

В. А. Подсосонный, Ю. М. Константинов, Г. Н. Луценко

МАТРИЧНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМИДОПОДОБНЫХ ДНК МИТОХОНДРИЙ КУКУРУЗЫ В ОТНОШЕНИИ СИНТЕЗА ДНК

*Изучали синтез ДНК в изолированных митохондриях кукурузы. Установлено, что матричной активностью в отношении синтеза ДНК *in organello* обладают как высокомолекулярная, так и плазмидоподобные митохондриальные ДНК. Линейные (S1, S2, 2,3 и 2,1 тыс. п. н.) и кольцевая (1,9 тыс. п. н.) ппДНК в качестве генетических матриц проявляют более высокую активность по сравнению с митохондриальной хромосомой. Наибольшая репликативная активность присуща кольцевой ппДНК размером 1,9 тыс. п. н.*

Введение. Митохондриальный геном кукурузы (*Zea mays* L.) содержит высокомолекулярную кольцевую ДНК (вм мтДНК), а также определенный набор миникольцевых и минилинейных плазмидоподобных ДНК (ппДНК). Специфичность набора этих ДНК коррелирует с таким важным в агрономическом отношении признаком растений, как цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) [1].

Различия между типами ЦМС у кукурузы проявляются также и в характере экспрессии митохондриальных генов, что приводит к появлению дополнительных полос полипептидов в электрофоретических спектрах [2]. Однако, согласно недавно опубликованным данным, эти особенности не являются строго специфическими, а реверсия к фертильности может не сопровождаться изменениями в качественном и количественном составе митохондриальных белков и полиморфизме ппДНК [3]. В связи с этим представляет значительный научный и практический интерес изучение транскрипционной и репликативной активностей ппДНК как возможных идентификаторов типов ЦМС кукурузы. Кроме того, учитывая вероятную независимость репликации ппДНК от вм мтДНК, модельная система на основе изолированных растительных митохондрий может быть использована для анализа проблем репликации и транскрипции этих дополнительных генетических элементов.

Цель настоящей работы состояла в исследовании матричной активности ппДНК разных размерных классов в отношении синтеза ДНК в системе изолированных митохондрий кукурузы.

Материалы и методы. В экспериментах использовали изолированные митохондрии этиолированных проростков кукурузы гибрида Краснодарский 303АТВ и линии W64А с различными типами ЦМС.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности сахарозы [4, 5].

Синтез митохондриальной ДНК *in organello* проводили с использованием [³²P]dАТР и [³²P]dСТР по методу, описанному ранее [6, 7]. От невключившейся в материал митохондрий радиоактивной метки освобождались отмывкой органелл центрифугированием.

Для выделения и очистки митохондриальной ДНК применяли метод [1] с собственными модификациями.

Электрофоретический анализ митохондриальной ДНК осуществляли в 1% -м геле агарозы в трис-боратном буфере. Для получения радиоавтографа гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-В. Денситометрирование результатов радиоавтографии и

окрашенных бромистым этидием гелей проводили на микроденситометре MD-100 с выводом цифровых значений на ПЭВМ.

Результаты и обсуждение. Как установлено нами ранее, в условиях *in organello* со значительной скоростью происходит синтез как мтДНК, так и ппДНК [7]. Основываясь на этих свойствах изолированных митохондрий, мы определили оптимальные условия функционирования системы синтеза ДНК митохондрий кукурузы *in organello* и исследовали ее основные характеристики. Эти данные приведены ниже:

Температурный оптимум	20—35 °С
Оптимум рН	7,5—8,0
Чувствительность к ингибитору матричной активности ДНК бромистому этидию (2 мкг/мл)	Высокая
Потребность в субстрате дыхания митохондрий	+
Потребность в ионах Mg ²⁺	+
K _m для dATP	3—7 мкМ

Установлено, что включение радиоактивной метки из [³²P]dATP в мтДНК является практически линейным, по крайней мере, в течение 1 ч. Однако анализ изменений функциональной активности митохондрий, наступающих при хранении препарата изолированных органелл, показал, что определение кинетики синтеза мтДНК необходимо производить в течение первых 30 мин после выделения митохондрий. В этом интервале используемый нами состав среды инкубации позволял поддерживать митохондрии в энергизованном состоянии. Температурные условия синтеза (30 °С) и рН реакционной среды были выбраны с учетом характера зависимости включения меченого предшественника в мтДНК от этих факторов. Расчеты показали, что скорость включения при использованных нами экспериментальных условиях составляла от 20 до 100 пмоль dCTP на 1 мг митохондриального белка за 10 мин. Это значительно выше, чем ранее было получено для митохондрий, изолированных из кукурузы линии В37 [8]; где уровень включения dATP был 2—4 пмоль. В цитируемой работе в состав среды инкубации вместо используемого нами АТФ был добавлен АДР, а осмолярность раствора за счет применения более высокой концентрации маннита вместо сахарозы была несколько выше.

В более ранних работах ДНК в изолированных органеллах синтезировали с использованием митохондрий дрожжей, печени цыпленка, печени крысы и неинтактных митохондрий пшеницы [6, 9, 10]. Скорость включения меченого предшественника была линейной в пределах 20—30 мин и варьировала от 0,2 до 200 пмоль нуклеотида на 1 мг митохондриального белка за 10 мин. Максимальное включение отмечалось в системе изолированных митохондрий пшеницы. В работе Бэдинжер и Уолбот [6] предполагается, что такое высокое включение нуклеотида может быть обусловлено обогащением быстрорастущей ткани эмбриона пшеницы активными митохондриями. Альтернативное объяснение основано на том, что авторами были использованы митохондрии с нарушенными мембранами. Это приводило к разбавлению эндогенного нуклеотидного пула и, как следствие, к завышенным результатам включения dNTP по сравнению с интактными митохондриями.

В нашем случае вероятной причиной высокого включения нуклеотидов в мтДНК (100 пмоль dCTP на 1 мг белка за 10 мин) может быть повышенная репликативная активность органелл. В отличие от авторов цитируемой статьи [8], где работали с 5—8-сут проростками кукурузы, выращенными на слабом свете, мы выделяли митохондрии из 4-сут этиолированных проростков. Об интактности полученных нами органелл можно судить по высокому значению дыхательного контроля, имеющего, в среднем, величину 3,0 при окислении сукцината. Структурная целостность используемых в этих экспериментах органелл подтверждена нами также в отдельных экспериментах с помощью электронно-микроскопического контроля.

На рис. 1 представлен радиоавтограф агарозного геля после электрофоретического разделения препаратов мтДНК проростков кукурузы

линии W64A с различными типами ЦМС. Заметно, что в митохондриях из С-типа цитоплазмы радиоактивно меченный предшественник включается в вмДНК и плазмиды 1,9 и 2,3 тыс. п. н., в митохондриях из Т-типа цитоплазмы — в вм мтДНК и плазмиду 1,9 тыс. п. н., а в митохондриях из S-типа цитоплазмы дополнительно оказываются мечеными S-плазмиды 5,4 и 6,4 тыс. п. н. (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что в используемой нами системе происходил активный синтез *in organello* различных классов митохондриальной ДНК.

Для определения количественных соотношений синтеза различных классов мтДНК было проведено денситометрирование радиоавтографов и негативов с окрашенных бромистым этидием гелей

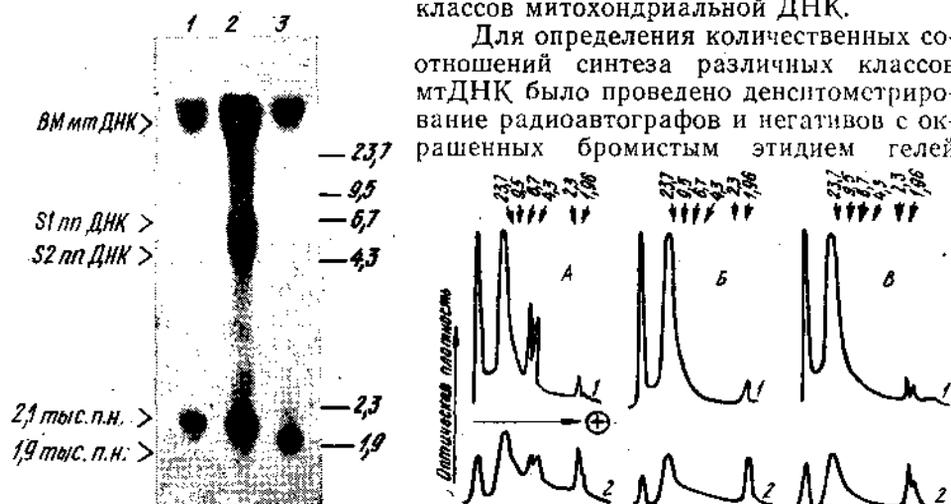


Рис. 1. Радиоавтографический анализ мтДНК кукурузы линии W64A с различными типами ЦМС: 1 — С; 2 — S; 3 — Т. Справа показано положение *HindIII*-фрагментов ДНК фага λ , используемых в качестве маркеров

Рис. 2. Денситограммы негативов с окрашенных бромистым этидием гелей (1) и радиоавтографов гелей (2) после электрофоретического анализа мтДНК кукурузы линии W64A с различными типами ЦМС: А, Б, В — S-, Т-, С-типы соответственно. Синтез *in organello* проведен с [^{32}P]dCTP

(рис. 2). Можно видеть, что положение пиков поглощения в обеих сериях денситограмм совпало. В то же время наблюдались существенные различия в соотношениях величин поглощения. В таблице представлены результаты расчетов относительного уровня включения dCTP в различные классы мтДНК. Видно, что все без исключения плазмидоподобные матрицы включали радиоактивный материал с большей эффективностью, чем основная ДНК. Особенно заметно это в случае плазмид размером 2,3 (2,1) и 1,9 тыс. п. н., которые присутствуют во всех стерильных цитоплазмах и гибриде Краснодарский 303ТВ (W64AT \times Cr25ТВ). Так, для S-цитоплазмы уровень включения в 14 раз, для С — в 10 раз, а для Т — в 33 раза выше в плаزمиде, чем в вм мтДНК. S-плазмиды также в большей мере включали dCTP, чем основная ДНК. У простого гибрида на основе линии W64A относительная скорость синтеза ДНК с размерами плазмид 2,3 и 1,9 тыс. п. н. была несколько ниже, чем у линий с ЦМС. Тем не менее, эти генетические матрицы были

Относительный уровень синтеза плДНК разных размерных классов в митохондриях проростков кукурузы

Источник митохондрий	Размерный класс митохондриальной ДНК, тыс. п. н.				
	1,9	2,3 (2,1)	5,4	6,4	вм мтДНК
W64AS	13	14	2,2	1,3	1
W64AC	9,6	10	—	—	1
W64AT	33	—	—	—	1
W64AT \times Cr25ТВ	5,2	6,3	—	—	1

в 5—6 раз более активными, чем в мтДНК, в отношении синтеза ДНК.

Факты дифференцированного включения радиоактивной метки в различные классы мтДНК были отмечены и ранее при регистрации синтеза ДНК в суспензионной культуре клеток кукурузы [11], а также при изучении синтеза ДНК в очищенных митохондриях кукурузы [8]. В работе Смита и соавт. [11] для клеток суспензионной культуры кукурузы линии «Black Mexican Sweet» установлен факт более высокой репликативной активности плазмиды размером 1,9 тыс. п. н. по сравнению с другими митохондриальными плазмидами при переносе клеток на свежую среду. При этом заторможенные в росте клетки (стационарная фаза роста) возобновляли синтез ДНК, начиная с плазмидоподобных (кольцевых и линейных) и пластидной ДНК, и только затем происходил синтез в мтДНК и ядерной ДНК. Аналогичное явление обнаружено в дрожжах, где была установлена связь избирательного синтеза мтДНК с адаптацией анаэробно растущих клеток к кислороду [12]. Возможно, что ппДНК высухших растений также имеют отношение к адаптационным перестройкам биоэнергетических систем клетки.

Продемонстрированный в наших экспериментах преимущественный синтез ппДНК может быть обусловлен двумя основными причинами — числом копий ДНК-матриц и активностью синтеза ДНК. Мы склонны объяснить полученные результаты влиянием обоих факторов. В пользу такого предположения свидетельствуют и данные о копийности S-плазмид. Установлено, что S1 и S2 ДНК содержатся в эквимолярных соотношениях и пятикратном избытке к в мтДНК [13]. В то же время, согласно нашим данным и данным из работы Бэдинжер и Уолбот [6], относительное включение радиоактивной метки в S-плазмиды только приблизительно вдвое превышает таковое для в мтДНК (таблица). Что касается кольцевой плазмиды 1,9 тыс. п. н., то полученные результаты трудно интерпретировать без сведений о копийности этой плазмиды в митохондриях с различными типами ЦМС. Однако в любом случае многократное относительное превышение включения радиоактивности в эту плазмиду подтверждает высокую активность репликона и дает основание рекомендовать его для использования при конструировании генетических векторов для цитоплазмы злаковых растений.

В целом, наши данные по включению радиоактивных предшественников в различные классы мтДНК *in organello* свидетельствуют о существовании независимого контроля синтеза плазмидоподобных ДНК в митохондриях высухших растений. Результаты проведенного исследования также позволяют сделать вывод о перспективности использования параметров активности ДНК-синтезирующей системы изолированных митондрий проростков растений как в качестве характеристики генотипа, так и для оценки некоторых хозяйственно ценных признаков (цитоплазматическая мужская стерильность, устойчивость к патотоксинам и др.).

В. А. Подсосонний, Ю. М. Константинов, Г. М. Луценко

МАТРИЧНА АКТИВНІСТЬ ПЛАЗМІДОПОДІБНИХ ДНК МИТОХОНДРІЙ КУКУРУДЗИ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО СИНТЕЗУ ДНК

Резюме

Вивчали синтез ДНК в ізольованих мітохондріях кукурудзи. Встановлено, що матричною активністю по відношенню до синтезу ДНК *in organello* володіють як високомолекулярна, так і плазмідоподібні мітохондріальні ДНК. Лінійні (S1, S2, 2,3 і 2,1 тис. п. н.) і кільцева (1,9 тис. п. н.) ппДНК як генетичні матриці проявляють вищу активність порівняно з мітохондріальною хромосомою. Найбільша репликативна активність притаманна кільцевій ппДНК розміром 1,9 тис. п. н.

TEMPLATE ACTIVITY OF PLASMID-LIKE DNA
OF MAIZE MITOCHONDRIA WITH RESPECT TO DNA SYNTHESIS

Summary

The DNA synthesis has been studied in isolated maize mitochondria. Both high-molecular and plasmid-like mitochondrial DNA were shown to possess the template activity with respect to DNA synthesis *in organello*. Linear (S1, S2, 2.3 and 2.1 kb) and circular (1.9 kb) pDNA exhibit higher activity as genetic templates than the mitochondrial chromosome. The circular pDNA of 1.9 kb have the greater replicative activity.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kemble R. J., Gunn R. E., Flavell R. B.* Classification of normal and male-sterile cytoplasms in maize. II. Electroforetic analysis of DNA species in mitochondria // *Genetics*.—1980.—95.—P. 451—458.
2. *Forode B. G., Oliver R. J. C., Leaver C. J. et al.* Classification of normal and male-sterile cytoplasms in maize. I. Electroforetic analysis of variation in mitochondrially synthesized proteins // *Ibid.*—P. 443—450.
3. *Ishige T., Storey K. K., Gengenbach B. G.* Cytoplasmic fertile revertants possessing S1 and S2 DNAs in S male-sterile maize // *Japan. J. Breed.*—1985.—35, N 3.—P. 285—291.
4. *Войников В. К.* К вопросу о выделении интактных растительных митохондрий // *Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук.*—1980.—10, № 2.—С. 121—126.
5. *Вечер А.* Техника биохимического исследования субклеточных культур и биополимеров.—Минск: Наука и техника, 1977.—С. 140.
6. *Schegget, Borst P.* DNA synthesis by isolated mitochondria. I. Effect of inhibitors and characterization of the product // *Biochim. et biophys. acta.*—1971.—246, N 2.—P. 239—248.
7. *Константинов Ю. М., Подсозныи В. А., Луценко Г. Н.* Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды pBR322 в изолированных митохондриях кукурузы // *Докл. АН СССР.*—1988.—298, № 2.—С. 502—504.
8. *Bedinger P., Walbot V.* DNA synthesis in purified maize mitochondria // *Curr. Genet.*—1986.—10, N 10.—P. 631—637.
9. *Гаузе Г. Г.* Митохондриальная ДНК.—М.: Наука, 1977.—288 с.
10. *Ricard B., Echeverria M., Christophe L., Litvak S.* DNA synthesis in highly purified wheat mitochondria // *Plant Mol. Biol.*—1983.—2, N 4.—P. 167—175.
11. *Smith A., Chourey P., Pring D.* Replication and amplification of the small mitochondrial DNAs in a cell suspension of Black Mexican Sweet maize // *Ibid.*—1987.—10, N 1.—P. 83—90.
12. *Rabinowich M., Getz G. S., Casey J., Swift H.* Synthesis of mitochondrial and nuclear DNA in anaerobically grown yeast during the development of mitochondrial function in response to oxygen // *J. Mol. Biol.*—1969.—41.—P. 381—400.
13. *Sederof R. R., Levings C. S., Raleigh N. C.* Supernumerary DNAs in plant mitochondria // *Genetic flux in plants / Eds B. Hohn, E. S. Dennis.*—New York: Springer, 1985.—P. 91—109.

Сиб. ин-т физиологии и биохимии растений
Сиб. отд-ния РАН, Иркутск

Получено 20.07.94