

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У РАСТЕНИЙ

Н.С. Белозерова, Я.О. Зубо,
А.Г. Шугаев, В.В. Кузнецов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

Статья посвящена оптимизации метода run-on транскрипции для изучения регуляции экспрессии митохондриального генома растительных клеток. В работе описаны основные аспекты, которые могут вызывать трудности у исследователей при применении данного метода. Цель работы заключается в том, чтобы способствовать быстрейшему внедрению метода run-on транскрипции в практику научных исследований биологами растений.

Растения обеспечивают процессы роста и поддержания функциональной целостности структурной биомассы за счет поставляемой дыханием энергии. В результате жизнедеятельности значительная доля ассимилированного при фотосинтезе углерода окисляется до CO_2 . Известно, что чистый прирост биомассы обеспечен превышением фотосинтеза над дыханием. Соотношение этих двух фундаментальных процессов определяется тремя геномами растительной клетки: ядерным, пластидным (пластомом) и митохондриальным. Экспрессия ядерного генома уже давно и интенсивно изучается многими учеными на различных объектах. Хлоропласт как органелла, присущая исключительно фотосинтезирующим организмам, также довольно активно изучается; в частности, исследуется регуляция экспрессии пластидного генома как экзогенными, так и эндогенными факторами. Нами ранее была показана регуляция биогенеза хлоропластов цитокенином на уровне экспрессии пластидных и ядерных генов, кодирующих хлоропластные белки [1]. Изучение экспрессии митохондриального генома происходит в основном на грибах и животных [2]. Это частично может быть связано с трудностями, которые встречаются при выделении функционально активных митохондрий из растений. В первую очередь к ним относится наличие плотных и жестких клеточных оболочек, вызывающих механические повреждения орга-

нелл при растирании тканей. Отрицательную роль играют кислая реакция клеточного сока, выделяющегося в процессе гомогенизации ткани, а также содержащиеся в значительном количестве во многих растительных клетках фенольные соединения, являющиеся разобщающими агентами и ингибиторами. Другие особенности растительных тканей, такие как высокое содержание крахмала, фотосинтетических пигментов и масел, также оказывают негативное влияние на качество и чистоту изолированной митохондриальной фракции. Поэтому для получения интактных митохондрий в каждом конкретном случае в зависимости от объекта и его физиологического состояния необходимо подбирать оптимальные условия выделения.

Несмотря на существование различных методов, дающих возможность определить общее содержание (steady state) индивидуальных мРНК в клетке в каждый определенный момент времени, нами был выбран метод run-on транскрипции: это единственный метод, который позволяет оценить скорость транскрипции индивидуальных генов, так как при его применении практически исключается влияние стабильности молекул РНК на получаемый результат.

Метод run-on транскрипции был впервые предложен для изучения скорости транскрипции ядерных генов [3]. В последнее время он стал чаще применяться для изучения экспрессии пластома [4; 5], однако работ по изучению интенсивности транскрипции митохондриальных генов, особенно у растений, в настоящее время практически нет. Это, вероятно, объясняется как сложностью выделения интактных митохондрий, так и особенностями проведения реакции run-on транскрипции в лизате этих органелл.

В данной работе отражены основные методические тонкости получения нативных митохондрий из семядолей люпина желтого, их подготовки для транскрипции *in vitro* и непосредственно самой реакции run-on транскрипции.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований были выбраны этиолированные семядоли люпина желтого (*Lupinus luteus* L.), так как они являются удобной системой для изучения гормональной и световой регуляции физиологических процессов, в том числе и биогенеза пластид [6]. Мы предполагали, что на семядолях люпина желтого можно будет изучать регуляцию экспрессии на уровне транскрипции не только пластидного, но и митохондриального генома.

Метод run-on транскрипции. Метод run-on транскрипции можно условно разделить на четыре этапа: 1) выделение органелл; 2) подготовка мембран с фрагментами изучаемых генов; 3) проведение реакции транскрипции с выделением меченых вновь синтезируемых транскриптов; 4) ДНК-РНК гибридизация, отмывка мембран и анализ данных.

Выделение органелл. Процедура выделения митохондрий включает гомогенизацию ткани, отделение митохондриальной фракции методом дифференциального центрифугирования, очистку полученной фракции митохондрий в градиенте плотности сахарозы, определение чистоты и качества полученного препарата митохондрий. Все операции по выделению митохондрий проводятся при температуре 0—4 °С.

Процесс гомогенизации тканей должен быть достаточно быстрым. Разрушение растительной ткани обычно производят при помощи пресса. Применение пресса для разрушения тканей этиолированных побегов проростков растений значительно сокращает время проведения гомогенизации и позволяет получить интактные митохондрии [7; 8]. Однако в нашем конкретном случае гомогенизация проводилась в блендере фирмы Moulinex при умеренных скоростях вращения, что связано с жесткостью тканей семядолей. Гомогенизация ткани проводилась в буфере следующего состава: 0,6 М сахароза; 25 мМ MOPS (pH 7,8); 2 мМ ЭГТА; 10 мМ ДТТ; 1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА); 6 г/л поливинилпирролидон. Соотношение навески ткани к буферу составляло 1 : 4 (вес/объем).

Гомогенат после фильтрования через 1 слой марли, мираклоса (Miracloth, «Calbiochem-Behring») и нейлона (размер пор 80 мкм) центрифугировали 5 мин при 3500 g. Супернатант переливали в новые пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 7500 g. После этого для осаждения митохондрий супернатант вновь переносили в чистые пробирки и центрифугировали при 20000 g в течение 10 мин.

Для получения более чистого препарата суспензия митохондрий может быть дополнительно очищена с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы или перкола. В нашем случае был использован ступенчатый сахарозный градиент (20, 35, 47, 60% сахароза в отмывочном буфере, центрифугирование 90 мин при 52 500 g) [9]. После градиента митохондрии дважды отмывались в среде следующего состава: 0,3 М сахароза; 25 мМ MOPS (pH 7,8); 2 мМ ЭГТА; 10 мМ ДТТ. Метаболическую активность митохондрий определяли по поглощению кислорода и регистрировали полярографически (полярограф LP 7) при 25 °С с помощью платинового электрода закрытого типа в ячейке объемом 1 мл. На основе полярограмм рассчитывали основные параметры окисления и фосфорилирования в митохондриях: скорость фосфорилирующего дыхания (состояние 3 или V3), скорость нефосфорилирующего дыхания (состояние 4 или V4), дыхательный контроль по Чансу-Вильямсу ($ДК = V3/V4$) и отношение АДФ/О — отношение фосфорилированного АДФ к количеству утилизированного при этом кислорода [10]. В качестве субстратов дыхания использовали сукцинат (10 мМ). Определение качества полученной фракции митохондрий проводилось по величинам ДК, и в опытах использовались препараты митохондрий, характеризующиеся ДК больше 2.

Приготовление мембран, несущих фрагменты ДНК анализируемых генов. Ген-специфичные фрагменты ДНК обычно получают с помощью ПЦР и наносят на нейлоновую мембрану в точки с помощью специального аппарата, применяемого для дот-гибридизации (Bio-Dot™, «Bio-Rad»). Праймеры для амплификации фрагментов митохондриальных генов люпина подбирали по консервативным последовательностям митохондриальных генов *Arabidopsis thaliana*. Вся процедура приготовления мембран в нашем случае была выполнена, как описано ранее [11]. Особенность работы с митохондриями заключается в том, что митохондрии даже после очистки с помощью сахарозного градиента могут содержать примесь пропластид. Это может привести к гибридизации ген-специфичных фрагментов

митохондриальных генов с имеющими некоторую гомологию пластидными генами. Чтобы исключить такую возможность, используемые при гибридизации фрагменты митохондриальных генов с помощью программы BLAST (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) были проверены на возможную гомологию с четырьмя случайно выбранными полностью секвенированными пластомами. Кроме того, на мембрану были также нанесены в качестве контролей фрагменты нескольких пластидных генов, Это позволяет при интерпретации результатов оценить возможный вклад этиопластов в интенсивность транскрипции индивидуальных митохондриальных генов.

Транскрипция in vitro. Выделение вновь синтезированной меченой РНК. Выделенные интактные митохондрии являются основой транскрипционной системы. Они содержат ДНК, РНК-полимеразы и белковые факторы регуляции транскрипции. После замены буфера для отмывки органелл на среду для реакции транскрипции *in vitro* митохондрии лизируются из-за резкого падения осмотической силы раствора, что позволяет ионам Mg^{2+} , нуклеотидтрифосфатам (НТФ) и другим компонентам транскрипционной системы беспрепятственно проникать в полуразрушенные органеллы.

Количество митохондрий, взятых в реакцию транскрипции, оценивают обычно по содержанию белка. Белок определялся по методу Бредфорда [12]. Для реакции *run-on* транскрипции брали 100 мкг белка. Транскрипцию *in vitro* проводили в реакционной среде следующего состава: 50 мМ HEPES (рН 8,0); 10 мМ $MgCl_2$; 25 мМ ацетат калия; 10 мМ ДТТ; 200 мкМ АТФ; 200 мкМ ЦТФ; 200 мкМ ГТФ; 50 мкМ УТФ; 20 ед. активности РНКазина; 2 МБк [$\alpha^{32}P$]-УТФ (молярная активность 148 ПБк/моль).

Для проведения реакции транскрипции в осадок митохондрий (100 мкг белка) добавляли 100 мкл транскрипционной среды, перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при температуре 30 °С. Нуклеиновые кислоты, в том числе и вновь синтезированную меченую РНК, выделяли, как описано в ранее опубликованной статье [11].

ДНК-РНК гибридизация, отмывка мембран, анализ данных. Гибридизация проводилась при 42 °С в течение ночи в буфере следующего состава: 250 мМ Na_2HPO_4 , 7% ДДС и 2,5 мМ ЭДТА. Все остальные этапы были аналогичны разработанной ранее в нашей лаборатории системе *run-on* транскрипции для хлопчатопластов [11], однако отмывку мембран после ДНК-РНК гибридизации проводили при более мягких условиях. Оценка результатов производилась при помощи фосфоимиджера (Typhoon Trio +, GE Healthcare).

Результаты и обсуждение. Применение практически любого нового метода требует оптимизации отдельных его этапов. При использовании *run-on* транскрипции в зависимости от объекта и типа органелл необходима оптимизация многих стадий метода — от выделения митохондрий до гибридизации и отмывки мембран.

На первых этапах работы мы использовали традиционные методы выделения митохондрий, которые основаны на дифференциальном центрифугировании без последующей очистки в ступенчатом градиенте сахарозы. Однако органеллы,

выделенные таким образом, имели очень низкую транскрипционную активность *in vitro*. Это могло быть связано со значительной примесью этиопластов и фрагментов клеток, что отмечается в литературе [13]. В результате самих митохондрий в транскрипционной среде оказывается недостаточно.

Чтобы исключить такую возможность, мы перешли к получению более чистой фракции митохондрий путем их очистки с помощью ступенчатого градиента сахарозы. Вопреки рекомендациям [13] в отмывочный буфер не был добавлен БСА, так как он может исказить результат по определению количества митохондрий.

При разделении в градиенте плотности сахарозы были получены три полосы, предположительно содержащие митохондрии, находящиеся на границах сахарозы разной концентрации (1 — граница 20 и 35% сахарозы; 2 — граница 35 и 47% сахарозы; 3 — граница 47 и 60% сахарозы). По литературным данным митохондрии при центрифугировании в градиенте сахарозы скапливаются на границе 60% и 47%, 47% и 35% сахарозы. Степень обогащенности каждой из фракций митохондриями оценивали по скорости дыхания с помощью полярографа. Интактные митохондрии были обнаружены на границе 35% и 47% сахарозы (рис. 1). Следует также отметить, что, согласно расчетам, количество белка митохондрий этой фракции от белка, определяемого до очистки на сахарозном градиенте, составляет 10%.

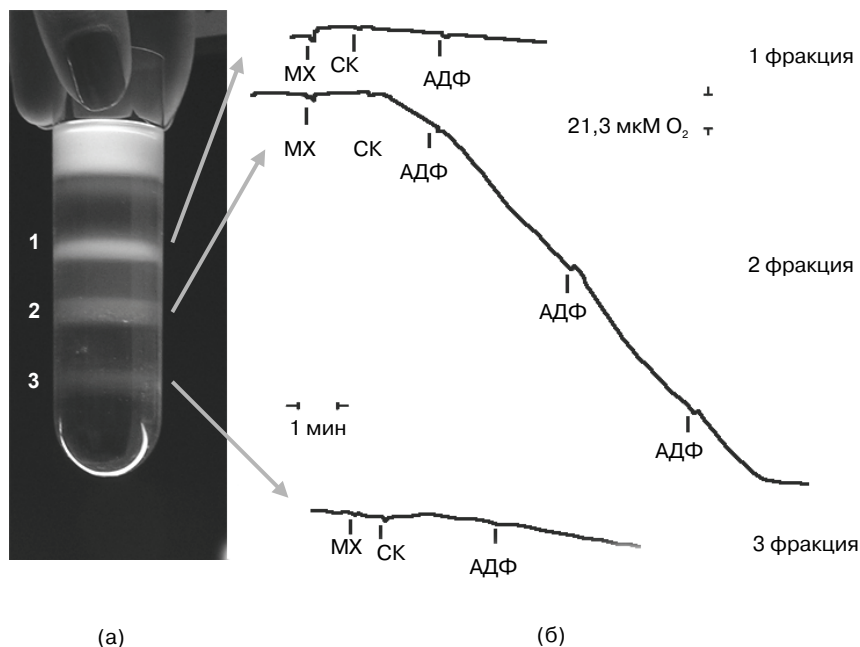


Рис. 1. Данные полярографических исследований различных фракций, полученных в результате очистки митохондрий в сахарозном градиенте:

а — расслоение грубой суспензии митохондрий после очистки в сахарозном градиенте: 1 — граница 20 и 35% сахарозы; 2 — граница 35 и 47% сахарозы; 3 — граница 47 и 60% сахарозы; б — полярограммы соответствующих фракций, МХ — добавление в ячейку митохондрий; СК — добавление в ячейку 10мМ сукцината; АДФ — добавление в ячейку 125 мкМ АДФ

Со всеми тремя фракциями, отобранными с сахарозного градиента и предположительно содержащими митохондрии, была проведена реакция транскрипции *in vitro*. Результаты показали, что наиболее активная транскрипция наблюдалась с митохондриями, которые локализовались во второй фракции и проявляли наибольшую функциональную активность. Это подтверждается наиболее интенсивными сигналами радиоактивности, полученными при гибридизации синтезированной *in vitro* РНК с фрагментами индивидуальных РНК митохондриальных генов. Наиболее высокая скорость транскрипции была показана для гена рРНК (*rrn18*, рис. 2б). Более низкую интенсивность транскрипции в условиях нашего эксперимента имели *cox3*, *cob*, *nad9* гены, а также ген, кодирующий транспортную РНК митохондрий — *trnl*. Есть в препарате митохондрий незначительная примесь пластид, что видно по наличию сигнала с пластидной рРНК (*rrn16* и *rrn23* гены). Однако на мембрану нанесены фрагменты генов митохондрий, не имеющих гомологий с какими-либо генами пластид, поэтому небольшая примесь пластид не будет влиять на транскрипцию митохондриальных генов. Результаты показывают, что наиболее качественные митохондрии находятся на границе 35 и 47% сахарозы, которые и рекомендуется брать для анализа. Следует отметить, что интенсивность транскрипции митохондриальных генов была значительно более низкой, чем показанная нами ранее скорость транскрипции большинства пластидных генов [1]. Полученные результаты показали, что оптимизированный нами метод позволяет выделить из семян люпина интактные транскрипционно активные митохондрии.

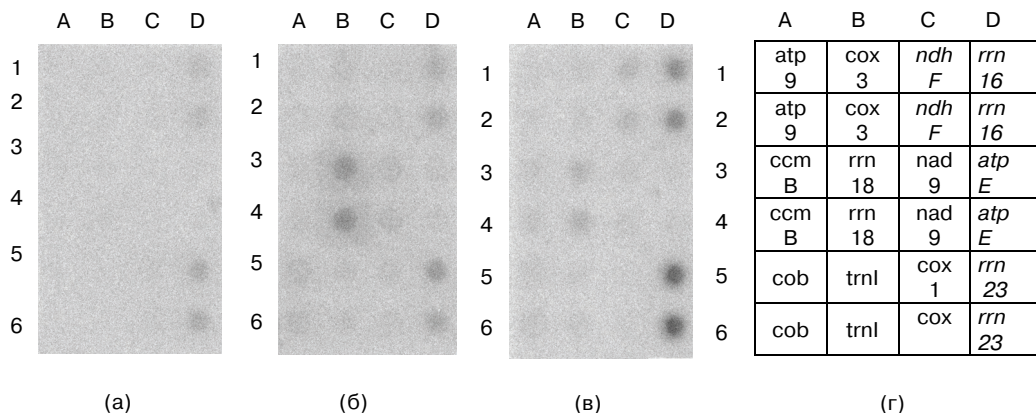


Рис. 2. Результаты run-on транскрипции с различными фракциями после очистки митохондрий в градиенте сахарозы: радиоавтографы экспериментов транскрипции с 1 (а), 2 (б) и 3 (в) фракциями; г — схема нанесения на мембрану фрагментов ДНК исследованных оргanelльных генов (прямой шрифт — митохондриальные гены, курсив — хлоропластные гены)

Заключение. Сложность выделения функционально активных митохондрий из растительных тканей служит одной из основных причин ограниченного количества работ по изучению функционирования этих органелл в растениях и, особенно, по изучению регуляции экспрессии их генов. Метод run-on транскрипции

является современным подходом для изучения интенсивности транскрипции сразу многих генов. Использование этого метода применительно к митохондриальному геному связано не только с необходимостью получения достаточно чистой фракции органелл, но и с оптимизацией условий проведения различных этапов run-on транскрипции.

В данной работе подобраны оптимальные условия для выделения высокоочищенных функционально-активных митохондрий из семян люпина желтого. Показана транскрипционная активность выделенных органелл в условиях *in vitro* и возможность их применения для изучения регуляции экспрессии митохондриального генома на уровне транскрипции.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президента РФ НШ-915.2008.4 и гранта РФФИ № 07-04-01398.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Зубо Я.О., Селиванкина С.Ю., Ямбуренко М.В., Зубкова Н.К., Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Цитокинины активируют транскрипцию хлоропластных генов // Доклады академии наук. — 2005. — Т. 400. — № 3. — С. 396—399.
- [2] Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов органелл. — Минск: Тэхноложыя, 2003. — С. 121—167.
- [3] Marzluff W.F. Transcription of RNA in Isolated Nuclei // Methods Cell Biol. — 1978. — V. 19. — P. 317—331.
- [4] Deng X.W., Stern D.B., Tonkyn J.C., Gruissem W. Plastid Run-on Transcription. Application to Determine the Transcriptional Regulation of Plastid Genes // J. Biol. Chem. — 1987. — V. 262. — P. 9641—9648.
- [5] Mullet J.E., Klein R.R. Transcription and RNA Stability Are Important Determinants of Higher Plant Chloroplast RNA Levels // EMBO J. — 1987. — V. 6. — P. 1571—1579.
- [6] Kusnetsov V.V., Oelmuller R., Sarwat M.I., Porfirova S.A., Cherepneva G.N., Herrman R.G., Kulaeva O.N. Cytocinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast protein in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels // Planta. — 1994. — V. 194. — P. 318—327.
- [7] Андреева И.Н. Методы выделения физиологически активных митохондрий из растительных тканей. — Клетка и клеточные структуры / Отв. ред. Ю.Г. Молотковский. — М.: Наука, 1968. — С. 16—24.
- [8] Генерозова Н.П., Маеская С.Н., Шугаев А.Г. Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков гороха, подвергнутых водному стрессу // Физиология растений. — 2009. — Т. 56. — № 1. — С. 45—52.
- [9] Giegé P., Hoffmann M., Binder S., Brennicke A. RNA degradation buffers asymmetries of transcription in *Arabidopsis* mitochondria // EMBO. — 2000. — V. 1. — № 2. — P. 164—170.
- [10] Chance B.W., Williams V.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation // Adv. Enzymol. — 1956. — V. 17. — № 1. — P. 65—132.
- [11] Зубо Я.О., Кузнецов В.В. Применение метода run-on транскрипции для изучения регуляции экспрессии пластидного генома // Физиология растений. — 2008. — Т. 55. — № 1. — С. 114—122.
- [12] Bredford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — № 72. — P. 248—252.
- [13] Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / Отв. ред. Р.К. Салаяев — М.: ООО «НПК „Промэкобезопасность“», 2004. — С. 11—16.

METHOD FOR STUDYING OF INDIVIDUAL MITOCHONDRIAL GENE TRANSCRIPTION IN PLANTS

**N.S. Belozerova, Y.O. Zubo,
A.G. Shugaev, V.V. Kusnetsov**

Timirjazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science
Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276

The article dedicates the optimization of run-on transcription method for studying regulation of mitochondrial genome expression in plant cell. Here we describe principle aspects which might give difficulty during investigation of transcription rate in plant mitochondria. The aim of this work is to promote quick application of run-on transcription method in practice research.