

KOULINTCHENKO M.V.¹, **KLIMENKO E.S.**¹, **IBRAHIM N.**², **WEBER-LOTFI F.**²,
DIETRICH A.², **KONSTANTINOYU.M.**¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,
Russian Federation, 664033, Irkutsk, Lermontov str., 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

² Institut de Biologie Moleculaire des Plantes CNRS,
France, F-67084, Strasbourg, 12 rue du general Zimmer, e-mail: andre.dietrich@ibmp-cnrs.unistra.fr

DNA AS MODULATOR OF H⁺-IONS PERMEABILITY OF INNER MEMBRANE OF MITOCHONDRIA IN *SOLANUM TUBEROSUM* ACTING ON THE LEVEL OF ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCATOR

Aims. To study the potential metabolic consequences of DNA import into mitochondria we investigated the effect of 200 bp length DNA on the permeability of inner membrane of tuber mitochondria in *Solanum tuberosum* in comparison with such an effect of adenine nucleotides (ADP, ATP), palmitic acid, palmitoyl-CoA and highly specific inhibitors of adenine nucleotide translocator as atractyloside and carboxyatractyloside. **Methods.** Freshly-isolated highly purified mitochondria from potato tuber (*Solanum tuberosum*) were used in all experiments. To evaluate the permeability of the inner mitochondrial membrane to H⁺-ions the swelling of mitochondria in the medium containing 100 mM NH₄NO₃, 20 mM tris-HCl (pH 7.4) was measured using LKB Ultrospec II UV-Visible spectrophotometer. **Results.** We showed that DNA in concentration 1 mM is able to induce swelling of potato tuber mitochondria like such highly specific ligands of adenine nucleotide translocator as carboxyatractyloside and atractyloside. Therefore the increase in permeability of inner mitochondrial membrane to H⁺-ions is presumably explained by binding of DNA to active sites of ADP/ATP carrier. The stimulation of mitochondrial swelling by addition of DNA was removed by the addition of ADP in physiological concentrations. As for carboxyatractyloside and atractyloside, both these ligands increase DNA effect on mitochondrial swelling. **Conclusions.** We conclude that DNA is able to bind to specific binding sites of adenine nucleotide translocator in plant mitochondria and through conformational changes of this key membrane carrier to induce the increase of inner mitochondrial membrane permeability to H⁺-ions. We hypothesize that in some critical states of plant cell (bacterial and viral infections leading to increase of DNA concentration in cytoplasm) the DNA effect on ion membrane permeability observed in this study may serve as one from a set of signals inducing apoptosis.

Key words: mitochondria, *Solanum tuberosum*, DNA, mitochondrial swelling, adenine nucleotide translocator, inner membrane permeability to H⁺-ions.

УДК 575.22+575.222

МИХАЙЛИК С.Ю., АНТОНІЮК М.З., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,
Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: sermuraha@gmail.com

МОЖЛИВІ МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ МІНЛИВОСТІ ГЛІАДИНОВИХ ГЕНІВ В ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ

Гени, що кодують гліадини пшениці, є однією з найзручніших моделей, яку можна використати для вивчення молекулярної природи тих процесів, які відзначаються сьогодні як генетична нестабільність геномів гібридного походження. Попереднє вивчення трьох наборів інтрогресивних ліній м'якої пшениці, які мають інтрогресії від трьох видів егілопсу [1], за електрофоретичними спектрами гліадинів виявило високий рівень мінливості між різними лініями та між рослинами однієї і тієї самої лінії. Гліадини кодуються двома серіями ортологічних генних кластерів, *Gli-1*

Gli-2, розташованих на коротких плечах хромосом 1-ої та 6-ої гомеологічних груп, відповідно. Вони складаються з мономерних протеїнів, які утворюють у електрофоретичному спектрі зони ω, γ, β та α. в напрямку збільшення електрофоретичної рухливості. Рекомбінація усередині генних кластерів відбувається вкрай рідко [2]. В гліадинових спектрах інтрогресивних ліній нові компоненти найчастіше зустрічалися у ω-зоні, рідше у γ- та β-зонах та зовсім рідко у α-зоні [3], що можна пояснити частково розмірами та роздільною здатністю електрофоретичних спектрів цих зон.

До складу генів, що кодують гліадини, входить повторювальний домен, консенсусна послідовність якого подібна в різних генів та містить велику кількість тринуклеотидів, що кодують глутамін, САА та САГ [4]. Наявність у складі гену таких повторів підвищує їхню поліморфність, яка може виникати за двома механізмами: через помилки при рекомбіногенезі, які спричинюються численими повторами, та через проковзування полімерази при реплікації ДНК [5]. Іншою причиною поліморфності гліадинів може слугувати велика кількість ретроелементів, що наявні у міжгенному просторі цих генів [6]. Наявність великої кількості ретроелементів у міжгенному просторі підвищує частоту проходження нерівного кросинговеру, що є причиною дуплікації генів гліадинів [7]. Метою нашого дослідження було встановити, чи супроводжується фенотипна мінливість, яку спостерігаємо на спектрах гліадинів, мінливістю у послідовності нуклеотидів гліадинових генів, чи потрібно шукати інші механізми виникнення поліморфізму в інтрогресивних лініях пшениці.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: 19 ліній – похідних Авродесу, представлені 49 генераціями, вирощеними у різні роки. ДНК виділяли з паростків чотирьох різних зернівок за стандартною методикою з метою відстеження внутрішньогенераційних відмінностей. ПЛР здійснювали з 9 парами праймерів, специфічних до САА та САГ мікросателітів гліадинових генів, що кодують білки трьох зон гліадинового спектра, α , β , ω .

Секвенували п'ять ампліконів: два після ПЛР з праймерами P3-a1-L/R до генного мікросателіту α -гліадину AJ133604.1, три після ПЛР з праймерами N-o1-R/L, специфічними до генного мікросателіту ω -гліадину DQ861428.1 (GenBank). Аналіз результатів сиквенсу проводився з використанням програмного

забезпечення Sequence Alignment Programs. Секвеновані послідовності порівнювали з очікуваними, отриманими з бази даних сиквенсів GeneBank. Для порівняння послідовностей використовувалося програмне забезпечення Clustal 2.1 (Cluster alignment) [8]. Праймерами для REMAP-технології слугувала консервативна послідовність ретротранспозону *Sukkula* та мікросателіт (CT)₉G.

Результати та обговорення

Реакція амплікації з використанням праймерів wggm-P3-a1-L/R, що є специфічними до поліглутамінового повтору α -гліадину AJ133604.1, продемонструвала від 2 до 3 компонентів на електрофоретичному спектрі. Маса більшості компонентів була очікувана, 164 н. Однак у спектрі ампліконів зернівки 2 лінії ges 32-1 з'явився новий компонент з розміром 230 н.

Наявність нових компонентів було виявлено при аналізі мікросателітного повтору гену ω -гліадину DQ861428.1 з використанням праймерів wggm-N-o1-L/R. У спектрі ампліконів однієї зернівки в одній з генерацій лінії ges 7 був компонент, важчий від інших компонентів, отриманих з використанням вказаного праймера, 220 н. В зернівках цієї ж лінії двох інших генерацій з'явився компонент масою 230 н. (рис. 1). Компонент масою 220 н. виявився у спектрі тієї самої зернівки лінії ges32-1, в якій був нетиповий спектр з праймерами до повтору α -гліадину AJ133604.1. Одна з зернівок лінії ges 12 мала додатковий компонент з розміром близько 300 нуклеотидів.

Використання пари праймерів P3-b1-L/R, специфічних до поліглутамінового регіону гену β -гліадину AF419254.1 також виявило поліморфізм компонентів ПЛР спектру. Спектри усіх зернівок можна поділити на два типи: ті, що у своєму спектрі мали два компоненти та ті, що мали один. Така відмінність у спектрі очевидно вказує на перебудови, що відбулися у поліглутамінових регіонах β -гліадину AF419254.1.

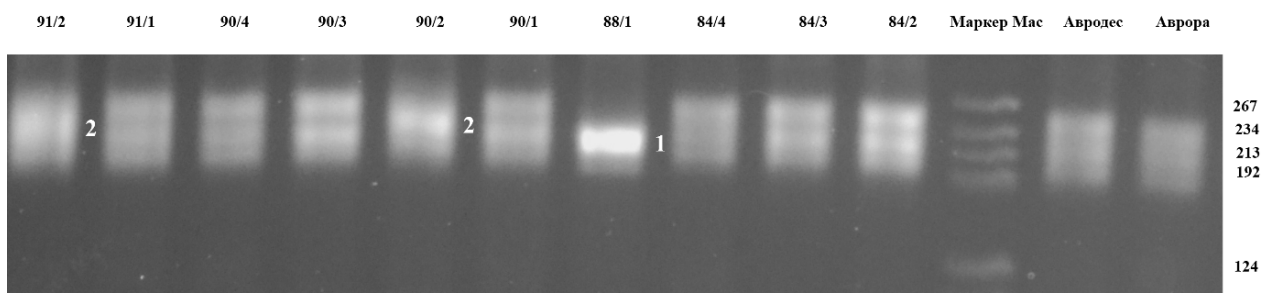


Рис. 1. Електрофоретичний спектр продуктів амплікації з парою праймерів wggm-N-o1-L/R. 1 та 2 – компоненти, що відрізнялися за масою від очікуваного продукту

Деякі з ампліконів, що не відповідають очікуваній масі, було піддано секвенсу. Перша послідовність – це продукт, отриманий з праймерами wggm-P3-a1-L/R. Його довжина складала 230 нуклеотидів, однак в процесі секвенування вдалося встановити лише 155 перших нуклеотидів. Послідовність отриманого продукту в тій частині, що була секвенована, порівнювали з послідовністю очікуваного для даної пари праймерів фрагменту гена. Ідентичність послідовностей, що порівнювалися, складала 57,3 %. Секвенована послідовність мала 5 делецій розміром від 2-х нуклеотидів до 6-ти та дві вставки: перша з 7-го по 12-й нуклеотиди, друга з 20-го по 32-й нуклеотид.

Другим об'єктом для секвенування було обрано компонент, що мав очікувану масу на електрофореграмі та був отриманий з ДНК тієї самої зернівки, що і продукт неочікуваної маси. Ідентичність послідовностей складала 56,4 %. Отримана в результаті секвенування послідовність мала три делеції та одну інсерцію з шести нуклеотидів, що знаходилася в кінці послідовності. Найбільша делеція мала довжину 31 нуклеотид і розташовувалася на початку послідовності. Загалом секвенована послідовність демонструвала коротший мікросателітний повтор від такого, що очікувався, оскільки мала однонуклеотидну інсерцію цитозину після 31 нуклеотиду, що розбиває сателітну послідовність на дві частини.

Було секвеновано три амплікони, отримані з праймерами до мікросателітної ділянки щ-гліадину номер DQ861428.1. Перша послідовність з лінії *res7*, яка відрізналась від продуктів інших зернівок за масою. Очікувана послідовність становила 206 нуклеотидів, секвенована послідовність мала масу 179 нуклеотидів. Ідентичність послідовностей складала 69,9 %. Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію, одну делецію 29 нуклеотидів довжиною на початку послідовності, та однонуклеотидну делецію у 45-му положенні. Сайти нагромадження кодонів глутаміну CAA та CAG майже не зазнали змін. Друга послідовність – це важкий нетиповий компонент лінії *res7*. Очікувана послідовність становила 206 нуклеотидів, секвенована послідовність мала масу 165 нуклеотидів. Ідентичність послідовностей складала 67,0%. Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію, 7 делецій довжиною від 20-ти нуклеотидів до 1-го. Переважна

більшість делецій розташовані на початку та в кінці секвенованої послідовності. Сайти нагромадження глутамінових кодонів залишаються, переважно, без змін. Третій компонент було отримано з електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК зернівки лінії *res70*, що відрізнявся від інших за масою. Очікувана послідовність становила 206 нуклеотидів, водночас секвенована послідовність мала розмір 179 нуклеотидів. Ідентичність послідовностей складала 71,8%. Секвенована послідовність мала одну тринуклеотидну інсерцію в кінці послідовності, як і у попередніх зразках, дві делеції, довжиною 11 та 19 нуклеотидів. В районі 60-го нуклеотиду секвенованої послідовності встановлено наявність сайленс мутації: кодон, що кодує глутамін CAA став глутаміновим кодоном CAG. Сайти нагромадження кодонів глутаміну CAA та CAG майже не зазнали змін.

Розгляд даних до секвенсу показує, що для всіх секвенованих послідовностей мала місце одна і та сама особливість профілю пиків секвенатора: для всіх зразків у ділянках гена, які розташовані між сайтами гібридизації праймерів та мікросателітною послідовністю, пики ставали слабо вираженими. Так буває у випадках, коли ДНК не характеризується мономорфністю, тобто гомологічні ділянки різних молекул мають певну кількість однонуклеотидних замін, SNP. Це примушує нас припустити, що ампліфікації піддається ДНК не лише того конкретного гена, до якого були підібрані праймери, а й ще інших генів з того самого кластера, адже гліадинові гени в межах кластера характеризуються близькою молекулярною структурою та можуть мати однакові послідовності для зв'язування з праймером.

Порівнювали два продукти ампліфікації, отримані з парою праймерів P3-a1-L/R на ДНК зернівки лінії *res32-2*, яка з двома іншими праймерами показала наявність неочікуваних ампліконів. Одна секвенована послідовність мала розмір 134 н. (*Seq-α-1*), інша – 155 (*Seq-α-2*). Послідовності демонстрували ідентичність між собою у 63,3 %, що виявилось більшою ніж при порівнянні отриманих секвенованих послідовностей з очікуваною послідовністю. Послідовність, яка була отримана з компоненту, що демонстрував меншу молекулярну масу, має довшу мікросателітну ділянку у порівнянні з іншою послідовністю, проте має велику кількість делецій від одного нуклеотиду до восьми у порівнянні з нею. Також

ідентифіковано велику кількість однонуклеотидних мутацій, як транзицій, так і трансверсій.

На ДНК зернівок ліній *res7* та *res32-2*, які мали нетипові компоненти спектрів, були отримані ПЛР-продукти з використанням праймерів N-01-L/R. Їх секвенували та порівняли одну з одною під назвами Seq- ω -1, Seq- ω -2, Seq- ω -3. Seq- ω -1 та Seq- ω -3 були 179-нуклеотидними, Seq- ω -2 – 165 нуклеотидною. Послідовності Seq- ω -1 та Seq- ω -2 демонстрували ідентичність у 73,7%, Seq- ω -1 та Seq- ω -3 мали вкрай високу ідентичність у 93,3%, Seq- ω -2 та Seq- ω -3 були ідентичними на 74,9%. Мікросателітний локус САА послідовності Seq- ω -2 складається з 18 повторів, в той час локус САА у послідовностях Seq- ω -1 та Seq- ω -3 – з 10 повторів. Така відмінність у кількості повторів, можливо, спричинена проковзуванням полімерази. Встановлено велику кількість однонуклеотидних мутацій, як транзицій так і трансверсій. Ідентичність секвенованих послідовностей виявилася вищою за таку в порівнянні секвенованих послідовностей з очікуваною.

Відмінності у розмірах та складі послідовностей надають можливість зрозуміти природу поліморфізму серед ампліконів мікросателітних повторів генів гліадинів, який може бути чинником поліморфізму гліадинових білків.

Відомо, що геноми рослин, які зазнали інтрогресій, демонструють зміну рівня метилювання та мобілізацію ретротранспозонів [9, 10]. Перемищення ретротранспозонів по геному можуть мати значні наслідки для геному рослин. Міжгенні ділянки гліадинів вкрай багаті на ретроелементи [6]. Метод REMAP надає можливість для ідентифікації руху ретроелементів по відношенню до мікросателітних повторів у геномі. Як донор консервативної ділянки ретротранспозону була використана послідовність найактивнішого ретротранспозона родини *Sukkula* [11], мікросателітний праймер – (CT)₉G.

На геномній ДНК Аврори було отримано 14 компонентів спектру (рис. 2).

Кожен з них є результатом ампліфікації ділянки ДНК, що знаходиться між ретротранспозоном *Sukkula* та мікросателітом (CT)₉G. Таким чином, зміна ПЛР спектру отриманого з використанням методики REMAP є свідченням або переміщення ретротранспозона, або змін у розташуванні чи структурі відповідного мікросателітного повтору. У REMAP-спектрі ДНК декотрих

зернівок були у наявності не всі компоненти, властиві аналогічному спектру ДНК Аврори (рис. 2). Загалом було проаналізовано 19 ліній – похідних Авродесу, які були представлені у 49 генераціях, і в 45 з них методом REMAP було зареєстровано внутрішньогенераційну мінливість за компонентами спектру.

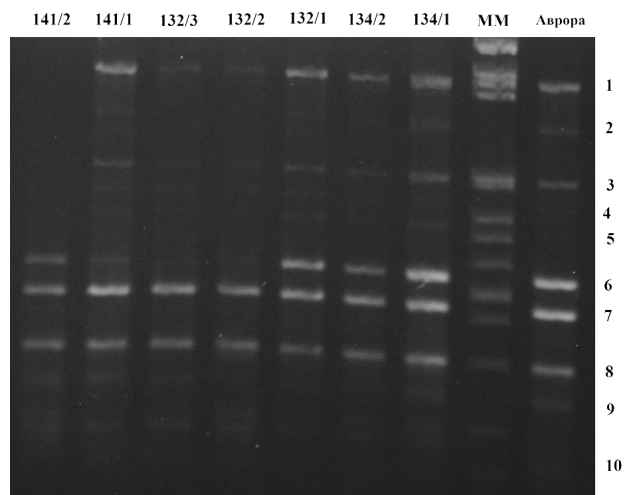


Рис. 2. REMAP-спектри ампліконів ДНК Аврори та деяких ліній

Така мінливість є свідченням переміщень ретротранспозонів у геномі інтрогресивних ліній або зміни положення чи структури мікросателіту (CT)₉G. Повністю повторювали спектр генотипу Аврора лише чотири генерації ліній *res*: 83, 102, 103 та 119. У решти генерацій зустрічалися окремі зернівки, що повторювали REMAP-спектр Аврори, це стосується ліній *res*: 7, 12, 13, 15, 16, 22, 70, 79. Усі інші генерації демонстрували відмінності у REMAP спектрі які проявлялися у наявності нових компонентів чи у відсутності компонентів, що є притаманними REMAP-спектрові Аврори.

Висновки

З використанням праймерів до мікросателітних повторів генів гліадинів було встановлено поліморфізм у ПЛР-спектрі гену α -гліадину AJ133604.1, β -гліадину AF419254.1 та ω -гліадину DQ861428.1. Виявлений поліморфізм свідчить про наявність перебудов у поліглутамінових трактах генів гліадинів або прилеглих до них ділянок. Секвенс ампліконів, отриманих з використанням праймерів P3-a1-L/R та N-01-L/R підтверджує наявність значних відмінностей у секвенованих послідовностях стосовно до очікуваних послідовностей, отриманих з баз даних секвенсів. Секвеновані послідовності відрізняються від очікуваних

певною кількістю делецій, деяких інсерцій, а також однонуклеотидних мутацій, як транзицій так і трансверсій. Встановлено подовження САА повторів у секвенованій послідовності, що отримана з продукту ампліфікації ДНК зернівки лінії *res7* з використанням праймерів N-01-L/R. Секвеновані послідовності демонстрували на 10–20% більшу ідентичність одна до одної, ніж до очікуваної послідовності. Вочевидь, це

свідчить про певні відмінності у послідовностях генів гліадинів пшениці м'якої та генів інтрогресивних ліній. Переважна більшість ліній, що досліджувалися, мала відмінності у спектрі REMAP у порівнянні з аналогічним спектром ДНК Аврори. Це вказує на значну рухливість ретроелементів у геномі інтрогресивних ліній пшениці, який знаходиться у стані стресу через своє гібридне походження.

Література

1. Антонюк М.З., Терновська Т.К. Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом «змішування» хромосом у межах одного субгеному // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – Київ: Логос, 2001. – 2. – С. 368–375.
2. Shewry P.R., Holford N.G., Lafandra D. Genetics of wheat gluten proteins // *Advanced in Genetics*. – 2003. – 49. – P. 111–171.
3. Михайлик С.Ю., Антонюк М.З., Терновська Т.К. Генетична варіабільність інтрогресивних ліній м'якої пшениці за генами *Gli* // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Біологія та екологія. – 119. – С. 8–14.
4. Anderson O.D., Huo N., Gu Y.Q. The gene space in wheat: the complete α -gliadin gene family from the wheat cultivar Chinese Spring // *Funct Integr Genomics*. – 2013. – 13. – P. 261–273.
5. Eckert K.A., Hile S.E. Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome // *Mol Carcinog*. – 2009. – 48. – P. 379–388.
6. Gu Y.Q., Crossman C., Kong X., Luo M., You F.M., Coleman-Derr D., Dubcovsky J., Anderson O.D. Genomic organization of the complex alpha-gliadin gene loci in wheat // *Theor Appl Genet*. – 2004. – 109. – P. 648–657.
7. Xie Z., Wang C., Wang K., Wang S., Li X., Zhang Z., Ma W., Yan Y. Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in 6-gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.) // *Theor Appl Genet*. – 2010. – 121. – P. 1239–1251.
8. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // *Mol Syst Biol*. – 2011. – 7. – P. 539–544.
9. Zhang X., Ge X., Shao Y., Sun G., Li Z. Genomic change, retrotransposon mobilization and extensive cytosine methylation alteration in *Brassica napus* introgressions from two intertribal hybridizations [Електронний ресурс] // *PLoS One*. – 2013. – Режим доступу: doi: 10.1371/journal.pone.0056346.
10. Feldman M., Levy A. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat // *Genetics*. – 2012. – 192. – P. 763–774.
11. Leigh F., Kalendar R., Lea V., Lee D., Donini P., Schulman A.H. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques // *Mol Genet Genomics*. – 2003. – 269. – P. 464–474.

MYKHAILYK S. YU., ANTONYUK M.Z., TERNOVSKA T.K.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy",

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: sermuraha@gmail.com

POSSIBLE MOLECULAR MECHANISMS OF VARIABILITY IN GLIADIN GENES IN THE WHEAT INTROGRESSIVE LINES

Aims. To determine whether phenotypic variability in gliadin spectra of introgression lines was caused by changes in DNA sequences of *Gli* genes. **Methods.** PCR using primers specific to *Gli* genes and retrotransposon. Sequence of PCR products and results alignment comparison. **Results.** Polymorphism in nucleotide sequences of three *Gli* genes encoding proteins in α -, β - and ω -zone of spectrum was identified. The alterations include deletions, insertions and single nucleotide transitions and transversions. The mobility of *Sukkula* retrotransposon relatively to microsatellite (CT)_nG was shown. **Conclusions.** The gliadin electrophoretic spectra variability is based on changes in the nucleotide sequences of *Gli* genes such as deletions, insertions and single nucleotide substitutions.

Key words: gliadin, wheat introgression line, gene microsatellite, retrotransposon.