

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ТРАНСДУКЦИИ СВЕТОВОГО СИГНАЛА, РЕГУЛИРУЮЩЕГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА КРЕБСА В КУКУРУЗЕ

Д.Н. Федорин, М.О. Гатаулина, М.В. Черкасских, А.Т. Епринцев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, bc366@bio.vsu.ru

Аннотация. Показана зависимость скорости функционирования аконитатгидратазы, фумаратгидратазы и малатдегидрогеназы от действия света разной длины волны на кукурузу. Красный свет снижает скорость функционирования митохондриальных форм исследуемых энзимов, а для цитоплазматических выявлен противоположный эффект. Криптохромная система также вызывает угнетение работы митохондриальных изоферментов. Установлено, что регуляция функционирования аконитазы, фумаразы и малатдегидрогеназы в листьях кукурузы контролируется внутриядерными транскрипционными факторами PIF и COP1.

Ключевые слова: аконитатгидратаза, фумаратгидратаза, малатдегидрогеназа, регуляция, транскрипционные фактор

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-773-776

Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) играет важную роль в энергетическом метаболизме всех аэробных организмов. Углеводы различной природы метаболизируются в ацетил-КоА, который окисляется в ЦТК с высвобождением энергии, конвертируемой в АТФ в результате работы электронтранспортной цепи митохондрий. Однако, помимо этого цикл Кребса синтезирует интермедиаты для биосинтетических процессов, например аспартата [Igamberdiev, 2016]. В растениях регулирование цикла Кребса и митохондриального дыхания в целом более сложный процесс, чем у других гетеротрофных организмов, поскольку метаболизм митохондрий растения должен быть соотнесен с такими процессами как фотосинтез, ассимиляция углерода в цикле Кальвина, фотодыхании, ассимиляции азота, и диссипация избыточной энергии [Araujo, 2012; Schwarzlender, 2013].

Координация митохондриальных и хлоропластных функций ранее была показана на растениях томата, мутантных по различным генам митохондриальных ферментов [Nunes-Nesi, 2011]. Однако, мало исследований по механизмам регуляции ферментов ЦТК, обеспечивающим координацию работы хлоропластов и митохондрий [Nunes-Nesi, 2013].

В связи с этим целью данной работы являлось изучение регуляции функционирования ферментов цикла Кребса на генетическом уровне, что может выступать важным механизмом координации работы митохондрий и хлоропластов в фотосинтезирующих тканях растений. Важную роль в данном процессе могут играть специфические фоторецепторные системы растительной клетки, фитохромы и криптохромы.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служили зеленые листья кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные гидропонным способом при температуре 22°C в течение 14 дней. Различные условия светового режима создавали с помощью светодиодов с областью испускания 660 нм (КС), 730 нм (ДКС) и 465 нм (СС) с интенсивностью 0.044 Вт/м².

Уровень транскриптов определяли методом ПЦР в реальном времени с генспецифичными праймерами на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария), используя в качестве красителя SYBR Green I. Определение относительного уровня

экспрессии исследуемых генов проводили с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -метода.

Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев [Лакин, 1990].

Исследование уровня транскриптов генов цитозольной и митохондриальной форм фумаратгидратазы в листьях кукурузы показало зависимость данного параметра от условий освещения растений. Установлено, что ген *fum1*, кодирующий митохондриальную форму ФГ, имеет более высокий уровень транскриптов у растений в темноте по сравнению с растениями на свету и при действии красного света. При этом, для гена *fum2* характерен иной вид зависимости содержания транскриптов от светового режима растений. В условиях темноты уровень мРНК данного гена ниже, чем на свету и при облучении растений красным светом.

Изучение экспрессии гена другого митохондриального фермента, акониатгидратазы, участвующего в работе ЦТК, показало, что он также проявляет светозависимость. Содержание транскриптов гена *aco1* в условиях дневного света и при облучении растений красным светом было значительно ниже такового показателя в темноте. Также светозависимость характерна и для гена *aco2*, кодирующего цитоплазматическую форму фермента. При этом красный свет и дневной свет вызывают увеличение скорости накопления мРНК гена *aco2* в листьях кукурузы. В условиях темноты содержание транскриптов гена *aco2* уменьшалось в 3 раза по сравнению со светом.

Зависимость содержания мРНК митохондриальной формы МДГ от светового режима растений сходна с таковым показателем для генов *fum1* и *aco1*. В условиях темноты концентрация транскриптов гена *mdh-mt* выше их значений на свету и после облучения красным светом.

При исследовании влияния светового режима на работу генов митохондриальных и цитоплазматических форм фумаразы, аконитазы и малатдегидрогеназы установлено, что в значительной степени реагируют на изменение светового режима растений. Непосредственное участие в регуляции функционирования исследуемых ферментов принимает фитохромная система, поскольку специфично акцептирует свет длиной волны 660 и 730 нм. При облучении растений красным светом наблюдается снижение уровня транскриптов генов митохондриальных форм исследуемых ферментов по сравнению с растениями в темноте. Следовательно, активная форма фитохрома проявляет ингибирующее действие на функционирование генов митохондриальных форм исследуемых ферментов.

Исследование действия синего света на содержание транскриптов генов показало, что для генов митохондриальных форм исследуемых ферментов активная форма криптохрома является ингибитором. При этом наблюдается противоположный эффект для цитоплазматических форм ФГ, АГ и МДГ. Синий свет является активатором работы генов *fum2* и *aco2*, что проявляется в увеличении содержания их мРНК при облучении растений данным светом.

Для генов митохондриальной и пероксисомальной форм МДГ установлено отсутствие зависимости содержания их мРНК от состояния криптохромной системы.

Анализ содержания свободных катионов кальция в листьях кукурузы показал, что изменение их концентрации в ядрах листьев кукурузы связано с изменением светового режима растений. Следовательно, кальций выступает вторичным внутриклеточным мессенджером фоторецепторного сигнала [Kim, 2009]. При этом установлено, что кальций участвует в трансдукции фитохромного сигнала, но не криптохромного, что проявляется в увеличении его концентрации в ядрах клеток листьев кукурузы после облучения растений красным светом.

Исследование уровня транскриптов рецептор-специфичных внутриядерных факторов транскрипции PIF3 и COP1, ответственных за реализацию фитохромного и криптохромного сигналов, соответственно [Zuo, 2011; Oh, 2009], показало зависимость данного показателя от условий освещения. Активная форма фитохрома увеличивает содержания транскрипционного фактора PIF3, что имеет определенную корреляцию с содержанием мРНК генов *fum1*, *fum2*, *aco1*, *aco2*, *mdh-mt* и *mdh-per*. Действие синего света на растения кукурузы проявляется в увеличение экспрессии гена *cop1* и его субклеточном перераспределении (рисунок). В условиях дневного света и при облучении растений синим светом COP1 накапливается в цитозоле, но в темноте его содержание увеличивается в ядрах [Von Arnim, 1994]. Увеличение содержания COP1 в ядрах приводит к его более активному взаимодействию с фактором HY5 вызывая деградации последнего [Osterlund, 2000], и уменьшению воздействия на специфический участок G-box светозависимых генов [Zhang, 2011; Yang, 2005].

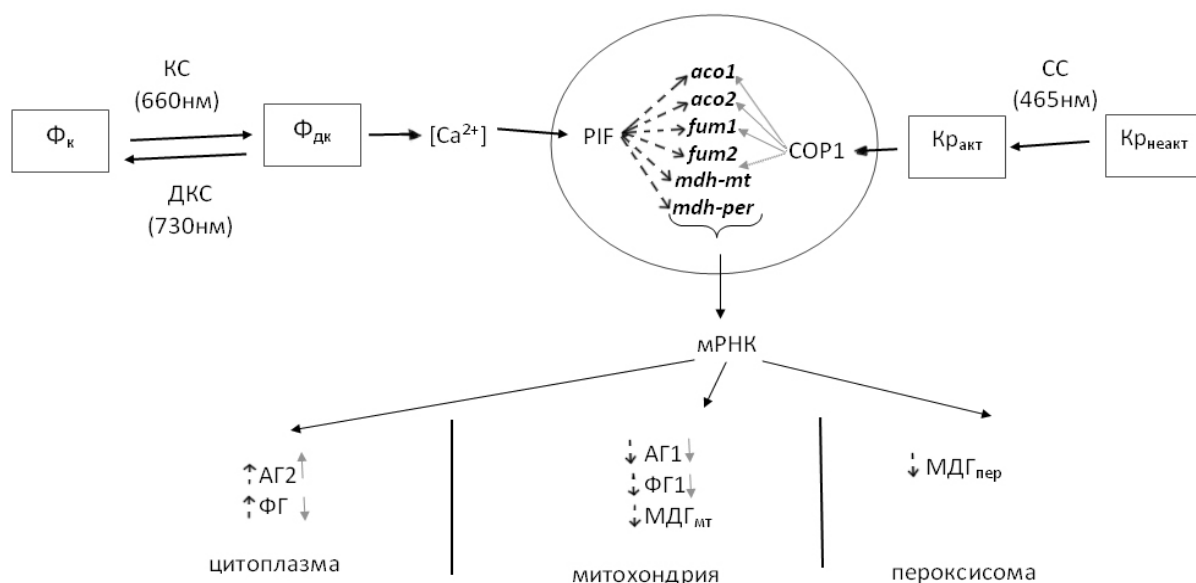


Рисунок. Гипотетическая схема регуляции функционирования молекулярных форм аконитатгидратазы, фумаратгидратазы и малатдегидрогеназы в зеленых листьях растений и механизм трансдукции сигнала от фитохромной и криптохромной систем. Условные обозначения: Φ_k – неактивная форма фитохрома, Φ_{dk} – активная форма фитохрома, $Kp_{акт}$ – активная форма криптохрома, $Kp_{неакт}$ – неактивная форма криптохрома, АГ – аконитатгидратаза, ФГ – фумаратгидратаза, МДГ – малатдегидрогеназа. Пунктирная линия - активация или ингибирование посредством фитохромной системы, сплошная линия - активация или ингибирование посредством криптохромной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, грант №17-04-01039).

Литература

- Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 351с.
 Araujo W.L., Tunes-nesi A., Tikoloski Z., Sweetlove L.J., Fernie, A.R. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues // Plant Cell Environ. – 2012. – V. 35. – P. 1–21.
 Igamberdiev A.U., Eprintsev A.T. Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants // Front Plant Sci. – 2016. - V. 7. 1042. – doi: 10.3389/fpls.2016.01042.

Kim M.C., Chung W.S., Yun D.J., Cho M.J. Calcium and Calmodulin-Mediated Regulation of Gene Expression in Plants // *Molecular Plant*. – 2009. - V. 1. – P. 13–21.

Nunes-Nesi A., Araujo W.L., Fernie A.R. Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis // *Plant Physiol*. – 2011. – V. 155. – P. 101–107.

Nunes-Nesi A., Araujo W.L., Obata T., Fernie A.R. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle // *Curr. Opin. Plant Biol*. – 2013. – V. 16. – P. 335–343.

Oh E., Kang H., Yamaguchi S., Park J., Lee D., Kamiya Y., Choi G. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. – 2009. – V. 21. – P. 403–419.

Osterlund M.T., Hardtke C.S., Wei N., Deng X.W. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis* // *Nature*. - 2000. – V. 405. – P. 462–466.

Schwarzlander M., Finkemeier I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – V. 18. – P. 2122–2144.

Von Arnim A.G., Deng X.W. Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis* // *Cell*. – 1994. – V. 79. – P. 1035–1045.

Yang J., Lin R., Sullivan J., Hoecker U., Liu B., Xu L., Deng X. W., Wang H. Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. – 2005. – V. 17. – P. 804–821.

Zhang H., He H., Wang X., Wang X., Yang X., Li L., Deng X.W. Genome-wide mapping of the HY5-mediated gene networks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation // *Plant J*. – 2011. – V. 65, No. 3. – P. 346–358.

Zuo Z., Liu H., Liu B., Liu X., Lin C. *Arabidopsis* cryptochrome 2 undergoes blue light-dependent interaction with the SPA1–COP1 complex to regulate floral initiation in plants // *Curr Biol*. – 2011. – V. 21, No. 10. – P. 841–847.

THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTORS IN THE TRANSFORMATION OF THE LIGHT SIGNAL, REGULATING THE FUNCTIONING OF CROSS CYCLE IN CORN

D.N. Fedorin, M.O. Gataullina, M.V. Cherkasskikh, A.T. Eprintsev

Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, bc366@bio.vsu.ru

Abstract. The dependence of the rate of functioning of aconitate hydratase, fumarate hydratase and malate dehydrogenase on the effect of light of different wavelengths on maize is shown. Red light reduces the speed of functioning of the mitochondrial forms of the enzymes studied, and for cytoplasmic the opposite effect is revealed. The cryptochromic system also causes oppression of the mitochondrial isoenzymes. It was found that the regulation of the functioning of aconitase, fumarase and malate dehydrogenase in maize leaves is controlled by the intranuclear transcription factors PIF and COP1.

Keywords: *aconitate hydratase, fumarate hydratase, malate dehydrogenase, regulation, transcription factor*