green Maize Leaves Under Hypoxic Conditions

Fedorin D.N., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh, Russia

*E-Mail: bc366@bio.vsu.ru

Received June 9, 2017

The dynamics of fumarase activity in maize leaves under the conditions of different gas composition of the medium was studied. It is shown that under hypoxic conditions a decrease in this index of the enzyme under study is observed in comparison with normal conditions. It was found that in the environment of carbon dioxide and nitrogen two forms of the enzyme are observed, mitochondrial and cytoplasmic. The level of expression of *fum1* and *fum2* genes in green maize leaves was established in control and experimental samples. The dependence of the expression rate of fumarase genes in maize leaves is shown in different conditions of the gaseous medium.

Key words: hypoxia, isoenzyme, regulation, fumarate hydratase, expression

В настоящее время механизмы, лежащие в основе кратко- и долговременной устойчивости растений к анаэробным условиям, исследуются многими учеными. Они направлены на предотвращение цитоплазматического ацидоза, адекватную реакцию на стресс, обеспечение минимальной энергией для поддержания жизнедеятельности, модификации экспрессии генов и изменения метаболических путей с целью акклиматизации к низкому содержанию кислорода в среде (Vartapetian and Jackson, 1997).

В условиях гипоксии электронтранспортная цепь митохондрий претерпевает некоторые изменения: растения осуществляют поиск других альтернативных соединений, способных выступать в качестве конечного акцептора электронов. Цикл Кребса так же не является исключением, соответственно и его компоненты тем или иным образом реагируют на недостаток кислорода.

Фумараза (фумаратгидратаза, КФ 4.2.1.2) - это фермент, который занимает одно из ключевых положений в регуляции дыхания митохондрий, а так же выполняет важную роль в обеспечении взаимодействия клеточных органелл. Показано наличие двух изоформ фумаразы в условиях нормального функционирования растительного организма. Так, форма, локализованная в митохондриях, является компонентом цикла Кребса и катализирует реакцию превращения фумарата в L-малат, то есть принимает участие в дыхательном метаболизме, в то время как цитоплазматическая выполняет целый ряд своих функций. Сообщается, что цитозольная форма фумаразы участвует в глюконеогенезе, поставляя малат в качестве субстрата, который метаболизируется в универсальное соединение пировиноградную кислоту (ПВК), а также выполняет функцию по утилизации сукцината, поступающего из глиоксилатного цикла (Eprintsev *et al.*, 2014). Данный фермент у некоторых организмов кодируется 2 генами *fum 1* и *fum2*, в клетке представлен в цитозольной и митохондриальной форме. В роли митохондриального фермента он катализирует одну из стадий цикла: реакцию превращения фумарата в

малат, а в цитозоле ему предписывают несколько функций: непосредственное участие в метаболизме азота и утилизация фумарата, образующегося в реакции, катализируемой аргининсукцинатлиазой, находящейся в цитозоле или пластидах (Taylor and Stewart, 1981). В связи с тем, что недостаток кислорода оказывает существенное влияние на обмен веществ в клетке, а фумаратгидратаза является важным участником метаболизма растений, целью нашей работы являлось изучить механизмы изменения активности фумаратгидратазы в зеленых листьях кукурузы в условиях гипоксии.

MATERIALS AND METHODS

В качестве объекта исследования были выбраны 14-дневные растения кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Воронежская 76, выращенные гидропонным методом при температуре 25°C и 12-часовом световом дне.

Растения перед постановкой опыта в течение суток выдерживали в темноте. Затем помещали на 24 часа в изолированные от поступления света вакуум-эксикаторы объемом 5 литров, через которые пропускались различные газовые среды – воздух, углекислый газ и азот. Скорость поступления газа составила 17 см³/сек по разработанной ранее методике. По сертификату присутствие O₂ в баллоне с азотом составляло не более 0,5 %, следовательно, используемые в опытах условия можно считать гипоксическими.

Активность фумаратгидратазы определяли спектрофотометрическим методом на СФ 2000 при длине волны 240 нм (Eprintsev *et al.*, 2014).

Электрофоретические исследования проводили по методу Дэвис (Davis, 1994). Специфическое проявление осуществляли тетразолиевым методом (Eprintsev *et al.*, 2014).

При выделении РНК из зеленых листьев кукурузы использовался метод гуанидин-тиоционат-фенол-хлороформной экстракции (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Обратная транскрипция осуществлялась при помощи набора AmpliSence (Хеликон, Россия) согласно инструкции производителя.

Количественную ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler96 (Roche, Швейцария), краситель, применяемый в работе - SYBR Green I. В качестве праймеров, подобранных с помощью программного обеспечения Primer3, использовали нуклеотидные последовательности: к гену *fum 1*: прямой – 5' -gattactcgcattgaggt-3', обратный 5' -accagaactcgcggtatgtggc-3'; к гену *fum 2*: прямой – 5'-acaactgcccattcgtcacc-3', обратный – 5'-tggtcattctcaggcagaga-3'. Параметры проводимой амплификации: денатурация 95°C – 5 мин., после чего цикл: 95°C – 30 сек., 60°C – 30 сек., 72°C – 30 сек. (детекция), финальная элонгация - 72°C – 10 мин.

Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев. Обсуждали статистически достоверные различия при $p < 0,05$ (Лакин, 1990).

RESULTS

В ходе исследования по влиянию гипоксии на растения кукурузы показано, что в нормальных условиях активность фумаразы на протяжении всего эксперимента была наиболее стабильна. К 3 часам экспозиции она составила 15,54 Е/г.с.м. По прошествии 6 часов активность данного фермента установилась на значении 16, 13 Е/г.с.м., а к окончанию опыта составляла 16,1 Е/г.с.м. Результаты влияния гипоксии на функционирование фумаратгидратазы в листьях кукурузы представлены на рисунке 1. Из графика видно, что в течение 24 часов эксперимента наблюдалось изменение активности исследуемого фермента.

Установлено, что максимальное значение активности ФГ наблюдается при экспозиции растений в течение 3ч в атмосфере углекислого газа и составляет 26,3 Е/г.с.м., однако к 6 часам экспозиции данный показатель резко снизился до значения в 12,28 Е/г.с.м. Через 24ч инкубации в среде CO₂ достигалось наименьшее значение скорости функционирования фумаразы и составляло 7,75 Е/г.с.м.

В атмосфере азота наблюдался иной характер зависимости активности фумаразы от времени инкубации растений. В течение первых шести часов

экспозиции активность исследуемого фермента изменялась незначительно и составляла от 13,7 Е/г.с.м. до значения 15,3 Е/г.с.м. Однако, к 24ч эксперимента скорость функционирования фумаратгидратазы снизилась практически вдвое и составила 8,67 Е/г.с.м.. При этом, данное значение было выше, чем данный показатель в атмосфере углекислого газа.

Анализ полученных нами данных позволил выявить наличие двух активных изоформ фермента в листьях кукурузы во всех экспериментальных условиях (рис. 2). Предположительно, форма фумаразы с $R_i=0,51$ митохондриальная, а форма с $R_i=0,41$ цитоплазматическая. Эти данные подтверждают ранее установленное наличие двух функционально важных изоформ ФГ - митохондриальной и цитоплазматической (Eprintsev *et al.*, 2014).

Проведенный анализ образцов кДНК из кукурузы с праймерами к гену *fum1* в условиях нормы и гипоксии позволил установить, что в растениях, находящихся в кислородной среде, относительная концентрация мРНК исследуемого гена практически не изменялась на протяжении 24 часов инкубации, оставаясь на уровне 4,5-4,7 относительных единиц. Значительно большее разнообразие для данного показателя было обнаружено в растениях, находящихся в условиях углекислого газа. К 3 часу экспозиции уровень транскриптов гена *fum1* увеличился относительно контрольной точки (0 часов экспозиции) в 1,47 раза, после чего в последующие часы наблюдалось резкое снижение величины исследуемого показателя. К 24 часам инкубации в среде углекислого газа значение относительной транскрипции гена *fum1* составляло 0,3 относительные единицы. Аналогичная ситуация наблюдается при инкубации растений в условиях азота. Интенсивность транскрипции гена *fum1* в первые 3 часа увеличилась на 1,48 раза, но в последующем так же, уровень относительной транскрипции снижался до значения 1,1 отн. ед. (рис. 3).

Полученные результаты по влиянию углекислого газа и азота на уровень транскрипции гена *fum2*

фумаратгидратазы в листьях кукурузы свидетельствуют, что в нормальных условиях не происходит изменения в концентрации транскриптов данного гена. Углекислый газ и азот вызывают изменения в работе генетического аппарата клетки, приводящие к уменьшению количества мРНК *fum2* в клетках растений. Значительно выраженный эффект наблюдается в условиях азота, что проявляется в резком снижении скорости транскрипции гена *fum2*

уже к 3 часу эксперимента (рис. 4). Уровень относительной транскрипции для исследуемого гена на 3 час инкубации составил 9,1 отн. ед., что в 1,91 раза меньше контроля. Аналогичный эффект на экспрессию гена *fum2* оказывает действие углекислого газа, однако скорость изменения данного показателя значительно меньше по сравнению с влиянием азота.

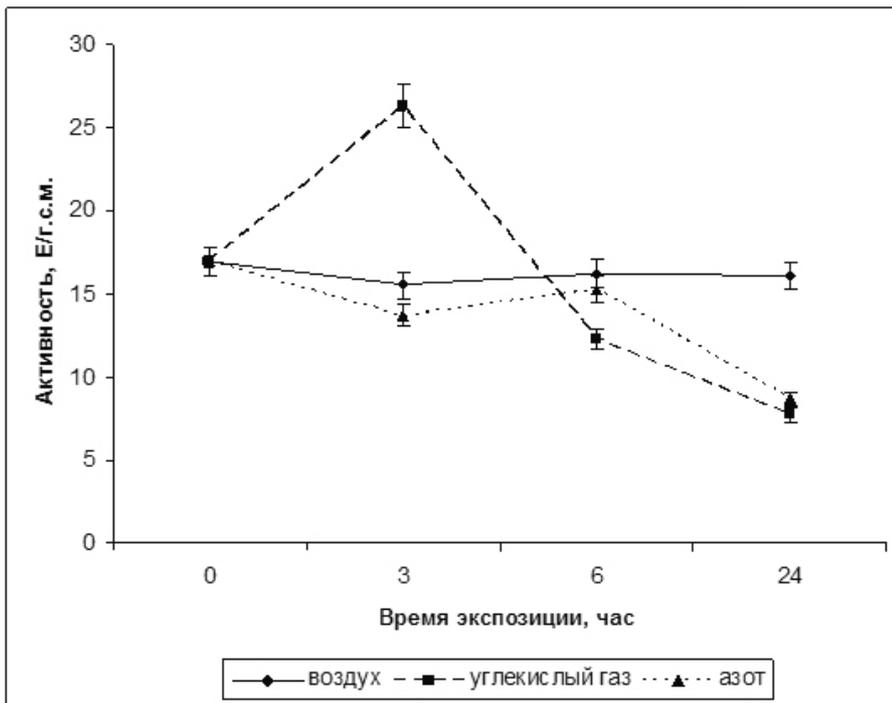


Figure 1. Динамика активности фумаратгидратазы в листьях кукурузы в условиях различной газовой среды.

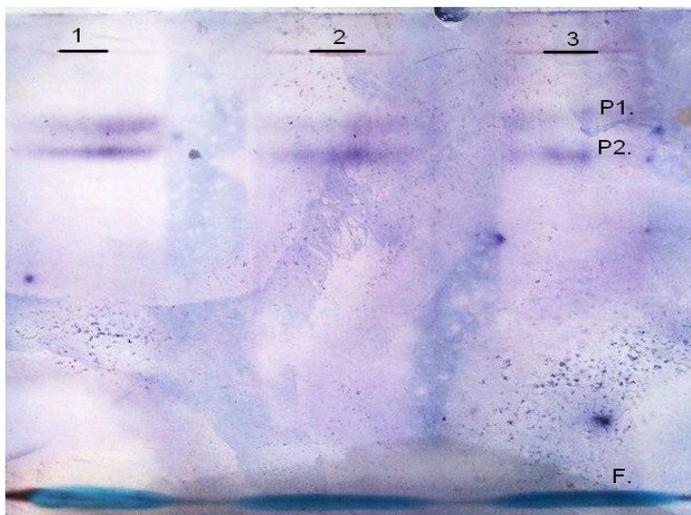


Figure 2. Типичная электрофореграмма изоферментного состава фумаратгидратазы в листьях кукурузы.

1-атмосфера CO_2 ,
 2-атмосфера N_2 ,
 3-атмосфера воздуха.
 P1, P2 – белковые полосы,
 F – фронт красителя бромфенолового синего.

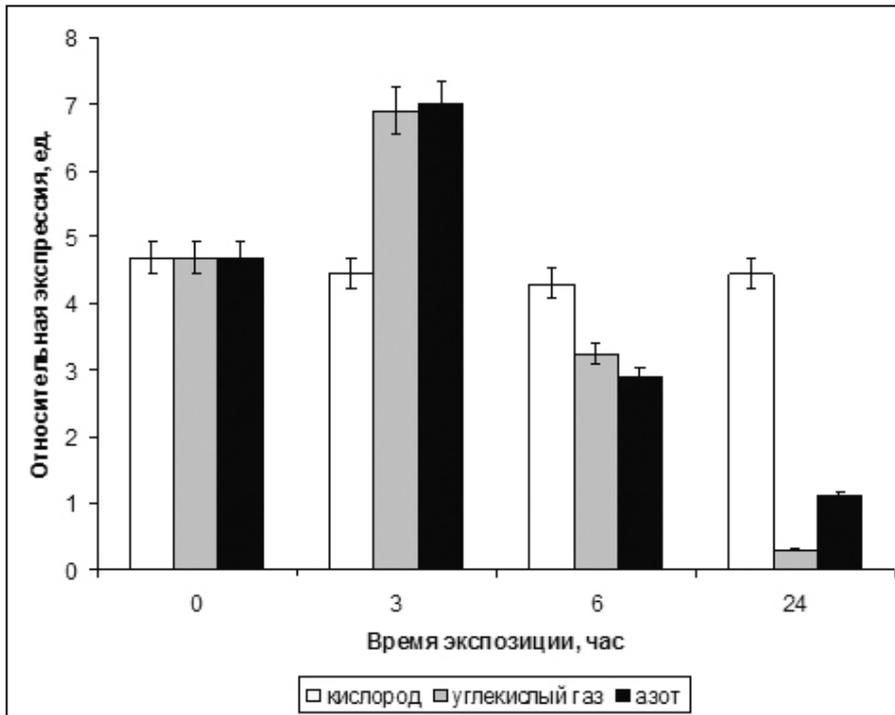


Figure 3. Относительный уровень транскрипции гена *fum1* в листьях кукурузы в разных экспериментальных условиях. Значения экспрессии гена рассчитывались относительно уровня экспрессии гена фактора элонгации *ef-1a* методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

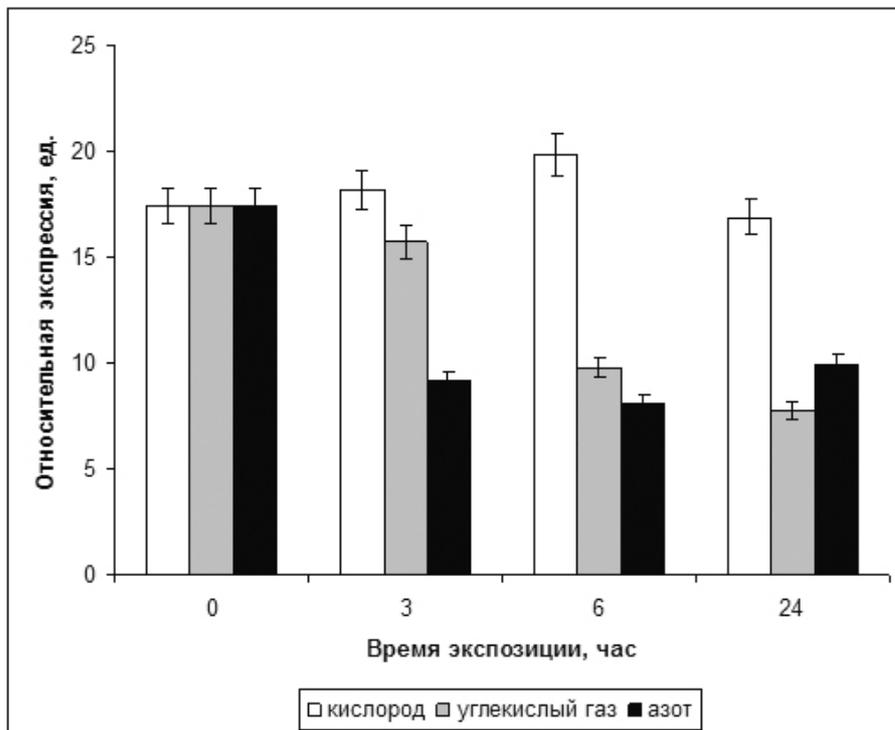


Figure 4. Относительный уровень транскрипции гена *fum2* в листьях кукурузы в разных экспериментальных условиях. Значения экспрессии гена рассчитывались относительно уровня экспрессии гена фактора элонгации *ef-1a* методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

DISCUSSION

С целью изучения действия стрессовых условий на активность фумаратгидратазы проводили исследования в различных газовых средах: в среде азота и в среде углекислого газа. Полученные данные по динамике активности фумаратгидратазы в

зеленых листьях кукурузы в условиях гипоксии свидетельствуют об ингибировании митохондриального дыхания. Возрастание активности фермента в первые часы в условиях углекислого газа, вероятно, связано с необходимостью мобилизации всех обменных процессов для адаптации к стрессовым условиям.

Компенсаторные перестройки дыхательного метаболизма при недостатке кислорода в значительной степени отражают использование сформированных систем гликолиза и пентозофосфатного пути окисления глюкозы, поставляющих АТФ, достаточно большое количество промежуточных веществ для биосинтеза и биологических восстановителей (Чиркова, 2002).

Избыток углекислого газа может влиять на синтез белковых молекул, рост организма, активировать или угнетать те или иные физиологические процессы (Bown and Lampmann, 1972). Отмечено, что повышение содержания CO₂ в окружающей атмосфере способно снижать дыхание растения, а так же изменять проницаемость мембраны клеток и, как следствие, снижать поглощение воды (Ракитина, 1978).

Резкое повышение активности исследуемого фермента в начале эксперимента может быть объяснено действием диоксида углерода как специфического стрессового фактора, способствующего мобилизации всех обменных процессов, однако при более длительном воздействии потенциал организма иссякает. По-видимому, активация дыхательного метаболизма в клетках листа компенсирует дефицит НАДФН, АТФ и продуктов обмена и одновременно при непродолжительной гипоксии вызывает усиление фотосинтетической активности и стабилизацию первичных фотохимических реакций, локализованных в хлоропластах, что обеспечивает, наряду с другими защитными реакциями, устойчивость растений к гипоксии (Войцековская *и др.*, 2007).

Как известно, одним из возможных поставщиков АТФ является дыхательный метаболизм, неотъемлемая часть которого электронтранспортная цепь, для которой в аэробных условиях конечным акцептором электронов является кислород. В том случае, когда доступ к кислороду затруднен, синтез энергетических эквивалентов происходит преимущественно в реакциях спиртового и молочнокислого брожения, однако данная стратегия способна обеспечивать организм энергией весьма

недолговременно. В настоящее время рассматривают другой механизм, помогающий выживать растениям в условиях гипоксии - это использование NO в качестве промежуточного акцептора электронов, способствующего окислению NADH, которое достигается в реакции образования NO и его последующего окисления обратно в нитраты (Igamberdiev and Hill, 2008).

Сукцинат - важный метаболит, который выделяется при гипоксии, накапливается во всходах рассады и в клетках водорослей (Vanlerberghe and Turpin, 1990; Vanlerberghe *et al.*, 1989), подвергнутых дефициту O₂, в результате частичной операции цикла трикарбоновых кислот в обратном направлении. Полученные нами данные согласуются с данной теорией, поскольку накопление сукцината может являться следствием низкой активности сукцинатдегидрогеназы, окисляющей последний до фумаровой кислоты. При этом недостаток субстрата для фумаразы проявляется в снижении ее активности по истечении 6 часов инкубации.

Поскольку специфическое проявление фумаразы в листьях кукурузы в условиях различной газовой среды показало однородность изоферментного состава, мы можем сделать вывод о том, что изменение активности фумаратгидратазы не связано с изменением количества изоформ.

Полученные результаты по влиянию газовой среды на уровень транскрипции генов фумаразы в листьях кукурузы свидетельствуют, что углекислый газ и азот вызывают уменьшение количества мРНК генов *fum1* и *fum2*. Для исследуемых генов экспрессия была стабильна на протяжении всего эксперимента в кислородсодержащей среде. В условиях углекислого газа уровень их транскриптов имел дифференциальный характер. Активность гена *fum2* снижалась на протяжении всего эксперимента, а для *fum1* характерно увеличение экспрессии на 3 день экспозиции растений. Полученные данные по уровню транскриптов генов фумаратгидратазы коррелируют с изменением ее активности в условиях гипоксии, что, вероятно, свидетельствует об их регуляции в условиях гипоксии за счет изменения скорости

транскрипции.

ACKNOWLEDGEMENTS

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 14-14-00721.

REFERENCES

- Bown A.W., Lampmann W.W. (1972) The influence of carbon dioxide on protein synthesis in ethiolated coleoptiles of *Avena sativa*. *Canad. J. Bot.*, **50(9)**, 1937-1942.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Singlestep-method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159.
- Davis B.J. (1994) Disc electrophoresis II Method and Application to Human Serum Protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **121**, 404-427.
- Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Starinina E.V., Igamberdiev A.U. (2014) Expression and properties of the mitochondrial and cytosolic forms of fumarase in germinating maize seeds. *Physiologia Plantarum*, **152**, 231-240.
- Igamberdiev A.U., Hill R.D. (2008) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Annals of Botany*, **103**, 259-268.
- Taylor A.A., Stewart G.R. (1981) Tissue and subcellular localization of enzymes of arginine metabolism in *Pisum sativum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1281–1289.
- Vanlerberghe G.C., Horsey A.K., Weger H.G., Turpin D.H. (1989) Anaerobic Carbon Metabolism by the Tricarboxylic Acid Cycle : Evidence for Partial Oxidative and Reductive Pathways during Dark Ammonium Assimilation. *Plant Physiol.*, **91(4)**, 1551-1557.
- Vanlerberghe G.C., Turpin D.H. (1990) Anaerobic Metabolism in the N-Limited Green Alga *Selenastrum minutum*: II. Assimilation of Ammonium by Anaerobic Cells. *Plant Physiol*, **94(3)**, 1124-1130.
- Vartapetian B., Jackson M. (1997) Plant Adaptations to Anaerobic Stress. *Annals of Botany*, **79**, 3-20.
- Войцекская С.А., Астафурова Т.П., Верхотурова Г.С., Зайцева Т.А. (2007) Активность некоторых ключевых ферментов метаболизма в зеленых проростках ячменя при гипобарической гипоксии. *Вестник Томского государственного университета*, **297**, 181-183.
- Лакин Г.Ф. (1990) *Биометрия*. М.: Высш. шк., 351 с.
- Ракитина В.Г. (1978) Нарушение нормального газообмена растений – фактор, препятствующий защитному действию сахаров и глицерина. *Физиология растений*, **25(3)**, 584-591.
- Чиркова Т.В. (2002) *Физиологические основы устойчивости растений*. СПб.: Изд-во СПб. Ун-та, 244 с.