

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ МИТОХОНДРИЙ АРАБИДОПСИСА В ИМПОРТЕ ДНК

Т.А. Болотова, В.И. Тарасенко, Ю.М. Константинов, М.В. Кулинченко
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: bolotova_t.a@mail.ru

Условием нормального функционирования митохондрий высших эукариот является наличие у них мембранных систем транспорта макромолекул (белков и нуклеиновых кислот). Импорт РНК в митохондрии имеет важное значение для экспрессии митохондриальных генов и их регуляции, в то время как импорт ДНК, вероятнее всего, вносит вклад в динамику генома и эволюцию этих органелл. Горизонтальный перенос генетического материала, происходящий в растительные митохондрии с гораздо более высокой частотой, чем в ядерный и хлоропластный геномы (Sanchez-Puerta, 2014), может быть связан с природной способностью этих органелл к активному поглощению ДНК (Koulintchenko et al, 2003; Weber-Lotfi et al, 2009). На сегодняшний день нами установлено, что процесс импорта ДНК не ограничен участием двух мембранных белков – адениннуклеотидтранслоказы (ANT) во внутренней мембране и порина (VDAC) в наружной мембране (Koulintchenko et al, 2003), а сам процесс импорта может осуществляться с участием нескольких пока нерасшифрованных механизмов, имеющих специфичность в отношении длины и структуры транспортируемых молекул (Ibrahim et al, 2011; Константинов и др., 2016). Однако до сих пор не идентифицированы другие белки внешней мембраны, которые могли бы определять специфичность транспорта молекул ДНК разной длины и структуры в митохондриях.

При проведении протеомного анализа уровней флуоресцентного мечения белков в присутствии и отсутствии ДНК, было показано пятикратное снижение интенсивности мечения для полипептида внутренней мембраны CuBP (Weber-Lotfi et al, 2015). Этот белок является компонентом дыхательного комплекса I и имеет Cu-связывающую активность. Кроме того, с помощью методов биоинформатики в последовательности CuBP было показано наличие ДНК-связывающего сайта (Nair and Rost, 2005). Исходя из этого, интересно было исследовать роль CuBP в импорте ДНК более детально. Ранее была высказана гипотеза (Зоров, 1996) о возможном участии в транспорте ДНК бензодиазепинового рецептора PBR (от: Peripheral Benzodiazepine Receptor), являющегося в митохондриях животных одним из важных компонентов митохондриальной поры сдвига проницаемости MPTP (от: Mitochondrial Permeability Transition Pore). У растений этот белок, известный как TSPO (от: Tryptophan-rich Sensory Protein), также ассоциирован с наружной мембраной митохондрий (Lindemann et al, 2004), хотя, в отличие от животных, его функции остаются малоизученными. При определенных стрессовых ситуациях PBR/TSPO способен формировать транзитную пору (олигомерные комплексы с порином и ANT в местах контакта двух мембран), через которую может осуществляться транспорт ДНК. Известно, что VDAC, один из основных компонентов наружной мембраны транзитной поры MPTP в митохондриях растительного и животного происхождения, способен взаимодействовать не только с ANT, но и с другими представителями суперсемейства митохондриальных переносчиков в составе внутренней мембраны, обозначаемыми как MCF (Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012). В растительных митохондриях известны четыре изоформы митохондриального порина (Tateda et al, 2011), функции которых не до конца ясны. Сложная структура митохондриальных мембран дает основания для предположения о полиморфизме MPTP: любой белок-представитель семейства MCF с участием различных изоформ VDAC способен формировать пору, через которую, в определенных условиях, может транслоцироваться ДНК.

С целью характеристики роли мембранных белков (CuBP, TSPO, изоформ VDAC) в процессе импорта ДНК было проведено исследование импорта молекул ДНК разной длины в митохондрии в системе *in organello* и *in vivo* с использованием гомозиготных линий *Arabidopsis thaliana*, мутантных по одному из этих кандидатных белков.

При изучении роли белка внутренней мембраны CuBP в процессе импорта ДНК обнаружено, что отсутствие CuBP ухудшает транспорт ДНК, в особенности через внутреннюю митохондриальную мембрану, причем наиболее существенно этот эффект выражен для транспорта ДНК-субстратов большой длины (9 т.п.н.). CuBP, таким образом, можно рассматривать в качестве нового фактора импорта нуклеиновых кислот, который выступает в роли рецептора в межмембранном пространстве митохондрий.

Анализ характера импорта ДНК разной длины в митохондрии мутантной линии *tspo* показал, что митохондриальный мембранный белок TSPO, скорее всего, не играет существенной роли в импорте молекул ДНК малой длины (фрагментов ДНК $\leq 0,3$ т.п.н.). Тем не менее, не исключено участие TSPO в импорте в митохондрии молекул ДНК средней длины (фрагментов ДНК $> 0,3$ т.п.н.).

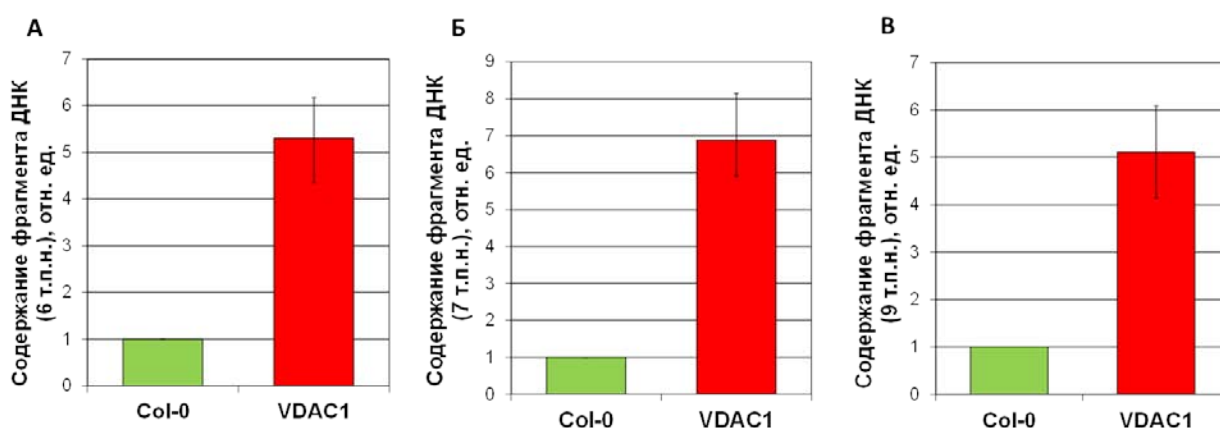


Рис. 1. Анализ эффективности импорта трех фрагментов ДНК большого размера в митохондрии протопластов арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутанта *vdac1* *in vivo*.

На рисунке показано относительное количество ДНК фрагментов размером 6 т.п.н. (А), 7 т.п.н. (Б) и 9 т.п.н. (Б), нормированное к содержанию фрагмента гена *MAD4* (митохондриальная ДНК). Количество импортированной ДНК в митохондриях линии *Col-0* принято за 1.

Импорт ДНК в митохондрии, изолированные из линий арабидопсиса *vdac1* и *vdac3*, у которых инактивированы изоформы порина VDAC1 или VDAC3, был осуществлен исходя из того, что для этих линий оказалось возможным выращивать достаточное для выделения органелл количество растительного материала, в отличие от частично стерильных линий *vdac2* и *vdac4*. Показано, что VDAC1 или VDAC3 транспортируют ДНК с большей эффективностью в сравнении с митохондриями дикого типа. При этом, повышенный уровень активности митохондриального импорта у этих мутантов не является специфичным в отношении длины транспортируемой молекулы ДНК: для всех трех тестируемых субстратов, малой (0,27 т.п.н.) и средней (0,85 и 2,7 т.п.н.) длины, мы наблюдали стимуляцию процесса. Следует отметить, что импорт фрагмента 0,27 т.п.н. в митохондрии обоих мутантов был более эффективным (в 5 раз для мутанта *vdac1* и в 3 раза для мутанта *vdac3*) в сравнении с импортом в митохондрии дикого типа, чем импорт фрагментов 0,85 / 2,7 т.п.н. Исходя из представленных данных, следует также, что уровень импорта ДНК, как малой, так и средней длины, существенно выше в митохондриях, изолированных из проростков мутанта *vdac1*, чем в митохондриях мутанта *vdac3*. По-видимому, отсутствие одной из изоформ порина, VDAC1 или VDAC3, может вызывать конформационные изменения в поре, способствуя более эффективной

транслокации фрагментов ДНК. Можно предположить, что VDAC выполняет регуляторную и/или барьерную роль в импорте ДНК.

С помощью разработанного в ходе выполнения работы *in vivo* метода изучения импорта ДНК в митохондрии с использованием протопластов арабидопсиса установлено, что находящаяся в цитоплазме растительной клетки ДНК активно поступает в митохондрии. При трансформации протопластов, полученных из листьев растений арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии *vdac1*, у которой инактивирована изоформа порина VDAC1, набором ДНК-субстратов различной длины (2,7-9 т.п.н.) обнаружено, что для всех использованных субстратов характерна достоверно более высокая активность импорта в митохондрии протопластов линии *vdac1* (рис.1). Эти данные хорошо согласуются с результатом, полученным в экспериментах по импорту ДНК в митохондрии линий *Col-0* и *vdac1* в системе *in organello*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00603), с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Зоров Д.Б. Митохондриальный транспорт нуклеиновых кислот. Участие бензодиазепинового рецептора // Биохимия. – 1996. – Т. 61. – С. 1320–1332.

Константинов Ю.М., Дмитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. Импорт ДНК в митохондрии // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 10. – С. 1307–1321.

Haferkamp I., Schmitz-Esser S. The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects // Front. Plant Sci. – 2012. – V.3. doi: 10.3389/fpls.2012.00002.

Ibrahim N., Handa H., Cosset A., Koulintchenko M., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A., Weber-Lotfi F. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement // Pharm. Res. – 2011. – V. 28. – P. 2871–2882.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich, A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – V. 22. – P. 1245–1254.

Lindemann P., Koch A., Degenhardt B., Hause G., Grimm B., Papadopoulos V. A novel Arabidopsis thaliana protein is a functional peripheral-type benzodiazepine receptor // Plant and cell physiology. – 2004. – V. 45. – P. 723–733.

Nair R., Rost B. Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization // J. Mol. Biol. – 2005. – V. 348 (1). – P. 85–100.

Sanchez-Puerta M.V. Involvement of plastid, mitochondrial and nuclear genomes in plant-to-plant horizontal gene transfer // Acta Soc. Bot. Pol. – 2014. – V. 83. – P. 317–323.

Tateda C., Watanabe K., Kusano T., Takahashi Y. Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in Arabidopsis // Journal of Experimental Botany. – 2011. – V. 62 (14). – P. 4773–4785.

Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Boesch P., Paulus F., Cosset A., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – V. 1787. – P. 320–327.

Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Mileschina D.V., Konstantinov Y.M., Dietrich A. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – V. 1853 (12). – P. 3165–3181.