

16. Bornens M. The centriole as a gyroscopic oscillator. Implications for cell organization and some other consequences // Biol. Cell.—1979.—35, N 2.—P. 115—132.
17. Albrecht-Buehler G. Does the geometric design of centrioles imply their function? // Cell Motility.—1981.—1, N 2.—P. 237—245.
18. Pickett-Heaps J. D., Tippit D. H., Porter K. R. Rethinking mitosis // Cell.—1982.—29, N 3.—P. 729—744.
19. Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs / H. Schatten, G. Schatten, D. Mazia et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 1.—P. 105—109.

Межфакультет. пробл. н.-и. лаб. молекуляр. биологии
и биоорг. химии им. А. Н. Белозерского,
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 25.02.87

УДК 577.255.2:576.311+575:633.63

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА *Beta vulgaris* L.

Е. В. Киселева, Н. А. Дударева, А. Э. Бояринцева,
А. Г. Майстренко, Н. Б. Христолюбова, Р. И. Салганик

Введение. Известно, что геном митохондрий высших растений резко отличается от генома митохондрий животных как по размерам, так и по своей организации [1]. Так, размеры митохондриальной ДНК (мтДНК) растений достигают 2500 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.), тогда как мтДНК животных не превышают 18 т. п. н. Показано, что геном митохондрий растений, кроме высокомолекулярных форм ДНК, содержит многочисленные субгеномные кольцевые ДНК, образующиеся, как полагают, за счет рекомбинаций основного генома в районах прямых повторов и, наконец, в ряде случаев плазмидоподобные ДНК [2].

Изучению митохондриального генома растений в последние годы уделяется все большее внимание, поскольку показано, что помимо основной функции — энергетического обеспечения внутриклеточных процессов — митохондрии ответственны за целый ряд таких практических важных свойств растений, как устойчивость к патотоксинам и цитоплазматическая мужская стерильность [3]. Для понимания функционирования митохондриального генома важное значение имеет исследование особенностей структурной и пространственной организации мтДНК.

Изучению этого вопроса, а также биохимическому анализу гетерогенности состава митохондриального генома фертильных растений сахарной свеклы посвящена эта работа.

Материалы и методы. В работе исследовали мтДНК, выделенные из растений фертильной линии сахарной свеклы СОАН-102 (коллекция лаборатории полиплоидии Ин-та цитологии и генетики Сиб. отд-ния АН СССР).

Митохондрии выделяли из пятидневных этиолированных проростков методом дифференциального центрифугирования, обрабатывали ДНКазой для освобождения от ядерной ДНК, отмывали от фермента и центрифугировали в ступенчатом 1,2 и 1,6 М сахарозном градиенте для очистки от примеси пластид и других субклеточных компонентов. Для выделения ДНК очищенные митохондрии собирали из фракций 1,35—1,45 М сахарозы и инкубировали в 1 %-ном Na-саркозиле с протеиназой K («Sigma», США, 100 мкг/мл) в течение 30 мин при 37 °С, чтобы разрушить мембраны и гидролизовать белки, и далее при выделении и очистке мтДНК следовали методу, описанному в [4]. Фенольную депротеинизацию мтДНК проводили до исчезновения видимой интерфазы.

Электрофоретический анализ мтДНК осуществляли в 1,5 %-ном агарозном геле, в каждой пробе содержалось по 30 мкг ДНК. Условия электрофореза и окраски бромистым этидием были стандартными.

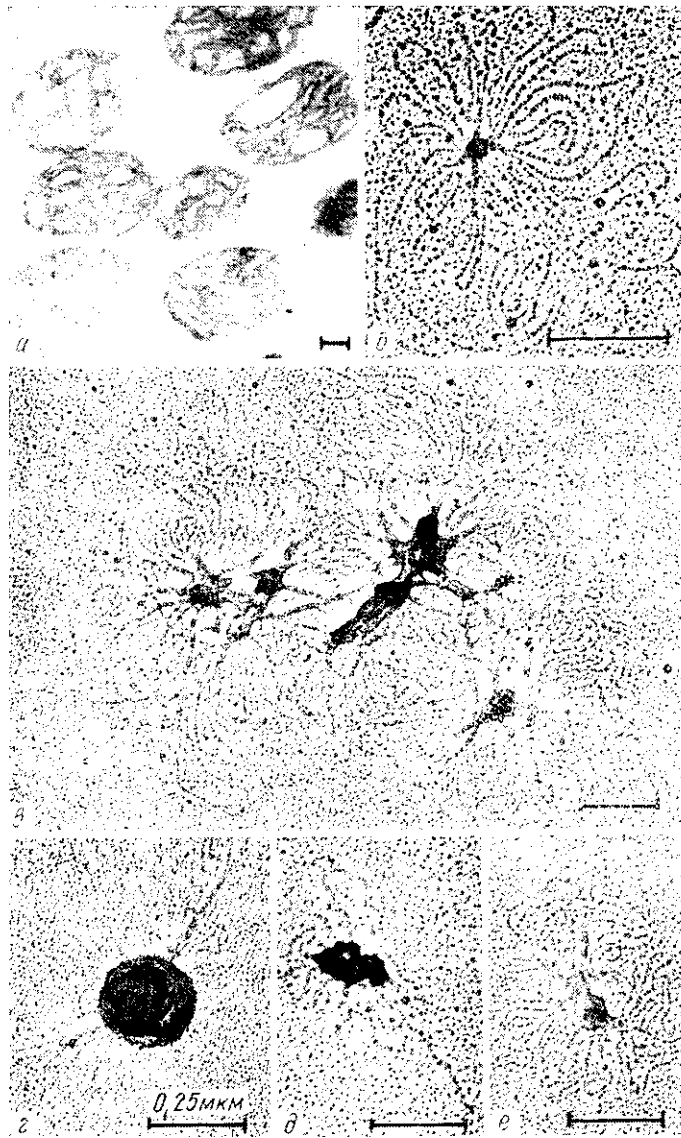


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии изолированных митохондрий сахарной свеклы на срезах (*a*) и мтДНК на распластанных (по методу белково-монослойной техники) препаратах (*b*—*e*); *b*—кольцевая молекула мтДНК, упакованная в розетку; *c*—высокомолекулярная форма мтДНК, состоящая из связанных розеток; *d*—*e*—последовательные стадии расправления отдельной компактной глобулы в розетку

Fig. 1. Electron micrographs of isolated mitochondria of sugar beet on thin section (*a*) and mtDNA on spreaded preparations (*b*—*e*); *b*—circular molecule of mtDNA forming a rosette, *c*—high molecular mtDNA consisting of interconnected rosettes; *d*—*e*—consecutive stages of decondensation of a separate compact globule into a rosette

Препараты мтДНК обрабатывали S₁-нуклеазой («Sigma», 5 ед. активности) в течение 10 мин при 20 °С для получения релаксированных кольцевых форм ДНК или в течение 10 мин при 37 °С для получения линейных форм.

Электронно-микроскопический анализ макромолекул в препаратах мтДНК проводили методом белково-монослойной техники [5]. Для изучения структуры высокомолекулярных мтДНК митохондрии сахарной свеклы обрабатывали 1 %-ным Na-саркозилем в 0,1 М трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ ЭДТА (30 мин, 37 °С). Выделенные препа-

раты мтДНК исследовали на различных стадиях очистки: после одной, трех и восьми фенольных депротенинизаций. Дополнительную обработку мтДНК, полученных после восьми фенольных депротенинизаций, протеиназой *K* (100 мкг/мл) проводили в течение 30 мин при 37 °С. Препараты напыляли силивом платина—палладий под углом 7°. Параллельно проводили электронно-микроскопический анализ чистоты выделенных митохондрий на срезах. Материал фиксировали 1%-ным OsO₄ и заливали в аралдиг. Препараты исследовали в электронном микроскопе JEM-100С (Япония). Контурную длину молекул ДНК измеряли курвиметром. В качестве маркера длины использовали ДНК фага *M13* размером 7200 п. н.

Результаты и обсуждение. Электронно-микроскопический анализ фракции изолированных митохондрий выявил достаточную ее чистоту и хорошую сохранность оболочки и крист митохондрий (рис. 1, *a*).

Исследование распластанных по методу Кляйншмидта препаратов мтДНК показало, что она представлена гетерогенной популяцией кольцевых молекул с различной степенью упаковки ДНК (рис. 1, *b—e*, рис. 2), среди которых иногда наблюдаются линейные молекулы. По результатам электронно-микроскопического анализа мтДНК можно разделить на две основные группы: высокомолекулярную с размером молекул от 20 до 160 мкм (62—496 т. п. н.) и выше и низкомолекулярную, состоящую из плазмидоподобных ДНК, которые по контурным размерам можно условно разделить на большие (1—10 мкм или 3,1—31 т. п. н.) и малые (0,2—0,8 мкм или 0,6—2,4 т. п. н.).

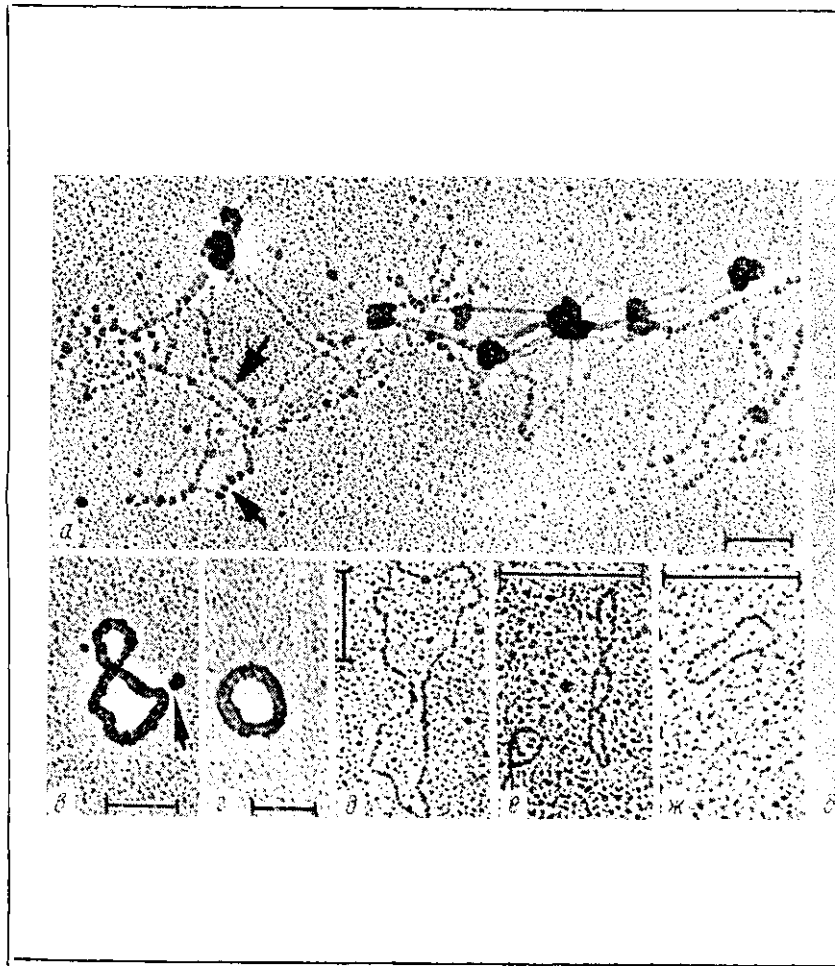
Высокомолекулярные мтДНК после трех фенольных депротенинизаций еще сохраняют связь с белками и видны на препаратах как в релаксированном, так и суперспирализованном состоянии. Релаксированные высокомолекулярные мтДНК имеют вид отдельных (рис. 1, *b*, *e*) или связанных между собой (рис. 1, *в*) розеткоподобных структур (розеток), содержащих центральную плотную глобулу (40—60 нм) и радиально отходящие от нее замкнутые петли ДНК различных размеров (0,6—1,5 мкм). При этом число петель в отдельных розетках колеблется от 16 до 30 и составляет в среднем 22 ± 3 .

Аналогичная упаковка мтДНК описана ранее у животных организмов после мягкого осмотического шока митохондрий [6] или разделения ДНК в градиенте плотности сахарозы [7], а также в ДНК кинетопластов динофлагеллят [8]. Что касается растений, то скопления петель, не содержащих центральной глобулы, но напоминающих розетки, наблюдали недавно на фотографиях крупных кольцевых молекул мтДНК, выделенных из проростков кормовых бобов [9].

Все вышеизложенное позволяет предположить, что розеткоподобная организация ДНК отражает основной принцип упаковки крупных кольцевых молекул в геноме митохондрий различных типов организмов.

В поддержании розеткоподобной организации высокомолекулярной мтДНК участвуют, вероятно, прочно связанные с ДНК белки, которые полностью не удаляются даже после восьми фенольных депротенинизаций. И только дополнительная обработка мтДНК протеиназой *K* приводит к появлению свободных кольцевых молекул, не уложенных в розетки (рис. 2, *б*). Сходные результаты были получены при исследовании мтДНК животных [7].

Наряду с релаксированными розеткоподобными структурами в составе высокомолекулярной мтДНК встречаются (до 30 %) более компактные образования, состоящие из связанных между собой и отдельно лежащих глобул размером 150—200 нм (рис. 1, *г*), а также их промежуточные формы, находящиеся на разных стадиях декомпактизации, которая сопровождается появлением петель ДНК (рис. 1, *д*, рис. 2, *а*). Такие структуры наблюдаются только на начальных этапах выделения ДНК из митохондрий. Можно предположить, что такие крупные глобулы представляют собой плотно упакованные розетки, петли которых суперспирализованы и, возможно, связаны с гистонopodobными белками, присутствие которых в митохондриях показано пока только у дрожжей [10, 11]. Эти компактные глобулы сходны по



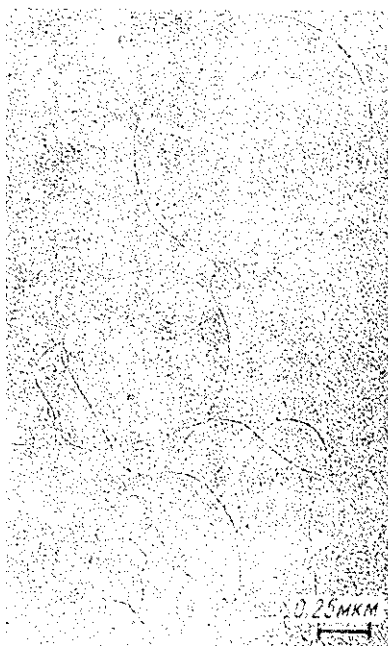


Рис. 2. Электронно-микроскопические фотографии различных форм мтДНК сахарной свеклы на распластанных препаратах: *a* — высокомолекулярная форма мтДНК в виде связанных компактных глобул и розеток, содержащая в своем составе фибриллы и гранулы (стрелки) разных размеров; *b* — крупная кольцевая молекула мтДНК после обработки протеиназой *K*; *c-g* — суперспирализованные кольцевые формы мтДНК (стрелкой указана компактная частица, представляющая суперспирализованную миникольцевую ДНК); *d-z* — релаксированные формы плазмидоподобных кольцевых ДНК

Fig. 2. Electron micrographs of different sugar beet mtDNA forms on spreaded preparations: *a* — high molecular mtDNA which are seen as interconnected compact globules and rosettes containing fibrils and regularly distributed granules (arrows) of different sizes; *b* — a large circular DNA molecule after incubation of the material with proteinase *K*; *c-g* — supercoiled circular mtDNA forms (arrow indicates a compact particle of supercoiled minicircular DNA); *d-z* — relaxed forms of minicircular DNA

размерам и морфологии с хромомероподобными структурами, обнаруженными нами ранее у прокариот [12], и с хромомерами, выявляемыми обычно в хроматине и метафазных хромосомах растений [13] и животных [14].

В составе промежуточных форм ДНК (рис. 2, а) выявляются тонкие фибриллы толщиной 7—8 нм, представляющие расправленные нити ДНК, а также фибриллы, толщиной 12—14 и 30—40 нм, на которых видны регулярно расположенные гранулы сходных размеров, весьма напоминающие нуклеосомы (10—12 нм в диаметре) и нуклеомеры.

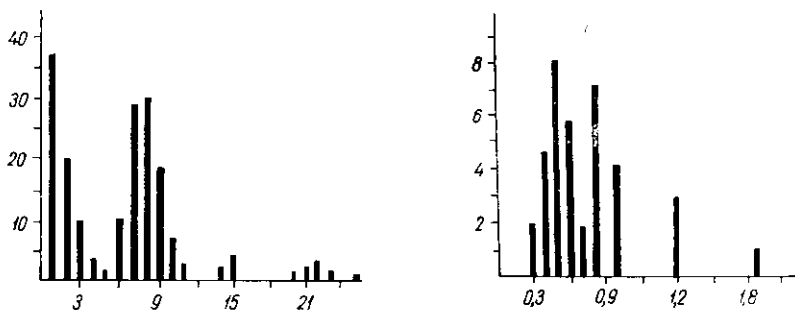


Рис. 3. Гистограмма распределения высокомолекулярных форм мтДНК, содержащих различное число розеток. По оси абсцисс — количество розеток в структуре, которое оценивали по числу центральных плотных глобул. По оси ординат — число молекул
Fig. 3. Histogram of distribution of high molecular mtDNA according to the number of rosettes. On the abscissa axis is number of rosettes (counted by the number of central compact globules). On the ordinate axis — number of molecules

Рис. 4. Гистограмма распределения кольцевых суперспирализованных форм мтДНК по длине. По оси абсцисс — размеры суперспирализованных молекул, мкм. По оси ординат — число молекул

Fig. 4. Histogram of distribution of circular supercoiled mtDNA molecules according to their length. On the abscissa axis — sizes of superspiralized molecules in μm . On the ordinate — the number of molecules

(25—30 нм в диаметре) эукариот. Хромомеро-, нуклеомеро- и нуклеосомоподобные структуры в митохондриальном геноме растений в настоящей работе описаны впервые. Полученные данные свидетельствуют, очевидно, о существовании универсального способа упаковки ДНК не только ядерных, но и митохондриальных геномов различных типов живых организмов.

Количественный анализ показал, что среди высокомолекулярных форм ДНК, представленных одиночными розетками (измерено 38 молекул) более половины составляют ДНК с контурной длиной 20—37 мкм.

Основная же масса высокомолекулярных форм ДНК представлена структурами, состоящими из связанных между собой розеток (рис. 1, в, рис. 3) (измерено 146 молекул), контурная длина ДНК в которых (по приблизительным оценкам) составляет 130—160 мкм (403—496 т. п. н.). Эти значения близки к размерам высокомолекулярной мтДНК сахарной свеклы (375 ± 24 т. п. н.), полученным с помощью рестрикционного анализа [15]. В то же время на препаратах встречаются и более крупные скопления ДНК, состоящие из большего числа розеток. Присутствие подобных структур, возможно, связано с амплификацией митохондриального генома [16] либо с его репликацией, хотя нельзя исключить и случайной агрегации розеток в процессе выделения.

Плазмидоподобные мтДНК обнаруживаются на препаратах в виде суперспирализованных кольцевых молекул размером 0,2—1,5 мкм (рис. 2, в, г) либо компактных частиц размером 0,02—0,05 мкм (рис. 2, в). Среди первых наиболее многочисленными являются молекулы, имеющие в суперспирализованном состоянии размеры 0,4; 0,5; 0,6 и 0,8 мкм (рис. 4), которые после обработки S_1 -нуклеазой (10 мин,

20 °С) превращаются в релаксированные кольцевые молекулы с контурной длиной ДНК 1—10 мкм (рис. 2, *д*). Подобные субгеномные кольцевые молекулы обнаружены в составе мтДНК других высших растений [17]. Есть данные, указывающие на то, что они возникают в результате рекомбинаций по участкам прямых повторов основной высокомолекулярной формы мтДНК [18]. Исследование первичной структуры подобных кольцевых ДНК показало наличие в их составе уникальных последовательностей [19], однако функциональное значение этих генетических элементов пока не установлено.

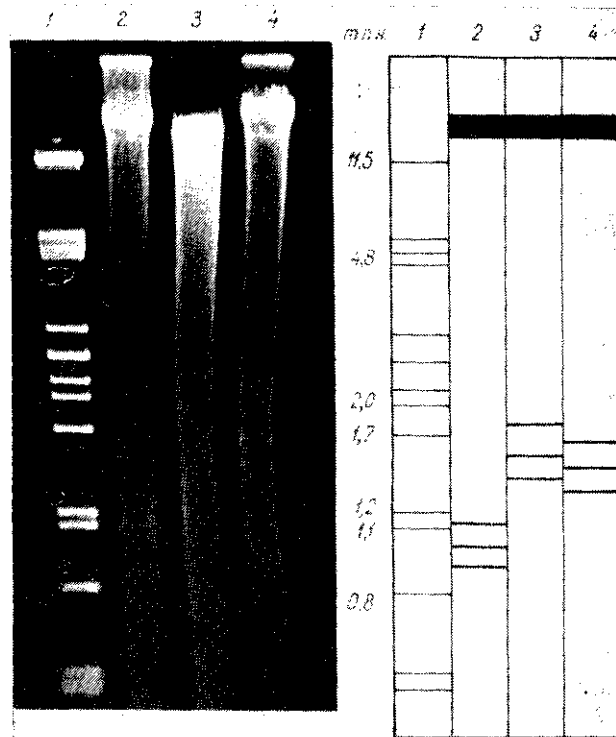


Рис. 5. Электрофоретический анализ мтДНК, выделенной из фертильной линии сахарной свеклы, в 1,5 %-ном агарозном геле. В качестве маркеров использовали продукты расщепления ДНК фага λ рестриктазой *Pst*I (1); 2 — мтДНК; 3 — мтДНК, обработанная S_1 -нуклеазой 10 мин, 20 °С (релаксированные кольцевые формы); 4 — мтДНК, обработанная так же при 37 °С (линейные формы ДНК)

Fig. 5. Electrophoresis in 1.5 % agarose gel of mtDNA from fertile line of sugar beet. Products of digestion of phage λ DNA by *Pst*I were taken as markers (1); 2 — intact mtDNA; 3 — mtDNA digested by S_1 -nuclease for 10 min at 20 °С (relaxed circular forms); 4 — mtDNA digested by S_1 -nuclease for 10 min at 37 °С (linear DNA forms)

Вторая подгруппа плазмидоподобных мтДНК, выявляющаяся в суперспирализованном состоянии как небольшие компактные частицы (рис. 2, *в*), после обработки S_1 -нуклеазой (10 мин, 20 °С) приобретает вид миникольцевых ДНК контурной длиной 0,2—0,8 мкм (рис. 2, *е, ж*), среди которых чаще всего встречаются молекулы длиной 0,4—0,5 мкм (1,3—1,55 т. п. н.).

При электрофоретическом анализе мтДНК было обнаружено, что помимо высокомолекулярной ДНК имеются три низкомолекулярные фракции в нижней части 1,5 %-ного агарозного геля (рис. 5, дорожка 2). Они представлены суперспирализованными кольцевыми молекулами, что было установлено по изменению электрофоретической подвижности после обработки мтДНК S_1 -нуклеазой в различных условиях (рис. 5, дорожки 3, 4); размер их, оцененный путем сравнения электрофоретической подвижности линейных форм этих молекул (рис. 5, дорожка 4) с подвижностью маркерных фрагментов (рис. 5, дорожка 1),

составлял 1,3; 1,4; 1,6 т. п. н. Полученные данные согласуются с результатами электронно-микроскопического анализа и совпадают с данными Томаса [20], который обнаружил в составе мтДНК сахарной свеклы три класса миникольцевых ДНК размером 1,3; 1,4 и 1,6 т. п. н. Предполагается, что миникольцевые мтДНК растений имеют отношение к явлению цитоплазматической мужской стерильности, поскольку обнаружена корреляция между наличием этого признака и отсутствием некоторых из миникольцевых молекул [21].

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что митохондриальный геном сахарной свеклы, как и других высших растений, представлен гетерогенной популяцией молекул, среди которых обнаруживаются высокомолекулярные сложно организованные формы и субгеномные плазмидоподобные ДНК. Впервые продемонстрировано наличие различных уровней организации ДНК в составе митохондриального генома. Высокомолекулярная ДНК представляет собой, вероятно, гигантское кольцо размером до 500 т. п. н., которое компактизовано, во-первых, за счет образования нуклеосомо- и нуклеомероподобных глобулярных структур (рис. 2, а) и, во-вторых, за счет укладки такой ДНК в петли, образующие розеткоподобные структуры (рис. 1, б, в, е). Сердцевинной таких розеток являются, очевидно, специализированные белки, которые могут иметь сродство к определенным последовательностям нуклеотидов в составе мтДНК. Такой принцип укладки ядерной ДНК в петли исследован в настоящее время достаточно детально [22]. Можно допустить, что такие петли представляют собой функциональные единицы транскрипции.

Обнаруженные в мтДНК розеткоподобные и хромомероподобные структуры аналогичны тем, которые наблюдаются в нуклеоиде бактерий, а также в метафазных хромосомах и интерфазном хроматине растительных и животных клеток [13, 14].

Среди плазмидоподобных миникольцевых ДНК в составе генома митохондрий, судя по данным электрофоретического и электронно-микроскопического анализов, преобладают три класса (1,3; 1,4 и 1,6 т. п. н.). По-видимому, эти молекулы, даже если они образовались путем рекомбинаций по участкам прямых повторов высокомолекулярной мтДНК [20], выполняют какие-то существенные функции. Это следует из того, что не происходит их элиминации в процессе эволюции, а наоборот, они сохраняются в геноме митохондрий сахарной свеклы и других высших растений. В пользу этого свидетельствует и то, что полное или частичное отсутствие таких плазмидоподобных ДНК у кукурузы, сорго, сахарной свеклы сопряжено с цитоплазматической мужской стерильностью [2, 20, 21].

Авторы выражают благодарность С. И. Малецкому за предоставление семян сахарной свеклы, Е. С. Беляевой — за полезное обсуждение полученных результатов, В. А. Мельникову и Н. А. Дементьевой — за техническую помощь в работе.

STRUCTURAL ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL GENOME OF *BETA VULGARIS* L.

E. V. Kiseleva, N. A. Dudareva, A. E. Boyarintseva, A. G. Majstrenko, N. B. Khristolyubova, R. I. Salganik

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

It is shown by electron microscopy and biochemical methods that mitochondrial DNA (mtDNA) of *Beta vulgaris* L. is multicomponent and consists of high molecular DNA (~500 kb) and minicircular plasmid-like DNA molecules (1.3, 1.4 and 1.6 kb). High molecular mtDNA when not entirely free of proteins is presented by resembling chromomers of globular and rosette-like structures. The typical rosette has a protein core

and stemming from it DNA loops. The globules and rosettes are interconnected between themselves by thick and thin DNA fibrils along which nucleosome- and nucleomere-like structures are regularly distributed. The plasmid-like DNA molecules are in supercoiled forms.

1. Sederoff R. R. Structural variation in mitochondrial DNA // *Adv. Genet.*—1984.—22.—P. 1—108.
2. Leaver C. J., Gray M. W. Mitochondrial genome organization and expression in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.*—1982.—33.—P. 373—402.
3. Негрук В. И. Внеядерные геномы высших растений // *С.-х. биология.*—1984.—№ 11.—С. 103—108.
4. Synenki R. M., Levings C. S., Shan D. M. Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from soy bean // *Plant Physiol.*—1978.—61, N 3.—P. 460—464.
5. Kleinschmidt A. K. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules // *Meth. Enzymol.*—1968.—12B.—P. 361—377.
6. Mitochondrial DNA. 3. Electron microscopy of DNA released from mitochondria by osmotic shock / E. F. J. van Bruggen, C. M. Runner, P. Borst et al. // *Biochim. et biophys. acta.*—1968.—161, N 2.—P. 402—414.
7. Van Tiule J. C., Pherson M. L. A compact form of rat liver mitochondrial DNA stabilized by bound proteins // *J. Biol. Chem.*—1979.—254, N 13.—P. 6044—6055.
8. Renger H. C., Wolstenholme D. R. The form and structure of kinetoplast DNA of *Crithidia* // *J. Cell Biol.*—1972.—54, N 2.—P. 346—364.
9. Diversity of *Vicia faba* circular mtDNA in whole plants and suspension cultures / V. I. Negruk, G. J. Eisner, T. D. Redichkina et al. // *Theor. and Appl. Genet.*—1986.—72, N 4.—P. 541—547.
10. Kuroiwa T. Mitochondrial nuclei // *Int. Rev. Cytol.*—1982.—75.—P. 1—58.
11. Caron F., Jacq C., Rouviere-Yaniv J. Characterization of a histone-like protein extracted from yeast mitochondria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76, N 9.—P. 4265—4269.
12. Электронно-микроскопический анализ уровней структурной организации хромосомы *Escherichia coli* / Е. В. Киселева, Е. В. Лихошвай, Н. А. Сердюкова, Н. Б. Христоролюбова // *Докл. АН СССР.*—1986.—289, № 5.—С. 1235—1237.
13. Горюнг Е. М., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. Уровни компактизации ДНК в интерфазных и митотических хромосомах высших растений // *Цитология.*—1986.—28, № 9.—С. 911—914.
14. Зацепина О. В., Поляков В. Ю., Ченцов Ю. С. Электронно-микроскопическое изучение хромосомы в митотических и интерфазных хромосомах // *Там же.*—1983.—25, № 2.—С. 123—129.
15. Powling A. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugarbeet with normal and male-sterile cytoplasms // *Heredity.*—1982.—49, N 1.—P. 117—120.
16. Jamet-Vierney C., Begel O., Belcour L. Senescence in *Podospora anserina*: amplification of a mitochondrial DNA sequence // *Cell.*—1980.—21, N 1.—P. 189—194.
17. Levings C. S. III, Pring D. R. The mitochondrial genome of higher plants // *Stadler Symp.*—1978.—10.—P. 77—94.
18. Milligan R. M., Walbot V. Gene expression and recombination in plant mitochondrial genomes // *Trends Genet.*—1986.—2, N 10.—P. 263—266.
19. Quétier F., Vedel F. Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants // *Nature.*—1977.—268, N 5618.—P. 365—368.
20. Thomas C. M. The nucleotide sequence and transcription of minicircular mitochondrial DNA's associated with male-fertile and cytoplasmic male-sterile lines of sugarbeet // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 23.—P. 9353—9370.
21. Powling A., Ellis T. W. N. Studies on the organelle genomes of sugarbeet with male-fertile and male-sterile cytoplasms // *Theor. and Appl. Genet.*—1983.—65, N 4.—P. 323—328.
22. Георгиев Г. П., Бакаев В. В. Три уровня структурной организации хромосом эукариот // *Молекуляр. биология.*—1978.—12, № 6.—С. 1205—1230.

Ин-т цитологии и генетики
Сиб. отделения АН СССР, Новосибирск

Получено 07.08.87