

***Brachypodium distachyon* Bitkisinin Vegetativ Toxumalarında FEPK-aza Fermentinin Gen Ekspressiyasının Və Zülal Miqdarının Dəyişməsinin Tədqiqi**

Ş.M. Bayramov*, N.M. Guliyev

AMEA-nın Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Mətbuat prospekti, 2A, Bakı AZ1073, Azərbaycan; *E-mail: shahniyarb@yahoo.com

***Brachypodium distachyon* genomunda olan fosfoenolpirüvat karboksilaza (FEPK-aza) fermentinin izoformasının gen ekspressiyasını və bitki tip PEPK-aza polipeptidlərinin zülal miqdarının dəyişmə dinamikası tədqiq olunmuşdur. Umminoblotinq metodu ilə aparılmış experimentlər göstərmişdir ki, ən çox zülalı ekspressiya olunan bənd Brppc1 genin ekspressiya məhsuluna uyğun gəlir. Lakin duz və su stressi zamanı FEPK-azanın bakterial və bitki izoformalarında gen ekspressiyasının dəyişməsi fərqli olur. Quraqlıq stressinə məruz qalmış yetkin bitkilərin yaşlı yarpaqlarda FEPK-azanın hər iki polipeptidinin miqdarının artması görünür həmin yarpaqlarda üzvi azotun və karbonun yenidən mobilizasiyası ilə bağlıdır.**

Acar sözlər: *B. distachyon*, fosfoenolpirüvat karboksilaza, gen ekspressiya, zülal miqdarı, abiotik stress

GİRİŞ

Fosfoenolpirüvat karboksilaza (FEPK-aza) fermenti bitkilərdə karbon və azot metabolizmində mühüm rol oynayaraq fosfoenolpirüvatın (FEP) dönməyən karboksilləşmə reaksiyasını kataliz etməklə onu oksalasetata (OAA) çevirir (Chollet et al., 1996). Bitki FEPK-azaları hüceyrənin sitoplazmasında fəaliyyət göstərərək bitkinin inkişafı dövründə müxtəlif fizioloji funksiyaları yerinə yetirirlər. C₄ və KAM (crassulacean acid metabolism) bitkilərdə CO₂ qazının ilkin fiksasiyasında mühüm rol oynaması ilə əlaqədar olaraq FEPK-aza bu bitkilərdə intensiv tədqiq edilmişdir (Huppe, Turpin 1994; Chollet et al., 1996; Alvarez et al., 2011; O'Leary et al., 2011). FEPK-aza fermenti aktiv formada homotetramer olaraq dörd homoloji, molekul çəkili 95-110 kDa arasında dəyişən subvahidlərdən təşkil olunmuşdur. Bitkilərdə FEPK-azanı kodlaşdıran genlər yüksək dərəcədə konservativ struktura malikdirlər (Sánchez et al., 2003). FEPK-aza fermenti faktiki olaraq C₃ bitkilərin bütün orqanlarında mövcuddur və onun genləri toxumalara görə spesifik ekspressiya nümayiş etdirir. Lakin C₃ bitkilərdə FEPK-azanın funksiyaları və xassələri hələ tam aydınlaşdırılmamışdır. Bundan başqa, qeyri-fotosintetik FEPK-azalar substrata-FEP-ə görə fotosintetik FEPK-azalardan fərqli katalitik xassələr nümayiş etdirirlər (O'Leary et al., 2011). Duz və quraqlıq stressi zamanı FEPK-aza aktivliyinin artmasının adaptasiya üçün nə kimi əhəmiyyətə malik olduğu hələ də tam aydın deyil. Bu tədqiqat işinin əsas məqsədi mülayim qurşaqlarda yetişdirilən mədəni taxıllar üçün model bitki olan *B. distachyon*-da FEPK-aza fermentinin bəzi izoformalarının gen ekspressiyasının və zülal miqdarının bitkinin vegetativ orqanlarında dəyişmə dinamikasının tədqiqindən ibarət olmuşdur.

MATERIAL VƏ METODLAR

Əkin materialı kimi istifadə olunan *B. distachyon* Bd21 ekotipinin toxumları strelizə edilmiş Petri diskələrində cücərmənin sinkronlaşdırılması üçün 4°C temperaturda 2 gün müddətində inkubasiya edilmişdir. Sonra toxumlar steril şəraitdə otaq temperaturuna keçirilərək cücərməyə qoyulmuşdur. Yetkin bitkiləri yetişdirmək üçün ətraf mühitin parametrlərinə nəzarət edilən təbii və süni işıq sistemlərindən istifadə olunmuşdur. 16/8 saat işıq-qaranlıq fotoperiodunda temperatur 25/18 °C olmaqla əlavə işıqlandırmadan istifadə edilmişdir. Gündüz zamanı işıqlandırma 400 µmol photon m⁻²s⁻¹ və işıqlandırma vaxtı nisbi rütübət 60-70% arasında saxlanılmışdır.

Bitki tip FEPK-azanın izoformalarının gen ekspressiyasının RT-PCR və zülal miqdarının tədqiqi immunoblotinq metodu ilə aparılmışdır. Denaturasiyaedici poliakrilamid gel elektroforezi (SDS-PAAG) Laemmli metoduna əsasən həyata keçirilmişdir (Laemmli et al., 1970). FEPK-nın öyrənilən hər üç geninin mRNT əsasında dizayn olunmuş prайmerlərlərindən istifadə olunmuşdur. Bitki ekstraktlarında həll olan zülalın miqdarı Bradford üsulu ilə təyin olunmuşdur (Bradford et al., 1976).

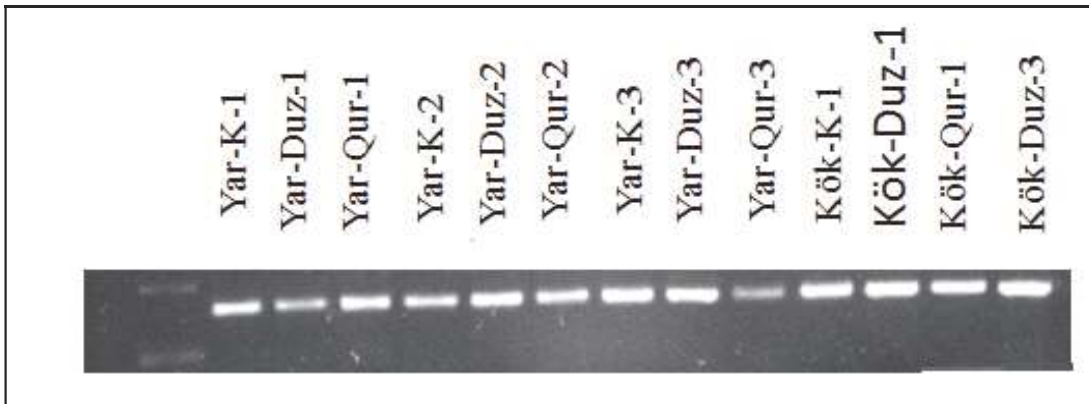
NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

B. distachyon genomunda FEPK-aza fermentinin gen ardıcılıqları *Arabidopsis* genomunda olan 4 PEPK-aza gen ardıcılıqlarına əsasən Blast programının köməyi ilə aşkarlanmışdır. Bu axtarış nəticəsində *B. distachyon* genomunda həmin genlərə uyğun olan PEPK-azanın üç müxtəlif geninin olması

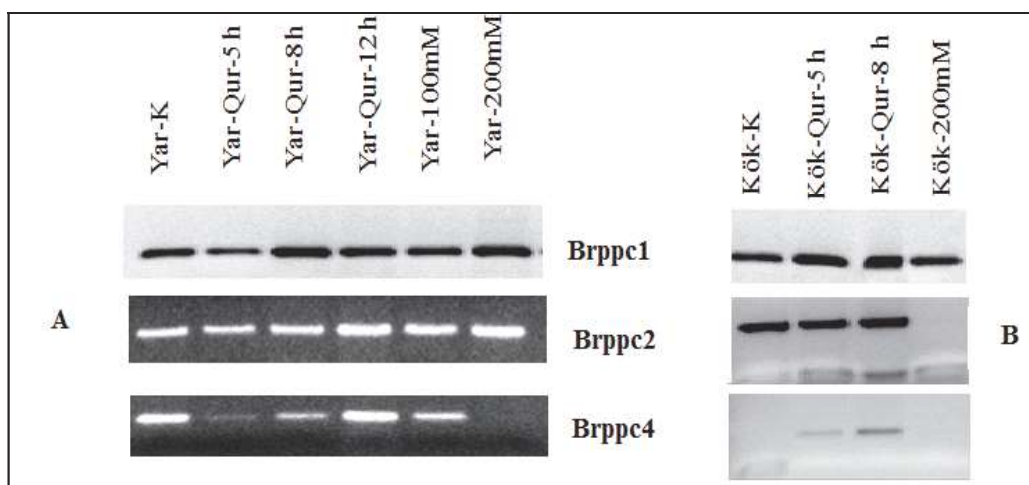
müəyyən edilmişdir. Bu genlərdən ikisi mRNT-sinin nukleotid ardıcılığına görə bir-biri ilə çox yaxın olmaqla 90 faizdən çox homolojiya təşkil etsə də, digər izoformanın gen ardıcılığının daha çox son zamanlarda ali bitkilərdə aşkarlanmış FEPK-aza fermentinin bakterial tipinə aid olduğu müəyyən edilmişdir. Buna görə də, şərti olaraq Brppc1 və Brppc2 adlandırılmış genlərin bitki tip və Brppc4 adlandırılan genin isə bakterial tip izoformanı kodlaşdırdığı güman edilmişdir. Hər üç genin mRNT-si əsasında dizayın edilmiş praymerlər vasitəsilə *B. distachyon* bitkisinin müxtəlif orqan və toxmalarda və eləcə də ilkin cücərtildə müxtəlif inkişaf mərhələlərində bu genlərin ekspressiyası və zülal miqdarının dəyişmə dinamikası tədqiq olunmuşdur. *B. distachyon* bitkisinin ilkin cücərtilərinin yarpaq və köklərində Brppc1 geninin ekspressiyası su və duz stresinin təsirindən asılı olaraq müxtəlif dəyişir (Şəkil 1). 24 saat 50 mM NaCl duzu konsentrasiyasına keçirilmiş ilkin cücərtilərin yaşıl yarpaqlarında Brppc1 geninin ekspressiyası azalsa da, sonrakı iki gün ərzində artaraq normal şəraitdə olan cücərtildəki səviyyəyə yaxınlaşmışdır. Tədricən quraqlıq stresinə məruz qalmış cücərtilərin yarpaqlarında isə əksinə stresin ilk günü Brppc1 geninin ekspressiyasının miqdarı dəyişməsə də, sonrakı iki gün ərzində onun səviyyəsi uyğun olaraq quraqlıq stresin davam etmə müddətindən asılı olaraq tədricən azalmışdır. Eləcə də, 50 mM NaCl təsirindən ilkin cücərtilərin gövdələrində Brppc1 geninin ekspressiyası normal suvarılan cücərtilərin gövdələri ilə müqayisədə artır. Tədricən quraqlıq və yaxud 50 mM NaCl stresinə məruz qalmış ilkin cücərtilərin köklərində isə Brppc1 geninin ekspressiyası normal suvarılan nümunələrlə müqayisədə demək olar ki, dəyişməz

qalır. Qısa müddətli kəskin quraqlıq stresinə məruz qalmış cücərtilərin ilkin yarpaqlarında Brppc1 geninin ekspressiyası ilk 5 saat müddətində azalsa da, sonrakı 8 və 12 saat müddətində artaraq normal cücərtildəki səviyyəyə yaxın olur (Şəkil 2A). *B. distachyon* bitkisinin ilkin cücərtilərinin köklərində isə onun ekspressiyası qısa müddətli kəskin quraqlıq və duz streslərinin təsirindən sonra dəyişməz qalır (Şəkil 2B). Bu nəticələr bir daha göstərir ki, quraqlıq stresinin müddətindən asılı olmayaraq ilkin cücərtilərin köklərində Brppc1 geninin ekspressiyası stabil qalır. Lakin Brppc1 genindən fərqli olaraq, qısa müddətli quraqlıq şəraitində və NaCl duzunun müxtəlif konsentrasiyalarında Brppc2 və Brppc4 genlərinin ekspressiyaları fərqli dəyişir (Şəkil 2 A,B).

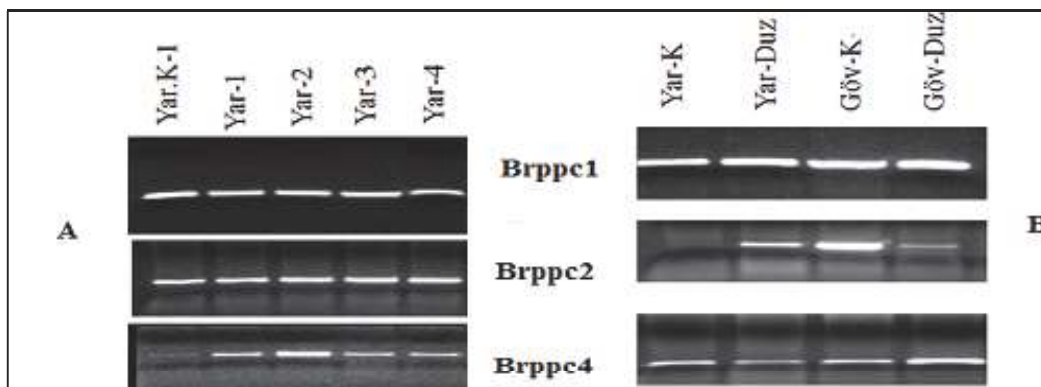
Belə ki, 100 və 200 mM NaCl konsentrasiyalarının təsirindən ilkin cücərtilərin yarpaqlarda Brppc2 geninin ekspressiyası artsa da, ilkin köklərdə əksinə kəskin azalır, lakin qısa müddətli kəskin quraqlıq zamanı və NaCl duzunun müxtəlif qatılıqlarında ilkin cücərtilərin yarpaqlarında elə də kəskin dəyişikliyə baş vermir. Brppc4 geninin ekspressiyası isə əksinə qısa müddətli kəskin quraqlıq stresinin ilk 5 və 8 saat müddətində yoxlanan nümunələrində kontrola nisbətən azalsa da, 12 saat strestən sonra artaraq onun səviyyəsi kontrola yaxın olmuşdur. Normal suvarılan ilkin cücərtilərin köklərində Brppc4 geni ekspressiya olunmasa da, kəskin quraqlıq stresinin təsirindən onun ekspressiyası induksiya olunur. Lakin kəskin quraqlıq stresindən fərqli olaraq, NaCl duzunun yüksək konsentrasiyasında *B. distachyon* n ilkin cücərtilərinin yarpaq və köklərində Brppc4 geninin ekspressiya kəskin azalır.



Şəkil 1. *B. distachyon* bitkisinin ilkin cücərtilərin yarpaqlarında (Yar-) və köklərində (Kök-) tədricən (1-3 gün müddətində) quraqlıq stresinin və NaCl duzunun (50 mM qatılığında) Brppc1 geninin ekspressiyasına təsiri.



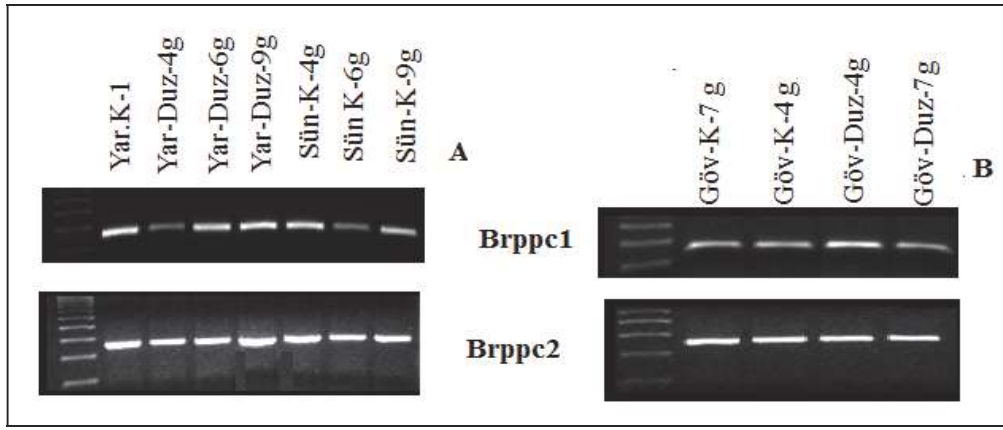
Şəkil 2. *B. distachyon* bitkisinin ilkin cücərtilərinin yarpaqlarında (Yar-) (A) və köklərində (Kök-) (B) qısa müddətli güclü quraqlıq stresinin və NaCl duzunun (100 və 200 mM qatılıqlarında) Brppc1, Brppc2 və Brppc4 genlərinin ekspressiyasına təsiri.



Şəkil 3. A) *B. distachyon* bitkisinin ilkin cücərtilərinin yarpaqlarında (Yar-) və gövdələrində (Göv-) NaCl duzunun 50 mM qatılığında və B) *B. distachyon* bitkisinin müxtəlif yarpaq yaruslarında Brppc1, Brppc2 və Brppc4 genlərinin ekspressiyasının dəyişmə dinamikası.

Tam yetişmiş *B. distachyon* bitkisinin müxtəlif yarpaq yaruslarında Brppc1 və Brppc2 genlərinin ekspressiyasının səviyyələri bir-biri ilə müqayisədə dəyişmir və onların ekspressiya intensivliyi bir-birinə yaxın olur. Lakin Brppc4 geninin ekspressiyası birinci yarpaqlarda zəif olsa da, ikinci və üçüncü yarpaqlarda bu səviyyə artır, dördüncü yarpaqlarda isə azalır (Şəkil 3 A). 7 gün duz stresinə məruz qalmış bitkilərin yarpaqlarında və gövdələrində hər üç genin ekspressiyası fərqli dəyişir. Brppc1 geninin ekspressiyası həm yarpaq və həm də gövdədə kontrol və duz stresinə məruz qalmış bitkilərdə eyni intensivlikdə dəyişir. Lakin həmin şəraitdə Brppc2 geninin ekspressiyası duz stresinin təsirindən bitkinin yarpaqlarında kontrola nisbətən artsa da, yaşıl gövdədə əksinə azalır. Duz stresinin təsirindən Brppc4 geninin ekspressiyası isə yarpaqlarda qismən azalsa da bitkinin gövdəsində artır (Şəkil 3B).

Torpaqda əkilmiş yetkin bitkilər tərkibində 100 mM NaCl duzu olan Hoaqland məhlulu ilə suvarılmışdır. Həmin bitkilərin yarpaq və yaşıl gövdələrindən vaxtdan asılı olaraq götürülmüş nümunələrdə Brppc1 və Brppc2 genlərinin ekspressiyalarının dəyişmə dinamikası öyrənilmişdir (Şəkil 4 A, B). Şəkil 3.16-dan görüldüyü kimi yetkin bitkilərin yarpaq və gövdələrində duz stresinin davam etmə müddətindən asılı olmayaraq Brppc2 geninin ekspressiyasında elə də əhəmiyyətli dəyişikliklər baş vermir. Yetkin yarpaqlarda duz stresinin təsirindən Brppc1 geninin ekspressiya səviyyəsi stresin 4-cü günü azalsa da, sonrakı günlərdə onun ekspressiyası artaraq kontrol yarpaqlardakı səviyyəyə yaxın olmuşdur. Lakin yarpaqlardan fərqli olaraq, kontrol və duz stresinə məruz qalmış bitkilərin gövdələrində demək olar ki, dəyişməmişdir (Şəkil 4 B). Normal şəraitdə yetişdirilən bitkilərin ilkin yaşıl sünbüllərində vaxtdan asılı olaraq hər iki genin ekspressiya səviyyələri oxşar dəyişir.



Şəkil 4. *B. distachyon* bitkisinin yarpaqlarında (Yar-) və yaşıl gövdələrində (Göv-) duz stresi (NaCl-in 100 mM qatılığında) və normal şəraitdə yetişdirilən bitkilərin yaşıl sünbüllərində (Sün-) vaxtdan asılı olaraq Brppc1 və Brppc2 genlərinin ekspresiyasının dəyişmə dinamikası.

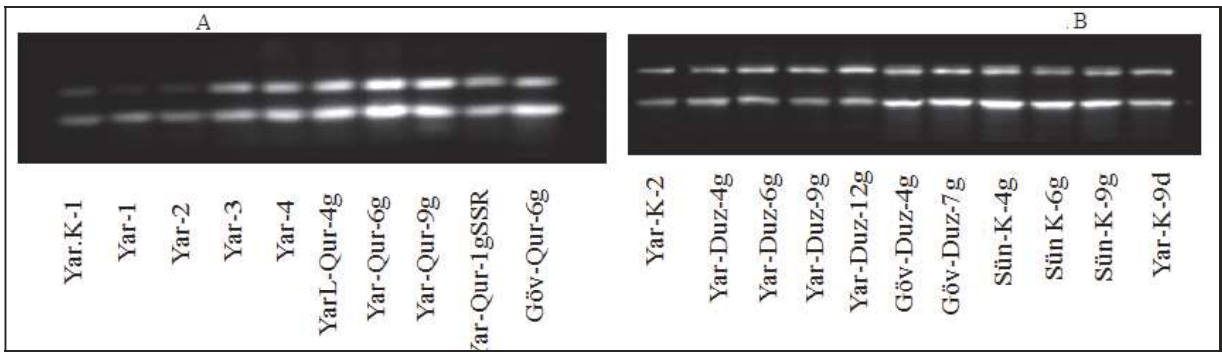


Şəkil 5. A) *B. distachyon* bitkisinin 5 günlük cücərtilərinin yarpaqlarında (Yar-), gövdələrində (Göv-) və köklərində (Kök-) 2 günlük quraqlıq və duz stresinin təsirindən (NaCl duzunu 50 mM qatılığında) və (B) 5 günlük cücərtilərin yarpaqlarında qısa müddətli güclü quraqlıq və duz stresinin (NaCl duzunun 100 və 200 mM qatılıqlarında) FEPK-azanın zülal miqdarının dəyişməsi.

Öyrənilən nümunələrdə gen ekspresiyası ilə paralel olaraq immuno-blotinq metodunun köməyi ilə bitki tip FEPK-aza polipeptidlərinin zülal miqdarının dəyişmə dinamikası öyrənilmişdir. Şəkil 5-dən görüldüyü kimi iki gün müddətinə tədricən quraqlıq və duz stresinə məruz qalmış ilkin cücərtilərin yarpaqlarında bitki tip PEPK-azanın hər iki polipeptidinin miqdarı artır. Lakin ilkin cücərtilərin gövdələrində yarpaqlardan fərqli olaraq hər iki polipeptidin miqdarı normal suvarılan cücərtilərin gövdələrində kəskin azalır. Tədricən quraqlıq stresinin vaxtının artmasından asılı olaraq ilkin cücərtilərin köklərində isə FEPK-azanın molekulyar çəkisi 102 kDa olan polipeptidin miqdarı dəyişməsə də, onun molekulyar çəkisi 110 kDa olan polipeptidinin zülal miqdarı kəskin azalır (Şəkil 5 A). Eləcə də, qısa müddətdə kəskin quraqlıq stresinə məruz qalmış və NaCl duzunun 100 və 200 mM konsentrasiyalarına keçirilmiş ilkin cücərtilərin yarpaqlarında vaxtdan asılı olaraq FEPK-azanın hər iki polipeptidinin zülal miqdarlarının dəyişməsi öyrənilmişdir (Şəkil 5 B). Kontrol bitkilərə nisbətən qısa müddətdə kəskin quraqlıq stresinə məruz qalmış və NaCl duzunun 100 və 200 mM konsentrasiyalarına keçirilmiş cücərtilərinin yarpaqlarında FEPK-azanın hər iki polipeptidinin zülal miqdarları nisbətən artmışdır. Lakin bu artmanın səviyyəsi tədricən quraqlıq stresinə məruz qalmış ilkin yarpaqlardakı kimi əhəmiyyətli olmamışdır.

Öyrənilən nümunələrdə gen ekspresiyası ilə paralel olaraq immuno-blotinq metodunun köməyi ilə bitki tip FEPK-aza polipeptidlərinin zülal miqdarının dəyişmə dinamikası öyrənilmişdir. Şəkil 5-dən görüldüyü kimi iki gün müddətinə tədricən quraqlıq və duz stresinə məruz qalmış ilkin cücərtilərin yarpaqlarında bitki tip PEPK-azanın hər iki polipeptidinin miqdarı artır. Lakin ilkin cücərtilərin gövdələrində yarpaqlardan fərqli olaraq hər iki polipeptidin miqdarı normal suvarılan cücərtilərin gövdələrində kəskin azalır. Tədricən quraqlıq stresinin vaxtının artmasından asılı olaraq ilkin cücərtilərin köklərində isə FEPK-azanın molekulyar çəkisi 102 kDa olan polipeptidin miqdarı dəyişməsə də, onun molekulyar çəkisi 110 kDa olan polipeptidinin zülal miqdarı kəskin azalır (Şəkil 5 A). Eləcə də, qısa müddətdə kəskin quraqlıq stresinə məruz qalmış və NaCl duzunun 100 və 200 mM konsentrasiyalarına keçirilmiş ilkin cücərtilərin yarpaqlarında vaxtdan asılı olaraq FEPK-azanın hər iki polipeptidinin zülal miqdarlarının dəyişməsi öyrənilmişdir (Şəkil 5 B). Kontrol bitkilərə nisbətən qısa müddətdə kəskin quraqlıq stresinə məruz qalmış və NaCl duzunun 100 və 200 mM konsentrasiyalarına keçirilmiş cücərtilərinin yarpaqlarında FEPK-azanın hər iki polipeptidinin zülal miqdarları nisbətən artmışdır. Lakin bu artmanın səviyyəsi tədricən quraqlıq stresinə məruz qalmış ilkin yarpaqlardakı kimi əhəmiyyətli olmamışdır.

B. distachyon bitkisinin müxtəlif yarpaq yaruslarında PEPK-azanın hər iki polipeptidinin miqdarı bir-biri ilə müqayisədə fərqli dəyişmişdir. Cavan yarpaqlarda hər iki polipeptidin miqdarı yaşlı yarpaqlarla müqayisədə nisbətən az olmuşdur. 3-cü və 4-cü yarpaqlarda uyğun olaraq onların miqdarı 1-ci və 2-ci yarpaqlara nisbətən tədricən artmışdır (Şəkil 6A). Lakin hər iki polipeptidin ümumi miqdarlarının müxtəlif yarpaq yaruslarında bir-birinə olan nisbəti stabil qalmışdır (Şəkil 6A). Bu hal tədricən quraqlıq stresinə məruz qalmış yetkin bitkilərdə stressin davam etmə müddətindən asılı olaraq da müşahidə olunur. Belə ki, quraqlıq stresinin davam etmə müddəti artıqca hər iki polipeptidin miqdarı paralel olaraq artır (Şəkil 6A). Lakin 6 gün quraqlıq stresinə məruz qalmış bitkiləri yenidən suvarıdıqda onlarda suvarmadan bir gün sonra yoxlanan FEPK-azanın hər iki polipeptidinin zülal miqdarı azalaraq kontrola yaxın olmuşdur.



Şəkil 6. A) *B. distachyon* bitkisinin yarpaq (Yar-) yaruslarında və tədricən quraqlıq və B)duz (50 mM NaCl) streslərinin təsirindən onun yarpaqlarında, yaşıl gövdəsində (Göv-) və normal suvarılan bitkilərin ilkin yaşıl sünbüllərində (Sün-) FEPK-azanın zülal miqdarının dəyişməsi.

100 mM NaCl duzunun təsirindən *B. distachyon* bitkisinin yetkin yarpaqlarında stresin davam etmə müddətindən asılı olaraq FEPK-azanın hər iki polipeptidinin miqdarı normal suvarılan bitkilərə nisbətən qismən də olsa artır, lakin bu artma quraqlıq stressi ilə müqayisədə elə də kəskin müşahidə olunmur (Şəkil 6 B). Yetkin *B. distachyon* bitkisinin gövdələrində isə duz stresinin davam etmə müddətindən asılı olmayaraq hər iki polipeptidin miqdarı stabil qalır. Eləcə də, vaxtdan asılı olaraq normal şəraitdə yetişdirilmiş bitkilərin ilkin sünbüllərində yoxlanan hər iki FEPK-aza polipeptidinin zülal miqdarı nisbətən stabil qalır. Yetkin *B. distachyon* bitkisinin yarpaq, gövdə və sünbüllərindən eyni miqdarda zülal götürülərək yoxlanılan FEPK-aza polipeptidlərinin zülal miqdarları bir-biri ilə müqayisə edilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, yarpaqlara nisbətən onun miqdarı bitkinin gövdəsində və yaşıl sünbüllərində daha çox olur.

FEPK-aza fermentinin yetişməkdə olan toxumlarda yağ turşularının biosintezi, azotun assimilyasiyası, enerji istehsalı, duz və quraqlıq stressinə bitkilərin adaptasiyasında iştirakı məlum olsa da, FEPK-azanın genlərinin funksiyası və onların arasındakı qarşılıqlı təsir haqqında olan məlumatlar məhduddur (Sánchez et al., 2003; Sebei et al., 2006). Bu sahədə əvvəllər aparılan tədqiqatlarda göstərilmişdir ki, qeyri-fotosintetik FEPK-azanın əsas funksiyalarından biri azotun fiksasiyası üçün bitkini lazım olan üzvi turşularla təmin etməkdən ibarətdir. Köklərdə üzvi turşu metabolizmində baş verən pozuntular nəticəsində kökün uzanması zəifləyə bilər. Bakterial tip FEPK-azanın 2-ci sinif FEPK-aza kompleksinin tərkibində katalitik və tənzimləyici subvahid kimi fəaliyyət göstərməsi güman edilir (Gennidakis et al., 2007). Bu tədqiqatlar nəticəsində bakterial və bitki tip FEPK-azalar arasında qarşılıqlı təsir aşkar edilmişdir. Son vaxtlarda aparılan tədqiqat işinin nəticələrində müəyyən olunmuşdur ki, Arabidopsisin bakterial FEPK-aza fermentini kodlaşdıran Atppc4 geninin ekspressiyasının

ingibirləşməsi digər FEPK-aza genlərinin transkripsiyasının və köklərdə FEPK-aza fermentinin aktivliyinin əhəmiyyətli dərəcədə artmasına səbəb olur. Bu nəticələr bitkilərdə bakterial və bitki tip FEPK-aza genlərinin transkripsiyasının da qarşılıqlı təsirdə olduğunu göstərir. Həmin tədqiqatların nəticələrinə əsasən bakterial tip FEPK-aza genlərinin, o cümlədən, Arabidopsis bitkisinin genomunda olan FEPK-azanın bakterial formasını kodlaşdıran Atppc4 geninin bitki tip FEPK-aza genlərinin transkripsiya səviyyələrinin modullaşmasında mühüm rol oynaya bilməsi güman edilmişdir (Wang et al., 2015). C_3 bitkilərin köklərində FEPK-azanın polipeptidlərinin zülal miqdarının digər orqanlara nisbətən çox olduğu əvvəllər aparılmış tədqiqatda göstərilmişdir. Belə ki, Arabidopsis bitkisinin ilkin cücərtilərində FEPK-azanın duz və quraqlıq stresslərinə cavab reaksiyasında iştirak etdiyi göstərilmişdir (Sánchez et al., 2003). Cardi və başqalarının (Cardi et al., 2015) son tədqiqat işlərində duz stressi təsirindən arpanın köklərində FEPK-azanın aktivliyinin və zülal miqdarının azaldığı qeyd olunmuşdur. Gənəgərçək genomunda FEPK-azanı kodlaşdıran üç genin olduğu aşkar edilmişdir (Gennidakis et al., 2007). Bunlardan ikisinin (RcPpc1 və RcPpc3) bitki tip FEPK-azanı, birinin isə bakterial (RcPpc4) tip FEPK-azanı kodlaşdırdığı göstərilmişdir. Bu genlərin ekspressiyasının analizi göstərmişdi ki, RcPpc3 və RcPpc4 genlərinin ekspressiya səviyyəsi müxtəlif toxumalarda dəyişdiyi halda, RcPpc1 ekspressiyası daha sabit olur. RcPpc3 və RcPpc4 genlərinin ekspressiyasının cücərən toxumlarda və ilkin cücərtilərin kökləri istisna olmaqla digər orqanlarda kifayət qədər oxşar dəyişdiyi göstərilmişdir (Gennidakis et al., 2007; Uhrig et al., 2008). Ali borulu bitkilərdə və yaşıl yosunda olan bakterial tip FEPK-azalar *in vivo* şəraitində bitki tip FEPK-azanın subvahidləri ilə assosiasiya olunaraq fərqli fiziki, kinetik və tənzimləyici xüsusiyyətlərə malik olan Sinif- 2 FEPK-aza adlandırılan ferment kompleksi kimi mövcud olması bu sahədə aparılan

tədqiqatlarda göstərilmişdir (Rivoal et al., 1996; Gennidakis et al., 2007; Igawa et al., 2008; Uhrig et al., 2008). Sınıf-2 FEPK-azaların həmçinin hüceyrənin sürətli böyüməsi zamanı osmotənizməyə yardım etdiyi güman edilir ki, bu da osmotik stres zamanı *Arabidopsis* cücərtilərində bakterial FEPK-azanı kodlaşdıran AtPpc4 geninin transkriptlərinin artmasına uyğun gəlir. Hər iki halda bakterial FEPK-azanın subvahidlərinin funksiyasının üzvi turşuların toplanmasına yardım edərək hüceyrədə osmotik potensialın artmasına kömək etdiyi və ya yuxarıdakı onları həmin toxumalarda anabolizmə yardım etmək üçün karbon skiletləri və reduksiyaedici enerji mənbəyi rolunu oynadıqları güman edilir (Sanchez et al., 2006; Uhrig et al., 2008).

Əvvəllər *Arabidopsis*in ilkin cücərtilərində AtPpc4 adlandırılan bakterial tip FEPK-aza geninin ekspressiyasının quraqlıq və su stresinin təsiri ilə yüksək dərəcədə induksiya olunduğu, lakin bitki tip FEPK-aza genlərinin heç birinin ekspressiyasına quraqlıq stresinin təsir etmədiyi göstərilmişdir (Sanchez et al., 2006).

PEPK-azanın iki polipeptidinin nisbi intensivliyinin *Proteaceae* fəsiləsinə aid olan *Hakea prostrata* bitkisinin klaster köklərinin inkişafı zamanı dəyişdiyi göstərilmişdir. Belə ki, klaster kökün inkişafı zamanı molekulyar kütləsi az olan zolağın intensivliyinin artması, molekulyar kütləsi yüksək olan yuxarı zolağın intensivliyinin isə azaldığı qeyd olunmuşdur (Shane et al., 2004). Bundan başqa monoubikvitinləşmə yolu ilə bitki tip FEPK-azanın aktivliyinin də tənzimləndiyi güman edilir (Uhrig et al., 2008).

Hal-hazırda bitkilərdə FEPK-aza fermentinin *in vivo* şəraitində karbon və azot metabolizmində rolu tam analiz olunmamışdır. Son zamanlar bu məqsədlə *Arabidopsis* bitkisinin aparılan tədqiqatlarda göstərilmişdir ki, onun yarpaqlarında FEPK-aza fermentinin bitki tip izoformalarını kodlaşdıran PPC1 və PPC2 adlandırılan genlər yüksək səviyyədə ekspressiya olunaraq yarpaqda olan FEPK-aza aktivliyinin 93%-ni təşkil edir. ppc1/ppc2 genlərinin ikiqat mutantlarında bitkilərin böyüməsi xeyli güclü zəifləmiş, onlar normal şəraitdə yetişdirildikdə bu mutant bitkilərin cücərtilərində nişasta və saxarozanın miqdarı transformasiya olunmamış bitkilərlə müqayisədə kəskin artmışdır. Bu tədqiqatların nəticələrinə əsasən onlar *Arabidopsis* yarpaqlarında FEPK-aza fermentinin karbon və azot metabolizminin balanslaşdırılmasında mühüm rol oynadığını göstərmişlər (Shi et al., 2015). Bizim öyrəndiyimiz hər iki bitki tip FEPK-aza geninin *Arabidopsis*də olan ppc1/ppc2 genləri ilə yüksək səviyyədə homoloji təşkil etməsi belə nəticəyə gəlməyə imkan verir ki, Brppc1 və Brppc2 genlərinin ekspressiya məhsulları olan polipeptidlərdən təşkil olunmuş FEPK-aza izoformaları *B. distachyon* bitkisinin onun əsas funksional formalarıdır.

ƏDƏBİYYAT

- Alvarez R., Gandullo J., Feria A. et al.** (2011) Characterisation of seeds of a C-4 phosphoenolpyruvate carboxylase deficient mutant of *Amaranthus edulis*. *Plant Biology*, **13**: 16–21.
- Bradford M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**: 248–254.
- Cardi M., Castiglia D., Ferrara M. et al.** (2015) The effects of salt stress cause a diversion of basal metabolism in barley roots: Possible different roles for glucose-6-phosphate dehydrogenase isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, **86**: 44–54.
- Chollet R., Vidal J., O’Leary M.** (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 273–298.
- Gennidakis S., Rao S., Greenham K. et al.** (2007) Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides interact in the heterooligomeric class-2 PEPC complex of developing castor oil seeds. *Plant J.*, **52**: 839–849.
- Huppe H., Turpin D.** (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, **45**: 577–607.
- Igawa T., Fujiwara M., Tanaka I., Fukao Y., Yanagawa Y.** (2010) Characterization of bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase expressed in male gametophyte of higher plants. *BMC Plant Biology*, **10**: 200.
- Laemmli U.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680–685.
- O’Leary B., Park J., Plaxton W.** (2011) The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem J.*, **436**: 15–34.
- Rivoal J., Plaxton W., Turpin D.** (1998) Purification and characterization of high- and low-molecular-mass isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*: kinetic, structural and immunological evidence that the green algal enzyme is distinct from the prokaryotic and higher plant enzyme. *Biochem J.*, **331**: 201–209.
- Sánchez R., Cejudo F.** (2003) Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.*, **132**: 949–957.
- Sanchez R., Flores A., Cejudo F.** (2006) *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes

- encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, **223**: 901-909.
- Sebei K., Ouerghi Z., Kallel H., Boukhchina S.** (2006) Evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase activity and lipid content during seed maturation of two spring rape seed cultivars (*Brassica napus* L.). *Comptes Rendus Biologies*, **329**: 719-725.
- Shane M., Cramer M., Funayama-Noguchi S. et al.** (2004) Developmental physiology of cluster-root carboxylate synthesis and exudation in harsh hakea: expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and the alternative oxidase. *Plant Physiol.*, **135**: 549-560.
- Shi J., Yi K., Liu Y. et al.** (2015) Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Arabidopsis Leaves Plays a Crucial Role in Carbon and Nitrogen Metabolism. *Plant Physiol.*, **167**: 671-681.
- Uhrig R., O'Leary B., Spang H. et al.** (2008) Coimmunopurification of phosphorylated bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylases with the plastidial pyruvate dehydrogenase complex from developing castor oil seeds. *Plant Physiol.*, **146**: 1346-1357.
- Wang J., Meng Y., Li B. et al.** (2015) Physiological and proteomic analyses of salt stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus*. *Plant Cell Environ.*, **38**: 655-669.

Изучение Изменений В Экспрессии Генов И Содержании Белка ФЕПК В Вегетативных Тканях *Brachypodium distachyon*

Ш.М. Байрамов, Н.М. Гулиев

Институт молекулярной биологии и биотехнологии НАН Азербайджана

Экспрессия генов трех изоформ фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПК) и динамика изменений в содержании белка ФЕПК-полипептида растительного типа были изучены в геноме *Brachypodium distachyon*. С помощью иммуноблоттинга самый высокий уровень экспрессии белка обнаружен для гена Brppc1. Тем не менее, экспрессия гена бактериальной формы фермента отличается от фермента растительного происхождения при солевом и водном стрессе. Увеличение количества обоих полипептидов в зеленых листьях зрелых растений, подвергнутых засухе, вероятно связано с ремобилизацией органического азота и углерода.

Ключевые слова: *B. distachyon*, фосфоенолпируваткарбоксилаза, экспрессия генов, количество белка, абиотический стресс

The Study Of Alterations In Gene Expression And Protein Content Of PEPC In Vegetative Tissues Of *Brachypodium distachyon*

Sh.M. Bayramov, N.M. Guliyev

Institute of Molecular Biology & Biotechnology, Azerbaijan NAS

Gene expression of three isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) and dynamics of the alterations in the protein content of the plant type PEPC-polypeptide in the *Brachypodium distachyon* genome have been studied. Immunoblotting method showed that the Brppc1 had the highest expression level of the protein. However, the gene expression pattern of the bacterial form of the enzyme is different from that of the plant type enzyme under salt and water stress. It is suggested that the increase of the amounts of both polypeptides in green leaves of the drought-stressed mature plants is related to the remobilization of organic nitrogen and carbon.

Keywords: *B. distachyon*, phosphoenolpyruvate carboxylase, gene expression, protein amount, abiotic stress