ПОТАПОВА Т.В.[1,2], ЗУБО Я.О.[1*], ТАРАСЕНКО В.И.[2], НЕВИНСКИЙ Г.А.[4], БЕРНЕР Т.[1], КОНСТАНТИНОВ Ю.М.[1,2,3]

[1]Institute fьr Biologie/Genetik, Humboldt-Universitdt zu Berlin, Chaussestr., 117 Germany, 10115, Berlin

[2]Сибирский институт физиологии и биохимии СО РАН
Россия, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 123

[3]Иркутский государственный університет
Россия, 664033, Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5

[4]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, пр-т Ак.
Россия, 630090, Новосибирск, Лаврентьева, 8

[*] Current address – Dartmouth College, 78 College st., Hanover, NH, 03755, USA

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРАНСКРИПЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У *ARABIDOPSIS THALIANA*

Окислительный стресс относится к числу наиболее опасных видов стресса для растительных организмов, поскольку мишенью действия повреждающих факторов в этих условиях являются основные типы информационных биополимеров (ДНК, РНК и белки). Наблюдаемые при этом нарушения экспрессии генов основных ДНК-содержащих органелл растительной клетки (ядра, хлоропластов и митохондрий) могут приводить к серьезным метаболическим и структурным повреждениям клетки, включая возможную ее гибель. К числу наиболее важных последствий при действии факторов окислительного стресса относится нарушение нормальной работы генетического аппарата клетки. Однако, до самого последнего времени детальных исследований изменений экспрессии митохондриальных генов не проводилось. Одним из информативных подходов для решения этой задачи может быть использование экспериментальных систем *in vivo* с применением прооксидантов.

В настоящей работе с использованием метода run-on транскрипции исследовано влияние гербицида метилвилогена (параквата) на интенсивность транскрипции митохондриальных генов растений дикого типа арабидопсиса (WT) и трансгенной линии XX2 с повышенной экспрессией гена AOX1a, кодирующего альтернативную оксидазу. Обнаружено, что обработка растений обеих линий паракватом вызывает достоверное снижение транскрипционной активности исследованных митохондриальных генов, однако, подавление транскрипции было менее выражено в митохондриях линии XX2.

Материалы и методы

Растительный материал и обработка ингибиторами. Семена арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh) линии Col-0 (растения дикого типа, экотип “Columbia”), и линии XX-2 (растения, трансформированные конструкцией, экспрессирующей ген *aox1a* в сенсовой ориентации) получены из банка семян NASC (Великобритания). Растения выращивали в климатических камерах при температуре 20-23°C, 16-ти часовом освещении (130 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$) (Lamp Master HPI-T Plus 400W E40) («Philips»). Семена проращивали в кюветах в почве, смешанной с перлитом в соотношении 1:1. Возраст растений определяли с момента прорастания семян. Инкубацию срезанных растений на воде и растворах ингибиторов проводили при постоянном освещении интенсивностью 180 или 270 мкмоль квантов $м^{-2}с^{-1}$ в течение 4-х часов. Конечная концентрация метилвиологена при экспозиции срезанных растений в водном растворе составляла 0,5 mM. В контрольном варианте срезанные растения инкубировались в течение 4-х часов в воде.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности сахарозы как описано в [1] в нашей модификации. Для этого 12-дневные растения (10 г) гомогенизировали в 90 мл буфера А (0.3 М сахароза, $Na_2P_2O_7$ 5 мМ, 2 мМ EDTA, PVP 1%, BSA 1%, цистеин 5 мМ, 5 мМ в-меркаптоэтанол). Гомогенат пропускали через мираклос (“Calbiochem-Boehring”) и центрифугировали при 5000 g 15 мин. Отбирали супернатант и центрифугировали 20 мин при 22000 g. Полученный осадок ресуспендировали в 20 мл среды промывания (буфер Б: 50 мМ Tris-HCl, pH 7.0, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, and 4 мМ в-меркаптоэтанол). Затем добавляли буфер Б до 40 мл и центрифугировали суспензию при 3000 g 5

мин. Супернатант отбирали в новые стаканы и центрифугировали при 18000 g 15 мин. Осадок ресуспендировали в 8 мл буфера Б и затем гомогенизировали с помощью поттера объемом 15 мл. Суспензию центрифугировали при 3000 g 5 мин. Затем супернатант наносили на градиент перколла 18%/25%/50% и центрифугировали при 40,000 g 30 мин. Интактные митохондрии собирали между фазами 25% и 50% перкольного градиента. Митохондрии промывали дважды в буфере Б и центрифугировали при 22000 g 10 мин. Конечный осадок митохондрий ресуспендировали в 0.5 - 1 мл буфера Б. Все процедуры проводились при 4° С. Концентрацию митохондриального белка определяли по методу Бредфорда (1976) с красителем Кумасси голубой R-250 с использованием набора «Bio-Rad Protein Assay» (“Bio-Rad”). Стандартная кривая для определения концентрации белка построена с использованием БСА (“Sigma”). Митохондрии использовались в run-on транскрипции сразу после выделения.

Run-on транскрипция. Изучение транскрипции митохондриальных генов проводили методом run-on транскрипции [1] в нашей модификации. Подбор праймеров для исследуемых генов осуществляли при помощи программы Vector NTI. Интактные митохондрии (в количестве, эквивалентном 100 мкг митохондриального белка) добавляли к реакционной смеси, содержащей 50 мл транскрипционного буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 10 мМ $MgCl_2$, 0.2 мМ CTP, GTP и ATP, 0.01 мМ UTP, 50 mCi [б-32P]UTP (“Amersham”), 20 ед. РНазин (“Fermentas”) и 10 мМ в-меркаптоэтанол. Реакционная смесь осторожно пипетировалась 6 раз для разрушения митохондрий. Раствор инкубировали 15 мин при 25°С и останавливали реакцию добавлением эквивалентного объема стоп-буфера (50мМ Tris-HCl, pH 8.0, 25 мМ EDTA, 5% саркозил). ^{32}P-меченные транскрипты изолировали из митохондрий, как описано в работе [2], и гибридизовали с нанесенными на нейлоновую мембрану митохондриальными генами, в буфере, содержащем 250 мМ Na_2HPO_4, 7% SDS, и 2.5 мМ EDTA. Радиоактивные сигналы детектировали с помощью сканера «Molecular Imager FX» с использованием программы «Quantity One software» (“Bio-Rad”). Эффекты ингибиторов, используемых в run-on транскрипции митохондриальных генов, рассматривались как достоверные, если сигналы отличались от контрольного варианта (срезанные растения, инкубируемые в воде), как минимум, в 2 раза. Все эксперименты выполнены в 3-4-х повторностях.

Нанесение митохондриальных генов на мембрану. Тотальная ДНК была изолирована из *Arabidopsis thaliana* Col-0 методом фенол-хлороформной экстракции и обработана РНазином (DNase-free) (“Fermentas”). Фрагменты 31 митохондриальных генов были амплифицированы с помощью ПЦР. Генные фрагменты наносились на нейлоновую мембрану Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech). ДНК каждого генного фрагмента в количестве 1 мкг обрабатывали, как описано [2], и затем наносили на мембрану в двух повторностях с помощью аппарата Bio-Dot (“Bio-Rad”). Схема нанесения фрагментов изучаемых генов на нитроцеллюлозную мембрану приведена рис. 1, А.

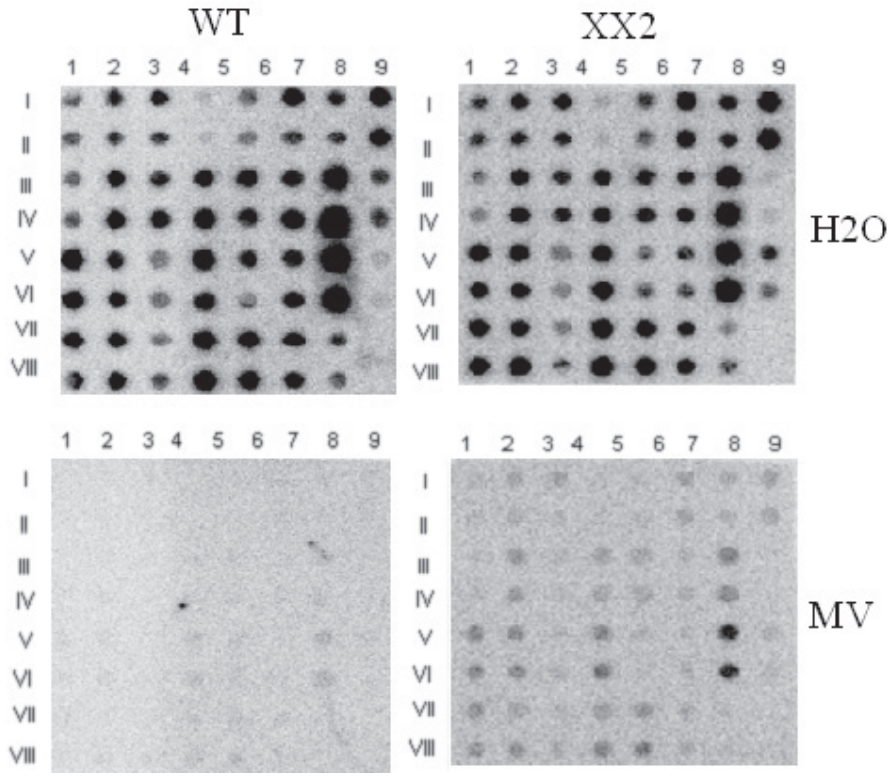
Результаты и обсуждение

Исследованные в данной работе гены являются представителями разных функциональных групп митохондриального генома: 3 гена рибосомальных РНК, 8 генов транспортных РНК, 4 кодирующих рибосомальные белки гена, 9 кодирующих компоненты дыхательной цепи генов, 3 кодирующих субъединицы АТФ-синтазы гена, 4 гена биогенеза цитохрома *c* и гены *orf*. Из представленных на рис. 1, В данных можно видеть, что обработка растений дикого типа паракватом, в целом, оказывает негативное влияние на митохондриальную транскрипцию. При этом необходимо отметить, что снижение скорости транскрипции проявлялось в различной степени для отдельных митохондриальных генов.

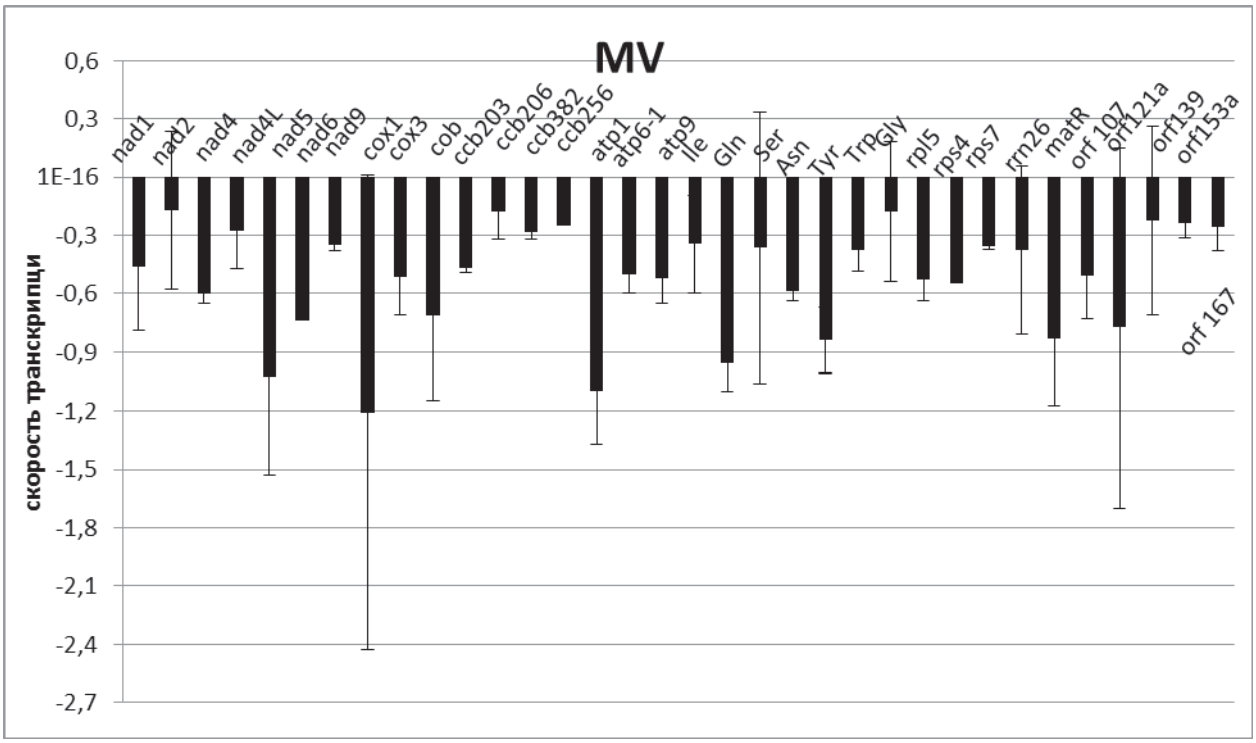
А.

	1	2	3	4	5	6	7	8
I, II	nad1	nad5	cob	ccb382	Ile	Trp	rps7	orf139
III, IV	nad2	nad9	ccb203	atp1	Gln	Gly	rrn26	orf153a
V, VI	nad4	cox1	ccb206	atp6-1	Ser	rpl5	orf 107	orf 167
VII,VIII	nad4L	cox3	ccb256	atp9	Tyr	rps4	orf121a	

Б.


WT
XX2
1 2 3 4 5 6 7 8 9
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
H2O
MV

В.


MV
скорость транскрипции
0,6
0,3
1E-16
-0,3
-0,6
-0,9
-1,2
-1,5
-1,8
-2,1
-2,4
-2,7
nad1
nad2
nad4
nad4L
nad5
nad6
nad9
cox1
cox3
cob
ccb203
ccb206
ccb382
ccb256
atp1
atp6-1
atp9
Ile
Gln
Ser
Asn
Tyr
Trp
Gly
rpl5
rps4
rps7
rrn26
matR
orf 107
orf121a
orf139
orf153a
orf 167

Г.

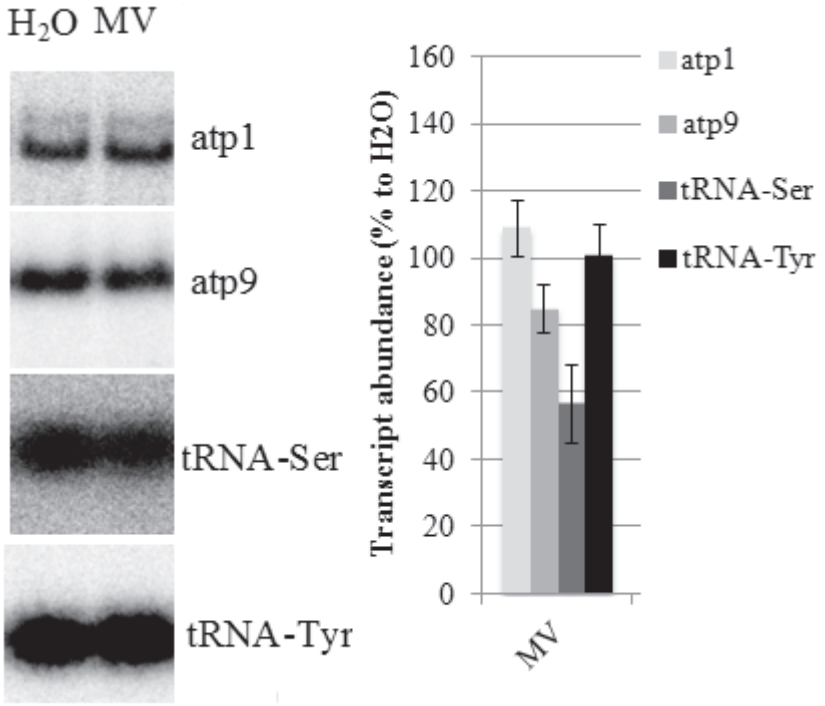


Рис. 1. Влияние параквата (MV) на скорость транскрипции митохондриальных генов в 12-дневных проростках арабидопсиса условиях run-on эксперимента. Митохондрии выделяли из проростков арабидопсиса, инкубированных в растворе MV или воде в течение 4-х часов. А – схема нанесения фрагментов ДНК для 31 гена. Б – радиоавтограф результатов транскрипции митохондриальных генов. В – гистограмма значений транскрипции для всех генов. Г – гистограмма содержания транскриптов генов *atp1, atp9, мРНК-Ser, мРНК-Tyr*

Эффект параквата на содержание митохондриальных транскриптов был сильнее, чем его эффект на скорость транскрипции (рис. 1, Г). При этом содержание транскриптов т*РНК-Ser* уменьшалось до 56%. Уровень транскриптов гена *atp9* также достоверно снижался, тогда как содержание транскриптов генов *atp1* и т*РНК-Tyr* не отличалось от контрольного варианта (рис. 1, Г). Сравнение результатов определения скорости транскрипции митохондриальных генов растений арабидопсиса дикого типа и линии XX2 при их обработке паракватом показало меньшую степень подавления митохондриальной транскрипции в линии XX2, что можно объяснить защитным эффектом повышенной экспрессии гена AOX1a.

Выводы

1. С использованием метода run-on транскрипции исследовано влияние гербицида параквата на интенсивность транскрипции митохондриальных генов растений арабидопсиса дикого типа и трансгенной линии XX2 с повышенной экспрессией гена AOX1a, кодирующего альтернативную оксидазу.

2. Обработка растений обеих линий паракватом вызывает достоверное снижение транскрипционной активности исследованных митохондриальных генов, однако, подавление транскрипции менее выражено в митохондриях линии XX2, что можно объяснить защитным эффектом повышенной экспрессии гена AOX1a.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного междисциплинарного проекта СО РАН № 59, гранта РФФИ 12-04-01148-а и Министерства образования и науки Российской Федерации.

Литература

1. Giege P., Hoffmann M., Binder S., Brennicke A. RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria // EMBO Rep. – 2000. – Vol. 2 – P. 164-170.

2. Zubo Y.O., Kusnetsov V.V. Application of run-on transcription method for studying the regulation of plastid genome expression // Russ. J. Plant Physiol. – 2008. – Vol. 55 – P. 114-122.

POTAPOVA T.V.[1,2], ZUBO Y.O.[1*], TARASENKO V.I.[2], NEVINSKY G.A.[4], BÕRNER TH.[1], KONSTANTINOV Y.M.[1,2,3]
[1]Institute fьr Biologie/Genetik, Humboldt-Universitдt zu Berlin, Chaussestr., 117 Germany, 10115, Berlin,
[2]The Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
Russia, 664033, Irkutsk, Lermontova st., 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru
[3] The Irkutsk State University, Sukhe-Batar st., 5
Russia, 664033, Irkutsk
[4]The Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS
Russia, 630090, Novosibirsk, Acad. Lavrent'ev Pr., 8
[*] Current address – Dartmouth College, 78 College st., Hanover, NH, 03755, USA

STUDIES OF OXIDATIVE STRESS INFLUENCE ON MITOCHONDRIAL GENES TRANSCRIPTION IN ARABIDOPSIS THALIANA

Aims. The influence of oxidative stress on mitochondrial genes transcription in wild type Arabidopsis plants and XX2 line overexpressing AOX1a gene was studied. ***Methods.*** Transcriptional activity of mitochondrial genes was measured by run-on assays with mitochondria isolated from Arabidopsis plants treated by methylviologen (MV). ***Results.*** Treatment by methylviologen of wild type plants resulted in decrease of mitochondrial genes transcript level and MTR values. It was shown also that mitochondrial genes transcription rate in XX2 line plants was less sensitive to oxidative stress caused by MV in comparison to wild type plants.. ***Conclusions***. The results obtained show the importance of *in organello* run-on transcription system in studies of physiological mechanisms of mitochondrial genes transcriptional regulation *in vivo*.
Key words: mitochondrial genes transcription, oxidative stress, methylviologen.

СТЕГНИЙ В.Н.
Томский государственный университет
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина 36, e-mail: stegniy@res.tsu.ru

ПРИНЦИПЫ ЭВОЛЮЦИОННОЙ И АДАПТАЦИОННОЙ ЗНАЧИМОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ВИДОВЫХ ГЕНОМОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ

В селекционной работе нередки случаи, когда некоторые виды растений и животных, используемые как исходный материал, плохо реагируют на отбор по требуемым признакам и не проявляют необходимого уровня адаптивной генетической пластичности. Причиной этого могут быть разные обстоятельства и прежде всего особенности генетической конституции видов, используемых для селекции. Изучение генетических аспектов видообразования и адаптации, проводимое мной около 40 лет позволило выявить ряд генетических параметров, различающих эволюционно лабильные виды (генераторы видообразования) и виды, эволюционно консервативные (терминальные звенья филогенетических цепей) [1]. Для обоснования сути проблемы кратко рассмотрим характер эволюции эукариот.

Эволюционное развитие жизни на Земле осуществлялось на основе выявленных Ламарком двух главных процессов: 1) повышения уровня организации (градация); 2) возникновения разнообразия типов организации на каждом уровне. Впоследствии Б. Ренш вертикальную эволюцию (градации) назвал *анагенезом*, а горизонтальную – *кладогенезом*, который связан с адаптивной радиацией. Дж. Хаксли добавил третье направление – *стасигенез* – явление эволюционной стабилизации, то есть сохранения неизменяющихся, персистирующих ветвей. Повышение уровня организации (*вертикальная эволюция*) и возникновение адаптивного разнообразия таксонов на каждом уровне (*горизонтальная эволюция*) имеют принципиальные различия по способу своего осуществления. Для вертикальной эволюции Э. Коп в 1896 году разработал правило неспециализированности предков: новые крупные таксономиче-