

Выделение и характеристика митохондриальной ДНК-топоизомеразы I типа из проростков кукурузы (*Zea mays*)

В. И. Тарасенко, Ю. М. Константинов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск-33, абонент. ящик 1243

Проведена очистка и изучены биохимические характеристики ДНК-топоизомеразы типа I из митохондрий проростков кукурузы. Установлено, что фермент проявляет свойства, характерные для ДНК-топоизомераз как эукариотического, так и прокариотического происхождения.

Введение. ДНК-топоизомераза I типа — один из важнейших ферментов метаболизма нуклеиновых кислот, необходимый для нормального протекания в клетке основных генетических процессов [1, 2]. Данный фермент играет ключевую роль в контроле топологического состояния молекулы ДНК, регулируя степень ее суперспирализации посредством разрыва в одну из цепей. Механизм работы фермента включает несколько стадий: связывание с дуплексной ДНК в области разделения цепей, разрезание одной из цепей, протягивание интактной цепи через образовавшийся пробел, залечивание пробела [1, 2]. ДНК-топоизомеразы типа I принято подразделять на две группы, достаточно четко различающиеся по ферментативным свойствам — топоизомеразы прокариотического и эукариотического происхождения [1, 2].

Осуществляемое топоизомеразой I изменение степени сверхскрученности ДНК является важным условием для репликации молекулы и, предположительно, может иметь значение для регуляции этого процесса [3—5]. Топоизомеразы участвуют также в рекомбинационных и репарационных процессах [1, 6]. Суперспирализация ДНК и контролируемые ее ферменты оказывают значительное влияние и на транскрипцию [7, 8]. Согласно полученным в последние годы данным, ДНК-топоизомераза I способна участвовать в регуляции экс-

прессии генетической информации, влияя на активность генов изменениями топологического состояния соответствующих регуляторных областей [8, 9]. В связи с этим детальные молекулярно-биологические и биохимические исследования данного фермента представляют наряду с теоретическим значительный практический интерес, поскольку их результаты могут найти применение в работах по генетической инженерии растений.

Свойства ДНК-топоизомераз в настоящее время хорошо изучены у бактерий и животных, в значительно меньшей степени — у растений, причем исследовались, главным образом, ферменты ядерной локализации [10—12]. Поскольку растительный геном состоит из трех относительно независимых генетических систем, представляется необходимым исследовать ферментативный аппарат, регулирующий топологические перестройки ДНК в составе каждой из этих систем. Уже получены данные, свидетельствующие о наличии в хлоропластах топоизомераз прокариотического типа, что рассматривается как аргумент в пользу эндосимбиотического происхождения этих органелл [10, 13]. В то же время для растительных митохондрий существуют только краткие сообщения о наличии в них топоизомеразной активности [14, 15]. В связи с этим целью настоящей работы состояла в выделении, очистке и изучении некоторых свойств ДНК-топоизомеразы I из митохондрий проростков кукурузы.

Материалы и методы. В качестве растительно-

го материала в работе использованы четырехдневные этиолированные проростки кукурузы гибрида ВИР 42МВ, выращенные при температуре 27 °С. Митохондрии выделяли в соответствии с описанным ранее методом [16] с дополнительной очисткой в ступенчатом градиенте концентраций сахарозы.

мтДНК-топоизомеразу выделяли и частично очищали следующим образом. Конечный осадок митохондрий ресуспендировали в 10 мл буфера I: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 5 мМ MgCl₂; 1 мМ ЭДТА; 12,5 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,2 мМ ФМСФ («Sigma», США); 10 % глицерин. К суспензии добавляли 500 мкл 10 %-го раствора тритона X-100 в воде и инкубировали на протяжении 10 мин. Центрифугирование осуществляли при 15000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбিরали, объем смеси доводили до 20 мл с помощью буфера II: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0; 30 мМ KCl; 0,5 мМ ЭДТА; 12,5 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,2 мМ ФМСФ; 10 % глицерин.

При постоянном перемешивании добавляли порошкообразный сульфат аммония до 30 % от насыщения. Смесь инкубировали в течение 30 мин, затем центрифугировали при 15000 об/мин в течение 30 мин. К супернатанту добавляли сульфат аммония до 80 % от насыщения. После выдерживания в течение 30 мин осуществляли центрифугирование при 15000 об/мин на протяжении 30 мин. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл буфера II и диализовали против 2 л буфера II.

Диализат наносили на колонку (10 × 1,5 см) с DEAE-Toyopearl 650 («Toyo-Soda», Япония), уравновешенную буфером II. Белок элюировали линейным градиентом концентрации KCl (0,03—1,0 М) в буфере II. Фракции, содержащие топоизомеразную активность, объединяли, диализовали против буфера II и хранили при -20 °С.

Активность ДНК-топоизомеразы I определяли

по релаксации ковалентно замкнутой отрицательно суперспирализованной плазмидной ДНК в инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 15 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 1 мМ ДТТ («Sigma»), 0,2—0,3 мкг ДНК плазмиды *pUC19*. Необходимое количество буфера II, содержащего топоизомеразную активность (0,25—2 ед. акт.), добавляли к инкубационной смеси (общий объем смеси составлял 30 мкл). Инкубацию осуществляли при 37 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 8 мкл раствора, содержащего 100 мМ ЭДТА и 0,5 % SDS. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 0,8 %-м агарозном геле. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [17]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для полной релаксации 0,5 мкг суперспирализованной ДНК в течение 1 ч.

Результаты и обсуждение. Данные по выделению и очистке ДНК-топоизомеразы типа I из митохондрий кукурузы представлены в таблице. Наибольшая степень очистки фермента была достигнута в результате использования хроматографии на колонке с DEAE-Toyopearl. В процессе элюции с сорбента ферментативная активность выходила в интервале концентраций 200—250 мМ KCl в виде одного четко очерченного пика (рис. 1). Следует заметить, что попытки использовать такие сорбенты, как DEAE-целлюлоза и DEAE-сефадекс, не дали положительных результатов, показав очень низкую степень очистки белка.

Анализ гомогенности препарата ДНК-топоизомеразы I митохондрий кукурузы с помощью электрофореза в 7 %-м ПААГ показал, что после проведения всех используемых нами стадий очистки удается получить высокоочищенный препарат фермента (данные не приведены).

Отметим, что большая часть активности фермента обнаруживалась в солюбилизируемой фракции уже при 0,4 % концентрации тритона X-100. Этот факт, по-видимому, означает отсутствие тес-

Очистка мтДНК-топоизомеразы типа I кукурузы

Фракция	Количество белка, мг	Активность фермента, ед. акт.	Специфическая активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Суспензия митохондрий	80	—	—	—	—
Экстракт митохондрий	25	13400	536	—	100
Высаливание сульфатом аммония (30 %)	12,5	11900	952	1,78	88,8
Высаливание сульфатом аммония (80 %)	4,5	7360	1636	3,05	54,9
Хроматография на DEAE-Toyopearl	0,14	2140	15285	28,5	16

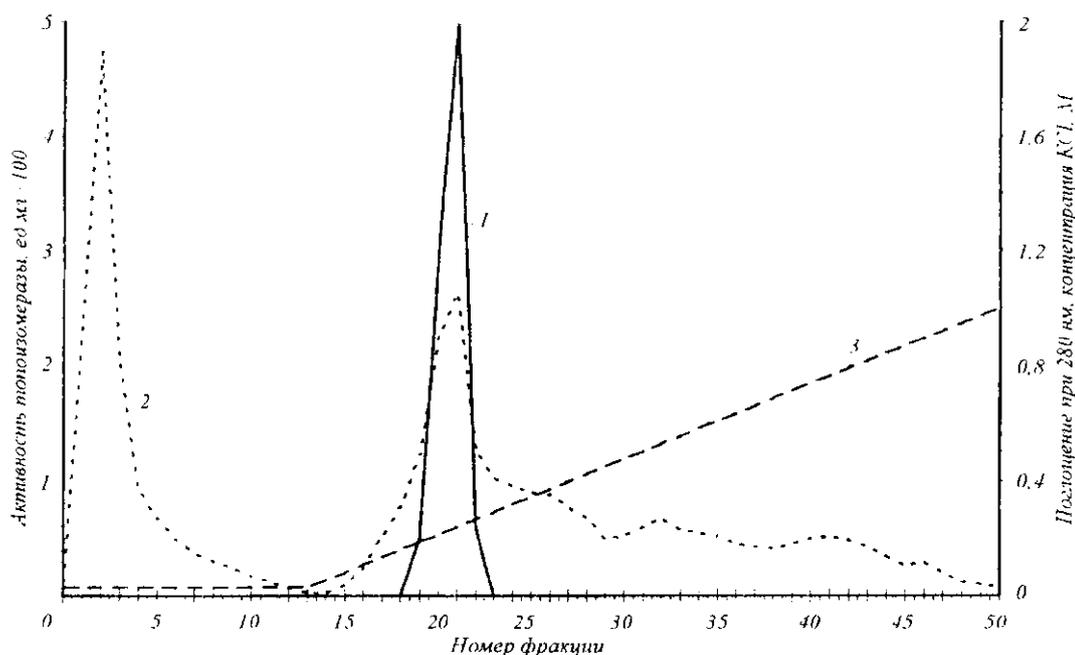


Рис. 1. Очистка ДНК-топоизомеразы I митохондрий кукурузы на колонке с DEAE-Toyopearl: 1 — топоизомеразная активность; 2 — содержание белка; 3 — концентрация KCl

ной ассоциации фермента с митохондриальными мембранами *in vivo*. Сходные данные были получены для топоизомераз из митохондрий пшеницы и *Chenopodium album* [14, 15]. С другой стороны, показано, что фермент из митохондрий печени крысы тесно связан с мембранной фракцией оргanelл [18]. В наших экспериментах ДНК-топоизомеразная активность не обнаруживалась в суспензии интактных митохондрий и постмитохондриальном супернатанте, что является указанием на внутримитохондриальную локализацию изучаемого фермента.

Очищенный ферментный препарат использовали для изучения некоторых биохимических свойств мтДНК-топоизомеразы *Zea mays*. Одним из характерных свойств ДНК-топоизомераз I типа независимо от происхождения является зависимость активности фермента от ионов Mg^{2+} [1]. Для работы топоизомераз прокариот требуется обязательное присутствие магния, активность эукариотических ядерных топоизомераз значительно стимулируется ионами Mg^{2+} , но не является абсолютно зависимой от наличия данного катиона [12]. В то же время характер влияния ионов Mg^{2+} на митохондриальные ферменты до настоящего времени неясен.

На рис. 2 представлены данные по зависимости

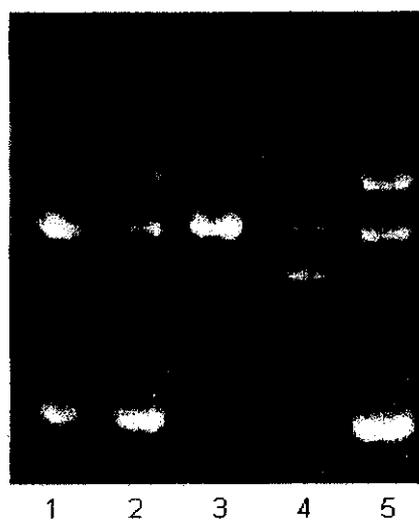


Рис. 2. Эффект катионов на активность мтДНК-топоизомеразы I кукурузы: 1 — $MgCl_2 + KCl$; 2 — KCl в отсутствие $MgCl_2$; 3 — $MgCl_2$ в отсутствие KCl; 4 — отсутствие $MgCl_2$ и KCl; 5 — контрольный препарат *pUC19*. Концентрация $MgCl_2$ — 10 мМ; KCl — 150 мМ

релаксирующей активности из митохондрий кукурузы от присутствия в реакционной смеси ионов магния и калия. Специфическая топоизомеразная активность обнаруживалась только в присутствии ионов Mg^{2+} . Ионы калия (150 мМ) оказывали заметное ингибирующее действие. В отсутствие $MgCl_2$ и KCl проявления ДНК-топоизомеразной активности зарегистрировано не было. Максимум активности фермента наблюдался при добавлении в инкубационную среду 10—20 мМ $MgCl_2$ (данные не приведены). Результаты наших экспериментов согласуются с результатами исследований топоизомераз из митохондрий пшеницы и *Chenopodium album* [14, 15], также продемонстрировавших абсолютную зависимость активности изученных ферментов от ионов Mg^{2+} .

Поскольку известно, что взаимодействие между топоизомеразой I и молекулой ДНК по существу является электростатическим, ионная сила раствора имеет важное значение для проявления активности фермента. На рис. 3 представлены результаты экспериментов по изучению влияния концентрации KCl в инкубационной среде на релаксацию ДНК топоизомеразой. Максимальная активность фермента наблюдалась при 50 мМ KCl . Увеличение ионной силы раствора оказывало ингибирующий эффект на ДНК-релаксирующую активность. Так, при концентрациях KCl от 150 до 300 мМ наблюдалось постепенное снижение, а затем исчезновение активности топоизомеразы. Подобная зависимость от ионной силы раствора является типичной для растительных топоизомераз типа I [10].

Изучение зависимости активности очищенной мтДНК-топоизомеразы I кукурузы от температуры показало, что фермент активен в широком диапазоне температур (от 10 до 50 °С) с максимумом

около 35 °С (данные не приведены). Интересно отметить, что фермент из митохондрий кукурузы, по нашим данным, обладает относительно высокой термостабильностью, сохраняя некоторое время активность при температурах вплоть до 50 °С.

В специальной серии экспериментов изучено действие некоторых известных ингибиторов ДНК-топоизомеразной активности (ЭДТА, бромистого этидия и спермидина) на активность мтДНК-топоизомеразы кукурузы (рис. 4). ЭДТА, ингибирующий топоизомеразы типа I прокариотического происхождения, а также топоизомеразы типа II, не оказывал ингибирующего эффекта на ферментативную активность митохондрий кукурузы. Лишь при очень высоких концентрациях реагента наблюдалось падение активности (см. рис. 4, дорожка 4). Сходным образом другой ингибитор прокариотических ДНК-топоизомераз — бромистый этидий — не влиял на работу фермента (см. 4, дорожки 5—7). С другой стороны, введение в инкубационную смесь полиамина спермидина вызывало некоторое снижение топоизомеразной активности (см. рис. 4, дорожки 8—10). Подобный эффект данного соединения считается характерным для ДНК-топоизомераз прокариотической природы в противоположность эукариотическим ферментам, для которых установлено стимулирующее действие полиаминов [19].

Наиболее характерным отличием эукариотических топоизомераз от ферментов прокариот является их способность эффективно релаксировать положительно суперспирализованную ДНК [1]. Для выяснения вопроса о природе ДНК-топоизомеразы из митохондрий кукурузы фермент инкубировали с положительно суперспирализованной ДНК *pUC19*, полученной выдерживанием раствора плазмиды в присутствии бромистого этидия в течение 30 мин

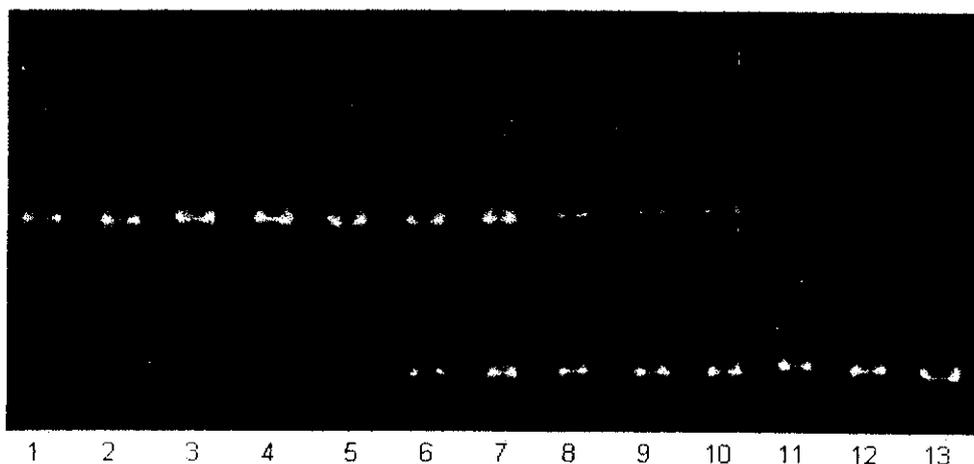


Рис. 3. Влияние ионной силы раствора KCl (мМ) на активность мтДНК-топоизомеразы I кукурузы: 1 — 0; 2 — 10; 3 — 30; 4 — 50; 5 — 70; 6 — 90; 7 — 120; 8 — 150; 9 — 180; 10 — 210; 11 — 250; 12 — 300; 13 — контрольный препарат *pUC19*.

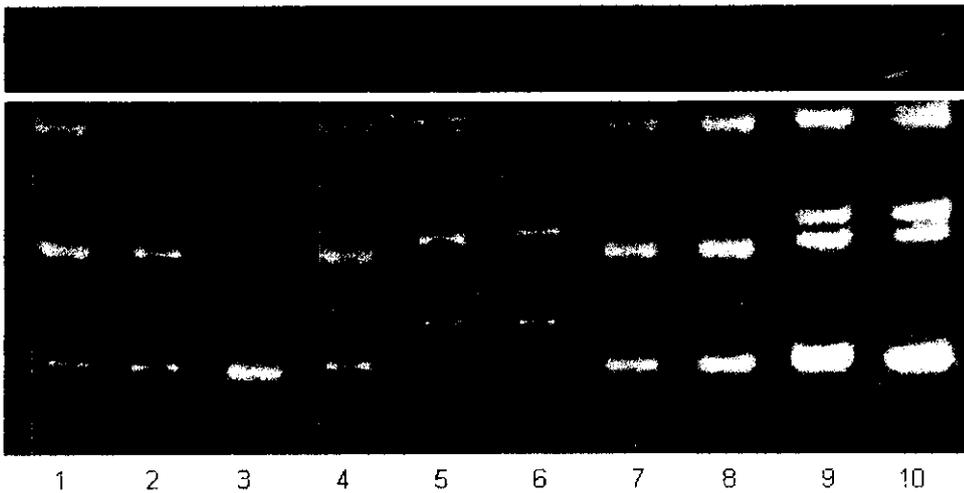


Рис. 4. Эффект ингибиторов на активность мтДНК-топоизомеразы I кукурузы: 1 — 2 мМ ЭДТА; 2 — 10 мМ ЭДТА; 3 — 50 мМ ЭДТА; 4 — бромистый этидий (0,5 мкг/мл); 5 — бромистый этидий (5 мкг/мл); 6 — бромистый этидий (10 мкг/мл); 7 — 2 мМ спермидин; 8 — 5 мМ спермидин; 9 — 20 мМ спермидин; 10 — контрольный препарат *pUC19*



Рис. 5. Активирующий эффект тритона X-100 на мтДНК-топоизомеразу I кукурузы: 1 — контрольный препарат *pUC19*; 2 — 2 ед. акт.; 3 — 0,2 ед. акт.; 4 — 2 ед. акт. + 0,02 % тритон X-100; 5 — 0,2 ед. акт. + 0,02 % тритон X-100

(данные не приведены). Фермент оказался способным использовать в качестве субстрата положительно суперспирализованную ДНК, что свидетельствует о его родстве с топоизомеразами эукариотического типа.

В связи с известными данными об активирующем влиянии низких концентраций детергентов на эндонуклеазы рестрикции [20] была предпринята попытка изучения действия неионного детергента тритон X-100 на активность ДНК-топоизомеразы митохондрий кукурузы (рис. 5). При этом было установлено, что релаксация плазмидной ДНК

происходит существенно эффективнее в присутствии несольбилизирующей (0,02 %) концентрации тритона X-100 (см. рис. 5, дорожки 4, 5). Общепринято считать, что влияние тритона X-100 на конформационное состояние ДНК состоит в локальном разделении (плавлении) цепей двойной спирали нуклеиновой кислоты. По всей вероятности, подобное изменение конформации ДНК и обуславливает наблюдаемое повышение активности фермента, так как образование одноцепочечных участков в молекуле ДНК является существенным фактором, влияющим на работу топоизомеразы I.

Биохимические данные о свойствах мтДНК-топоизомеразы типа I кукурузы суммированы ниже:

Температурный оптимум	35 °С
Оптимум рН	7,5
Релаксация положительных сверхвитков	Имеется
Зависимость от ионов Mg^{2+}	«
Зависимость от ионной силы раствора	«
Оптимальная концентрация KCl	50 мМ
Действие ингибиторов и активаторов:	
ЭДТА	Ингибирование отсутствует
Бромистый этидий	>>
Спермидин	Частичное ингибирование
Тритон X-100 (0,02 %)	Активация

Видно, что большая часть описанных свойств ДНК-топоизомеразы митохондрий кукурузы имеет сходство со свойствами эукариотических ядерных

топоизомераз типа I. Данный факт резко отличает митохондриальный фермент от изученных ферментов хлоропластной локализации [4, 10, 19]. В то же время такие качества фермента, как зависимость от ионов Mg^{2+} и частичное ингибирование полиаминами, характерны для ДНК-топоизомераз I прокариот и отличаются от свойств, описанных для ядерного фермента из того же растительного объекта [12]. Так как сходные данные получены для митохондриальных топоизомераз пшеницы и *Chenopodium album* [14, 15], можно предположить существование в растительных митохондриях самостоятельной формы фермента со свойствами, занимающими промежуточное положение между свойствами прокариотических и эукариотических ДНК-топоизомераз I типа. Следовательно, особенно важным представляется идентификация гена, кодирующего данный белок, и выяснение степени его структурного сходства с известными нуклеотидными последовательностями гена топоизомеразы I разных организмов. В настоящее время наши усилия направлены на определение аминокислотной последовательности N-концевого фрагмента для создания генетического зонда для поиска и выделения кодирующего фермент гена.

В. И. Тарасенко, Ю. М. Константинов

Виділення і характеристика мітохондріальної ДНК-топоізомерази I типу з проростків кукурудзи (*Zea mays*)

Резюме

Здійснено очистку та вивчено біохімічні характеристики ДНК-топоізомерази типу I з мітохондрій проростків кукурудзи. Встановлено, що згаданий фермент виявляє властивості, характерні для ДНК-топоізомераз як еукаріотичного, так і прокаріотичного походження.

V. I. Tarasenko, Yu. M. Konstantinov

Purification and characterization of type I DNA topoisomerase from maize (*Zea mays*) seedling mitochondria

Summary

The type I DNA-topoisomerase has been isolated and purified by procedures of salting out and ion chromatography from maize seedling mitochondria. It has been found that the enzyme examined possesses properties characteristic of DNA-topoisomerases of both eukaryotic and prokaryotic origin.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wang J. C. DNA topoisomerases // Ann. Rev. Biochem.—1985.—54.—P. 665—697.

2. Gellert M. DNA topoisomerases // Ibid.—1981.—50.—P. 879—910.
3. Kaufman W., Boyer J., Estabrooks L., Wilson S. Inhibition of replication initiation in human cells following stabilization of topoisomerase-DNA cleavable complexes // Mol. and Cell. Biol.—1991.—11, N 7.—P. 3711—3718.
4. Brent L., Nielsen, Tewari K. Pea chloroplast topoisomerase I: purification, characterization, and role in replication // Plant. Mol. Biol.—1988.—11.—P. 3—14.
5. Kaguni J., Kornberg A. Replication initiated at the origin of *E. coli* chromosome reconstituted with purified enzymes // Cell.—1984.—38.—P. 183—190.
6. Skov M., Miller T. A. DNA topoisomerase inhibitors causes increase of sensitivity to low doses // Radiat. Res.—1994.—138, N 1.—P. 117—120.
7. Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия.—М.: Наука, 1989.
8. Caserta M., Camilloni G., Venditti P. Conformational information in DNA: Its role in the interaction with topoisomerase I and nucleosomes // J. Cell. Biochem.—1994.—55.—P. 93—97.
9. Merino A., Madden K., Lane W., Champoux J. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription // Nature.—1993.—365.—P. 227—232.
10. Руденко Г. Н. Выделение и характеристика двух различных ДНК-топоизомераз I типа из листьев *Pisum sativum* // Молекуляр. биология.—1991.—25, № 5.—С. 1316—1331.
11. Dynan W., Lendrisak J. Purification and characterization of wheat germ DNA topoisomerase I // J. Biol. Chem.—1981.—256.—P. 5860—5865.
12. Карпенчук К. Г., Руденко Г. Н. Ядерная ДНК-топоизомераза зародышей кукурудзы // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 2.—С. 77—82.
13. Siedlecki J., Zimmermann W., Weissbach A. Characterization of a prokaryotic DNA topoisomerase I in chloroplast extracts from spinach // Nucl. Acids Res.—1983.—11, N 5.—P. 1523—1537.
14. Meisner K., Dorfel P., Borner T. Topoisomerase activity in mitochondrial lysates of higher plant (*Chenopodium album*) // Biochem. Int.—1992.—27, N 6.—P. 1119—1125.
15. Echeverria M., Martin M. T., Litvak S. A DNA topoisomerase type I from wheat embryo mitochondria // Plant. Mol. Biol.—1986.—N 6.—P. 417—427.
16. Konstantinov Yu. M., Podsonny V. A., Lutsenko G. N. // Physiol. Plant.—1988.—72.—P. 403—406.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193.—P. 265—275.
18. Fairfield F., Bauer W., Simpson M. Mitochondria contain a distinct DNA topoisomerase // Ibid.—1979.—255.—P. 9352—9354.
19. Ситайло Л. А. Хлоропластная ДНК-топоизомераза I типа из листьев гороха // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 4.—С. 97—103.
20. А. с. № 1480357. Константинов Ю. М., Стрельникова И. И. Способ расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции II типа // БИ.—1989.—№ 18.—С. 254.

Поступила в редакцию 28.02.97