

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи



Тарасенко Татьяна Андреевна

**ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ
РАСТИТЕЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В
ИМПОРТЕ ДНК**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кулинченко Милана Вячеславовна

Иркутск-2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Митохондриальный геном растений.....	15
1.1.1. Особенности структурной организации митохондриального генома растений.....	15
1.1.2. Митохондриальные плазмиды растений.....	19
1.1.3. Пластичность и динамичность митохондриального генома растений...	23
1.1.4. Роль горизонтального переноса ДНК в пластичности митохондриального генома растений.....	25
1.2. Структурная неоднородность митохондриальной популяции в клетке....	29
1.2.1. Изучение митохондриальных субпопуляций в клетках животных.....	29
1.2.2. Изучение митохондриальных субпопуляций в клетках растений.....	31
1.2.3. Изучение особенностей и функций митохондриальных субпопуляций в клетке.....	32
1.3. Транспорт макромолекул в митохондриях.....	35
1.3.1. Импорт белков в митохондрии.....	35
1.3.2. Импорт РНК в митохондрии.....	38
1.3.2.1. Импорт тРНК в митохондрии различных организмов.....	38
1.3.2.2. Механизм импорта тРНК в растительные митохондрии.....	41
1.3.3. Импорт ДНК в митохондрии.....	44
1.3.3.1. Явление природной компетенции митохондрий к поглощению ДНК..	44
1.3.3.2. Участие импортированной ДНК в митохондриальных генетических процессах.....	46
1.3.3.3. Специфичность импорта ДНК в отношении длины и структуры переносимых молекул.....	48
1.3.3.4. Изучение механизма импорта ДНК.....	51
1.4. Роль транспортного белка VDAC в растительных митохондриях.....	54
1.5. Выводы из обзора литературы.....	57
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
2.1. Растительный материал и условия выращивания.....	60

2.1.1. Линии <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
2.1.2. Другие растительные объекты.....	60
2.2. Получение субстратов импорта ДНК.....	61
2.3. Методы, связанные с выделением и характеристикой митохондрий растений.....	62
2.3.1. Выделение митохондрий из растительных объектов.....	62
2.3.1.1. Выделение митохондрий из арабидопсиса.....	62
2.3.1.2. Выделение митохондрий из этиолированных проростков кукурузы...	62
2.3.1.3. Выделение митохондрий из картофеля и корнеплодов репы.....	63
2.3.2. Получение митопластов.....	64
2.3.3. Оценка качества препарата изолированных митохондрий.....	64
2.3.3.1. Определение дыхательного контроля и интактности митохондрий....	64
2.3.3.2. Определение активности сукцинатдегидрогеназы.....	65
2.3.3.3. Электрофорез митохондриальных белков в полиакриламидном геле..	65
2.3.3.4. Определение активности дыхательных комплексов методом BN-PAGE.....	66
2.3.3.5. Электронная микроскопия.....	66
2.4. Импорт ДНК в митохондрии растений.....	67
2.4.1. Импорт ДНК в системе <i>in organello</i>	67
2.4.2. Методы, связанные с изучением импорта ДНК в системе <i>in vivo</i>	67
2.4.2.1. Получение протопластов из листьев арабидопсиса.....	67
2.4.2.2. Трансфекция протопластов ДНК-субстратом.....	68
2.4.2.3. Выделение митохондрий из протопластов арабидопсиса.....	68
2.5. Экстракция нуклеиновых кислот из митохондрий.....	68
2.6. Электрофоретический анализ ДНК / РНК и элюция ДНК из агарозного геля.....	69
2.7. Методы анализа импорта ДНК.....	69
2.7.1. Флуоресцентный анализ.....	69
2.7.2. Количественная ПЦР в режиме реального времени.....	69
2.8. Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих изоформы VDAC.....	70
2.8.1. Экстракция РНК.....	70
2.8.2. Обратнo-транскриптазная ПЦР в реальном времени.....	70

2.9. Статистическая обработка результатов.....	71
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	72
3.1. Оптимизация условий изучения импорта ДНК в растительные митохондрии.....	72
3.1.1. Анализ импорта ДНК с использованием флуоресцентно меченой ДНК	72
3.1.2. Анализ импорта ДНК с использованием количественной ПЦР в реальном времени.....	75
3.1.3. Постановка метода изучения импорта ДНК в митохондриях протопластов арабидопсиса <i>in vivo</i>	79
3.2. Изучение кинетических характеристик импорта ДНК короткой и средней длины в растительные митохондрии.....	84
3.3. Изучение роли мембранных белков митохондрий арабидопсиса в импорте ДНК разной длины.....	90
3.3.1. Получение гомозиготных линий мутантов <i>Arabidopsis thaliana</i>	91
3.3.2. Изучение участия в механизме импорта ДНК белка наружной мембраны митохондрий TSPO.....	92
3.3.3. Изучение роли в механизме импорта ДНК изоформ VDAC.....	95
3.3.3.1. Изучение участия изоформ VDAC в процессе импорта ДНК в системе <i>in organello</i>	96
3.3.3.2. Изучение участия изоформ VDAC в процессе импорта ДНК в системе <i>in vivo</i>	98
3.3.3.3. Анализ экспрессии генов, кодирующих изоформы VDAC, в нокаут - мутантах по одной из его изоформ.....	101
3.3.4. Изучение участия в механизме импорта ДНК белка наружной мембраны митохондрий OM47.....	103
3.3.5. Изучение участия в механизме импорта ДНК белка внутренней мембраны митохондрий MIC60.....	106
3.3.6. Изучение возможной роли в механизме импорта ДНК белков из семейства DRP3, участвующих в процессах деления митохондрий.....	109
3.4. Исследование зависимости эффективности импорта ДНК от гетерогенности популяции митохондрий.....	112
3.4.1. Получение митохондриальных фракций различных растительных	

объектов.....	112
3.4.2. Изучение эффективности импорта ДНК разной длины в митохондриальные фракции.....	115
3.4.3. Характеристика митохондриальных фракций.....	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	125
ВЫВОДЫ.....	131
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГПГ – горизонтальный перенос генов
- ДК – дыхательный контроль
- ДНК (РНК) – дезокси-(рибо-)нуклеиновая кислота
- КИП (ИП) – концевые инвертированные повторы
- МПМ - митохондриальная пора мегапроницаемости
- мтДНК – митохондриальная ДНК
- ОРС – открытая рамка считывания
- ОТ-ПЦР-РВ – обратнo-транскриптазная ПЦР в режиме реального времени
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ппДНК – плазмидоподобная ДНК
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ – ПЦР в режиме реального времени
- СВ – среда выделения
- СДГ - сукцинатдегидрогеназа
- СП – среда промывания
- ЭГТА - этиленгликольтетраацетат
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- ЭР (ЭПР) – эндоплазматический ретикулум
- DRP3 – белок внешней мембраны митохондрий с динамин-подобной структурой (от англ. Dynamin-Related Protein3)
- GFP – зелёный флуоресцентный белок (от англ. Green Fluorescent Protein)
- BN-PAGE – «голубой нативный» электрофорез в полиакриламидном геле (от англ. Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
- MBR – митохондриальный бензодиазепиновый рецептор (от англ. Mitochondrial Benzodiazepine Receptor)
- MCF – семейство митохондриальных белков-переносчиков (от англ. Mitochondrial Carrier Family)

MIA (от англ. Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly) – механизм импорта и сборки белков межмембранного пространства

MIC60 – белковая субъединица внутренней мембраны митохондрий, обнаруженная в составе мультисубъединичного белкового комплекса MICOS (от англ. the Mitochondrial contact site and Cristae organizing system)

MTPTs – митохондриальные последовательности ДНК пластидного происхождения (от англ. Mitochondrial plastid DNAs)

NUMTs – ядерные последовательности ДНК митохондриального происхождения (от англ. Nuclear Mitochondrial DNA Sequences)

NUPTs – ядерные последовательности ДНК пластидного происхождения (от англ. Nuclear Plastid DNA Sequences)

OM47 – белок внешней мембраны с мол.массой 47 кДа (от англ. Outer Membrane 47 kDa)

PRAT – семейство переносчиков предшественников белков и нуклеиновых кислот (от англ. Preprotein and Amino acid Transporters)

PTMTs – пластидные последовательности ДНК митохондриального происхождения (от англ. Plastid Mitochondrial DNAs)

SAM – мембранный комплекс митохондрий, осуществляющий сортировку и сборку белков (от англ. Sorting and Assembly Machinery)

ТАЕ – трис-ацетатный-ЭДТА буфер (от англ. Tris base, Acetic acid and EDTA)

TIM – транслоказа внутренней мембраны митохондрий (от англ. Translocase of the Innner Membrane)

TOM – транслоказа внешней мембраны митохондрий (от англ. Translocase of the Outer Membrane)

TRIC – тРНК-переносчик внешней мембраны растительных митохондрий (от англ. tRNA Import Component)

TSPO – сенсорный белок с высоким содержанием триптофана (от англ. Tryptophan-rich Sensory Protein)

VDAC – митохондриальный порин (от англ. Voltage-Dependent Anion Channel)

АНТ – адениннуклеотидтранслоказа (от англ. Adenine Nucleotide Translocase)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований

Митохондрии, важнейшие клеточные органеллы, помимо того, что играют ключевую роль в метаболических процессах клетки, обладают своим собственным геномом. Геном растительных митохондрий содержит последовательности совершенно различного происхождения – ядерного, хлоропластного и даже вирусного, однако большая его часть по своему происхождению и функциям до сих пор остается нерасшифрованной. Хорошо известно, что большинство генов предков митохондрий – альфа-протеобактерий и предков пластид – цианобактерий – переместились в ядерный геном в ходе процесса симбиогенеза. В составе митохондриального генома сохранился достаточно ограниченный набор генов, поэтому для осуществления своих функций митохондрии нуждаются в импорте белков и нуклеиновых кислот. Импорт РНК имеет важное значение для трансляции митохондриальных белков, в то время как способность митохондрий к поглощению ДНК, вероятнее всего, вносит вклад в динамику генома и эволюцию этих органелл.

Горизонтальный перенос генов (ГПГ) играет важную роль в эволюции. Известно, что для митохондриального генома растений характерна удивительно высокая, в сравнении с другими геномами, частота событий горизонтального и внутриклеточного переносов (Sanchez-Puerta, 2014). Высока вероятность того, что на структуру и динамику митохондриального генома растений значительное влияние может оказывать наличие у митохондрий природной компетентности – способности поглощать ДНК из окружающей среды. Этот феномен первоначально был продемонстрирован для растений (Koulintchenko et al., 2003; Konstantinov et al., 2016), но в дальнейшем был описан и для митохондрий млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009). Митохондрии также импортируют РНК, главным образом тРНК.

В отличие от импорта белков и тРНК, биологическая роль и молекулярный механизм импорта ДНК в митохондрии до сих пор остаются недостаточно изученными. Согласно более ранним исследованиям (Koulintchenko et al., 2003; Delage et al., 2003; Weber-Lotfi et al., 2009) основным каналом импорта ДНК и тРНК в митохондрии растений на уровне внешней мембраны является VDAC. В

дальнейших исследованиях импорта тРНК было показано, что у растений в этот процесс вовлечены также и компоненты аппарата импорта белков (Campo et al., 2017; Verechshagina et al., 2018). Протеомный анализ изменения интенсивности флуоресценции меченых белков в присутствии ДНК, позволил выявить несколько мембранных белков, обладающих потенциальной способностью к участию в импорте ДНК в митохондрии арабидопсиса (Weber-Lotfi et al., 2015). Один из этих белков, предшественник β -субъединицы АТФ-синтазы, на уровне внешней мембраны может взаимодействовать с VDAC в процессе связывания ДНК; другой белок, субъединица комплекса I, CuBP, возможно, выполняет рецепторную функцию в межмембранном пространстве (Weber-Lotfi et al., 2015). Перенос ДНК через внутреннюю мембрану в матрикс остается малоизученным и может происходить в растениях и у млекопитающих с участием различных механизмов: ингибиторы белка-переносчика внутренней мембраны адениннуклеотидтранслоказы блокируют импорт ДНК в растениях, но не в митохондриях млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006).

Проведенные к настоящему времени исследования транспорта ДНК в митохондрии растений указывают на то, что процесс импорта ДНК, по всей видимости, происходит посредством нескольких альтернативных механизмов, при участии разнообразных белковых комплексов (Weber-Lotfi et al., 2015). Мы полагаем, что перенос ДНК в митохондрии происходит через этапы рецепции молекулы нуклеиновой кислоты поверхностными белками внешней митохондриальной мембраны и ее последующей транслокации через белковый канал или пору в двойной мембране. Исходя из предположения о том, что транспорт ДНК в митохондрии происходит посредством не одного, а нескольких мембранных каналов, этот процесс может иметь сложную кинетическую зависимость субстрат-белкового взаимодействия.

Кроме того, в настоящее время широко известно, что митохондрии представляют собой гетерогенную популяцию клеточных органелл, т.е. существует их структурная и функциональная неоднородность в растительной или животной клетке (Lund et al., 1958; Bain et al., 1964; Berl and Clarke, 1969; Solomos et al., 1972; Malhotra and Spencer, 1973; Белякович, 1990; Dai et al., 1998; Logan et al., 2001; Шишмаков и др., 2004; Logan, 2006; Howell et al., 2006; Petrusa et al., 2008;

Бегунова и Векшин, 2015). К критериям различия субпопуляций митохондрий относят физиологическое состояние, ферментативную активность, митохондриальный трансмембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$), копияность митохондриальной ДНК, а также импорт белков, жизненно необходимых для нормального функционирования органеллы. Однако, никаких данных о связи процесса импорта ДНК в митохондрии с гетерогенностью митохондриальной популяции в настоящее время не существует.

Важно отметить, что все исследования импорта ДНК в митохондрии животных и растений, проводившиеся до настоящего времени, осуществлялись на уровне изолированных митохондрий. До настоящего момента остается неясным, происходит ли импорт на уровне целых клеток и сохраняются ли *in vivo* закономерности этого процесса, продемонстрированные ранее *in organello*. Разработка системы, позволяющей изучать механизмы переноса молекул ДНК из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в целых клетках, помимо фундаментальной значимости, может послужить отправной точкой для осуществления трансформации мт-генома высших растений, чрезвычайно важной и, на настоящий момент, нерешенной задачи.

Исходя из вышесказанного, **цель** настоящей работы – провести исследование роли факторов белковой и небелковой природы, оказывающих влияние на организацию транспортной системы растительных митохондрий, в импорте ДНК разной длины.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработать комплексный подход, позволяющий изучать процесс импорта ДНК в митохондрии *in organello* и *in vivo* (с использованием системы трансформации протопластов *A. thaliana*).
2. Изучить кинетические характеристики импорта ДНК разной длины в растительные митохондрии.
3. С использованием инсерционных мутантов *A. thaliana* исследовать роль в импорте ДНК белков, способных к транспортной активности во внешней митохондриальной мембране (изоформ VDAC, TSPO, OM47), потенциально

участвующих в формировании межорганельных контактных сайтов (MIC60), участвующих в процессах деления/слияния митохондрий (DRP3A и DRP3B).

4. Изучить возможное влияние структурно-функциональных особенностей митохондриальных популяций в растительной клетке на процесс импорта ДНК.

Научная новизна

В представленной работе с использованием двух систем – *in organello* и *in vivo* – впервые исследована роль белков-переносчиков внешней митохондриальной мембраны *A.thaliana*, а именно: 1) изоформ VDAC, митохондриального порина (VDAC1, VDAC2, VDAC3, VDAC4); 2) белка внешней мембраны растительных митохондрий TSPO; 3) субъединицы MIC60, локализуемой во внутренней митохондриальной мембране; 4) белка внешней митохондриальной мембраны OM47; 5) субъединиц ассоциированного с внешней мембраной митохондрий белка DRP3, участника процесса деления митохондрий - DRP3A и DRP3B. Показано, что отсутствие любой из изоформ VDAC, за исключением VDAC3, приводит к значительному усилению процесса импорта ДНК, возможно вследствие компенсаторного эффекта, вызванного повышением содержания в мембране изоформы VDAC3 и/или структурных перестроек митохондриальной мембраны. Показано, что белок TSPO не является участником основного механизма, транслоцирующего ДНК в митохондрии, но может быть частью какого-то дополнительного транспортного пути, в случае использования для импорта повышенных концентраций ДНК-субстрата. Для белка внешней мембраны OM47, имеющего анион-транспортную активность, белка внутренней мембраны MIC60, потенциально участвующего в формировании контактов митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭР), и белка DRP3, играющего роль в делении митохондрий, роли в импорте ДНК не установлено.

Впервые исследована кинетическая зависимость процесса импорта ДНК в митохондрии *S. tuberosum* от размера и количества импортируемого ДНК-субстрата. Показано, что зависимость импорта от количества ДНК-субстрата имеет различный характер для ДНК разной длины: 1) линейный для ДНК малой длины; 2) ступенчатый для ДНК средней длины. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что импорт ДНК средней длины происходит посредством нескольких механизмов.

Впервые исследовано влияние на эффективность импорта ДНК структурно-функциональных особенностей митохондрий, формирующих разные митохондриальные популяции. Показано, что митохондрии, обладающие менее сформированной системой внутренних мембран, проявляют более выраженную способность к импорту ДНК.

В диссертации представлен новый подход к изучению импорта ДНК с использованием системы *in vivo*. Показано, что 1) ДНК эффективно транслоцируется из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в протопластах арабидопсиса; 2) эффективность импорта ДНК *in vivo* значительно выше импорта ДНК в системе *in organello*, что позволяет предположить существование различных клеточных факторов, способствующих эффективному транспорту ДНК в митохондрии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены новые данные о факторах, влияющих на формирование транспортных систем растительных митохондрий, которые участвуют в импорте ДНК, что позволит углубить понимание механизма этого процесса и его значимости для митохондриальных функций в клетке. Результаты полученных данных можно использовать не только в фундаментальных исследованиях по выяснению функций митохондриального генома у организмов разных видов, но также в работах по биотехнологии (клонирование целевых генов в митохондриях) и биомедицине (генотерапия митохондриальных болезней и болезней пожилого возраста человека).

Материалы диссертации могут быть использованы в образовательных учреждениях, а также специалистами-биологами научно-исследовательских институтов.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на III Международной Конференции молодых ученых «OpenBio» (Новосибирск, 5-6 октября, 2016 год); 10th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB; Hangzhou, China, May 22 – 27, 2017); Международной конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева «Беляевские чтения» (Новосибирск, 7-10 августа, 2017 г.); 2-й всероссийской научной конференции

«Механизмы регуляции функций органелл эукариотической клетки» (Иркутск, 22-24 мая 2018 г.); Годичном собрании ОФР-2018, научной конференции «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 10-15 июля, 2018 год); 11th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB; Ein Gedi, Israel, March 10-15, 2019), 5th International Scientific Conference «Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology» (PlantGen2019) (24-29 June 2019 Novosibirsk, Russia); Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (ВОГиС; 18-22 июня 2019, Санкт-Петербург).

Основные положения, выносимые на защиту

1. При трансформации протопластов арабидопсиса ДНК поступает из цитоплазмы в митохондрии. Закономерности импорта ДНК, показанные в исследованиях в системе изолированных митохондрий, сохраняются *in vivo*.
2. Существует несколько путей импорта ДНК в растительные митохондрии, зависящих от длины транспортируемой молекулы.
3. Отсутствие одной из изоформ VDAC в нокаут-мутантных линиях арабидопсиса приводит к структурным и функциональным изменениям митохондриальной мембраны, оказывающим существенное влияние на активность импорта ДНК в митохондрии.
4. Выявляемые при выделении митохондрий субпопуляции этих органелл обладают структурной разнородностью и различной способностью импортировать ДНК.

Публикации

По теме диссертации опубликовано опубликовано 13 научных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах из Перечня ВАК РФ (входящих в базу Web of Science).

Личное участие автора

Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке, обобщении и интерпретации полученных данных, а также в написании статей, опубликованных по результатам

работы. В диссертационной работе использованы экспериментальные материалы, полученные лично автором, а также совместно с сотрудниками лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения и трех глав, включающих обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводы и списка использованной литературы, включающего 271 библиографический источник, 261 из которых на английском языке. Материалы диссертации изложены на 157 страницах машинописного текста, иллюстрированы 38 рисунками и 8 таблицами.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю диссертационной работы – старшему научному сотруднику лаборатории генетической инженерии растений, кандидату биологических наук, Милане Вячеславовне Кулинченко за идейное руководство и всестороннюю помощь, а также за предоставленную возможность работать над интересной темой. Автор выражает искреннюю благодарность с.н.с. лаборатории генетической инженерии растений, к.б.н. Владиславу Игоревичу Тарасенко за ценные советы, рекомендации и помощь в работе, а также сотрудникам лаборатории физиологической генетики с.н.с., к.б.н. Ольге Андреевне Боровик, профессору, д.б.н. Ольге Ивановне Грабельных, с.н.с., к.б.н. Наталье Евгеньевне Коротаевой и с.н.с. отдела «Ультраструктуры клетки» ЛИН СО РАН, к.б.н. Игорю Викторовичу Клименкову за помощь в проведении экспериментальной работы. Автор выражает признательность профессору, в.н.с. лаборатории физиолого-биологической адаптации растений, д.б.н. Светлане Владимировне Осиповой и зав. лабораторией физиологии растительной клетки, д.б.н. Озолиной Наталье Владимировне за внимательное ознакомление с работой и сделанные замечания.

Автор благодарит заведующего лабораторией генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН профессора, д.б.н. Юрия Михайловича Константинова и весь коллектив лаборатории за создание творческой научной атмосферы, доброжелательное отношение и моральную поддержку.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности структурной и функциональной организации митохондриального генома растений

1.1.1. Состав и функции митохондриального генома

Митохондрии присутствуют в цитоплазме всех эукариотических клеток: они имеют двойную мембрану, размер от 0,5 до 10 мкм, а их основной функцией является генерация энергии в форме аденозинтрифосфата (АТФ). В дополнение к производству энергии, у митохондрий в клетке широкий спектр других функций, включающих биосинтез промежуточных метаболитов, ретроградный сигналинг и запрограммированную гибель клеток. Многие нейродегенеративные заболевания человека обусловлены дефектами функционирования митохондрий, связанными с различными мутациями в мтДНК.

Согласно общепризнанной эндосимбиотической теории, ДНК митохондрий происходит от кольцевых геномов α -протеобактерий, поглощенных ранними предками современных эукариотических клеток. В ходе эволюции древние митохондрии постепенно теряли свою ДНК: их гены переносились и включались в ядерный геном клеток-хозяев. В какой-то момент эти изменения привели к тому, что митохондрии потеряли способность выживать самостоятельно (Morley and Nielsen, 2017). В настоящее время ядро эукариотической клетки кодирует подавляющее большинство митохондриальных белков (Johnston et al., 2016).

Тем не менее, современные митохондрии, по-прежнему, содержат собственную ДНК, оставшуюся со времени произошедшего эндосимбиоза, и поддерживают ее независимую репликацию и экспрессию. Количество копий митохондриального генома в каждой из митохондрий варьирует от 2 до 10 (Wiesner et al., 1992). Митохондриальная ДНК упаковывается в мембрано-связанные структуры, называемые нуклеоидами, которые представляют собой свободную ассоциацию молекул ДНК, РНК и белков, участвующих в компактизации ДНК (Gualberto et al., 2014). Была высказана гипотеза (Logan, 2006) о том, что кодирование большого количества жизненно важных генов в митохондриальном геноме, т.е. роль митохондрий в качестве хранилища генетической информации, несовместима с основной функцией этих органелл в биоэнергетике: транспорт

электронов приводит к образованию активных форм кислорода (АФК), которые способствуют возникновению повреждений в мтДНК.

Причины, почему митохондрии всё же сохранили некоторые гены, в настоящее время активно обсуждаются. В цитоплазме некоторых видов присутствуют органеллы, происходящие от митохондрий, но не сохранившие своего собственного генома (Giezen et al., 2005). Этот факт указывает на то, что для митохондрий возможна потеря всего генома (Adams et al., 2003). Согласно одной из гипотез, объясняющих сохранение части генов в мтДНК (Björkholm et al., 2015), доставка и транспортировка продуцируемых в цитоплазме гидрофобных белковых продуктов в митохондрии является сложной; согласно другой гипотезе, целесообразно сохранение локализованного генетического контроля над митохондриальными функциями (Allen, 2015). Проведенный недавно анализ широкого спектра мтДНК указывает на то, что обе эти причины могут лежать в основе митохондриального генетического консерватизма (Johnston et al., 2016).

В отличие от большинства других эукариот, митохондрии растений имеют сложную и своеобразную генетическую систему. В пределах растительного царства структура и размер митохондриального генома сильно варьирует (Wolstenholme and Fauron, 1995). Исследования митохондриальных нуклеотидных последовательностей указывают на то, что предки зеленых растений обладали компактным митохондриальным геномом, подобным митохондриальному геному современных животных (Turmel et al., 2002). Однако если размер большинства митохондриальных геномов животных составляет всего лишь около 16,5 т.п.н. (в т.ч. мтДНК человека - 16,6 т.п.н.), для митохондриального генома современных растений характерен диапазон от 200 до 2000 т.п.н. (Morley and Nielsen, 2017) (рис. 1). Если принимать во внимание растения-паразиты, самый маленький из ныне известных митохондриальных геномов покрытосемянных составляет 66 т.п.н., и обнаружен этот геном в паразитическом растении *Viscum scurruloideum*. В геноме этого паразита отсутствует множество генов, которые находят в мт-геномах свободноживущих покрытосемянных (Skippington et al., 2015).

Наиболее маленький из полностью секвенированных митохондриальных геномов свободноживущих покрытосемянных принадлежит роду *Brassica* и составляет приблизительно 220 т.п.н. в длину (Chang et al., 2011; Grewe et al., 2014),

что более чем в 10 раз превышает размер животного митохондриального генома. Один из крупных митохондриальных генов высших растений принадлежит виду *Cucumis melo* (дыня) и насчитывает около 2500 т.п.н. (Logan, 2006), а наиболее обширный геном размером 11,5 м.т.п. секвенирован у одного из видов рода смолевков, *Silene conica* (Sloan et al., 2012).

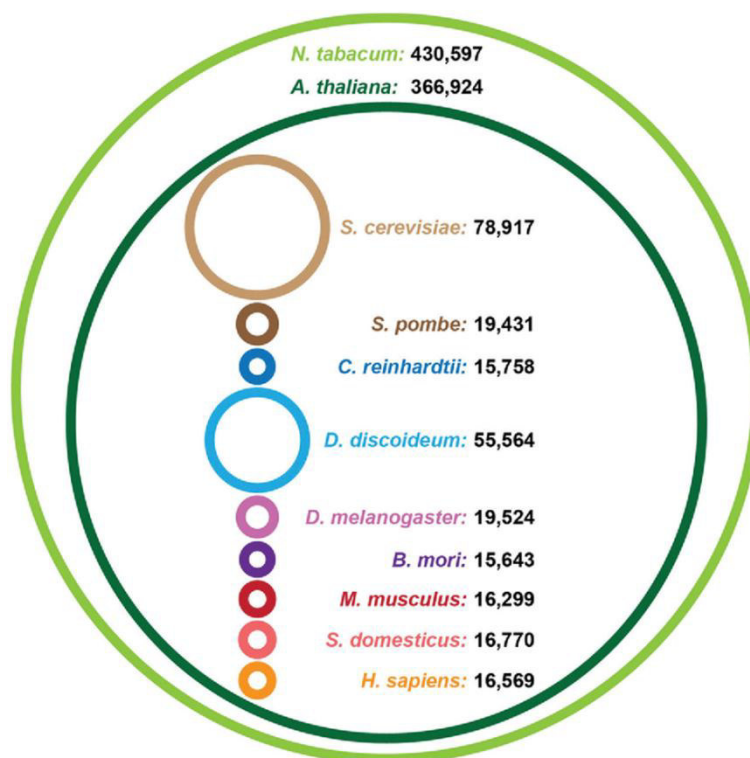


Рис. 1. Схематическая репрезентация размеров митохондриальных геномов (Morley and Nielsen, 2017)

Тот факт, что митохондриальные геномы растений в десятки, сотни и даже тысячи раз превышают по размеру геномы животных (рис. 1), свидетельствует о существенном различии в эволюционных путях развития растительных и животных геномов митохондрий, несмотря на их общее происхождение от α -протеобактериального предка (Morley and Nielsen, 2017).

Анализ первых полностью секвенированных митохондриальных геномов, печеночного мха *Marchantia polymorpha* (Oda et al., 1992) и резуховидки Таля, или арабидопсиса, *Arabidopsis thaliana* (Unsel et al., 1997) позволил установить, что значительное изменение размера генома последнего может быть объяснено избыточностью кодирования и преобразованиями геномной структуры, вызванными высоким уровнем рекомбинации и интеграцией чужеродной ДНК. Большинство растительных геномов, независимо от того, насколько они велики,

содержат лишь 30-60 функциональных генов (Christensen, 2018), что ненамного превышает количество генов в митохондриальных геномах других эукариотических организмов (табл. 1) (Morley and Nielsen, 2017). Эти гены кодируют несколько полипептидов, необходимых для биогенеза комплексов цепи окислительного фосфорилирования, рибосомных белков, тРНК и рРНК (Schuster and Kondorosi, 1994; Knoor, 2004; Gualberto et al., 2014). Другие белки, необходимые для функций органеллы, кодируемые в ядре, импортируются в митохондрии из цитоплазмы. К митохондриальным белкам ядерного кодирования относятся белки, обеспечивающие механизм репликации ДНК, транскрипцию генов, синтез некоторых белков и тРНК, необходимые для трансляции.

Таблица 1

Сравнительная характеристика митохондриальных геномов эукариотических организмов

Таксон Параметр мт-генома	Растения	Животные	Дрожжи	Простейшие
Размер мт-генома	200-2000 т.п.н. (Logan, 2006; Morley and Nielsen, 2017)	15-18 т.п.н. (Logan, 2006; Morley and Nielsen, 2017)	19,4-86 т.п.н. (Burger and Lang, 2003)	6-77 т.п.н. (Burger and Lang, 2003)
Число генов: кодирующих белки кодирующих РНК	30-60 до 30 22 (Sloan et al., 2012; Christensen, 2018)	17-37 13 4-24 (Burger and Lang, 2003)	35-36 8 27 (Burger and Lang, 2003)	5-95 3-64 2-31 (Burger and Lang, 2003)
Структура мт-генома	Сложная многокомпонентная организация. Динамичная система множества субгеномных молекул различного размера и форм (Gualberto et al., 2014, Morley and Nielsen, 2017)	Жестко организованная структура мелких, компактных кольцевых молекул определенного размера (Christensen, 2018)	Кольцевые, редко линейные (Hausner, 2003)	Гетерогенные группы молекул линейной или кольцевой формы, кинетопласты (Kolesnikov and Gerasimov, 2012)
Плазмидоподобные ДНК	да (Gualberto et al., 2014; Morley and Nielsen, 2017)	нет (Christensen, 2018)	да (Hausner, 2003)	да (Kolesnikov and Gerasimov, 2012)

Большая часть дополнительной ДНК, найденной в геномах митохондрий растений, состоит из обширных интронов, повторов и некодирующих областей. Исходя из данных о нуклеотидных последовательностях митохондриального

генома (рис. 2), лишь 11 - 18% мтДНК представляют собой гены, кодирующие белки или структурные РНК, более 5% последовательностей, интегрированные, по-видимому, в разные моменты эволюции, имеют хлоропластное, ядерное или вирусное происхождение (Schultze, 1998; Knoop and Brennicke, 2002; Knoop et al., 2011; Mower et al., 2012). Наиболее интригующим является то, что для более половины всех митохондриальных последовательностей до сих пор не определены ни их функции, ни происхождение (Kubo et al., 2000; Marienfeld et al., 1999; Unseld et al., 1997).

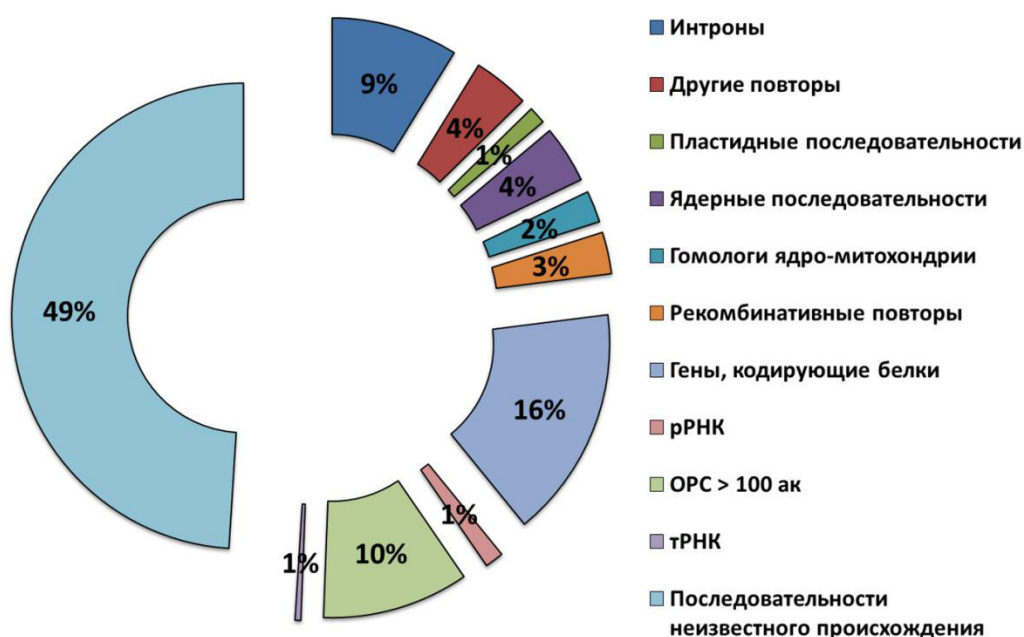


Рис. 2. Состав митохондриального генома растений (Marienfeld et al., 1999)

1.1.2. Митохондриальные плазмиды растений

Помимо основной высокомолекулярной митохондриальной ДНК в митохондриях многих растительных видов может присутствовать видоспецифичный набор линейных или кольцевых экстрахромосомных плазмидоподобных ДНК или РНК, которым характерны небольшой размер (от 0,7 до более чем 20 т.п.н.), автономная репликация и отсутствие гомологии с основной хромосомой (Brown and Zhang, 1995; Leon et al., 1992).

Кольцевые плазмиды изначально были обнаружены в митохондриях грибов, в дальнейшем их присутствие было показано также и в митохондриальных геномах простейших и многих высших растений (Esser et al., 1986; Lonsdale et al., 1988) (табл. 2). В кольцевых плазмидах могут обнаруживаться короткие регионы

гомологии с последовательностями митохондриальной или ядерной ДНК. Растительные кольцевые плазмидные ДНК имеют относительно небольшой размер (от 1 до 7,3 т.п.н.) и короткие (до 1 т.п.н.) открытые рамки считывания (ОРС или ORF - от англ. *open reading frame*), способные транскрибироваться, однако функции кодируемых ими белков неизвестны (Smith et al., 1987; Wahleithner et al., 1987; Flamand et al., 1992; Thomas et al., 1992). В кольцевой плазмиде обнаружен специфичный сайт с высоким содержанием АТ-оснований, обладающий гомологией с нуклеотидной последовательностью точки начала репликации в дрожжах *ori* (от англ. *origin*), отвечающей за ее репликацию.

Линейные ДНК-плазмиды митохондрий встречаются значительно реже, чем кольцевые формы экстрахромосомной ДНК, и их распространение ограничивается несколькими растительными видами. Например, плаزمида размером 11,6 т.п.н. присутствует в митохондриях *Brassica rapa* и *Brassica napus* – представителей семейства крестоцветных (Palmer et al., 1983; Handa, 2008). Кроме того, линейные плазмиды были обнаружены также в митохондриях таких видов как *Beta vulgaris* (свекла), *Daucus carota* (морковь), *Sorghum bicolor* (сорго) и *Zea mays* (кукуруза) (табл. 2). Линейным плазмидам характерен размер в среднем от 2 до 12 т.п.н. По-видимому, линейные митохондриальные плазмиды растений были приобретены митохондриальным геномом благодаря событиям горизонтального переноса из грибов (Handa, 2008). Обычно линейные ДНК-плазмиды содержат в своем составе концевые инвертированные повторы (КИП), 5'-концы которых связаны с терминальными белками (Handa, 2008) (табл. 2). Такие структуры имеют сходство с различными классами митохондриальных плазмид грибов, вирусов, фагов и транспозонов (Sakaguchi et al., 1990). Терминальные белки, вероятно, играют роль в инициации репликации ДНК этих плазмид и выполняют определенную роль в структурной стабилизации ДНК-плазмид, подобно теломерным участкам хромосом (Smith et al., 2013). Интересно, что линейные плазмиды могут существовать как автономные внехромосомные элементы либо быть физически встроенными в мт-геном благодаря наличию повторяющихся последовательностей, общих для плазмид и мтДНК (Brown and Zhang, 1995).

Таблица 2

Митохондриальные плазмиды высших растений*

Виды растений, содержащие митохондриальные плазмиды	Характеристика митохондриальных плазмид			
	Название плазмиды	Размер плазмиды (т.п.н.)	Структура	Наличие КИП (п.н.)
<i>Beta vulgaris</i>	– Mc.a Mc.d Po –	10,4 1,6 1,3 1,4 7,3	линейная кольцевая кольцевая кольцевая кольцевая	407
<i>Brassica campestris</i>	–	11,5	линейная	325
<i>Brassica napus</i>	–	11,6	линейная	327
<i>Brassica rapa</i>	–	11,6	линейная	327
<i>Daucus carota</i>	–	9,2	линейная	
<i>Helianthus annuus</i>	P1 P2 P3	1,4 1,8 1,8	кольцевая – –	
<i>Oryza sativa</i>	B1 B2 B3 B4 L1 L2 L3 L4	2,1 1,5 1,5 1,0 1,0 1,4 1,4 2,1	кольцевая кольцевая кольцевая кольцевая кольцевая кольцевая кольцевая кольцевая	
<i>Chenopodium album</i>	mp1	1,3	кольцевая	
<i>Sorghum bicolor</i>	N1 N2 – – –	5,8 5,4 2,3 1,7 1,4	линейная линейная кольцевая кольцевая кольцевая	– –
<i>Lolium perenne</i>	LpCMSi	9,6	линейная	?
<i>Vicia faba</i>	mtp2 mtp3	1,7 1,5	кольцевая кольцевая	
<i>Zea luxurians</i>	M1 M2	0,75 5,4	линейная линейная	?
<i>Zea diploperennis</i>	D1 D2	7,4 5,4	линейная линейная	– –
<i>Zea mays</i> S-cytoplasm S-cytoplasm RU-cytoplasm RU-cytoplasm N,S,C -cytoplasm N,S,C -cytoplasm C-cytoplasm C-cytoplasm	S1 S2 R1 R2 – – – –	6,4 5,5 7,5 5,4 2,3 1,9 1,6 1,4	линейная линейная линейная линейная линейная кольцевая кольцевая кольцевая	208 208 187 187 170

* Kawano et al. (1995) с дополнениями.

В настоящий момент известны последовательности автономных плазмид митохондрий четырех видов покрытосеменных (Handa, 2008), в том числе пяти линейных плазмид: плазмиды S1 (Paillard et al., 1985), S2 (Levings et al., 1983) и 2,3 т.п.н. (Leon et al., 1989) из кукурузы, 10,4 т.п.н. из свеклы (Saumitou-Laprade et al., 1989) и 11,6 т.п.н. из *Brassica napus* (Handa et al., 2002). Длины концевых инвертированных повторов (КИП), содержащихся в этих плазмидах, варьируют от 170 п.н. (в 2,3 т.п.н. *Z. mays*) до 407 п.н. (в 10,4 т.п.н. *B. vulgaris*) и, за исключением плазмид S1 и S2, не являясь идентичными друг другу (Handa, 2008) (рис. 3).

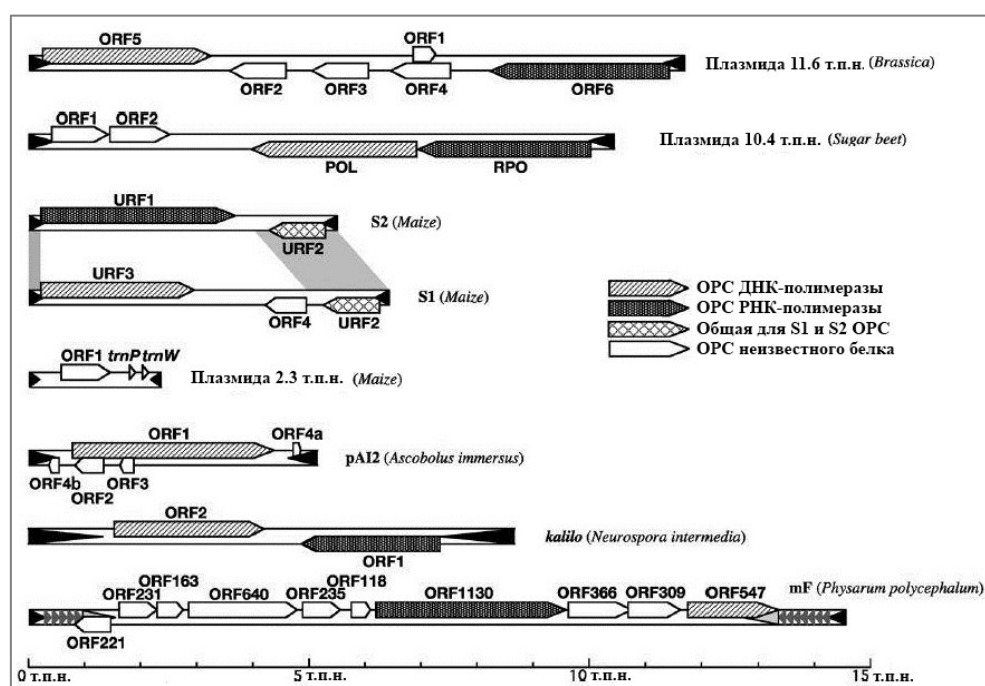


Рис. 3. Схематическая репрезентация структуры линейных митохондриальных плазмид растений и грибов (Handa, 2008)

Линейные митохондриальные плазмиды обычно имеют в своем составе несколько открытых рамок считывания (ОРС) (рис. 3), некоторые из которых кодируют ДНК- или РНК-полимеразы, функции других транскриптов в настоящий момент неизвестны. Наличие у линейных плазмид генов, кодирующих ДНК- и РНК-полимеразы, позволяет объяснить их способность автономно реплицироваться и транскрибироваться (Zabala et al., 1988; Leon et al., 1992). РНК-полимеразы линейных плазмид являются полимеразами фагового типа, подобно выполняющим транскрипционные функции в митохондриях и хлоропластах NEP (от англ. Nuclear Encoded Polymerases) (обзор в Liere et al., 2011), но тем не менее эти два класса ферментов различаются. Плазмидные ДНК-полимеразы родственны

ДНК-полимеразам некоторых вирусов (Knopf, 1998; Filee et al., 2002) и отличаются от полимераз ядерного кодирования, отвечающих за репликацию митохондриальных и пластидных геномов растений (Cupp and Nielsen, 2014).

Функции митохондриальных плазмид до настоящего времени остаются неясными. Согласно более ранним исследованиям присутствие плазмидоподобных ДНК часто коррелирует с признаком цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) у *Z. mays* и *B. vulgaris* (Kemble et al., 1980; Tomas, 1986; Mikami et al., 1986; Bok, 2000), однако, однозначной зависимости между ЦМС-фенотипом и присутствием линейных плазмид не выявлено (Kemble et al., 1986; McDermott et al., 2008; Matera et al., 2011). Были предположения, что существует некоторая корреляция между встраиванием линейных плазмид S1 и S2 из S-типа цитоплазмы кукурузы в основной мт-геном и формированием фенотипических признаков ЦМС и NCS (non-chromosomal stripe, нехромосомно кодируемая пятнистость листьев) (Handa, 2008). В то же время реверсия ЦМС-S к фертильному фенотипу не всегда приводила к потере плазмид S1/S2 (Matera et al., 2011). В растении плевел многолетний (*Lolium perenne*) линейная ппДНК (LpCMSi, 9,6 т.п.н.) в случае встраивания в митохондриальный геном приводила к формированию ЦМС-фенотипа, но в других линиях она также присутствовала в митохондриях в качестве низкокопийного автономного репликона (McDermott et al., 2008). Точно так же не было обнаружено однозначной зависимости между ЦМС-фенотипом у *Brassica napus* и присутствием или отсутствием линейной митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н. (Kemble et al., 1986).

В последнее время, изменения в скоростях эволюции митохондриального генома растений связывают с функциональной ролью линейных плазмид растительных митохондрий (Swart et al., 2012; Warren et al., 2016).

1.1.3. Пластичность и динамичность митохондриального генома растений

Хондриом высших растений (совокупность всех митохондрий клетки) является высокодинамичной структурой, состоящей преимущественно из физически дискретных органелл, количеством от сотен до нескольких тысяч. В растительной клетке митохондрии постоянно сливаются между собой и делятся, что оказывает большое влияние на организацию и динамику митохондриального генома (Logan, 2006).

Митохондриальный геном растений существует в основном как совокупность линейных и кольцевых молекул ДНК различного размера (Gualberto et al., 2014; Morley and Nielsen, 2017). Об этом свидетельствуют подробные исследования количественных соотношений молекул ДНК различной структуры в митохондриальных нуклеоидах бобов мунг (Lo et al., 2011) и культивируемых клеток табака (Oldenburg and Bendich, 1996). Около 50 % всей митохондриальной ДНК в клетках табака имело очень сложную структурную форму, около 30 % являлось линейными молекулами, 15 % представляли собой открытые кольца переменного размера и 5 % находилось в суперскрученной форме.

При анализе содержания мтДНК, размера митохондриального генома и числа митохондрий на клетку было установлено, что некоторые митохондрии растительной клетки содержат менее полный геном, чем другие (Lonsdale et al., 1988). Принимая во внимание, что в клетке млекопитающих присутствует до тысячи копий мтДНК, копийность митохондриальных генов растений, вероятно, относительно более низкая. В работе Preuten с соавторами (2010), с помощью метода ПЦР-РВ, установлено, что копийность исследованных митохондриальных генов в *A. thaliana* значительно варьирует в различных органах растения, а также зависит от стадии развития. Показанные значения копий генов были существенно меньше общего числа митохондрий на клетку (приблизительно 450 и 300 митохондрий в протопластах, полученных из зрелых и молодых листьев). Наибольшее количество копий генов *A. thaliana* (*atp1*, *rps4*, *nad6* и *cox1*), примерно 300-450 на клетку, было обнаружено в клетках меристемы корней, в то время как в листьях, цветах - только 80-140 копий. Исходя из этого, авторы предположили, что отдельные митохондрии растений содержат лишь часть генома или потенциально не содержат ДНК вообще (Preuten et al., 2010).

Появление фрагментированного генома у растений, существующего в виде ряда субгеномных, иногда субстехиометрических молекул ДНК, связывают с высокой частотой меж- и внутримолекулярной гомологичной рекомбинации (Lonsdale et al., 1988; Janska et al., 1998; Abdelnoor et al., 2003). Многие геномы митохондрий растений, хотя и не все, содержат обширные повторы в несколько тысяч пар нуклеотидов. Благодаря гомологичной рекомбинации между разными копиями этих повторов происходят множественные изомерные перестройки генома

(Klein et al., 1994; Unseld et al., 1997). В случае если рекомбинантно активные повторяющиеся последовательности находятся в прямой ориентации, рекомбинация по ним приводит к разделению генома на несколько различных, сильно избыточных субгеномных молекул. Второй класс повторностей, гораздо меньший по размеру и редко проявляющий активность, может приводить к внутригенной рекомбинации с образованием новых открытых рамок считывания (Andre et al., 1992; Vedel et al., 1994). Часто встречающиеся в растениях повторы размером 50-600 п.н. обычно не рекомбинируют (Arrieta-Montiel et al., 2009; Forner et al., 2005).

У большинства видов растений последовательности митохондриальных генов эволюционируют медленно, по сравнению с животными точечные мутации в них достаточно редки, что также связано, как полагают, с наличием активной системы рекомбинации ДНК, позволяющей корректировать и/или исключать из мт-генома мутантные копии генов (Gualberto et al., 2014). Такая низкая скорость мутаций является удивительной для огромного, динамичного и во многом нефункционального митохондриального генома.

Благодаря недавним работам был получен ответ еще на один вопрос, касающийся динамики генома митохондрий, а именно, того, как митохондриальный геном реплицируется и перестраивается. Исследования показывают, что рекомбинация является основным движущим механизмом и в репликации мтДНК растений (Morley and Nielsen, 2017). Важную роль в этом процессе играет митохондриальный белок, кодируемый ядерным геном *recG1* (Wallet et al., 2015). Предположительная функция RECG1 заключается в перезапуске заблокированных репликативных вилок, что ведет к дестабилизации кольцевых молекул и либо к их встраиванию в геном с помощью гомологичной рекомбинации в один или два сайта, либо к их потере. Также этот белок препятствует репликации кольцевых молекул, происходящей с вовлечением D- или L-петель (Wallet et al., 2015), указывая на то, что такие петли не используются в типичном механизме митохондриальной репликации.

1.1.4. Роль горизонтального переноса ДНК в пластичности митохондриального генома растений

Горизонтальный перенос ДНК, передача генетического материала между донорными и реципиентными организмами неполовым путем, сыграл важную роль в эволюции бактерий (Treangen and Rocha, 2007; Oren et al., 2014). Имеющиеся на сегодняшний день данные показывают, что этот процесс широко распространен у сложных многоклеточных эукариот и также важен для их эволюции, особенно для растений (Huang, 2013; Richardson and Palmer, 2007; Bock, 2010; Li et al., 2014). В дополнение к горизонтальному переносу ДНК от растения к растению, во многих случаях сообщают о внутриклеточном переносе генетического материала (ВПГ), происходящем внутри клетки у одного и того же растительного вида (Kleine et al., 2009; Smith et al., 2011; Smith, 2011).

В каждой отдельной клетке растений сосуществуют три ДНК-содержащих компартмента (ядерный, митохондриальный и пластидный геномы), что облегчает обмен внутриклеточной ДНК. Исходя из этого, выявлено 5 типов ВПГ: (1) от митохондрий к ядру (от англ. Nuclear Mitochondrial DNA Sequences – NUMTs), (2) от пластид к ядру (от англ. Nuclear Plastid DNA Sequences – NUPTs), (3) от пластид к митохондриям (от англ. Mitochondrial plastid DNAs – MTPTs), (4) от ядра к митохондриям, (5) от митохондрий к пластидам (от англ. Plastid Mitochondrial DNAs – PTMTs) (Kleine et al., 2009; Smith, 2011). Вследствие эндосимбиотического происхождения митохондрий и хлоропластов многие последовательности эубактериального происхождения мигрировали в ядро из этих органелл посредством внутриклеточного переноса (Timmis et al., 2004). Исходя из существующих данных, функциональный внутриклеточный горизонтальный перенос из митохондриального генома полностью прекратился у животных и практически прекратился в грибах. В растениях, напротив, митохондриальный геном участвует в горизонтальном и внутриклеточном переносах удивительно часто по сравнению с другими геномами (Rice et al., 2013; Xi et al., 2012; Mower et al., 2010; Bock, 2010; Sanchez-Puerta, 2014).

Относительно маленький митохондриальный геном человека (16,6 т.п.н.) кодирует 13 полипептидов, в то время как крупный геном арабидопсиса (366,9 т.п.н.) всего 33 полипептида. Это означает, что мтДНК арабидопсиса кодирует лишь в 2,5 раза больше белков, чем мтДНК человека при разнице в размерах геномов в 22 раза. Небольшое количество функциональных генов в геноме

митохондрий окружено длинными межгенными областями, в основном, неизвестного происхождения, не имеющих сходства с какой-либо другой секвенированной ДНК (Mower et al., 2012). Очевидно, что в ходе эволюции растительные геномы сильно увеличились в размере за счет некодирующих последовательностей, интронов и неидентифицированных ОРС, полученных из ядра и пластид посредством внутриклеточного переноса генетического материала (Logan, 2006), а также чужеродной митохондриальной ДНК, полученной от других видов растений посредством горизонтального переноса (Gandini and Sanchez-Puerta, 2017).

Отмечено, что если перенос чужеродных последовательностей в пластидный геном встречается очень редко (Smith, 2014), то внутриклеточный перенос ДНК от пластид в геном митохондрий, напротив, широко распространен (Ma et al., 2015). ДНК пластидного происхождения (МТРПТ) обнаружена в мтДНК покрытосемянных в различных количествах – от 0,1% до 10,3% всей митохондриальной ДНК, охватывая при этом от 0,5% до 87,2% пластидного генома (Sloan and Wu, 2014). Несмотря на то, что большинство переносов ДНК пластидного происхождения приводит к появлению нефункциональных последовательностей, считается, что интегрированная в тот или иной момент в митохондриальный геном МТРПТ может влиять на митохондриальные функции. Присутствие МТРПТ может способствовать формированию новой формы гена или промотора, или появлению новых функциональных генов тРНК (Hao and Palmer, 2009; Wang et al., 2012). Интересно, что многие МТРПТ могут приобретаться посредством горизонтального переноса из неблизкородственных видов покрытосемянных (Sloan and Wu, 2014; Rice et al., 2013; Xi et al., 2013; Park et al., 2015).

Процессы ВПГ и ГПГ тесно переплетаются и могут взаимно дополнять друг друга. При анализе фланкирующих регионов чужеродных последовательностей пластидного происхождения в 65% случаев были обнаружены убедительные доказательства переноса ДНК из митохондрии в митохондрию (Gandini and Sanchez-Puerta, 2017). Исходя из обнаружения в митохондриальном геноме 15 новых чужеродных последовательностей пластидного происхождения, авторы выдвинули гипотезу, что пластидные последовательности первоначально были получены нативной мтДНК посредством ВПГ, а затем перенесены в

неблизкородственный растительный вид через ГПГ, а не непосредственно из чужеродной пластиды в митохондриальный геном (рис. 4).

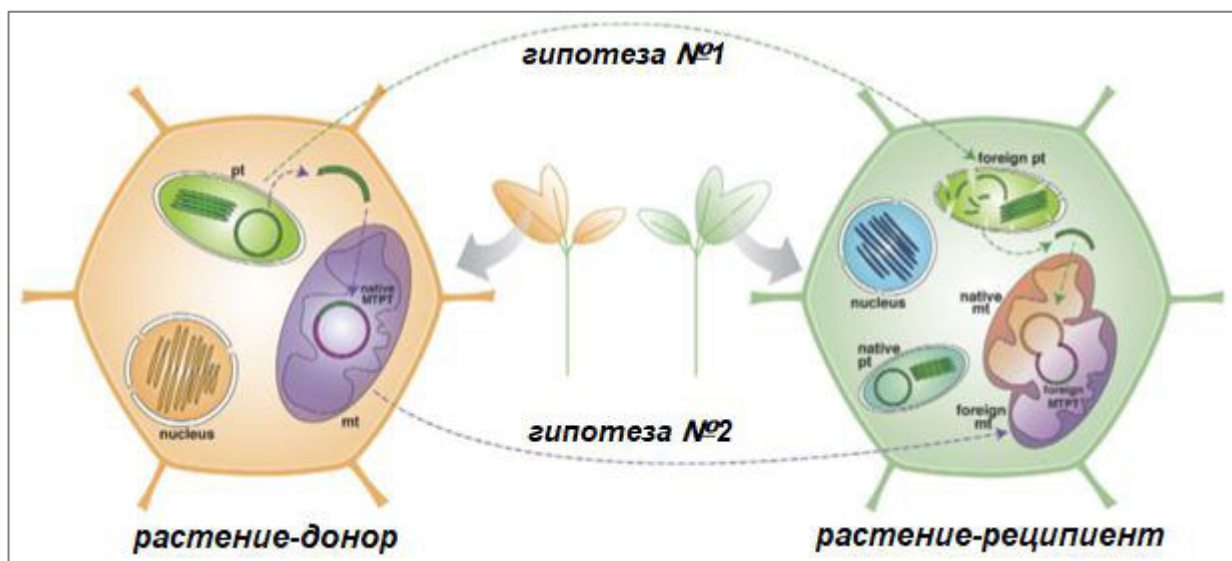


Рис. 4. Гипотезы о происхождении чужеродных пластидных последовательностей в растительной мтДНК (MTPT) (Gandini and Sanchez-Puerta, 2017)

Гипотеза №1: взаимодействия между растениями позволяют переносить целые пластиды (pt), чьи геномные последовательности высвобождаются в клетку-реципиент, а затем захватываются нативными митохондриями (mt). Гипотеза №2: последовательности пластидных генов переносятся в митохондрии внутри донорного растения; более поздние взаимодействия между растениями позволяют переносить целые чужеродные митохондрии в клетку-реципиент, где чужеродные и нативные митохондрии сливаются, а и их геномы рекомбинируют.

Паразитирование одних организмов на других достаточно широко распространено в природе, поэтому процесс ГПГ, лежащий в основе межвидового переноса генетической информации, может являться, как и у бактерий, важным движущим фактором эволюции у многоклеточных организмов. Непосредственный физический контакт тканей растений хозяина и паразита вполне может приводить к поглощению и обмену мтДНК. Нao et al. (2010) обнаружили «великолепную мозаику» митохондриальных генов и фрагментов генов, происходящих из различных линий взаимодействующих растений хозяина и паразита, возникшую путем горизонтального переноса и преобразования последовательностей, посредством, например, конверсии генетических последовательностей и последующей интеграции чужеродного генетического материала.

Полное секвенирование мтДНК *Lophophytum mirabile* (Balanophoraceae) показало беспрецедентное приобретение этим паразитическим организмом митохондриальных последовательностей растения-хозяина, представляющих 80 %

генов, кодирующих белки, в то время как нативные гомологи были потеряны. *L. mirabile* содержит 35 интактных белковых трансгенов, полученных от его бобовых хозяев посредством одного или нескольких событий ГПГ. Учитывая наличие чужеродных кластеров генов, интронов и сайтов редактирования РНК цитозин – урацил, авторы полагают, что чужеродные гены в *L. mirabile* были перенесены, скорее всего, в виде крупных фрагментов ДНК (или даже как целые хромосомы или весь геном). Вероятная функциональная замена такого количества генов в *L. mirabile* представляет собой впечатляющий пример потенциального воздействия массивного горизонтального переноса генов в растительные митохондрии. Использование растением-паразитом генов растения-хозяина может положительно влиять на отношения хозяина-паразита, но также может быть следствием коадаптации (Sanchez-Puerta et al., 2016).

Тем не менее, несмотря на широкое распространение горизонтального переноса ДНК в растительных митохондриях, механизм этого процесса является малоизученным и неясным. Остаются открытыми вопросы о том, какая молекула является донором, ДНК или РНК, что является посредником при передаче генетического материала, вирус или какая-либо плаزمид (Archibald and Richards, 2010). Некоторые свойства растительных митохондрий и их геномов способствуют переносу ДНК в эти органеллы. Митохондрии растений способны импортировать ДНК или РНК (Koulintchenko et al., 2003; Duchêne et al., 2009) и легко подвергаются слиянию (Arimura et al., 2004). Интересно отметить, что события переноса генетического материала в хлоропласты достаточно редки (Rice and Palmer, 2006), несмотря на то, что хлоропласты, точно так же, как и митохондрии, имеют эндосимбиотическое происхождение. Для хлоропластов до настоящего времени не было показано ни способности к слиянию, ни к поглощению ДНК (Richardson and Palmer, 2007 и ссылки в нем), что подчеркивает важность этих присущих митохондриям свойств для горизонтального и внутриклеточного переноса ДНК.

1.2. Структурная неоднородность митохондриальной популяции в клетке

1.2.1. Изучение митохондриальных субпопуляций в клетках животных

Митохондрии различаются по размеру, плотности, участию в метаболизме клеток, старении и апоптозе (Bereiter-Hahn et al., 1994; De Vos et al., 2005; Mishra et al., 2005; Granville et al., 2002). Считается, что в специализированных клетках

органов животных (печень, мышцы, сердце, почки и др.) одновременно имеются три популяции этих органелл: молодые протомитохондрии диаметром от 0,1 до 0,45 мкм, зрелые митохондрии – около 1 мкм и старые постмитохондрии – около 2 мкм (Белякович, 1990; Шишмаков и др., 2004). Соотношение этих трех популяций зависит от вида клеток, возраста и ряда других параметров (Белякович, 1990). Обычно протомитохондрии составляют в клетках около 30 % всех митохондриальных органелл (Белякович, 1990; Шишмаков и др., 2004).

Установлено, что протомитохондрии млекопитающих (1) имеют размер около 0,2–0,45 мкм, (2) обладают обеими мембранами, наружной и внутренней (определено с помощью электронной микроскопии), (3) имеют высокие активности NADH:феррицианид-редуктазы, NADH:тетразолий-редуктазы, сукцинат:феррицианид-редуктазы и сукцинат:тетразолий-редуктазы, (4) содержат заметно меньшее количество цитохромов, чем зрелые митохондрии (Шишмаков и др., 2004).

Одной из важнейших функциональных характеристик митохондрий является дыхание – потребление кислорода. В работе Бегуновой с соавт. (2015), с использованием в качестве субстрата дыхания сукцината, показано, что протомитохондрии поглощают кислород быстрее, чем митохондрии, но характеризуются меньшим показателем дыхательного контроля. Низкие показатели дыхательного контроля свидетельствует, по-видимому, о том, что дыхательная цепь разобщена с АТФ-синтетазой (Бегунова и Векшин, 2015).

Установлено, что митохондрии животных различаются по месту и характеру локализации. Ультраструктурным анализом показано, что в поперечно-полосатых мышцах позвоночных содержится две популяции митохондрий. Одна популяция находится на всем протяжении миофибрилл, а другая встречается непосредственно под клеточной мембраной (Battersby and Moyes, 1998). С помощью фракционирования гомогената печени млекопитающих выделяли тяжёлую и лёгкую митохондриальные фракции (Graham, 2002). Тяжелая митохондриальная фракция, содержащая преимущественно митохондрии с небольшим количеством других клеточных структур, являлась главным источником этих органелл для исследований дыхательной активности. Лёгкая митохондриальная фракция содержала митохондрии, лизосомы, пероксисомы, мембраны аппарата Гольджи и

эндоплазматический ретикулум (Graham, 2002). Некоторые митохондриальные субпопуляции часто содержат различные клеточные факторы и контактные сайты, посредством которых, вероятно, происходит обмен метаболитами и передача сигналов между органеллами.

1.2.2. Изучение митохондриальных субпопуляций в клетках растений

В растительных организмах классификацию митохондриальных субпопуляций чаще всего основывали на их физиологическом состоянии. Иными словами, митохондрии подразделяли на зрелые и молодые, неразвитые митохондрии, или протомитохондрии (Howell et al., 2006; Бегунова и Векшин, 2015). Еще в 1958 году появилась работа (Lund et al., 1958), в которой с помощью электронной микроскопии было показано, что в клетках апикальной меристемы корня кукурузы присутствуют два типа митохондрий, для одного из которых характерна четкая, хорошо развитая система внутренних мембран – крист, а для другого, интерпретируемого как тип органелл на незрелой стадии развития – гомогенный матрикс, в котором происходит постепенное развитие крист. С помощью биохимических методов исследования митохондриальных фракций установлено, что развитие этих крист связано с увеличением тканевого дыхания и скорости окисления и фосфорилирования изолированных митохондрий (Lund et al., 1958).

Ранее многие исследователи приписывали увеличение дыхательной активности семядолей из различных семян на ранних стадиях прорастания увеличению в них синтеза митохондрий *de novo* (Breidenbach et al., 1967; Cherry, 1963; Wilson and Bonner, 1971). На основании цитологических доказательств Бэйн и Мерсер предположили, что митохондрии гороха с семядолями не только увеличиваются, но также подвергаются дальнейшему структурному развитию в течение первых 5 дней прорастания (Bain and Mercer, 1964). Malhotra и Spencer (1973) выделили отдельные, зависящие от стадии прорастания, популяции митохондрий и других субклеточных частиц из семядолей гороха после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Solomos et al., 1972).

При изучении митохондриального биогенеза во время прорастания кукурузных семян (Logan et al., 2001) были выделены лёгкая и тяжелая субпопуляции митохондрий. В сухих семенах обе популяции содержали

слаборазвитые митохондрии: однако после набухания митохондрии тяжёлой фракции приобрели все признаки зрелых митохондрий с хорошо развитой системой крист, в то время как митохондрии лёгкой фракции даже после набухания семян не показали значительных структурных изменений.

Существование структурно-функциональной гетерогенности клеточной популяции митохондрий было продемонстрировано и в проростках фасоли (Dai et al., 1998). Митохондрии быстрорастущих и развивающихся проростков фасоли были разделены на четыре популяции, по плотности их седиментации в градиенте сахарозы, каждый из которых был условно обозначен 1500S и 150S. В двух популяциях 150S содержались ранее неидентифицировавшиеся, небольшие по размеру (в диапазоне 70-300 нм, большая часть ≤ 200 нм) органеллы, у которых не были обнаружены кристы и отсутствовала способность к дыханию. В более плотных популяциях 1500S были обнаружены типичные, хорошо структурированные, содержащие кристы митохондрии, размером 300-800 нм. Подобная гетерогенность митохондриальной популяции, как в системе изолированных митохондрий, так и *in situ*, дает основания предполагать, что небольшие митохондрии («ss-митохондрии»), представляют собой тип «митохондрий на стадии образования», происходящих посредством еще неизвестного способа их деления или размножения, функционирующего во время быстрого роста проростков (Dai et al., 1998).

Три субпопуляции митохондрий были выделены из эмбриональных масс двух видов хвойных (*Picea abies* и *Abies cephalonica*) (Petrussa et al., 2008). Было показано, что грубая фракция интактных митохондрий с высоким дыхательным контролем при очистке в ступенчатом градиенте плотности перколла разделялась на три фракции митохондрий. Митохондриальная фракция на границе между 0/18 % перколла состояла, в основном, из поврежденных и разобщенных митохондрий, в то время как две другие (фракции между 18/23 % и 23/40 % перкола) содержали интактные и высоко сопряженные митохондрии (Petrussa et al., 2008).

1.2.3. Изучение особенностей и функций митохондриальных субпопуляций в клетке

Помимо гетерогенности клеточной популяции митохондрий, обусловленной стадией их биогенеза (зрелые и молодые митохондрии), в качестве характеристик

митохондриальных субпопуляций у растений выделяют и некоторые другие параметры, например различия по трансмембранному потенциалу митохондрий, по копиям мтДНК, по субклеточной организации митохондрий и их межорганелльным взаимодействиям в клетке.

Во время старения мезофилла листа был проведен анализ трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) в протопластах с помощью флуорохрома JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтил бензимидазол карбоцианина) (Simeonova et al., 2004). Было показано, что на всех анализируемых стадиях старения листьев существуют две субпопуляции митохондрий, отличающиеся $\Delta\Psi_m$. Первая субпопуляция содержала митохондрии с высоким $\Delta\Psi_m$ (красная флуоресценция J-агрегатов). Вторая субпопуляция включала митохондрии с низкой $\Delta\Psi_m$ (зеленая флуоресценция мономеров), что характерно для полной деполяризации митохондриальных мембран. Анализ флуоресценции показал, что даже на последних анализируемых стадиях старения листьев все еще существуют митохондрии с высоким $\Delta\Psi_m$. Флюорометрические измерения показали, что интенсивность флуоресценции J-агрегатов уменьшается с возрастом растений, что указывает на то, что во время процесса старения происходит снижение $\Delta\Psi_m$; однако это снижение не происходит во всей популяции митохондрий в протопласте. Причиной этого может быть существенная реорганизация митохондрий в клетках мезофилла и появление на поздних стадиях крупных митохондрий, характеризующихся локальной гетерогенностью $\Delta\Psi_m$. При изменениях размера, распределения и структурной организации митохондрий в протопластах на всех стадиях старения, все митохондрии, тем не менее, сохраняли свою мембранную организацию (Simeonova et al., 2004).

Данные об изменении субклеточной организации митохондрий в клетке в процессе старения были отмечены и в работе (Bakeeva et al., 1999). Показано, что некоторая часть митохондрий, выделенных из колеоптилей пшеницы, находится не в свободном состоянии, а заключена в одномембранные везикулы с содержимым, аналогичным составу цитоплазмы. Кроме того, митохондриям такой структурной организации характерна интенсификация синтеза мт-ДНК, богатой ГЦ-остатками. Подобная структурная организация митохондрий характерна только для

стареющих растительных тканей, поскольку не была обнаружена в молодых тканях или встречалась крайне редко.

Митохондрии содержат свою собственную ДНК, кодирующую небольшое количество жизненно важных генов, но их роль хранилища генетической информации мало совместима с ролью в биоэнергетике, поскольку перенос электронов приводит к образованию АФК, которые индуцируют повреждения в мтДНК. Предполагается, что АФК влияют на морфологическую организацию митохондриальной популяции высших растений, оказывая селективное давление (Logan, 2006). Химическая индукция образования АФК или мягкий тепловой шок вызывали быстрое и последовательное изменение морфологии митохондрий (называемое переходной морфологией митохондрий), которая предшествовала гибели клеток (Scott et al., 2007).

В отдельной органелле может быть более одной копии ее генома (Birky, 2001) или же поддерживаться необычно низкое, менее одной копии, количество молекул субгеномных ДНК (Small et al., 1987). Данная геномная гетерогенность может иметь корреляцию с обнаруженными фенотипическими различиями митохондриальных субпопуляций внутри растительных клеток (Dai et al., 1998), и совпадает с наблюдениями о том, что некоторые из получаемых митохондриальных субпопуляций действительно содержат малое количество мтДНК по сравнению с типичными митохондриями.

Безусловно, что вклад в увеличение сложности структуры мт-генома в растениях вносит и необычная рекомбинационная активность, обнаруженная в растительных митохондриях. Процесс удвоения и разделения митохондрий во время клеточного цикла, сопровождаемый репликацией и сегрегацией ДНК в каждую из митохондрий, может приводить к случайному распределению мтДНК, вследствие отсутствия контроля над репликацией каждой из ее копий. Общее количество копий генома может контролироваться способом, подобным тому, как это осуществляется у бактерий, с участием гомолога бактериального белка FtsZ, входящего в состав аппарата перетяжки органеллы. В молекулярном аппарате митохондрий клеток животных используется белок динамин, который участвует в образовании мембранных везикул (Birky, 2001).

Одной из наиболее важных новых областей исследования митохондрий является идентификация молекул, опосредующих связи между органеллами. Хотя эта область еще недостаточно хорошо изучена, очевидно существование многочисленных межорганелльных взаимодействий. Ряд цитологических данных свидетельствует о наличии физических контактов между органеллами на конкретных стадиях развития клеток, включая такие контакты, как митохондрии-эндоплазматический ретикулум (Stachelin, 1997), митохондрии-хлоропласты (Kohler et al., 1997) и митохондрии-ядро (Smart et al., 1994; Southworth et al., 1997). Подобные контакты могут служить средством передачи генетической информации в митохондриальный геном и из него (Unsold et al., 1997), а также обмена мембранными компонентами и передачи межорганелльных сигналов. Предполагается, что митохондриальные субпопуляции могут представлять собой как отдельные свободные органеллы, так и митохондрии, находящиеся в каких-либо контактах с другими клеточными факторами. Показано, что митохондрии одной из выделенных фракций, для которых характерен небольшой размер и несформированная система внутренних мембран («ss-митохондрии»), почти всегда находились в контакте с нитевидной мембраноподобной структурой различной длины (Dai et al., 1998).

1.3. Транспорт макромолекул в митохондриях

Для осуществления своих функций в клетке и поддержания собственной генетической системы митохондриям необходимо осуществлять транспорт крупных молекул - белков и нуклеиновых кислот. Сложные механизмы, лежащие в основе транспорта этих макромолекул, уже давно изучаются, проводится поиск как непосредственных участников этих процессов, так и регулирующих их факторов.

1.3.1. Импорт белков в митохондрии

Большая часть митохондриальных белков кодируются ядерными генами, синтезируются на цитоплазматических рибосомах и транспортируются в митохондрии в форме предшественников. Изучение механизмов импорта белков первоначально проводили на митохондриях *S. cerevisiae*, однако, эти механизмы оказались высоко консервативными для всех эукариот. Цитоплазматические рибосомы, транслирующие мРНК митохондриальных белков-предшественников, локализуются вблизи внешней митохондриальной мембраны (MacKenzie and Payne,

2004). Для предотвращения неправильной укладки и агрегации митохондриальных белков-предшественников служат специальные шапероны, сопровождающие их до поверхности органеллы (Zara et al., 2009). Направление белков-предшественников в митохондрию и их сортировка по отдельным митохондриальным субкомпартментам требует наличия в транспортируемых полипептидах специфических сигналов импорта (Garcia et al., 2010). Наиболее часто встречающийся сигнал митохондриального импорта - N-концевая сигнальная последовательность – является амфипатическим α -спиральным сегментом с положительным зарядом и имеют длину преимущественно от 15 до 55 аминокислот (Vögtle et al., 2009). N-концевые сигналы могут быть как отщепляемыми, так и неотщепляемыми. Интересным исключением является хеликаза Hm1, которая направляется в митохондрии с помощью сигнальной структурной последовательности на своем С-конце (Lee, 1999). Первичный структурный сегмент в сигнальной последовательности определяет местоположение белка в матриксе, вторичные сегменты направляют белки во внутреннюю мембрану или в межмембранное пространство (Murcha, 2014).

Рецепторы внешней мембраны TOM20 и TOM70 у дрожжей и TOM20 у растений являются сайтами, связывающими белки-предшественники, и функционируют как пункты проверки качества, которые открывают доступ в митохондрию только в случае, если полученный белок содержит подходящий сигнал об адресации. За исключением некоторых альфа-спиральных белков наружной мембраны, для инициации транспорта в митохондрию практически всех предшественников необходим общий путь, образованный транслоказой наружной мембраны (комплексом TOM, от англ. translocase of the outer membrane).

Транслокация белков-предшественников через мембраны митохондрий осуществляется различными транспортными путями, существующими во всех эукариотических организмах (рис. 5) (обзор в Murcha et al., 2014). Многие белки межмембранного пространства импортируются с помощью механизма импорта и сборки MIA (от англ. Mitochondrial Intermembrane space import and Assembly), который объединяет сортировку белков с их укладкой. Предшественники белков наружной мембраны, содержащие β -цилиндрическую структуру, связываются в межмембранном пространстве небольшими шаперонами Tim, которые переносят

их к мембранному комплексу, осуществляющему сортировку и сборку белков, SAM (от англ. Sorting and Assembly Machinery); посредством этого механизма белки интегрируются во внешнюю мембрану. Митохондриальные белки-переносчики метаболитов также переносятся небольшими шаперонами Tim через межмембранное пространство и затем интегрируются во внутреннюю мембрану с помощью транслоказы внутренней мембраны 22 (комплекс TIM22, от англ. Translocase of the Innner Membrane 22). Этот процесс зависит от мембранного потенциала ($\Delta\Psi$).

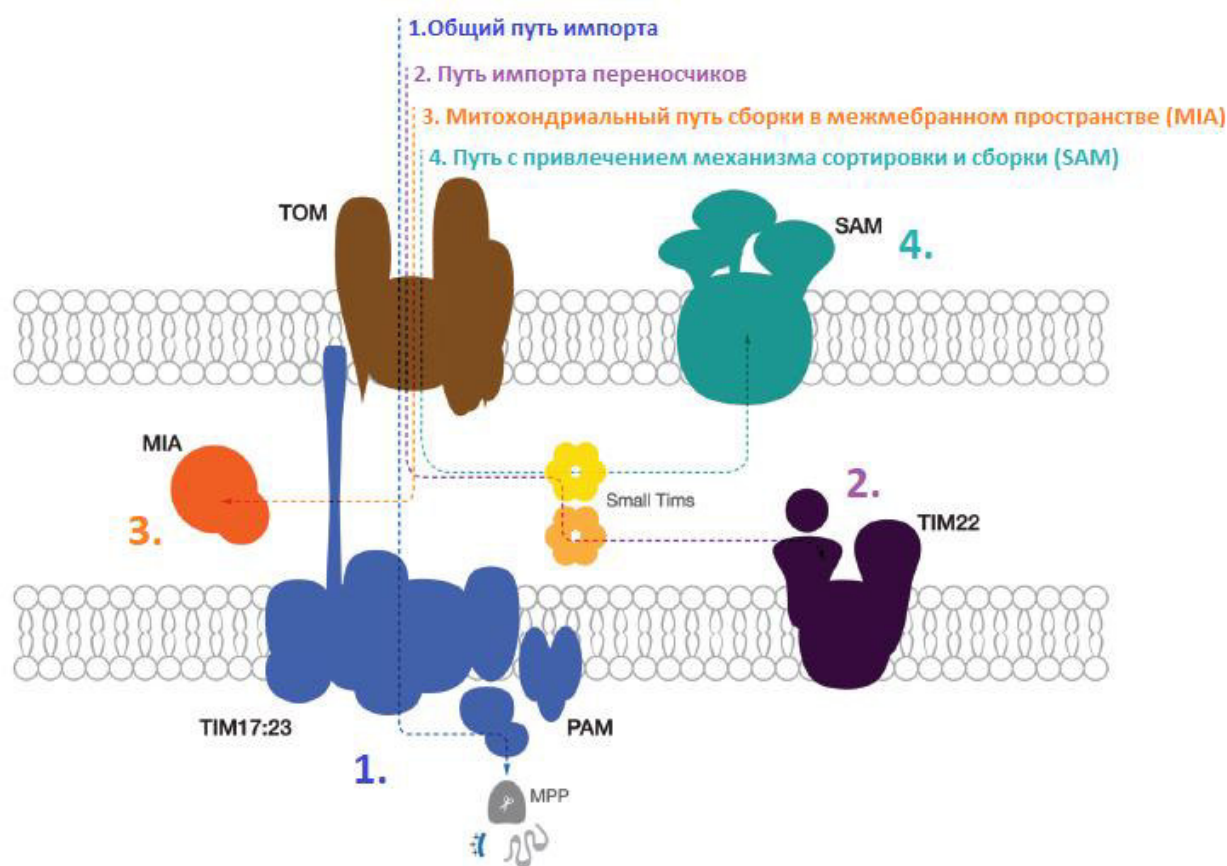


Рис. 5. Пути импорта белка в митохондрии (Murcha et al., 2014)

Схематическая репрезентация четырех основных путей импорта белков в митохондрии. В *общем пути импорта* для транспорта белков, содержащих N-концевой сигнальный пептид, используется транслоказа внешней мембраны TOM и транслоказа внутренней мембраны TIM17:23, а также связанная с ними транслоказа PAM. *Второй путь* (CIP, от англ. *carrier import pathway*) представляет собой импорт белков внутренней мембраны, которые содержат множественные трансмембранные области. В этом механизме задействован комплекс TOM во внешней мембране, множество небольших белков TIM во внутренней мембране и транслоказа внутренней мембраны 22 (TIM22). *Третий путь*, включающий комплекс TOM и механизм MIA, используется для импорта в межмембранное пространство различных белков, содержащих двойные цистеиновые остатки. Посредством *четвертого пути* с участием двух комплексов внешней мембраны – TOM и SAM и с привлечением небольших белков TIM в межмембранном пространстве, происходит встраивание белков, содержащих β -цилиндрические структуры, во внешнюю мембрану.

Белки-предшественники, содержащие сигнальные последовательности, непосредственно передаются из комплекса ТОМ на транслоказу внутренней мембраны 23 (комплекс TIM23), без посредничества шаперонов межмембранного пространства. В зависимости от наличия или отсутствия дополнительных сигналов импорта, комплекс TIM23 опосредует либо перенос предшественников, несущих сигнальную последовательность, в матрикс, либо их направление во внутреннюю мембрану. В то время как интеграция в мембрану зависит от наличия мембранного потенциала $\Delta\Psi$ как единственного источника энергии, для полной транслокации в матрикс дополнительно требуется АТФ-зависимый мембранный механизм, ассоциированный с транслоказой (РАМ, от англ. *presequence-assisted motor*) (Murcha et al., 2014).

После импорта белков N-концевые сигнальные последовательности, как правило, протеолитически удаляются с помощью митохондриальной процессирующей пептидазы (MPP, от англ. *mitochondrial processing peptidase*), а также различных дополнительных пептидаз, способных удалять вторичные сигналы (Stahl et al., 2002; Kmiec et al., 2013), которые в растениях, по сравнению с дрожжами (*Saccharomyces cerevisiae*), охарактеризованы недостаточно хорошо.

Кроме того, существуют также и другие пути белкового импорта, более специализированные для импорта специфичных белков или белковых групп и до сих пор недостаточно изученные.

1.3.2. Импорт РНК в митохондрии

1.3.2.1. Импорт тРНК в митохондрии различных организмов

Известно, что в митохондриальном геноме многих эукариот отсутствует полный набор генов, кодирующих тРНК, что компенсируется импортом необходимых тРНК из цитоплазмы клетки в митохондрию (Salinas et al., 2008; Alfonzo and Söll, 2009). У млекопитающих митохондриальный геном кодирует полный набор тРНК, однако, в митохондрию могут импортироваться некоторые другие типы молекул тРНК (Rubio et al., 2008), например, было показано, что митохондрии млекопитающих импортируют 5S рРНК (Entelis et al., 2001) и РНК-субъединицу РНКазы Р (Wang et al., 2012). Функции этих импортируемых РНК в митохондриях млекопитающих не выяснены, поскольку в структуре миторибосом

млекопитающих отсутствует 5S рРНК (Amunts et al., 2015), а в состав обнаруженной РНКазы Р входит только белок (Holzmann et al., 2008).

В отличие от белкового импорта, механизм импорта тРНК в митохондрии недостаточно понятен. Экспериментально этот процесс изучали на дрожжах, растениях и трипаносоматидах - по совокупности данных исследований были предложены две общепринятые модели импорта тРНК. Согласно первой модели, тРНК импортируется совместно с митохондриальным белковым предшественником по белковому пути импорта («модель коимпорта»). Данная модель, основанная на механизме импорта тРНК^{Lys} у дрожжей, была детально охарактеризована в (Tarassov et al., 1995). Согласно этому механизму, в клетках *S. cerevisiae* тRNA^{Lys}(CUU) (tRK1) взаимодействуют с цитозольными факторами, позволяющими этим тРНК выйти из происходящего в цитоплазме цикла белкового синтеза. Часть аминоацелированного цитозольного tRK1 специфически распознается одной из двух изоформ гликолитического фермента енолазы, Eno2p (Entelis et al., 2006). Eno2p затем направляется к большому гликолитическому макромолекулярному комплексу, тесно связанному с поверхностью наружной митохондриальной мембраны. К аминоацелированному цитоплазматическому tRK1 присоединяется предшественник (pre-MSK1) митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы (LysRS), которая ответственна за аминоацелирование своего субстрата, аналога тRNA^{Lys} митохондриального кодирования (рис. 6, а). Три компонента протеасомной системы убиквитин / 26S, Rpn13, Rpn8 и Doa1, которые взаимодействуют с тРНК и предшественником митохондриальной LysRS, играют регуляторную роль. Известно, что ключевым шагом в импорте белка в митохондрии является разворачивание белка: каким образом тРНК-предшественник синтетазного комплекса проникает через мембраны митохондрий, остается не ясным (Rubio and Hopper, 2011).

Согласно второй, менее разработанной на настоящий момент модели механизма импорта тРНК, в большей степени имеющей отношение к растениям и простейшим (Karush et al., 2000), тРНК импортируется в митохондрии непосредственно («модель прямого импорта»), процесс проходит независимо от белкового импорта и с использованием иного, отличного от белкового, транспортного канала (Alfonzo and Söll, 2009).

Удобной системой для исследований в области импорта тРНК в митохондриях таких организмов, как простейшие, служит паразитический вид *Trypanosoma brucei*. В отличие от других эукариот, их митохондриальный геном не кодирует ни одной тРНК, что предполагает необходимость импорта из цитоплазмы в органеллу всех митохондриальных тРНК (более 30 различных видов) (Tan et al., (2002), за исключением цитозоль-специфичных tRNA^{Met-i} и tRNA^{Sec}. В работе Niemann et al. (2017) показано, что в трипаносомах и белки, и тРНК используют для транслокации через внешнюю митохондриальную мембрану поры, формируемые белками с β -цилиндрическими структурами, при этом, импорт тРНК может быть разобщен с белковым импортом. Авторы предлагают «альтернативную модель импорта», комбинирующую элементы модели «коимпорта» и «прямого» импорта, согласно которой тРНК использует те же самые транспортные каналы внешней мембраны, что и импортируемые белки, но импортируется независимо от них, как свободная молекула (Niemann et al., 2017).

Проведенные *in vivo* и *in vitro* исследования в *T. brucei* показали, что во взаимодействии с тРНК участвует цитозольный фактор элонгации eEF1a, способствующий митохондриальной адресации импортируемых тРНК (Bouzaidi-Tiali et al., 2007). *In vivo* показано, что, в отличие от растений, для импорта тРНК через внешнюю мембрану митохондрий трипаносом *T. brucei* не требуется белок-транспортер VDAC, а для импорта через внутреннюю мембрану необходимо два белка, Tb11.01.4590 и Tb09.v1.0420 (Seidman et al., 2012). Помимо этого в переносе тРНК через внутреннюю мембрану участвуют белки Tim17 и Hsp70, являющиеся частью механизма белкового импорта. Две системы, импорта белков и тРНК, могут формировать общий транслокон, однако это еще предстоит доказать (Seidman et al., 2012) (рис. 6, в).

Во всех изученных организмах импортированные тРНК являются цитозольными тРНК, которые также необходимы и для цитоплазматической трансляции. Не все цитоплазматические тРНК импортируются в митохондрии: некоторые локализуются исключительно в цитоплазме, другие могут функционировать как в цитоплазме, так и в митохондриях. Вопрос о том, как клетка различает импортируемые в митохондрии и цитозоль-специфические тРНК, был исследован на различных таксономических группах с применением подходов,

позволяющих выявить детерминанты в импортируемых тРНК или антидетерминанты в цитозоль-специфических тРНК. Результаты показывают, что сигналы для импорта тРНК присутствуют не только в зрелых молекулах, но и в их предшественниках, и то, что они столь же разнообразны, как и количество изученных организмов (Schneider, 2011). Полагают, что причиной множественных сигналов импорта тРНК является их зависимость от взаимодействия с факторами импорта белка на протяжении всего процесса транслокации (Salinas et al., 2008). Избирательность импорта тРНК до сих пор остается загадкой, поскольку молекулы с одинаковой последовательностью могут импортироваться у одного вида, и не импортироваться у другого.

1.3.2.2. Механизм импорта тРНК в растительные митохондрии

Импорт тРНК в растительные митохондрии впервые был выявлен *in vivo* в 1992 году (Small et al., 1992). Дальнейший анализ импорта тРНК *in vitro* показал поглощение цитозольной тРНК изолированными митохондриями (обзор Sieber et al., 2011). Позже стало известно, что импорт тРНК в растительные митохондрии происходит посредством кооперации между компонентами белковой транслоказы наружной мембраны (ТОМ) и порином / анионным каналом, зависящим от напряжения (VDAC, от англ. voltage dependent anion channel) (рис. 6, б).

Основную роль в связывании тРНК с поверхностью митохондрий выполняют две главные субъединицы комплекса ТОМ, ТОМ20 и ТОМ40 (Salinas et al., 2006). Таким образом, ТОМ20 и ТОМ40 играют основную роль не только в импорте белков, но и в импорте тРНК. Показано (Salinas et al., 2006), что после того, как произошло связывание тРНК с рецептором импорта внешней митохондриальной мембраны ТОМ20, молекула тРНК транслоцируется через канал, формируемый ТОМ40, на VDAC. ТОМ20 или ТОМ40, каждая субъединица по отдельности, не могут эффективно взаимодействовать с тРНК, подтверждая идею о том, что связывание тРНК с наружной мембраной митохондрий требует согласованного действия нескольких белков, в частности, по меньшей мере обоих компонентов комплекса ТОМ. Тем не менее, как уже упоминалось (п. 1.3.2.1), несмотря на участие в импорте тРНК компонента аппарата белкового импорта ТОМ, в митохондриях растений импорт тРНК протекает независимо от пути, по которому осуществляется импорт белка. Транслоказа внутренней мембраны

(TIMs), участвующая в процессе импорта белка, по-видимому, не участвуют в импорте тРНК в растительные митохондрии (Salinas et al., 2006), как это происходит в дрожжах, где белки TOM и TIM необходимы для импорта белка-предшественника лизил-синтетазы с тРНК (Tarassov et al., 1995).

В исследованиях *in vitro* добавление белков, связывающих нуклеиновые кислоты, улучшает показатели эффективности импорта тРНК, позволяя предположить, что в процесс вовлекаются неопознанные пока цитоплазматические факторы (Sieber et al., 2011; Murcha et al., 2016). *In vitro* тРНК могут проникать в митохондрии без добавления каких-либо белковых факторов (Delage et al., 2003; Salinas et al., 2005; Salinas et al., 2006), тогда как *in vivo* необходимо участие аминоксил-тРНК-синтетаз (aaRS) (рис. 6, б), хотя более точную их роль в импорте еще необходимо выяснить (Dietrich et al., 1996).

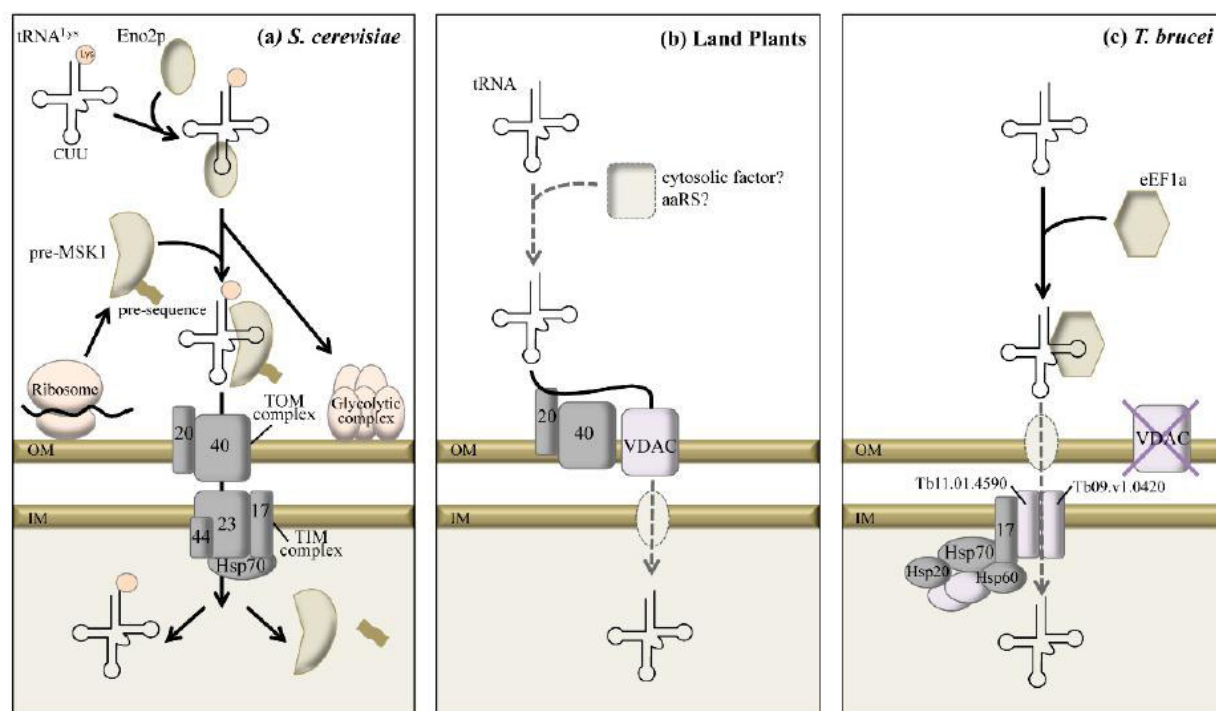


Рис. 6. Сравнение механизмов импорта тРНК в митохондрии (а) *S. cerevisiae*, (б) наземных растений и (в) *T. brucei* (Salinas-Giegé et al., 2015)

Черные стрелки указывают на установленные характерные этапы импорта, серые пунктирные стрелки – на гипотетические факторы или этапы. OM и IM - наружная и внутренняя митохондриальные мембраны соответственно. TIM и TOM - транслоказы внутренней и наружной митохондриальной мембраны. Указан размер субъединиц комплексов TOM и TIM в кДа. Hsp - различные белки теплового шока, Eno2p - гликолитический фермент энолаза, aaRS – аминоксил-тРНК-синтетаза, VDAC – анионный канал, зависимый от напряжения, пре-MSK1 – предшественник митохондриальной лизил-тРНК синтетазы, eEF1a – фактор 1 альфа эукариотической элонгации трансляции, Tb – *Trypanosoma brucei*. Белки, показанные серым цветом, обозначают белки, относящиеся к аппарату импорту белков.

Митохондриальный порин (VDAC) растений взаимодействует с тРНК *in vitro* и, как предполагается, является основным компонентом канала, вовлеченного в этап транслокации тРНК через наружную митохондриальную мембрану растения (Salinas et al., 2006). VDAC играет важную роль в транспорте метаболитов, обеспечивая проницаемость наружной мембраны митохондрий путем формирования потенциал-регулируемых каналов с открытой порой радиусом от 3 нм и до 1,8 нм в закрытом состоянии (Colombini, 2009). Примечательно, что для VDAC характерна способность осуществлять отбор среди небольших молекул, ионов и отрицательно заряженных метаболитов, таких как сукцинат, малат или АТФ, с гораздо меньшим эффективным радиусом приблизительно 0,5 нм. Каким образом VDAC выполняет функцию транспорта тРНК в митохондрии растений в своем открытом состоянии, остается загадкой, так как третичная L-образная структура тРНК имеет слишком большой размер. Возможно, перед транслокацией через VDAC молекулам тРНК приходится разворачиваться (Rubio and Horper, 2011).

Недостаточное понимание механизма трансмембранного переноса тРНК в митохондрии растений стимулирует проведение новых исследований, направленных на поиск дополнительных факторов этого процесса. В одной из последних работ (Murcha et al., 2016) были идентифицированы два белка семейства PRAT (от англ. Preprotein and Amino acid Transporters), кодируемые генами At3g49560 и At5g24650 и локализующиеся во внешней мембране митохондрий арабидопсиса. В связи с выявленной ролью этих белков в импорте тРНК, они были названы TRIC1 и TRIC2 (от англ. tRNA Import Component), соответственно. Анализ последовательностей этих белков показал 91 % их идентичности и присутствие, в дополнение к четырем трансмембранным доменам, уникального для растений домена SAM (Murcha et al., 2016). Отсутствие этих белков приводило к значительному замедлению роста, а также к модификациям ультраструктуры митохондрий и существенным изменениям транскриптома ядерного и митохондриального кодирования (Murcha et al., 2016). Анализ белковых компонентов комплексов импорта белков и дыхательной цепи показал, что отсутствие белков TRIC приводило к увеличению количества нескольких митохондриальных белков, включая Tom20-2 и VDAC и, в меньшей степени,

ТОМ40. Авторы предположили, что в мутанте *tric1tric2* происходит своего рода компенсация отсутствия белков TRIC1/TRIC2 и снижения эффективности импорта тРНК за счет увеличения количества TOM20 и VDAC в митохондриальной мембране (Murcha et al., 2016).

1.3.3. Импорт ДНК в митохондрии

1.3.3.1. Явление природной компетенции митохондрий к поглощению ДНК

Сотрудниками нашей лаборатории с 80-х годов проводились исследования транслокации, репликации и транскрипции ДНК с использованием растительных митохондрий *in organello* (Константинов и др., 1988; 1989). С применением системы импорта ДНК *in organello* было установлено, что бактериальные векторы серии рВR способны не только импортироваться в митохондрии, изолированные из проростков кукурузы, но и служить матрицей для синтеза ДНК. Эффективность транслокации и ДНК-синтеза при этом имела различия для разных форм плазмидной ДНК.

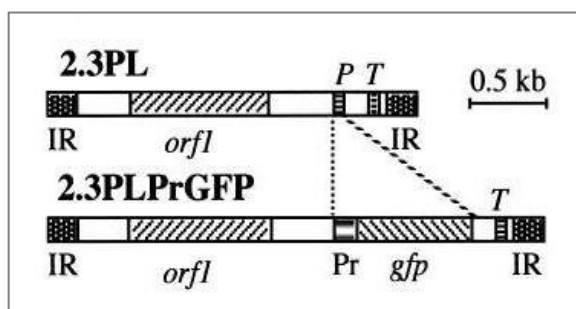


Рис. 7. Модельный субстрат импорта ДНК на основе митохондриальной плазмиды 2,3 т.п.н. *Z. mays* (Koulintchenko et al., 2003)

2,3 PL - линейная плазмида 2,3 т.п.н. из кукурузы (N-тип цитоплазмы) (Leon et al., 1989). Для исследования экспрессии импортируемой ДНК была создана конструкция 2,3PrGFP, в которой ген тРНК^{Pro} заменен маркерным геном *GFP* под контролем митохондриального промотора 18S рРНК картофеля и короткого 5'-фрагмента гена *ATP1* из табака (Pr).

В ходе дальнейших исследований, совместно с лабораторией Института Молекулярной Биологии Растений (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, IBMP CNRS) во Франции (Страсбург), были проведены более детальные исследования механизма переноса ДНК в изолированные растительные митохондрии. Было установлено, что митохондрии, выделенные не только из разных видов растений (кукуруза, цветная капуста, табак, картофель) (Koulintchenko et al., 2003; Ibrahim et al., 2011), но и из млекопитающих (печень крысы, культура клеток человека)

(Koulintchenko et al., 2006; Jackson et al., 2014) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009) способны осуществлять импорт ДНК путем активного транспорта.

Ранее (Koulintchenko et al., 2003; Mileschina et al., 2011) эксперименты по изучению явления митохондриального импорта ДНК проводили по следующей схеме: изолированные митохондрии инкубировали с радиоактивно меченой ДНК (либо с «холодной», немеченой ДНК), после чего митохондрии обрабатывали ДНКазой, проводили серию отмывок, и затем из митохондрий экстрагировали нуклеиновые кислоты и анализировали с помощью радиоавтографии, либо амплификацией в ПЦР (рис. 8). С применением радиоактивных ДНК-субстратов импортированные полноразмерные молекулы можно визуализировать по сигналу засветки на рентгеновской пленке.

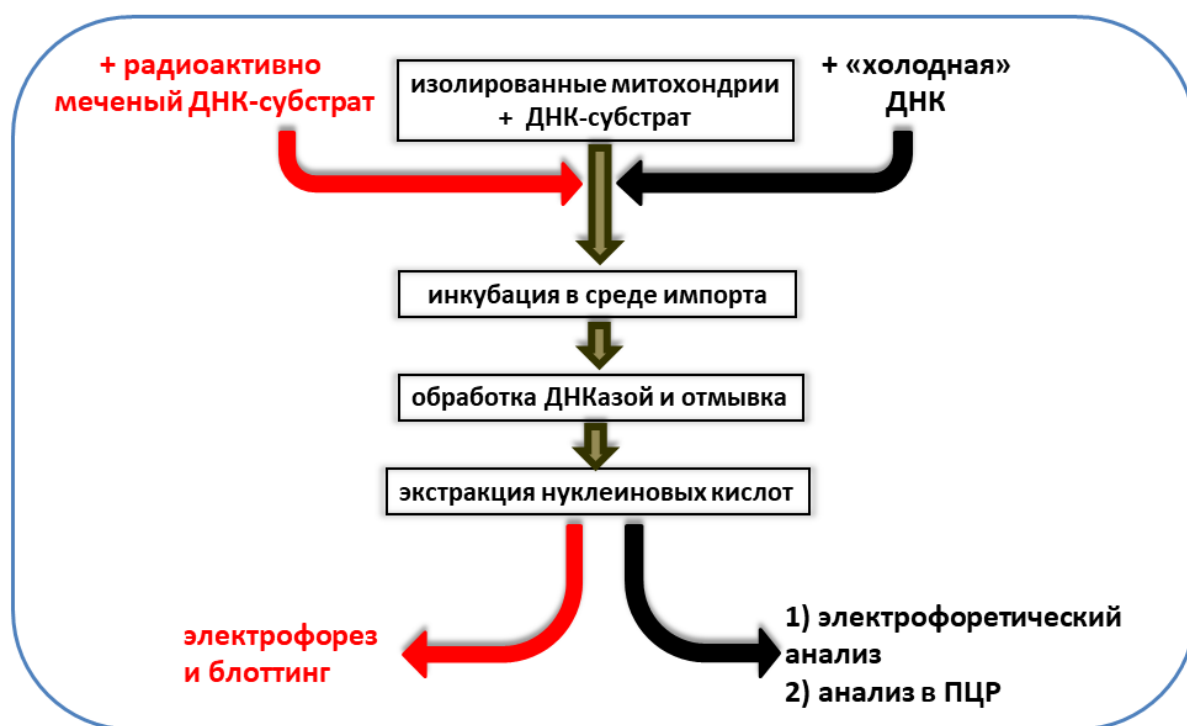


Рис. 8. Использованная ранее схема экспериментов по импорту ДНК в митохондрии растений

Были подобраны оптимальные условия импорта ДНК с использованием изолированных митохондрий картофеля: инкубация в «минимальной среде», содержащей осмотический (0,4 М сахараза) и буферный (40 мМ фосфат калия, pH 7.0) компоненты в течение 30 мин при 25°C (Koulintchenko et al., 2003).

Таблица 3

Условия импорта ДНК в митохондрии, изолированные из различных организмов

	растения	млекопитающие	дрожжи
Компонент для поддержания осмотичности	0.4 М сахара	220 мМ маннитол 70 мМ сахара	0.6 М маннитол
Буферный компонент	40 мМ фосфат калия	20 мМ трис-HCl	40 мМ трис-HCl
Субстрат дыхания	-	10 мМ глутамат 1 мМ малат	10 мМ глутамат 1 мМ малат
рН	7.0	7.4	7.25
Количество митохондриального белка в пробе (мкг)	300	400	100
Температура (°C)	25	30	30
Время инкубации (минуты)	30	80	40

В дальнейших исследованиях импорта ДНК в митохондрии других таксономических групп (дрожжи, млекопитающие) условия реакции импорта были оптимизированы для каждого источника изолированных митохондрий: состав буфера импорта содержал дополнительные компоненты (табл. 3), но несмотря на это, схема инкубации митохондрий с ДНК и последующих обработок оставалась, в целом, неизменной (Koulintchenko et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2009).

1.3.3.2. Участие импортированной ДНК в митохондриальных генетических процессах

Немаловажно отметить, что ДНК, импортированная в изолированные митохондрии различного происхождения, функционально активна. Было показано, что импортированная ДНК способна транскрибироваться и встраиваться в митохондриальный геном. Чтобы провести анализ транскрипции импортированной ДНК, были разработаны специальные генетические конструкции на основе плазмидного вектора pCK-GFP3 (Menand et al., 1998). Генетические конструкции, названные pCK/GFP/PRmt и pCK/GFP/Atmt, служили матрицей для амплификации фрагмента, содержащего последовательности плазмиды 2,3 т.п.н., промоторного участка картофельного гена 18S pPHK (pCK/GFP/PRmt) или промоторной области гена *atp1* арабидопсиса (pCK/GFP/Atmt), и гена GFP. Этот фрагмент был в дальнейшем использован в качестве немеченого ДНК-субстрата для импорта и транскрипции в изолированных митохондриях. Для анализа экспрессии

импортированной в митохондрии ДНК использовали 500 нг немеченой ДНК, амплифицированной в ПЦР с соответствующей генетической конструкции. По истечении процедуры импорта изолированные митохондрии инкубировали в среде транскрипции, после чего экстрагировали мтРНК и обрабатывали ДНКазой I. После экстракции мтРНК использовали в качестве матрицы в реакции ОТ-ПЦР (Koulintchenko et al., 2003).

Благодаря частым рекомбинационным событиям, у большинства видов растений мтДНК является динамичной структурой. В работе Milesina et al., 2011 с целью изучения гомологичной рекомбинации с митохондриальным геномом были использованы специально разработанные генетические конструкции (DR-Zm/gfp и nad2-St/gfp, рис. 9), включающие неполный репортерный ген GFP (зеленый флуоресцентный белок), фланкированный последовательностями мтДНК кукурузы (DR-Zm/gfp) или картофеля (nad2-St/gfp). По окончании процедуры импорта радиоактивно меченой молекулы ДНК, полученной с использованием одной из конструкций, и последующей ДНКазной обработки проводили инкубацию изолированных митохондрий в буфере синтеза ДНК, состав которого был различен в зависимости от растительного вида, из которого были выделены митохондрии (Milesina et al., 2011). С применением нескольких методов (электрофоретический анализ, Саузерн-блот гибридизация, рестрикционный и ПЦР-анализ), было показано, что такие экзогенные фрагменты ДНК, импортированные в митохондрии растений, могут интегрироваться в митохондриальный геном посредством гомологичной рекомбинации. Анализ 5' и 3' точек соединения показал точную интеграцию репортерного гена в состав мтДНК, без дублирования или удаления последовательности (Milesina et al., 2011).

Модельная система изолированных митохондрий растений и человека, кроме того, использовалась для исследований механизмов репарации импортируемой ДНК в матриксе митохондрий (Boesch et al., 2009; 2010). Анализ импорта в изолированные митохондрии урацил-содержащих фрагментов ДНК различного размера позволил выявить репарацию импортируемой ДНК, включавшую этапы вырезания урацила, вставки тимина и последующего лигирования.

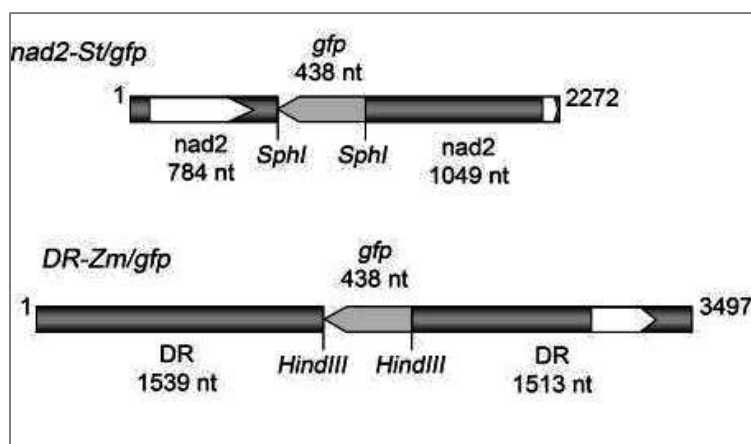


Рис. 9. Схема конструкций ДНК для изучения интеграции чужеродной ДНК в мт-геном растений (Mileshina et al., 2011)

Конструкции *nad2-St/gfp* и *DR-Zm/gfp* содержали маркерную последовательность (фрагмент гена *GFP*), фланкированную с двух сторон последовательностями из митохондриального генома растений, ген *NAD2* картофеля и *DR* - прямой повтор кукурузы.

1.3.3.3. Специфичность импорта ДНК в отношении длины и структуры переносимых молекул

В ранних экспериментах по изучению феномена импорта ДНК, которые проводились с использованием изолированных митохондрий картофеля и радиоактивно-меченых ДНК-субстратов, было установлено, что в растительные митохондрии наиболее эффективно импортируются линейные двухцепочечные молекулы ДНК небольшого размера, а сам процесс не зависит от нуклеотидной последовательности этих молекул (Koulintchenko et al., 2003). При исследовании особенностей импорта в митохондрии млекопитающих оказалось, что эти митохондрии способны импортировать также и одноцепочечные молекулы ДНК (Koulintchenko et al., 2006).

В дальнейших исследованиях (Ibrahim et al., 2011) с использованием ряда фрагментов ДНК разной длины (от 1 до 12,4 т.п.н.) было продемонстрировано, что эффективность импорта молекул ДНК линейной структуры зависит от их длины. В этой же работе (Ibrahim et al., 2011) для проведения экспериментов использовали два субстрата сходной длины - митохондриальную плазмиду 11,6 т.п.н. из турнепса (*Brassica napus*) (рис. 10) и плазмидный вектор *pBINPLUS* размером 12,4 т.п.н. В результате было показано, что в изолированные митохондрии репы импортируется митохондриальная плазида 11,6 т.п.н., но не вектор *pBINPLUS*. В ходе дальнейших экспериментов удалось установить, что некоторые структурные особенности митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н., а именно, наличие в ее

составе концевых инвертированных повторов (КИП), обеспечивают более эффективный импорт в растительные митохондрии.

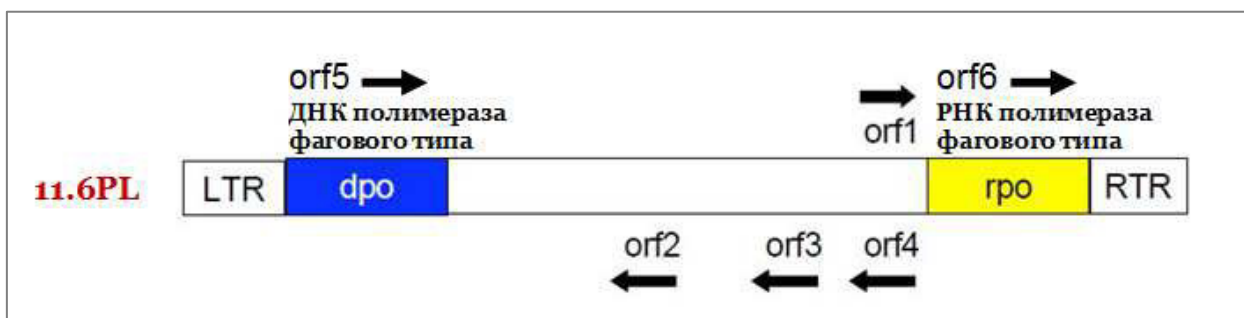


Рис. 10. Линейная плаزمида (11,6 т.п.н.) из митохондрий рапса и репы (*Brassica napus/rapa*) (Handa, 2008)

LTR и RTR- инвертированные повторы, размером 327 п.н., *dpo* - ДНК-полимераза фагового типа, *rpo* - РНК-полимераза фагового типа, orf1-4 - открытые рамки считывания.

Таким образом, авторами было сделано заключение, что с увеличением длины ДНК-субстрата импорт становится более специфичным процессом при наличии в молекуле определенных структурных особенностей (КИП), и что, по всей видимости, могут существовать и другие мотивы в последовательности молекулы ДНК, которые будут способствовать большей эффективности переноса ДНК в митохондрии растений (Ibrahim et al., 2011). Однако, данный эффект не был достигнут в экспериментах с использованием митохондрий человека (клеточной линии НерG2): эффективность импорта ДНК-субстратов, содержащих или не содержащих на своих концах КИП, была приблизительно на одном уровне. Стоит отметить, что эффект стимуляции процесса импорта ДНК, опосредуемый наличием в импортируемой молекуле КИП, в растительные митохондрии был отмечен только для ДНК-субстратов размером более 5 т.п.н. (Ibrahim et al., 2011).

Как было показано в ряде исследований, транслокация неуклеиновых кислот, ДНК и тРНК, в митохондрии растений на уровне внешней мембраны осуществляется с участием митохондриального порина, и, с учетом этого, пути импорта нуклеиновых кислот, очевидно, могут пересекаться. В работе Weber-Lotfi et al. (2015) было продемонстрировано, что присутствие в среде инкубации транспортной РНК оказывает влияние на активность импорта ДНК, что было особенно выражено для молекул ДНК малой длины (0,27 т.п.н.) по сравнению с ДНК среднего размера (2,7 т.п.н.). В данных исследованиях, для того, чтобы выявить предполагаемые конкурентные взаимоотношения, была проведена оценка

эффективности митохондриального импорта ДНК в растительные митохондрии в присутствии или отсутствии молекул тРНК в среде инкубации с митохондриями. При проведении этих экспериментов была использована тРНК^{Ala}, в обычных условиях импортирующаяся в митохондрии, и тРНК^{Met}, которая в норме не импортируется в митохондрии. При использовании в качестве субстрата для импорта фрагмента размером 0,27 т.п.н. небольшие количества любой из тРНК, взятой в эксперимент в 0,5-2 молярном избытке, незначительно активировали процесс импорта ДНК этой длины, в то время как 10-кратный избыток тРНК приводил к снижению эффективности импорта. Присутствие в среде импорта молекул тРНК оказывало сложное влияние на импорт субстрата большего размера (2,7 т.п.н.): при этом при 10-молярном избытке транскрипта происходила стимуляция процесса в 1,5 раза. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что механизм импорта фрагментов ДНК малой длины в растительные митохондрии, по-видимому, имеет определенные отличия в сравнении с импортом более длинных ДНК-субстратов и, в отличие от последнего, может использовать пути импорта тРНК.

1.3.3.4. Изучение механизма импорта ДНК в митохондрии различных организмов

Ранее было показано, что импорт ДНК ингибируется в условиях предварительной обработки изолированных митохондрий протеиназой К или трипсином (Koulintchenko et al., 2003; 2006). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в процесс импорта ДНК вовлечены, помимо каналообразующих белков-переносчиков, определенные рецепторные белки митохондриальной мембраны. Также было продемонстрировано, что перенос ДНК на уровне внешней мембраны происходит с участием митохондриального порина (VDAC): рутений красный (RuR), являющийся агентом, модулирующим транспортную активность митохондриального порина, а также антитела к порину, ингибировали процесс транспорта ДНК в изолированные митохондрии (Koulintchenko et al., 2003). Кроме того, показано, что в транспорте ДНК на уровне внешней мембраны в митохондриях млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009) также участвует митохондриальный порин.

АНТ, или адениннуклеотидтранслоказа, белок внутренней митохондриальной мембраны, вероятно, принимает участие в процессе импорта ДНК. Показано, что происходило существенное подавление процесса импорта в присутствии классических ингибиторов АНТ – атрактилозида и карбоксиатрактилозида (Koulintchenko et al., 2003). Наряду с этим, действие карбоксиатрактилозида не оказывало подавляющего действия на импорт ДНК в митохондрии млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006).

В присутствии разобщителей окислительного фосфорилирования СССР (карбонилцианид-М-хлорфенилгидразон) и олигомицина происходило подавление импорта ДНК в растительные митохондрии (Koulintchenko et al., 2006). Кроме того, было показано, что добавление миллимолярных концентраций АТФ к изолированным митохондриям человека и дрожжей оказывало на импорт ДНК стимулирующее действие (Koulintchenko et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2009). Эти данные указывают на то, что импорт ДНК – активный процесс, который, очевидно, зависит от функционального состояния митохондрий.

Позже с использованием мутантов дрожжей и арабидопсиса были проведены дальнейшие исследования потенциальных участников процесса митохондриального импорта ДНК (Weber-Lotfi et al., 2015). Согласно данным протеомного анализа, для некоторых изоформ VDAC арабидопсиса характерно наличие ДНК-связывающей активности. По результатам этого анализа был выявлен и ряд других белков-кандидатов, потенциальных участников процесса импорта ДНК в митохондрии растений. Помимо митохондриального порина в этих экспериментах была выявлена β -субъединица F_1F_0 -АТФ-синтазы. Ее предшественник связан с внешней митохондриальной мембраной и, судя по всему, поэтому способен выполнять функцию белка-рецептора при транслокации ДНК в митохондрии (рис. 11). Кроме этого, была выявлена субъединица комплекса I (ген At2G27730), представляющая собой Cu-связывающий белок (CuBP), ассоциированный с внутренней митохондриальной мембраной. Для этого белка с помощью биоинформатических методов также было продемонстрировано наличие ДНК-связывающей активности.

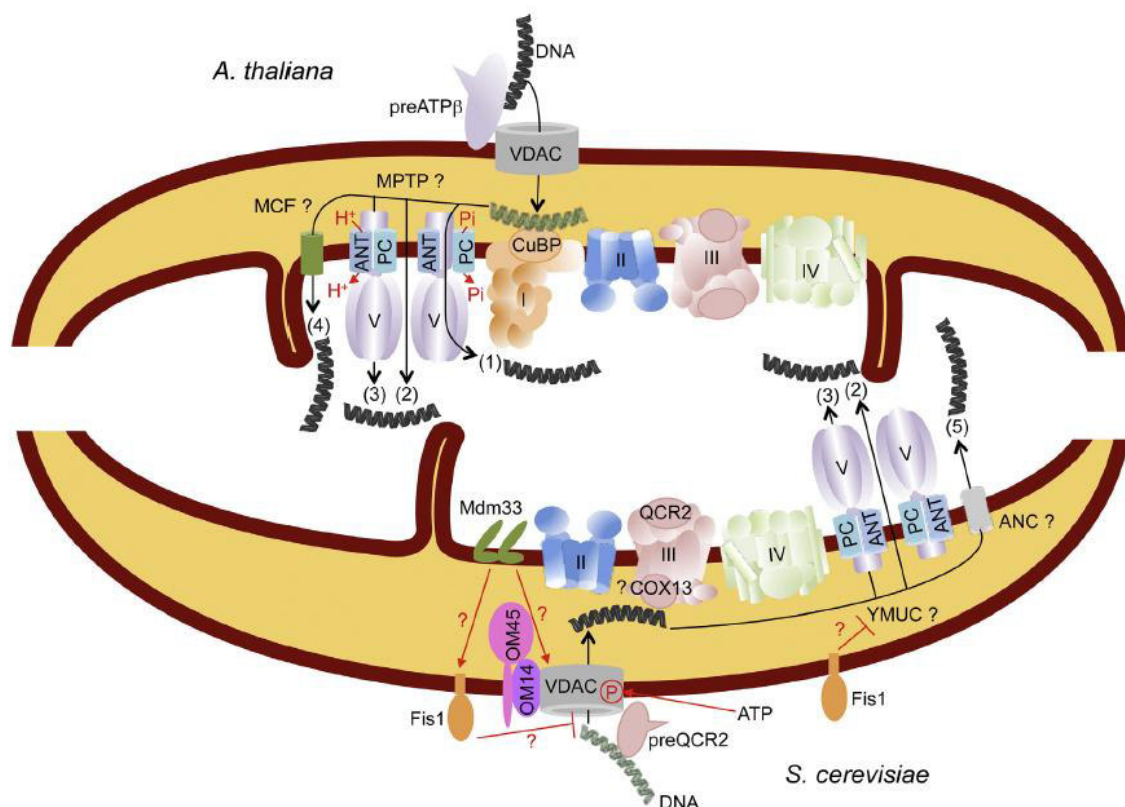


Рис. 11. Рабочая модель механизма импорта ДНК в изолированные митохондрии растений (*A. thaliana*, верхняя часть) и дрожжей (*S. cerevisiae*, нижняя часть) (Weber-Lotfi et al., 2015)

Согласно актуальной рабочей модели импорта ДНК (рис. 11), в растительных митохондриях ДНК (I) взаимодействует с предшественником β -субъединицы АТФ-синтазы (pre ATP β) и с мембранным белком VDAC, (II) пересекает наружную мембрану через канал, формируемый VDAC, (III) в межмембранном пространстве взаимодействует с белком CuBP, (IV) транслируется через внутреннюю мембрану посредством одного из возможных механизмов при участии некоторых компонентов суперкомплекса МПМ в результате:

- (1) конформационных изменений и структурных перестроек внутри АТФ-синтазного суперкомплекса;
- (2) формирования АТФ-синтазных димеров;
- (3) перестройки С-кольца АТФ-синтазы;
- (4) возможного участия в переносе ДНК через внутреннюю мембрану других белков из семейства митохондриальных транспортеров (MCF, mitochondrial carrier family), способных к формированию пор.

В митохондриях дрожжей ДНК-связывающая активность была выявлена для следующих мембранных белков: субъединицы комплекса III QCR2, субъединицы комплекса IV COX13, а также для белков внешней мембраны VDAC1 и Om14p (рис. 11).

На основании литературных данных можно предположить, что механизмы импорта ДНК в митохондрии, изолированные из тканей различных таксономических групп, по всей видимости, имеют определенные различия. Вероятно, митохондриальный импорт ДНК может быть опосредован участием нескольких динамично формирующихся транспортных путей митохондриальной мембраны. Различная степень доступности этих пороформирующих каналов для транспорта молекул нуклеиновых кислот может быть обусловлена как функциональным состоянием митохондрий, так и видоспецифичными особенностями транспортной системы митохондриальных мембран изучаемых организмов (Клименко, 2017).

1.4. Роль транспортного белка VDAC в растительных митохондриях

Анионный канал, зависимый от напряжения (VDAC, от англ. “voltage dependent anion channel”), принадлежащий к большому семейству пориновых белков, широко распространен в клетках эукариот. Известно, что в мембранной системе клетки VDAC может иметь двойную локализацию (Zhang et al., 2015). Посредством VDAC через внешнюю мембрану митохондрий осуществляется транспорт многих метаболитов или небольших катионов размером до 6 кДа (Tan and Colombini, 2007). Структура белка и свойства канала VDAC высоко консервативны, хотя в некоторых последовательностях VDAC были выявлены специфические молекулярные особенности (Young et al., 2007).

Биологические функции белков VDAC, особенно хорошо изученные в митохондриях человека, подчеркивают первостепенную роль VDAC в обмене метаболитов, таких как АТФ или НАДФН (Blachly-Dyson and Forte, 2001) через внешнюю митохондриальную мембрану, свидетельствуя о его роли в регуляции дыхания (Colombini, 2004; Rostovtseva et al., 2008). Исследования по реконструкции функций VDAC грибов *in vitro* продемонстрировали, что этот транспортный белок имеет два основных состояния проводимости: открытое состояние, которое позволяет диффундировать крупным метаболитам, включая нуклеотиды, и закрытое состояние, которое регулирует поток АТФ через мембрану (Rostovtseva and Colombini, 1996).

Обнаружено, что цитоскелетные белки тубулин и актин человека и дрожжей взаимодействуют с VDAC (Roman et al., 2006) и участвуют в регулировании проницаемости внешней мембраны митохондрий к АДФ (Rappaport et al., 1998; Saks et al., 1995). Показано, что тубулин может вызывать обратимую блокировку VDAC и уменьшать проницаемость АТФ / АДФ через митохондриальную наружную мембрану, а добавление тубулина в реакционную систему может снижать интенсивность дыхания митохондрий (Rostovtseva et al., 2008).

Многочисленные данные позволяют предположить участие белков VDAC в инициации процесса апоптоза. Имеются данные о том, что VDAC может быть частью поры сдвига проницаемости (РТР), способствующей высвобождению цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, что приводит к последующей гибели клеток (Shore, 2009; Shoshan-Barmatz et al., 2010). Функции VDAC в плазматической мембране все еще неясны и противоречивы (Bahamonde and Valverde, 2003; Sabirov et al., 2006). Ряд электрофизиологических и биохимических исследований свидетельствуют о роли VDAC в высвобождении клеточного АТФ и регуляции клеточного объема (Okada et al., 2004), в ассоциации с NADH: феррицианид редуктазой (Baker et al., 2004) и транспорте электронов, в формировании рецептора ГАМК (Darbandi-Tonkabon et al., 2003).

Биологическая роль VDAC растений так же до сих пор остается недостаточно ясной, несмотря на широкий спектр исследований молекулярных характеристик изоформ VDAC у разных видов, включая пшеницу (Elkeles et al., 1995), рис (Bitar et al., 2003) и *Lotus japonicus* (Wandrey et al., 2004). Только косвенные сообщения указывают на предполагаемую роль VDAC растений в реакции на патогены, в апоптозе и абиотическом стрессе (Jones and Dangl, 2006; Kusano et al., 2009), однако, этому до сих пор нет прямых генетических доказательств (Robert et al., 2012).

Как уже упоминалось выше, митохондриальный порин является главным участником канала для транслокации как тРНК (п.1.3.2) (Delage et al., 2003; Salinas et al., 2006), так и ДНК (Koulintchenko et al., 2003). Методом конкурентного ингибирования показано, что пути импорта тРНК и ДНК небольшого размера (до 300 п.н.) могут пересекаться (Weber-Lotfi et al., 2015). Очевидно, что именно VDAC является для этих двух процессов общим компонентом, участвующим в переносе через внешнюю митохондриальную мембрану.

Существуют предположения о том, что различные изоформы порина могут выполнять в растительной клетке различные функции. В геноме арабидопсиса присутствуют 4 гена, кодирующих изоформы порина (VDAC1, VDAC2, VDAC3, VDAC4). Интересно, что хотя пространственно-временная экспрессия и клеточная локализация VDAC2 и VDAC4 весьма сходные, эти белки, по-видимому, имеют разные функции. VDAC2 и VDAC4, экспрессирующиеся во всех органах растительного организма, важны для различных физиологических функций, таких как развитие листьев, устойчивое состояние митохондриального мембранного потенциала и развитие пыльца (Tateda et al., 2011). Изоформа порина VDAC4 локализуется исключительно в митохондриальной мембране (Robert et al., 2012). Изоформы арабидопсиса VDAC1 и VDAC3 отличаются от VDAC2 и VDAC4 тем, что имеют на своих С-концах особую структуру - MPS, характерную для эукариотических митохондриальных поринов (MPS, от англ. mitochondrial porin signature). Полагают, что именно эта структура определяет митохондриальную локализацию поринов (Tateda et al., 2011). Хотя функции VDAC1 и VDAC3 связывают в большей степени с митохондриями, их, наряду с VDAC2 обнаруживают и в плазмалемме (Zhang et al., 2015). Исследования на митохондриях млекопитающих показали, что альтернативный сплайсинг VDAC1 приводит к синтезу двух различных форм белка, одна из которых локализована во внешней митохондриальной мембране, а другая в плазматической мембране (Buettner et al., 2000).

Показано, что VDAC1, VDAC2 и VDAC4 арабидопсиса важны для поддержания целостности митохондрии (Robert et al., 2012). Известно, что VDAC1 существенно более важен для роста растений в сравнении с VDAC3 (Tateda et al., 2011). Более того, VDAC1 играет роль в устойчивости растений к болезням посредством регуляции образования перекиси водорода. Потеря функций VDAC1 приводит к подавлению активации клеточного апоптоза в ответ на бактериальную патогенную инфекцию (Tateda et al., 2011). Полагают, что некоторые из поринов могут играть ключевую роль в защитной реакции клетки при вирулентной бактериальной инфекции.

Вышеизложенное свидетельствует, скорее, не об избыточности изоформ порина, а об определенной специализации в выполняемых ими функциях. В работе Tateda et al. (2011) было показано, что у мутантов по всем изоформам VDAC значения митохондриального мембранного потенциала ниже, чем у растений дикого типа, при

этом потеря функции VDAC2 или VDAC4 в мутантных линиях приводит к большему снижению мембранного потенциала, чем потеря функции VDAC1 или VDAC3. При инактивации VDAC2 и VDAC4 серьезно замедляется рост организма, более того, мутантные линии *vdac2* и *vdac4* характеризуются почти полной стерильностью. Все это говорит о том, что именно VDAC2 и VDAC4 наиболее важны для нормального роста и развития растительного организма.

Таким образом, изоформы митохондриального порина представляют большой интерес в отношении исследуемого нами явления природной компетенции митохондрий к поглощению ДНК. Как и в случае с механизмом импорта тРНК, где порин играет не роль рецептора, а представляет собой порообразующий канал, на который от комплекса TOM передается молекула тРНК, в механизм импорта ДНК также могут быть вовлечены белки других семейств трансмембранных переносчиков, образуя, в кооперации с изоформами VDAC, свои собственные, в ряде случаев специфичные, каналы для импорта молекул ДНК. Расшифровка механизмов импорта ДНК и идентификация факторов, вовлеченных в этот процесс, помимо фундаментальной значимости, позволила бы решить ряд вопросов в области прикладных задач генетической инженерии, в частности, разработки способов трансформации и манипулирования митохондриальным геномом.

1.5. Выводы из обзора литературы

Таким образом, митохондриальный геном растений, по сравнению с геномами других эукариотических организмов, обладает огромным размером, превышающим 1500 т.п.н. (Alverson et al., 2011; Kubo and Newton, 2008), при этом содержит лишь 60 генов, кодирующих 3 рРНК, 15–20 тРНК и 30–35 белков с известными функциями. Для более чем половины последовательностей митохондриального генома растений функции не известны, отсутствует какая-либо гомология с имеющимися в базах данных последовательностями (Unsold et al., 1997). Геном митохондрий растений существует в основном как совокупность линейных и кольцевых молекул ДНК различного размера (Gualberto et al., 2014; Morley and Nielsen, 2017). В растительной клетке митохондрии постоянно сливаются между собой и делятся, что оказывает большое влияние на организацию и динамику митохондриального генома (Logan, 2006). Фрагментированный геном растений, существующий в виде ряда субгеномных, иногда субстехиометрических

молекул ДНК, связывают с высокой частотой меж- и внутримолекулярной гомологичной рекомбинации (Lonsdale et al., 1988; Janska et al., 1998; Abdelnoor et al., 2003).

Для митохондриального генома характерна гетерогенность, которая может иметь корреляцию с обнаруженными фенотипическими различиями митохондриальных субпопуляций внутри растительных клеток (Dai et al., 1998). Предполагается, что митохондрии могут выполнять различные функции: часть из них принимает участие в биоэнергетических процессах, часть – специализируется на хранении генетической информации (Logan, 2006). Гетерогенность клеточной популяции митохондрий может быть обусловлена стадией их биогенеза (зрелые и молодые митохондрии) (Lund et al., 1958; Solomos et al., 1972; Logan et al., 2001; Dai et al., 1998; Howell et al., 2006). Митохондриальные субпопуляции у растений различаются также по коэффициенту седиментации в градиенте плотности, величине дыхательного контроля, активности дыхательных комплексов, белковому составу, трансмембранному потенциалу митохондрий, субклеточной организации митохондрий (см. п. 1.2).

Помимо основной высокомолекулярной мтДНК в митохондриях многих видов растений могут присутствовать автономно реплицирующиеся кольцевые или линейные плазмидоподобные молекулы ДНК или РНК (Brown and Zhang, 1995). Предполагают, что митохондриальные экстрахромосомные плазмиды имеют чужеродное происхождение, о чем свидетельствует, в частности, структура линейных плазмид, имеющая сходство с последовательностями грибов, вирусов, фагов и транспозонов (Sakaguchi, 1990).

Известно, что для митохондриального генома растений характерна удивительно высокая, в сравнении с другими геномами, частота событий горизонтального и внутриклеточного переносов (Sanchez-Puerta, 2014). Более 5 % нуклеотидных последовательностей митохондриального генома имеют хлоропластное, ядерное или вирусное происхождение (Unsold et al., 1997; Kubo et al., 2000). Высока вероятность того, что на структуру и динамику митохондриального генома растений значительное влияние может оказывать наличие у митохондрий природной компетентности – способности поглощать ДНК из окружающей среды. Ранее митохондриальный импорт ДНК был показан у

растений (Koulintchenko et al., 2003), млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006; Jackson et al., 2014) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009). Экзогенная ДНК, импортированная в изолированные митохондрии, функционально активна, может транскрибироваться (Koulintchenko et al., 2003; 2006) и подвергаться репарации (Boesch et al., 2010). Соответствующие конструкции могут рекомбинировать с резидентной мтДНК (Mileshina et al., 2011).

Импорт ДНК в митохондрии может являться основой для отцовского наследования некоторых митохондриальных плазмид в растениях (Ibrahim et al., 2011), вносить вклад в горизонтальный перенос генов, в динамику структурной организации генома органеллы, а также в процесс митоптоза, индуцированного ДНК патогена (Koulintchenko et al., 2003; Zorov, 1996). Не исключено, что это явление может быть следствием механизма, оставшегося от бактериального предка митохондрий: как известно, способность бактериальных клеток к захвату чужеродного генетического материала играет огромную роль в их эволюции (Doolittle et al., 2003; Nakamura et al., 2004).

Накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что, как и в случае импорта РНК, основным каналом импорта ДНК является VDAC (Koulintchenko et al., 2003; Delage, 2003; Weber-Lotfi et al., 2009). В геноме арабидопсиса присутствуют 4 гена, кодирующих изоформы порина, которые различаются локализацией в мембране и своей ролью в клетке, свидетельствуя, скорее, не об избыточности изоформ порина, а об определенной специализации в выполняемых ими функциях (Tateda et al., 2011). Исходя из этого, логично предположить, что изоформы VDAC могут иметь определенную специфичность в отношении транспорта макромолекул в митохондрии, в том числе в импорте разноразмерных молекул ДНК.

Проведенный анализ источников литературы позволяет говорить о том, что до настоящего момента феномен импорта ДНК в митохондрии остается недостаточно изученным. В частности, ранее не проводились исследования (1) кинетических характеристик процесса импорта ДНК, (2) влияния на импорт ДНК отсутствия в клетке отдельных изоформ VDAC, а также других кандидатных белков-переносчиков митохондриальной мембраны, (3) особенностей импорта ДНК в митохондрии, принадлежащие разным митохондриальным субпопуляциям.

Учитывая это, **целью** работы явилось исследование роли факторов, белковой и небелковой природы, оказывающих влияние на организацию транспортной системы растительных митохондрий, в импорте ДНК разной длины.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Растительный материал и условия выращивания

2.1.1. Линии арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*

В работе были использованы растения арабидопсиса дикого типа *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia (Col-0) и линии инсерционных мутантов SALK_034653 (*vdac1*), SAIL_726_H02 (*vdac2*), SALK_127899 (*vdac3*), SALK_023908 (*vdac4*), SALK_135023 (*tspo*), SALK_007876 (*mic60*), SALK_016767 (*om47*), SALK_066958 (*drp3a-3*), SALK_046271 (*drp3b-1*), семена которых были получены из коллекции Arabidopsis Biological Resource Center (The Ohio State University, USA). В использованных мутантных линиях в результате встраивания Т-ДНК произошла инактивация: 1) одной из изоформ митохондриального мембранного транспортного белка VDAC1, VDAC2, VDAC3 или VDAC4, кодируемых генами At3g01280, At5g67500, At5g15090 и At5g57490 соответственно; 2) белка внешней мембраны растительных митохондрий TSPO, кодируемого геном At2g47770; 3) субъединицы MIC60 локализующейся во внутренней митохондриальной мембране и кодируемой геном At4g39690; 4) белка внешней митохондриальной мембраны OM47, кодируемого геном At3g27930; 5) динамин-подобных белков DRP3A или DRP3B, участвующих в процессах деления митохондрий, кодируемых генами At4g33650 и At2g14120, соответственно.

Гомозиготные растения изучаемых линий были получены с помощью ПЦР-генотипирования. Растения арабидопсиса, после стратификации в течение трех суток при +4 °С, выращивали при 22 °С в ростовой камере KBW-720 («Binder», Германия), в горшках, наполненных смесью почвогрунта для комнатных растений / торфа / вермикулита (2 : 1 : 3) при освещенности 150 мкмоль*м-2*с-1 и длине светового дня 16 ч.

2.1.2. Другие растительные объекты

Этиолированные проростки кукурузы *Zea mays* (сорт «Кубанский 250 МВ») выращивали при 29 °С в течение 4 суток в темноте. В работе были использованы также клубни картофеля *Solanum tuberosum* (сорт «Адретта») и корнеплоды репы *Brassica rapa* (сорт «Внучка»). Семена кукурузы приобретены в НПО «КОС-МАИС», Краснодар; картофель выращен на территории СИФИБР СО РАН,

Иркутск; семена репы приобретены в торговой сети.

2.2. Получение субстратов импорта ДНК

Подготовку субстратов импорта осуществляли амплификацией в стандартной полимеразной цепной реакции. Для синтеза ДНК размером от 269 п.н. до 2,7 т.п.н. использовали Taq-полимеразу («Thermo Scientific», США). Режим амплификации для фрагментов размером 109 п.н., 265 п.н. и 852 п.н.: 94 °C – 3 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 58 °C – 45 с, 72 °C – 45 с (30 циклов); 72 °C – 1 мин. Для фрагмента размером 2,7 т.п.н. использовали следующий режим амплификации: 94 °C – 3 мин (1 цикл); 94 °C – 30 с, 60 °C – 45 с, 72 °C – 180 с (30 циклов); 72 °C – 5 мин. Для амплификации ДНК размером 9 т.п.н. использовали смесь для проведения ПЦР «Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix» («Thermo Scientific», США). Амплификацию ДНК проводили в следующем режиме: предварительная денатурация в течение 30 секунд при 98 °C (1 цикл), денатурация при 98 °C – 10 с, отжиг праймеров и элонгация при 72 °C – 5 минут (30 циклов), финальная элонгация: 72 °C – 10 минут. Для получения флуоресцентного ДНК-субстрата использовали олигонуклеотиды, содержащие на 5'-конце флуоресцирующую группу Су3 («Евроген», Россия). Реакцию амплификации проводили в соответствии с рекомендациями изготовителя фермента, в объеме 50 мкл, с добавлением 10 pMol каждого праймера и 10 нг плазмидной ДНК. Фрагменты размером 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. амплифицировали с использованием в качестве матрицы генетической конструкции pСК/GFP/PRmt, содержащей последовательность гена *GFP* (Koulinchenko et al., 2003). Генетическая конструкция pIR-11.6/Br-9 (получена сотрудниками нашей лаборатории) служила матрицей для амплификации ДНК большого размера (9000 п.н.) (табл.4). ДНК очищали на колонках GeneJETTM PCR Purification Kit («Thermo Scientific», США), согласно инструкции производителя. Качество ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически с использованием Gel Doc XR System («Bio-Rad», США), количество ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 («IMPLEN», Германия).

Олигонуклеотиды, использованные для получения субстратов импорта ДНК, приведены в таблице 4.

Таблица 4

Олигонуклеотиды для синтеза субстратов импорта ДНК

Пары праймеров	Последовательность (5'→3')	Размер фрагмента, п.н. (ДНК-матрица)
gfpLc gfp(2) Rev	ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACT CGGGGCATGGCACTCTTGA	269 (pCK/GFP/PRmt)
gfp(2) For-Cy3 2,3(2989) Rev-Cy3	CTGTTCCCTTGGCCACACT ACGCTCTGTAGGATTTGAACC	852 (pCK/GFP/PRmt)
2,3(257) For 2,3(2989) Rev	CCAACCACCACATACCGAAA ACGCTCTGTAGGATTTGAACC	2732 (pCK/GFP/PRmt)
Bn-2380dr Bn-11414rv	GGTTAGATTGTTTGTGGGTTTGG TAAGTGGCTCACGAGGAATGG	9000 (pIR-11.6/Br-9)

2.3. Методы, связанные с выделением и характеристикой митохондрий растений

2.3.1. Выделение митохондрий из растительных объектов

2.3.1.1. Выделение митохондрий из арабидопсиса

Растительные митохондрии выделяли из арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), согласно модифицированному протоколу (Sweetlove et al., 2007). Листья арабидопсиса растирали в ступке, полученную суспензию смешивали в соотношении 1:12 со средой выделения (CB) (25 мМ пироглутамата натрия, 10 мМ KH_2PO_4 , 300 мМ сахарозы, 2 мМ ЭДТА, 0,5 % (в/о) бычьего сывороточного альбумина (БСА), 1 % (в/о) поливинилпирролидона-40, 5 мМ цистеина, 20 мМ аскорбиновой кислоты, pH 7.6). После фильтрации через 2 слоя нейлоновой сетки Miracloth («Calbiochem», США) грубый митохондриальный экстракт последовательно подвергали двум циклам центрифугирования, при низкой скорости вращения (2500 x g) и при высокой (17400 x g), с промежуточным ресуспендированием в среде промывания (СП) (1 мМ ЭГТА, 50 мМ MOPS, 300 мМ сахарозы, 0,2 % (в/о) БСА, pH 7.2). Для дальнейшей очистки, вторично ресуспендированный осадок митохондрий наслаивали на ступенчатый градиент перколлы (50 % – 25 % – 18 %) и центрифугировали в течение 40 минут при 40000 x g. Митохондрии отбирали из нижней части формирующегося во время центрифугирования градиента и промывали дважды в среде промывания. Количество белка в суспензии митохондрий оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

2.3.1.2. Выделение митохондрий из картофеля и корнеплодов репы

Выделение митохондрий из клубней картофеля и корнеплодов репы осуществляли методом дифференциального центрифугирования с последующей

очисткой в градиенте плотности перколла (Neuburger et al., 1982). Очищенные клубни картофеля гомогенизировали с использованием соковыжимающего аппарата (Moullinex, Франция). Полученный картофельный сок смешивали с 3х-кратной средой выделения (900 мМ сахараза, 90 мМ пирогосфат натрия, 6 мМ ЭДТА, 0,9 % (в/о) БСА, 2,4 % (в/о) ПВП-25, 15 мМ глицин, 9 мМ цистеин, 6 мМ β-меркаптоэтанол, рН 8,0). После фильтрации через нейлоновую и марлевую ткань полученный растительный экстракт подвергали двум циклам центрифугирования, при низкой скорости вращения (1000 x g), далее при высокой (10500 x g), с промежуточным ресуспендированием митохондриального осадка с использованием гомогенизатора Поттера (стекло-тефлон) и среды промывания (300 мМ сахараза, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, 0,1 % (в/о) БСА, 5 мМ глицин, рН 7.35). Для дальнейшей очистки митохондриальной фракции использовали ступенчатый градиент плотности перколла (45 % – 21 % – 18,5 %), на который наносили суспензию митохондрий и центрифугировали при 28250 x g в течение 60 минут. Очищенную митохондриальную фракцию отбирали из нижней части градиента, на границе между 45 % и 21 % перколла, и затем дважды промывали СП. Количество белка в суспензии митохондрий оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

2.3.1.3. Выделение митохондрий из этиолированных проростков кукурузы

Выделение митохондрий из этиолированных проростков кукурузы проводили методом дифференциального центрифугирования (Newton and Walbot, 1985) с последующим разделением в линейном градиенте плотности сахаразы с целью отбора митохондриальных субфракций. Разрушение тканей этиолированных побегов проростков, выращенных при 29 °С в течение 4 суток, проводили путём продавливания с помощью пресса через небольшие отверстия (диаметр 1-1,2 мм) в поршне с предварительно добавленной средой выделения в стакан гомогенизатора (0,25 М сахараза, 18 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl , 10 мМ MgCl_2 , 0,3 % БСА (в/о), 10 мМ β-меркаптоэтанол, 5 мМ цистеин). Полученный сок кукурузы подвергали фильтрации через 2 слоя нейлоновой ткани и центрифугировали однократно при низкой скорости (2700 x g) и двукратно при высокой скорости (19600 x g) с промежуточным ресуспендированием митохондриального осадка в гомогенизаторе Поттера (стекло-тефлон) в среде промывания (0,25 М сахараза, 18

мМ KH_2PO_4 , 5 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl , 10 мМ MgCl_2 , 0,1 % БСА (в/о)). Разделение митохондриальных фракций проводили с помощью центрифугирования в линейном градиенте сахарозы (0,3 М $\rightarrow$ 1,2 М), содержащем 18 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl , 10 мМ MgCl_2 , 0,3 % БСА. Митохондриальную суспензию наносили на поверхность градиента и центрифугировали при 7000 x g в течение 20 мин. После разделения митохондрий отбирали 3-6 различных митохондриальных фракций в зависимости от условий эксперимента и затем дважды промывали СП. Количество белка в суспензии митохондрий оценивали по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

2.3.2. Получение митопластов

Для получения митопластов внешнюю мембрану митохондрий разрушали с помощью осмотического шока: осадок митохондрий ресуспендировали в 1 мл 5 мМ фосфата калия, pH 7,5, инкубировали на льду 5 мин, затем осаждали и промывали в буфере, содержащем 0,3 М сахарозу, 10 мМ калий-фосфатный буфер, 1 мМ ЭДТА, pH 7,2.

2.3.3. Оценка качества препарата изолированных митохондрий

2.3.3.1. Определение дыхательного контроля и интактности митохондрий

Анализ функциональной активности изолированных митохондрий (100-150 мкг белка/мл) и определение дыхательного контроля проводили полярографическим методом с использованием платинового кислородного электрода и ячейки Oxytherm system («Hansatech», Великобритания). Коэффициент дыхательного контроля митохондрий определяли, измеряя уровень потребления кислорода по отношению его потребления в «активном состоянии» в присутствии АДФ (100-200 μM) к его потреблению в «пассивном состоянии» без АДФ, используя в качестве субстрата дыхания сукцинат (10 мМ) и глутамат (5 мМ), в электродном буфере (Douce and Neuburger, 1985).

Интактность внешней мембраны митохондрий рассчитывали по разнице скорости аскорбат-зависимого стимулируемого цитохромом *c* KCN-чувствительного поглощения кислорода в отсутствие и в присутствии 0,04 % Тритона X-100 (Грабельных и др., 2014).

Состав электродного буфера: 0,3 М сахараза, 10 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ KCl , 5 мМ MgCl_2 , 0,1 % БСА.

2.3.3.2. Определение активности сукцинатдегидрогеназы

Измерение активности сукцинатдегидрогеназы проводили с использованием 0,5 мл митохондриальной суспензии, содержащей 300 мкг белка в 1 мл фосфатного буфера (рН 7,8), в состав которого входили 0,1 мл раствора янтарной кислоты (0,1 М, рН 7,8), ЭДТА (25 мМ, рН 7,8) и азид натрия (150 мМ). Реакция инициировалась добавлением к пробам 0,1 мл 25 мМ раствора феррицианида калия. После инкубации (15 мин, 30 °С) реакцию останавливали погружением проб в лед и добавлением к пробам по 2 мл 20% ТХУ. Активность фермента (А) вычисляли по формуле: $A = 1000 \cdot 3.25 \cdot (E_k - E_o) / m \cdot t$, где E_k – экстинкция контрольной пробы, E_o – экстинкция проб, t – время инкубации, m – концентрация митохондриального белка, 3,25 – коэффициент, учитывающий соответствие между количеством феррицианида и разностью оптических плотностей контрольной и опытной проб, на линейном участке калибровочной кривой (Singer et al., 1957).

2.3.3.3. Электрофорез митохондриальных белков в полиакриламидном геле

Электрофорез митохондриальных белков проводили в блоках полиакриламидного геля размером 100 x 80 x 1 мм в модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970). Разделяющий полиакриламидный гель (12,5 % раствора акриламид : бис-акриламид, 29:1) полимеризовали в 0,375 М трис–HCl буфере, рН 8,8, содержащем 0,1 % SDS. Для создания ровной верхней границы разделяющего геля на него наслаивали воду. После полимеризации разделяющего геля заливали концентрирующий гель (5 %), в который погружали гребенку для формирования лунок. Концентрирующий полиакриламидный гель (5 % раствора акриламид : бис-акриламид, 29:1) полимеризовали в 0,625 М трис–HCl буфере, рН 6,8, содержащем 0,1% SDS. В качестве верхнего и нижнего электродного буфера использовали трис–глицин, рН 8,3 (0,025 М трис и 0,192 М глицин), содержащий 0,1 % SDS.

Анализируемые белки ресуспендировали в буфере, содержащем 0,625 М трис–HCl, рН 6,8, 2,3 % SDS, 5 % 2–меркаптоэтанол, 10 % глицерин, 0,001 % бромфеноловый синий. В лунки геля наносили по 10-15 мкл образца, содержащего 50-100 мкг белка. Электрофорез проводили при 4 °С, при 80 В (первые 30 мин) и

далее при 160 В (90 мин). После окончания электрофореза гель окрашивали в водном растворе, содержащем 0,2 % Кумасси G-250, 25 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты в течение 60 мин. Для обесцвечивания фона гели переносили в раствор, содержащий 10 % уксусной кислоты и 12,5 % изопропанола.

2.3.3.4. Определение активности дыхательных комплексов методом BN-PAGE

Солюбилизацию митохондриальных мембран проводили в течение 30 мин, на льду, в буфере, содержащем Тритон X-100 (состав буфера: 5 мМ NaCl, 2 мМ аминокaproновой кислоты, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ имидазол-HCl, 5 мМ фенилметилсульфонилфторид), соотношение количества белка и детергента составляло 1:1. В супернатант, обогащенный митохондриальными комплексами, полученный после центрифугирования при 16000 g (30 мин), добавляли 5 % (в/о) раствор красителя Coomassie brilliant blue G-250 (CBV). Электрофорез митохондриальных белковых комплексов проводили согласно протоколу (Heinemeyer et al., 2007). В качестве разделяющего геля использовали линейный градиент, 5-13 % (в/о) акриламида, концентрирующий гель содержал 4 % акриламида. Состав катодного буфера в электрофоретической камере - 50 мМ трицин, 15 мМ бис-трис, 0,02 % Coomassie G-250, pH 7,0; анодного - 50 мМ бис-трис, pH 7,0. Проба, которую наносили на гель, содержала 40-50 мкг белка. Электрофоретическое разделение проводили при 4 °C, до вхождения комплексов в разделяющий гель при 60 В, затем несколько часов при 150-180 В. По окончании электрофореза гель помещали в раствор, содержащий 5 % CBV в 10 % уксусной кислоты; для определения активности белковых комплексов использовали растворы, содержащие (для комплекса I) - 0,1 М трис-HCl, pH 7,4, 0,225 мМ NADH, 157 мкг/мл тетразолия голубого (Sabar et al., 2005), для комплекса II - 50 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, 84 мМ сукцината, 0,2 мМ феназинметасульфат, 20 мг/мл тетразолия голубого, 4,5 мМ ЭДТА, 10 мМ KCN (Nijtmans et al., 2002) и для комплекса IV - pH 7,4, 0,1 % диаминобензидин, 1 мг/мл цитохром c, 7,5 % сахараза (Sabar et al., 2005). Время определения активности комплекса I составляло 10-30 мин, комплекса II – 30-60 мин (в темноте), комплекса IV – 120 минут (в темноте).

2.3.3.5. Электронная микроскопия

Качество очищенной фракции митохондрий исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе *Leo 906E* («Zeiss», Германия) согласно ранее описанному протоколу (Layton et al., 2004) на базе Лимнологического института СО РАН (Иркутск).

2.4. Импорт ДНК в митохондрии растений

2.4.1. Импорт ДНК в системе *in organello*

Импорт ДНК в митохондрии, изолированные из различных растительных объектов, проводили согласно протоколу (Koulintchenko et al., 2003) в буфере импорта, содержащем 0,4 М сахарозы, 40 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,0, при температуре 25 °С и постоянном покачивании (350 rpm) на термощейкере TS-100 («BioSan», Латвия) в течении 30 мин. Объем реакции составлял 100–200 мкл. После инкубации митохондрии промывали 1-кратно в 1 мл СП. Далее митохондрии инкубировали в буфере импорта (100 мкл) в присутствии ДНКазы I (500 мкг/мл) («Sigma», США) и 10 мМ MgCl₂ в течение 20 мин при 25 °С, после чего промывали дважды в 1 мл СП, содержащем 10 мМ ЭДТА и 10 мМ ЭГТА. После каждого этапа отмывок митохондрии осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 11000 g.

Дальнейшая обработка митохондриального осадка включала процедуры получения митопластов (см. п. 2.3.2) и экстракции митохондриальной ДНК (см. п. 2.5).

2.4.2. Методы, связанные с изучением импорта ДНК в системе *in vivo*

2.4.2.1. Получение протопластов из листьев арабидопсиса

Протопласты получали из листьев *A. thaliana* в возрасте 35 суток, согласно описанному ранее протоколу (Wu et al., 2009) с модификациями. Верхний слой эпидермиса удаляли с помощью липкой ленты. Куски липкой ленты с приклеившимся нижним эпидермисом и клетками мезофилла помещали на поверхность среды выделения протопластов (0,4 М маннитол, 10 мМ CaCl₂, 20 мМ KCl, 20 мМ MES, pH 5,7, 0,1 % БСА), содержащей 1 % целлюлазу и 0,25 % пектолиазу («MP Biomedicals», США) и инкубировали при легком покачивании при 23 °С на свету в течение 2 ч. К отобранной суспензии протопластов добавляли 15 мл среды промывания (СП), содержащей 154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl₂, 5 мМ

KCl, 5 mM глюкозу, 2 mM MES, pH 5,7 и центрифугировали в течение 3 мин при 100 g, используя Allegra 64R («Beckman Coulter», США), при 20 °C. Супернатант удаляли, осадок протопластов ресуспендировали в 15 мл среды СП и повторяли центрифугирование. Осадок ресуспендировали в среде, содержащей 0,4 М маннитол, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES, pH 5,7 из расчета 300 мкл на один образец.

2.4.2.2. Трансфекция протопластов ДНК-субстратом

К суспензии протопластов добавляли раствор ДНК-субстрата (5 мкг), после чего к пробам добавляли 300 мкл раствора, содержащего 20 % (в/о) PEG (MW 2000), 0,2 М маннитол, 100 mM CaCl₂, и инкубировали в течение 5 мин. Затем суспензию протопластов подвергали трем циклам центрифугирования в 1,5 мл СП (пункт 2.4.2.1.) в течение 1 мин при 100 g и 20 °C. Протопласты ресуспендировали в СП и инкубировали в 48-луночной планшете (200 мкл на лунку) при 22 °C и слабом освещении в течение 20 ч.

2.4.2.3. Выделение митохондрий из протопластов арабидопсиса

Целостность протопластов оценивали методом световой микроскопии. Суспензию протопластов центрифугировали в течение 1 мин при 100 g и 20 °C. К осадку добавляли 400 мкл среды выделения митохондрий (СВ) (0,4 М сахароза, 50 mM трис-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,2 % БСА, 2 mM DTT). Непосредственно перед использованием в СВ добавляли ДНКазу I из расчета 1 ед. акт. фермента на 50 мкл СВ. Протопласты разрушали с помощью гомогенизатора Поттера. К каждому образцу добавляли СВ до объема 1 мл и подвергали двум циклам последовательных низко- и высокоскоростных центрифугирований: в течение 5 мин при 3000 g и в течение 7 мин при 15000 g, используя Allegra 64R («Beckman Coulter», США). Осадок митохондрий ресуспендировали в 100 мкл среды обработки ДНКазой (0,4 М сахароза, 40 mM калий-фосфатный буфер, pH 7,0), содержащей 0,2 % БСА, 10 mM MgCl₂ и ДНКазу I из расчета 1 ед. акт. фермента на 50 мкл среды и инкубировали 20 мин при 25 °C. После инкубации митохондрии подвергали двум циклам центрифугирования в СВ, содержащей 0,2 % БСА, 10 mM ЭДТА и 10 mM ЭГТА в течение 7 мин при 15000 g и 4 °C.

2.5. Экстракция нуклеиновых кислот из митохондрий

Экстракцию ДНК из осадка митохондрий проводили с использованием

буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, 1 % (в/о) SDS, pH 7,5, и равного объема фенола. Нуклеиновые кислоты, содержащиеся после центрифугирования в водной фазе, осаждали этанолом в присутствии 200 мМ NaCl.

2.6. Электрофоретический анализ ДНК/РНК и элюция ДНК из агарозного геля

Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в горизонтальной камере в 1 % агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, с использованием трис-ацетатного буфера (ТАЕ) (70 мМ трис-HCl, 5 мМ ацетат натрия, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0). Напряженность электрического поля варьировала от 8 до 12 В/см, продолжительность электрофоретического разделения составляла 60-90 мин. По окончании электрофореза анализ и документирование качества ДНК проводили с помощью прибора Gel Doc XR System («Bio-Rad», США).

Для элюции ДНК из геля использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific», США).

2.7. Методы анализа импорта ДНК

2.7.1. Флуоресцентный анализ

Для анализа эффективности импорта флуоресцентно меченого ДНК-субстрата пробы подвергали электрофоретическому разделению в 1 %-ном агарозном геле, без добавления бромистого этидия, в буфере ТАЕ. После окончания электрофореза гель сканировали при помощи Ettan™ DIGE Imager («GE Healthcare», Швеция).

2.7.2. Количественная ПЦР в режиме реального времени

Анализ импорта ДНК при помощи количественной ПЦР проводили с использованием набора SYBR Select Master Mix («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Для оценки количества импортированных ДНК-субстратов были использованы праймеры *GFP*, последовательности которых представлены в таблице 5. Параллельно проводили анализ количества митохондриального гена *NAD4*, по которому выполняли нормирование количества импортированной ДНК. Оценку чистоты препарата митохондриальной ДНК, выделенной из митохондрий протопластов арабидопсиса, проводили при помощи анализа количества фрагментов хлоропластного гена *RBCL* и ядерного гена *YLS8*

(табл. 5). Амплификацию проводили на CFX96 («Bio-Rad») в следующем режиме: 50 °C – 2 мин, 95 °C – 3 мин, 1 цикл; 95 °C – 20 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с, 40 циклов. Данные анализировали при помощи программного обеспечения CFX Manager («Bio-Rad»). Все эксперименты проводили как минимум в трех биологических повторностях.

Таблица 5

Олигонуклеотиды, использованные для количественного ПЦР-анализа

Пары праймеров	Последовательность (5'→3')	ДНК-матрица для ПЦР-РВ (размер фрагмента, п.н.)
NAD4-L NAD4-R	GCATTTTCAGTGGGTTGGTCTGGT AGGGATTGGCACGCTTTCGG	мтДНК (146)
RBCL-L RBCL-R	TGCCGTAGCCAACCGAGT TCTTCCATACTTCACAAGCAGCA	мтДНК (144)
YLS8-L YLS8-R	GAGGTGCTTGCGTCTGTTGCT TGTCCTTGAGAGCCCAAGTTGAT	мтДНК (199)
GFP-L GFP-R	GATGTGGAACAAGACAGGGGTTT TGGTGAACCGGGCGTACTATTT	2,7 т.п.н., 265 п.н. (185)
9kb(103)-For 9kb(257)-Rev	TGCTAGTGTTACCCGCTTT TAGAATCCCGCCCTTCCTGA	9 т.п.н. (154)

2.8. Анализ уровня экспрессии генов, кодирующих изоформы VDAC

2.8.1. Экстракция РНК

Экстракцию РНК из растительного материала проводили при помощи TRI-Reagent («Sigma-Aldrich») согласно инструкции производителя. Растительный материал гомогенизировали в TissueLyser II («QIAGEN», США) в течение 2 мин при частоте 30 колебаний в сек. Для того, чтобы денатурировать белки, использовали бромхлорпропанол («Sigma-Aldrich»). Нуклеиновые кислоты осаждали 2,5 объемами 96 % этанола при 4 °C в течение ночи. Далее образцы центрифугировали при 14000 g и 4 °C в течение 10 мин, осажденные нуклеиновые кислоты высушивали при комнатной температуре, растворяли в 20-40 мкл деионизированной стерильной воды и в дальнейшем использовали для синтеза первой цепи кДНК. Количество и качество выделенной РНК анализировали методом электрофоретического разделения в 1 % агарозном геле.

2.8.2. Обратно-транскриптазная ПЦР в реальном времени

Для того, чтобы удалить возможные примеси ДНК, образцы РНК обрабатывали ДНКазой I («Thermo Scientific») в объеме 10 мкл в течение 30 мин при 37 °C. Чтобы инактивировать ДНКазу, к смеси добавляли 1 мкл ЭДТА (25

мкМ) и инкубировали 10 мин при 65 °С. Далее добавляли 1 мкл раствора вырожденных праймеров (100 pM) («Thermo Scientific»), прогревали 5 мин при 70 °С, после чего выдерживали 5 мин на льду. К смеси добавляли 4 мкл 5х буфера обратной транскриптазы, 0,5 мкл (20 ед.) ингибитора РНКаз, 2 мкл (10 мМ) смеси dNTP («Thermo Scientific») и инкубировали в течение 10 мин при 25 °С. Затем к смеси добавляли 0,7 мкл (140 ед.) обратной транскриптазы («Thermo Scientific»). Инкубацию проводили в течение 60 мин при 42 °С. Фермент инактивировали, инкубируя смесь в течение 10 мин при 70 °С. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили, как описано выше (п. 2.7.2). В качестве референсного гена использовали ген *YLS8* (At5G08290) (Hong et al., 2010; Бельков, 2015).

2.9. Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводились не менее чем в трех биологических повторностях. Построение диаграмм выполняли с помощью пакета программ Microsoft Excel. Степень достоверности различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости различий $P < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оптимизация условий изучения импорта ДНК в растительные митохондрии

3.1.1. Анализ импорта ДНК с использованием флуоресцентно меченых субстратов

Ранее при изучении процесса импорта ДНК в митохондрии использовали преимущественно радиоактивно меченые субстраты ДНК (Koulintchenko et al., 2003). Анализ с помощью радиоавтографии позволяет визуализировать полноразмерные молекулы импортированной ДНК, оценить влияние тех или иных эффекторов на интенсивность переноса ДНК. Тем не менее, введение радиоактивной метки имеет ряд недостатков – радиоактивность может быть опасна для здоровья, требует для работы с ней специальных, лицензируемых условий, время полураспада ^{32}P составляет всего 14 суток (табл. 6).

Помимо радиоактивного метода при изучении процесса импорта были получены доказательства попадания ДНК в митохондриальный матрикс с помощью методов транскрипции (Koulintchenko et al., 2003) и гомологичной рекомбинации *in organello* (Mileshina et al., 2011). Импорт генетических конструкций с последующим анализом их транскрипции с помощью ОТ-ПЦР или проведение гомологичной рекомбинации *in organello* оптимальны для изучения процессов, связанных с экспрессией экзогенной ДНК и ее сохранением в составе мт-генома. Однако эти методы не подходят для оценки интенсивности процесса импорта ДНК в митохондрии. Таким образом, все подходы, использованные ранее для изучения импорта, имеют ряд недостатков. Поэтому, очевидна необходимость поиска альтернативных подходов к детекции и анализу импортированной ДНК для продолжения исследований этого явления.

В настоящей работе нами разработан способ анализа импорта ДНК в изолированные митохондрии растений с использованием флуоресцентно меченой ДНК. Мы предположили, что введение в молекулы ДНК нерадиоактивной флуоресцентной метки позволит преодолеть недостатки радиоактивного мечения, сохраняя при этом основные преимущества использования для импорта меченых субстратов ДНК – такие, как возможность тестирования после экстракции

полноразмерных импортированных молекул, высокую чувствительность и специфичность.

Флуоресцентную метку в состав субстрата импорта вводили амплификацией молекул ДНК с помощью праймеров, несущих на 5'-концах цианин 3 (Cy3) (рис. 12, а). Пользуясь данным подходом, мы получили флуоресцентно меченые субстраты ДНК (рис. 12, б) и оценили возможность их использования в зависимости от времени хранения. Пробы не теряли своей способности к флуоресценции в течение месяца: количество детектируемой ДНК (не менее 0,5 нг) оставалось на одном уровне (рис. 12, в).

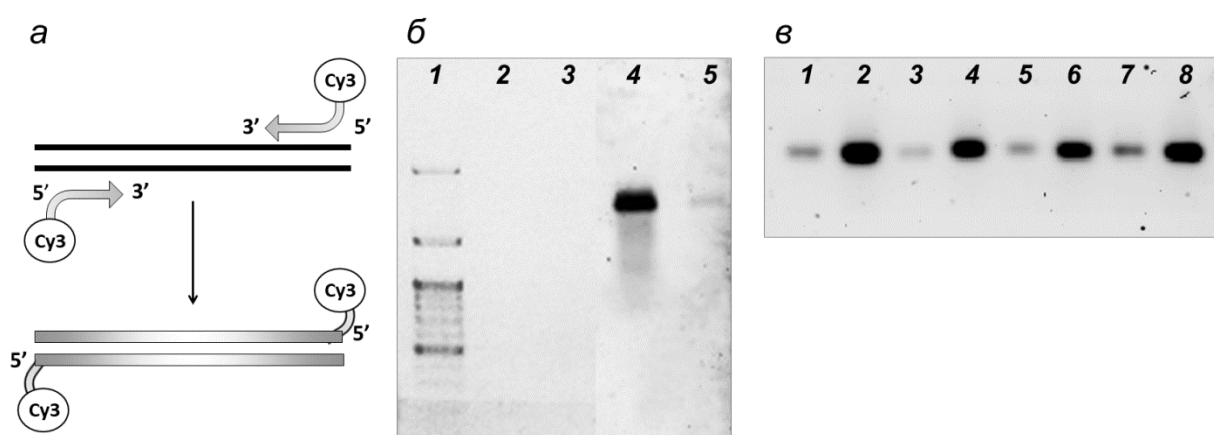


Рис. 12. Флуоресцентно меченые субстраты ДНК для импорта в митохондрии

а) Схема способа введения флуорофора Cy3 в молекулы ДНК; б) и в) визуализация флуоресцентно меченых фрагментов ДНК (852 п.н.) после электрофоретического разделения в агарозном геле; б) визуализация ДНК после окрашивания бромистым этидием (1-3) и в сканере флуоресценции (4-5); на гель нанесены 5 нг (2, 4) и 0,5 нг (3, 5) ДНК; (1) - маркер молекулярного веса ДНК; в) анализ зависимости качества флуоресцентно меченых проб ДНК от времени хранения; (1, 2) – 4х-, (3, 4) – 3х-, (5, 6) – 2х-, (7, 8) – 1-недельные пробы ДНК; на гель нанесены 1 нг (1, 3, 5, 7) и 5 нг (2, 4, 6, 8) ДНК фрагмента 852 п.н.

Ранее единственное исследование импорта ДНК с использованием флуоресцентно меченых фрагментов (Jackson et al., 2014) было проведено на изолированных митохондриях человека. Импортированную в митохондрии ДНК визуализировали с помощью конфокальной микроскопии. Было показано, что меченая ДНК сохраняется после обработки ДНКазой, т.е. находится в матриксе органеллы. Однако данный метод не включал удаления внешней митохондриальной мембраны (см. п. 3.1.2) и не гарантировал избавления от ассоциированной с ней ДНК, а также не позволил различить флуоресценцию

проникших в митохондрию полноразмерных фрагментов ДНК и продуктов их деградации.

Получив флуоресцентно меченые субстраты ДНК разной длины, мы изучили возможность их импорта в митохондрии трех видов растений (*A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*) (рис. 13).

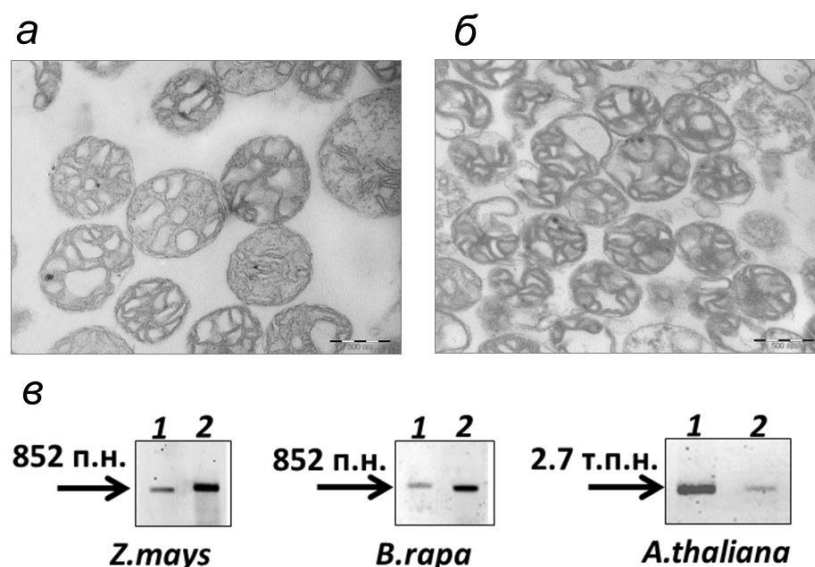


Рис. 13. Импорт меченой (Cy3) ДНК в растительные митохондрии

Митохондрии *B. rapa* (a) и *Z. mays* (б); изображения получены с помощью электронной микроскопии (масштаб 500 нм); в) флуоресцентно меченая ДНК (0,5 мкг) размером 852 п.н. и 2,7 т.п.н. была импортирована в изолированные митохондрии *Z. mays*, *B. rapa* и *A. thaliana*. После инкубации с митохондриями, мтДНК была экстрагирована и разделена электрофоретически в агарозном геле. Указаны - флуоресцентно меченый ДНК-субстрат (1) до импорта, 3 нг; (2) экстрагированный после импорта в митохондрии.

Оценка функциональной активности полученных митохондриальных препаратов показала, что митохондрии всех тестируемых растительных видов обладали высокой степенью сопряжения окисления и фосфорилирования (величина дыхательного контроля - около 4 при окислении сукцината), а их интактность составляла 85-90 %. Согласно данным электронной микроскопии, полученные фракции митондрий характеризовались высокой степенью очистки (рис. 13, а и б).

Сканирование флуоресценции препаратов мтДНК, выделенной из всех трех тестируемых нами растительных видов, позволило детектировать полноразмерные молекулы ДНК, импортированные в митохондриальный матрикс (рис. 13, в). Таким образом, очевидно, что флуоресцентно меченую ДНК можно

использовать в исследованиях эффективности митохондриального импорта *in organello*.

3.1.2. Анализ импорта ДНК с использованием количественной ПЦР в реальном времени

Тем не менее, детекция импорта в митохондриях с использованием флуоресцентно меченой ДНК обладает чувствительностью, недостаточной для решения ряда принципиальных задач, в частности, для изучения импорта ДНК *in vivo*. Этому недостатка практически лишен метод анализа импорта ДНК с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяющий определять значительно меньшие количества импортируемой ДНК. Очевидным недостатком данного подхода является то, что в реакции ПЦР-РВ детектируются не полноразмерные молекулы ДНК, а лишь ее фрагменты.

Впервые анализ импорта немеченых субстратов ДНК *in organello* с помощью ПЦР-РВ с использованием TaqMan-зондов был применен в работе (Клименко и др., 2011). В данном исследовании мы разработали стандартизованную систему анализа импорта ДНК в ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green, которая отличается удобством применения и относительной быстротой. Для анализа количества импортированной ДНК проводили амплификацию нуклеотидной последовательности размером 185 п.н., являющейся фрагментом импортированного субстрата. Параллельно, в каждой экспериментальной пробе проводили анализ количества эндогенного митохондриального гена *NAD4*, по которому затем нормировали количество импортированной ДНК.

Анализ активности импорта флуоресцентно меченого субстрата с помощью ПЦР-РВ подтвердил, что присутствие флуорофоров на концах молекул ДНК не препятствует их переносу в митохондриальный матрикс: меченая СуЗ и немеченая ДНК фрагмента 852 п.н. импортировалась в митохондрии арабидопсиса с равной эффективностью (рис. 14).

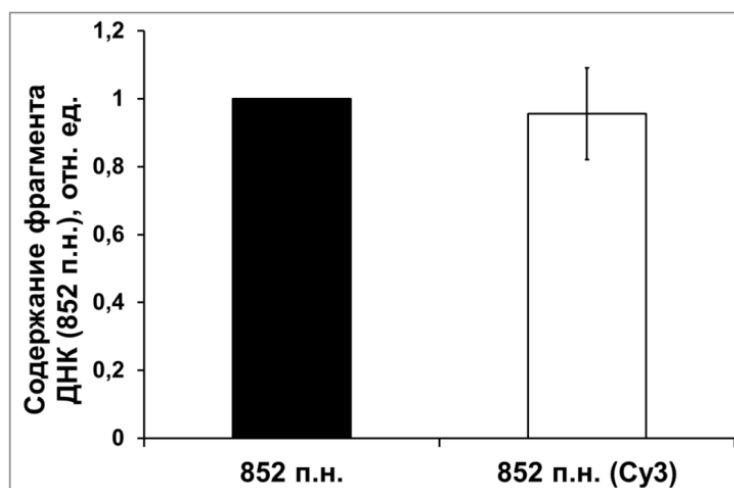


Рис. 14. Влияние наличия Cu_3 на 5'концах фрагмента ДНК размером 852 п.н. на его импорт в митохондрии

Показано относительное количество ДНК фрагмента размером 852 п.н., нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*, выявленное при анализе проб после импорта в изолированные митохондрии. Уровень импорта 852 п.н., не содержащего в своем составе флуорофора Cu_3 , принят за условную единицу. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

Исходя из накопленных экспериментальных данных, следует отметить, что корректность результатов, полученных с помощью ПЦР-РВ, зависит от условий постановки реакции импорта ДНК в митохондрии. Используя на настоящий момент подходы при постановке реакции импорта имели существенные различия в отношении наличия или отсутствия стадии получения митопластов, объема реакции импорта, способа экстракции мтДНК (Koulintchenko et al., 2003; Koulintchenko et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2015; Клименко и др., 2011) и др. В данной работе мы провели определение объема реакции импорта, оптимального для эффективного поглощения ДНК митохондриями. Нами была проанализирована интенсивность импорта ДНК в серии образцов, различающихся объемом реакции, но с постоянным количеством митохондриального белка (200 мкг) и добавленного ДНК-субстрата (500 нг) (рис. 15, а).

Низкой эффективностью импорта ДНК отличались образцы, объем реакции которых составлял 20 и 50 мкл. В небольших объемах реакции митохондрии, скорее всего, агрегируют, что может являться причиной блокирования транспортных каналов, необходимых для процесса переноса макромолекул. Объем реакции между 100-300 мкл оказался наиболее оптимальным для транспорта ДНК в митохондрии (рис. 15, а).

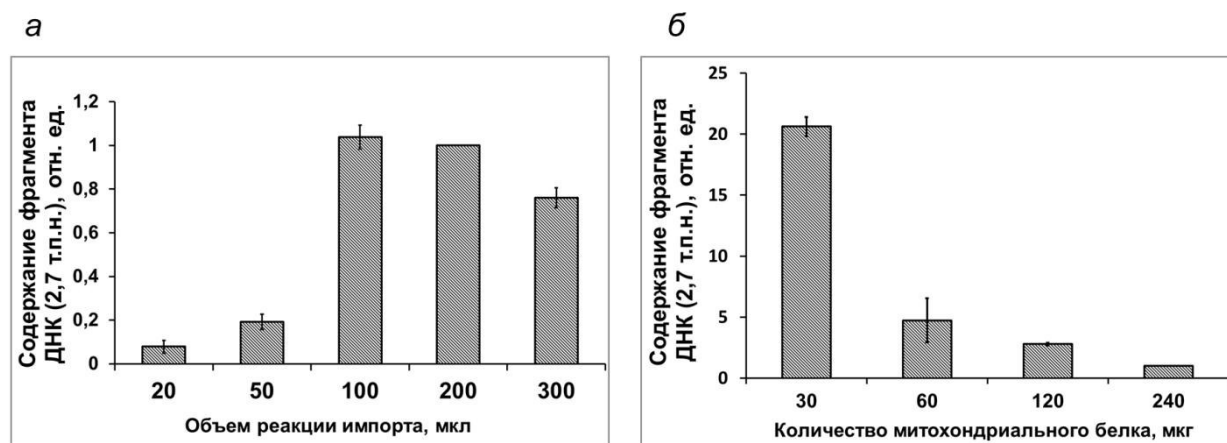


Рис. 15. Анализ параметров, влияющих на эффективность импорта ДНК в митохондрии *S. tuberosum*

Импорт немеченого или флуоресцентно меченого фрагмента ДНК размером 2,7 т.п.н. проводили в митохондрии *S. tuberosum*; показано относительное количество ДНК фрагмента размером 2,7 т.п.н., нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*, выявленное при анализе проб после импорта в изолированные митохондрии в условиях вариации (а) объема реакции и (б) количества митохондриального белка. Объем, равный 200 мкл (а), или количество белка, равное 240 мкг (б), приняты за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

Далее, нами был проведен анализ импорта в условиях вариации количества митохондриального белка (рис. 15, б) в постоянном объеме реакции (200 мкл). На рисунке 15 (б) представлен результат, который демонстрирует обратную корреляцию эффективности импорта ДНК от количества добавленного в реакцию митохондриального белка. Эти результаты подчеркивают важность стандартизации количества митохондриального белка, используемого в единичной реакции импорта.

Анализ флуоресцентно меченой ДНК, экстрагированной после импорта в митохондрии и подвергшейся электрофоретическому разделению в агарозном геле, выявил, помимо полноразмерного импортированного фрагмента размером 2,7 т.п.н., наличие «фона» низкомолекулярных фрагментов (рис. 16, а, дорожка 1). Появление этих низкомолекулярных фрагментов обусловлено, скорее всего, тем, что после обработки ДНКазой и отмывок некоторая часть не импортированных и частично деградированных молекул остается связанной с внешней мембраной митохондрий или в межмембранном пространстве и экстрагируется вместе с мтДНК. Присутствие этого «фона» может негативно влиять на количественную оценку импорта. Удаление внешней митохондриальной мембраны с помощью осмотического шока (этап получения митопластов), проведенное после импорта

ДНК в митохондри, позволяет существенно снизить содержание низкомолекулярных фрагментов (рис. 16, а, дорожка 2). Эта процедура приводит в то же время и к довольно значительному снижению количества импортированной в митохондрии ДНК, выявляемого в ПЦР-РВ (рис. 16, б). Для того, чтобы выяснить, насколько существенна доля низкомолекулярных фрагментов в получаемом количественном результате импорта целевых фрагментов ДНК, мы провели электрофоретическое разделение ДНК, экстрагированной после импорта в митохондрии и получения митопластов. Элюированные из агарозного геля мтДНК и участок, соответствующий полноразмерному импортируемому фрагменту, проанализировали с помощью ПЦР-РВ (рис. 16, в). Как оказалось, эффективность импорта ДНК обеих проб, как в случае использования в качестве матрицы экстрагированной ДНК непосредственно после импорта, так и при использовании элюата, содержащего полноразмерные импортированную и мтДНК, практически не различалась (рис. 16, в).

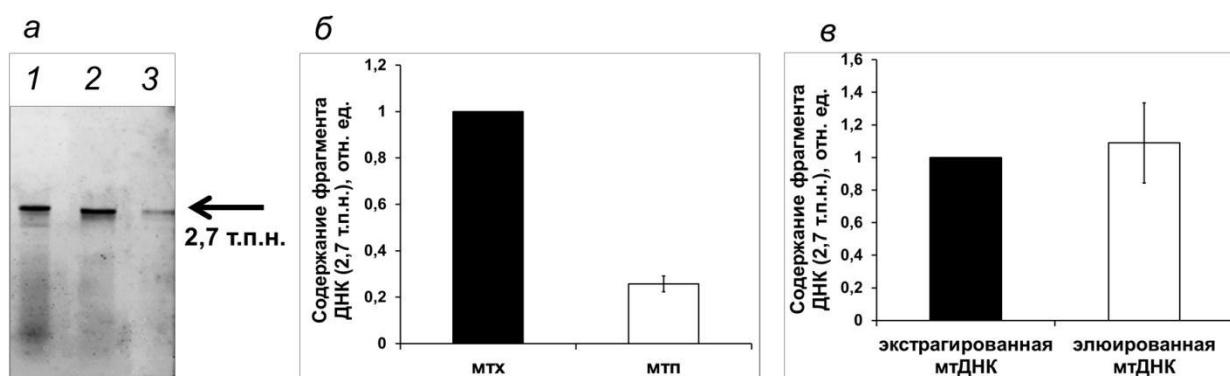


Рис. 16. Анализ влияния «фона» на качественную и количественную оценку импорта ДНК

Импорт немеченого или флуоресцентно меченого фрагмента ДНК размером 2,7 т.п.н. проводили в митохондриях *A. thaliana* (а, б) и *B. rapa* (в); а) и б) анализ импорта ДНК (2,7 т.п.н.) после экстракции из митохондрий (дорожка 1, мтх) или митопластов (дорожка 2, мтп); ДНК-субстрат до импорта (2,7 т.п.н.), 1 нг (дорожка 3); в) ПЦР-РВ-анализ ДНК, экстрагированной после импорта в изолированные митохондрии (экстрагированная мтДНК) и подвергшейся элюции после разделения в агарозном геле (элюированная мтДНК). Показано относительное количество ДНК фрагмента размером 2,7 т.п.н., нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. На диаграммах уровень импорта в митохондрии (б, мтх) и количество экзогенной ДНК в препарате экстрагированной мтДНК (в) приняты за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

Полученные результаты позволяют заключить, что, несмотря на возможность детекции лишь небольшого фрагмента ДНК, данные ПЦР-РВ-анализа импорта с использованием ДНК, экстрагированной из митопластов, совпадают с

данными, полученными методами анализа полноразмерных фрагментов ДНК, импортированных в митохондриальный матрикс.

Оптимизированный нами подход *in organello* позволяет использовать интактные митохондрии для изучения механизмов импорта ДНК и роли белков-переносчиков митохондриальной мембраны, однако, такая система не учитывает многочисленных клеточных факторов, способных влиять на процесс переноса.

Таблица 6

Сопоставление преимуществ и недостатков методов анализа импорта ДНК

Критерий выбора метода	Метод анализа импорта		
	Радиоактивный метод анализа	Флуоресцентный метод анализа	ПЦР-РВ
Детекция полноразмерного фрагмента	+	+	–
Количественная оценка эффективности импорта	–	–	+
Возможность длительного хранения ДНК-субстрата без потери качества	–	+	+
Удобство и быстрота метода	–	+	+
Безопасность для здоровья	–	+	+
Применение в системе <i>in organello</i>	+	+	+
Применение в системе <i>in vivo</i>	–	–	+

3.1.3. Постановка метода изучения импорта ДНК в митохондриях протопластов арабидопсиса *in vivo*

Ранее природную компетентность митохондрий, как животных, так и растений, к поглощению ДНК не исследовали *in vivo*. При этом на протяжении многих лет не прекращался поиск методических подходов для осуществления трансформации митохондриального генома млекопитающих. Были предприняты попытки трансформации митохондрий посредством связывания ДНК с митохондриальным транзитным пептидом или с рекомбинантным митохондриальным белком TFAM, бактериальной конъюгации, доставки с помощью липофильных катионных соединений, переноса генов, опосредованного аденовирусами и других способов (Remacle et al., 2012; Niazi et al., 2013). Тем не менее, ни один из этих методов не позволил достичь стабильной трансформации. Отсутствуют также сообщения и об успешной трансформации митохондрий высших растений (Verechshagina et al., 2018; Remacle et al., 2012). До настоящего момента остается неясным, происходит ли импорт на уровне целых клеток, и

сохраняются ли *in vivo* закономерности этого процесса, продемонстрированные ранее *in organello*. Разработка системы, позволяющей изучать механизмы переноса молекул ДНК из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в целых клетках, открыла бы поле как для фундаментальных исследований, в частности, влияния на импорт ДНК различных клеточных факторов, так и для разработки путей трансформации мт-генома высших растений, являющейся чрезвычайно важной и на настоящий момент нерешенной задачей. Между тем, подобная работа позволила бы получить трансгенные растения с контролируемым по материнской линии наследованием чужеродного генетического материала. Таким образом, очевидна необходимость создания системы, позволяющей изучать транспорт ДНК в митохондрии *in vivo*.

Трансформация протопластов широко применяется, в частности, для внедрения в клетку временно экспрессируемых конструкций с целью изучения внутриклеточной адресации белков (Bhushan et al., 2007), либо промоторной активности тех или иных регуляторных последовательностей (Wehner et al., 2011). Также трансформация протопластов посредством электропорации была использована при попытке изучения *in vivo* импорта тРНК в митохондрии *S. tuberosum* (Wintz and Dietrich, 1996). Однако трансформация протопластов никогда ранее не применялась для изучения механизмов импорта ДНК.

Нами впервые разработан подход, позволяющий детектировать транспорт ДНК из цитоплазмы в митохондрии, происходящий в протопластах арабидопсиса. Данный подход включает: (а) трансформацию протопластов ДНК-субстратом; (б) инкубацию клеток в оптимальных физиологических условиях (температура, освещенность) в течение 20 ч; (в) разрушение протопластов и выделение митохондрий из протопластов микрометодом; (г) обработку изолированных митохондрий ДНКазой с целью избавления от возможного загрязнения фракцией ДНК, связанной с наружной мембраной; (д) лизис митохондрий и выделение мтДНК; (е) оценку количества импортированной в митохондрии ДНК с помощью ПЦР-РВ. Использование флуоресцентного мечения ДНК-субстратов с помощью Су3-содержащих праймеров не позволило достичь эффективности включения, достаточной для выявления флуоресценции в препаратах ДНК митохондрий, выделенных из трансформированных протопластов (данные не приведены).

Поэтому нами был выбран подход, включающий ПЦР-РВ-анализ, преимуществом которого является более высокая чувствительность.

Для получения протопластов из листьев арабидопсиса и трансформации их ДНК был использован протокол (Wu et al., 2009), применявшийся ранее преимущественно в экспериментах, требующих временной экспрессии генетических конструкций в цитоплазме. Мы показали, что полученный препарат протопластов свободен от загрязнений, а протопласты сохраняют целостность в течение как минимум 20 часов после выделения и трансфекции их ДНК (рис. 17, а).

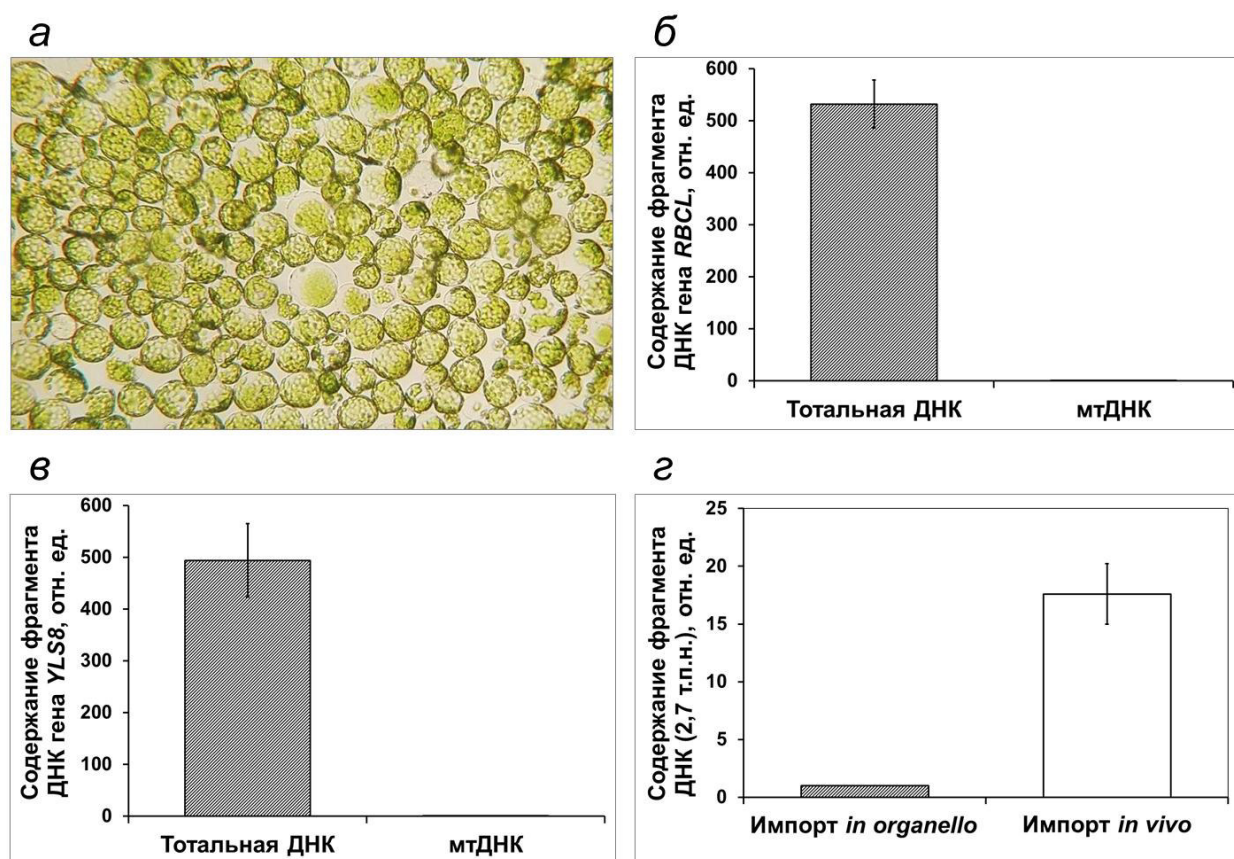


Рис. 17. Импорт ДНК в митохондрии протопластов арабидопсиса

а) Внешний облик протопластов арабидопсиса после трансформации фрагментом ДНК и инкубации в течение 20 ч; б) анализ степени очистки митохондрий, выделенных из протопластов, от хлоропластного загрязнения; в) анализ степени очистки митохондрий, выделенных из протопластов, от загрязнения ядерной ДНК. Показано относительное количество фрагментов генов *RBCL* (хлДНК) и *YLS8* (ядДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4* (мтДНК), выявленное при анализе проб ДНК, выделенной из общего экстракта протопластов и из препарата изолированных митохондрий; з) анализ импорта ДНК в изолированных органеллах (*in organello*) и в протопластах (*in vivo*) арабидопсиса. На диаграммах количество мтДНК (б, в) и уровень импорта *in organello* (з) приняты за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

Митохондрии были выделены на основе метода, разработанного для получения органелл из протопластов суспензионной культуры арабидопсиса

(Meyer and Millar, 2008), адаптированного нами для небольших количеств материала. С целью исключения возможности поглощения митохондриями фрагментов экзогенной ДНК в процессе выделения, в состав среды выделения митохондрий были включены $MgCl_2$ и ДНКаза I.

Для того, чтобы оценить степень загрязнения препарата ДНК, выделенной из митохондрий протопластов, последовательностями ДНК немитохондриального происхождения, был проведен ПЦР-РВ-анализ, в котором оценивалось содержание фрагментов хлоропластного гена *RBCL* и ядерного гена *YLS8*. Установлено, что содержание как хлоропластной, так и ядерной ДНК в полученном препарате митохондрий снижено приблизительно в 500 раз по сравнению с ее содержанием в тотальной ДНК протопластов (рис. 17, б и в). Таким образом, митохондрии, выделенные использованным нами методом, имеют достаточно высокую степень очистки от чужеродных примесей.

В предварительных экспериментах протопласты были трансформированы ДНК-субстратом размером 2,7 т.п.н. После инкубации протопластов в течение 20 ч, выделения митохондрий и экстракции мтДНК, детекция с помощью ПЦР-РВ показала достаточно высокое содержание импортированного фрагмента ДНК. Параллельно, было проанализировано содержание того же ДНК-субстрата, импортированного в изолированные митохондрии арабидопсиса. В результате показано, что содержание импортированного в митохондрии ДНК-субстрата было существенно выше в условиях импорта *in vivo* по сравнению с условиями *in organello* (рис. 17, г).

Для доказательства внутримитохондриальной локализации детектируемой ДНК митохондрии, выделенные из протопластов арабидопсиса, были обработаны неионным детергентом Тритон X-100, нарушающим целостность митохондриальных мембран. Выделенные митохондрии инкубировались в среде, содержащей 0,5% Тритон X-100, в течение 10 мин перед обработкой ДНКазой. Данная обработка приводила к практически полному отсутствию импортированного фрагмента ДНК (рис. 18, а), что служит важным аргументом в пользу того, что детектируемый фрагмент локализован в матриксе митохондрий, а не ассоциирован с внешней мембраной.

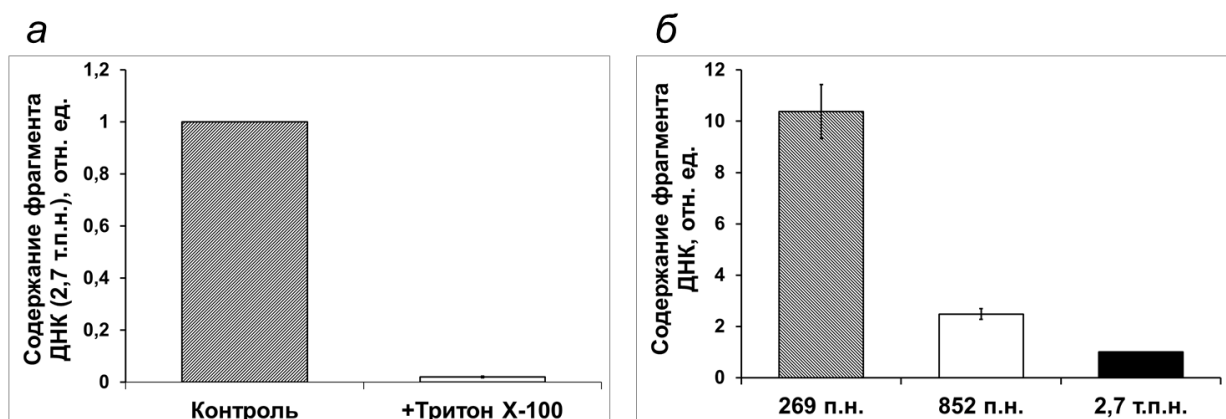


Рис. 18. Митохондриальный импорт ДНК *in vivo*, детектируемый (а) в условиях обработки митохондрий, выделенных из протопластов, детергентом Тритон X-100, и (б) в протопластах арабидопсиса с использованием ДНК различного размера

Показано относительное количество фрагмента гена *GFP* (содержащегося в импортированной ДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. На диаграммах контроль (а) и уровень импорта 2,7 т.п.н. (б) приняты за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

На следующем этапе работы было проведено сравнение интенсивности импорта ДНК-субстратов трех размеров – 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. Для трансфекции протопластов использовали равное количество ДНК каждого из трех субстратов (5 мкг). Из рисунка 18 (б) видно, что количество молекул ДНК, импортировавшихся в митохондрии в условиях *in vivo*, уменьшается с увеличением размера импортируемого субстрата. Схожая зависимость была отмечена ранее для импорта фрагментов ДНК разного размера в изолированные митохондрии (Koulintchenko et al., 2003), что свидетельствует в пользу того, что обнаруженные нами закономерности импорта ДНК *in organello* отражают процессы, протекающие *in vivo*. Таким образом, нами впервые показано, что ДНК, находящаяся в цитоплазме целой растительной клетки, активно поступает в митохондрии.

В целом, по результатам проделанной работы, нами был разработан комплексный подход для изучения импорта ДНК в растительные митохондрии, включающий анализ в системах *in organello* и *in vivo* (рис. 19) (Tarasenko et al., 2019).

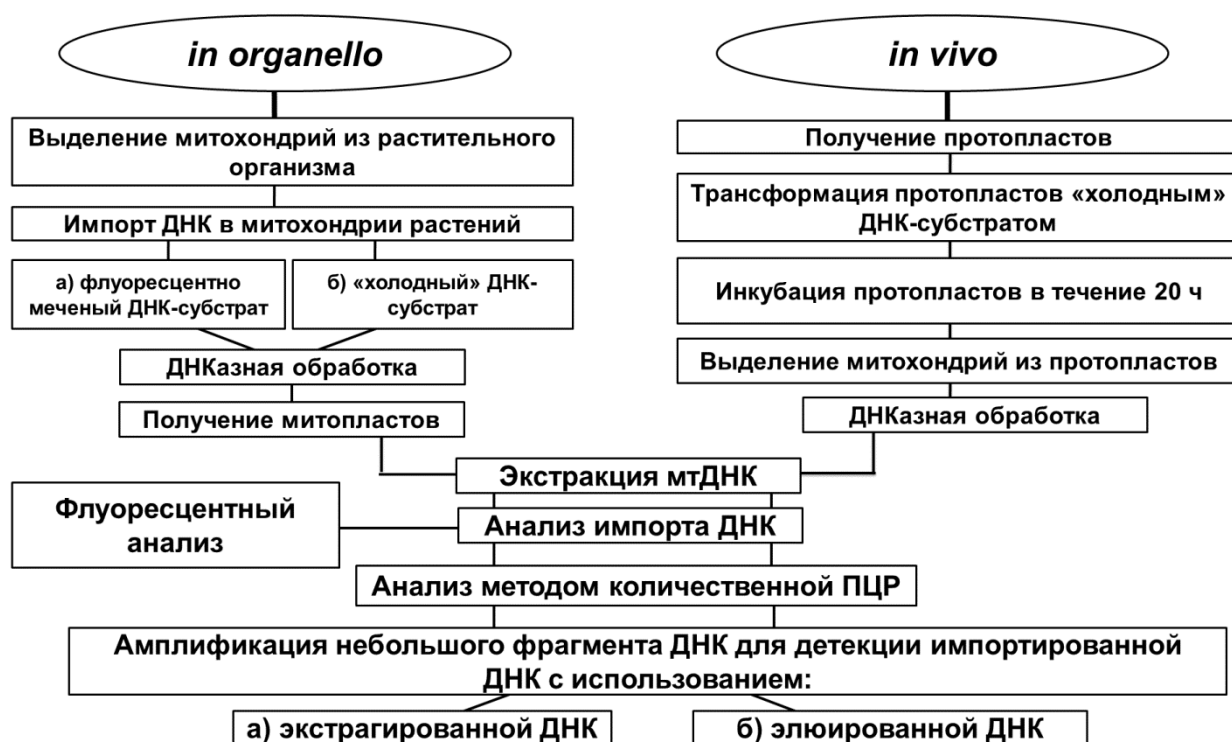


Рис. 19. Схема, иллюстрирующая комплексный подход, основанный на использовании систем *in organello* и *in vivo*, для исследований импорта ДНК в растительные митохондрии

Данный подход позволит в дальнейшем выявить, сохраняются ли закономерности импорта ДНК, показанные ранее с использованием изолированных митохондрий, такие как: зависимость от размера и структурных особенностей молекулы ДНК, влияние на интенсивность импорта инактивации определенных белков митохондриальной мембраны - на уровне целой растительной клетки. Помимо изучения механизмов переноса ДНК представленный нами комплексный подход может быть использован в дальнейших исследованиях по разработке системы трансформации митохондриального генома растений.

3.2. Изучение кинетических характеристик импорта ДНК короткой и средней длины в растительные митохондрии

Концентрация субстрата – один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативных реакций. У одних ферментов кривая имеет гиперболическую форму, у других - сигмоидную (рис. 20).

Еще в 1905 г. Браун и Анри предположили, что фермент сначала образует комплекс со своим субстратом, а затем этот комплекс распадается с высвобождением свободного фермента и продуктов реакции (Диксон и Уэбб,

1982). Это представление является центральным для всех современных концепций о механизме действия ферментов (Диксон и Уэбб, 1982). В 1913 г. Михаэлисом и Ментен впервые была предложена простая теория, основанная на этом представлении.



Рис. 20. Типичная кривая зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата, имеющая сигмоидную форму

Закономерности комплексообразования и превращения субстрата, катализируемые ферментом, были применены при изучении транспортного процесса на примере переносчика адениннуклеотидов (АНТ) (Klingenberg, 2008). Ранее (Scherer et al., 1973; Schultheiss et al., 1984) впервые детально изучил и описал работу переносчика АНТ, используя меченые по фосфору АДФ и АТФ и показал, что его работа описывается в рамках кинетики работы фермента, имеющего один субстрат. В случае АНТ результатом субстрат-белкового взаимодействия является не продукт реакции, а перемещение в матрикс митохондрий. Исходя из этого, можно оценить максимальную скорость переноса и определить кажущуюся константу Михаэлиса для переноса АДФ.

В этих исследованиях транспортный процесс анализировали с точки зрения концепции «индуцированного перехода» (от англ. induced transition fit, ITF). В данной концепции подчеркивается различие субстрат-белковых взаимодействий между ферментами и ADP/ATP-переносчиком. Существенное отличие АНТ от фермента заключается том, что переносчик адениновых нуклеотидов работает по принципу обменника (антипортер). Для того чтобы перенос произошел, необходимо осуществление связывания молекулы адениннуклеотида (АДФ и АТФ) с соответствующим сайтом одновременно с наружной и с внутренней стороны

внутренней мембраны митохондрий (Metelkin et al., 2006). Когда это происходит, АНТ транспортирует адениннуклеотиды в стехиометрическом соотношении 1:1, т.е. происходит перенос одной молекулы АДФ из цитоплазмы в обмен на одну молекулу АТФ из матрикса.

В ходе эволюции у АНТ появился ряд новых функций, а в аминокислотной последовательности АНТ возникли новые сайты, ответственные за ассоциацию с соответствующими белками-партнерами. В работе Haslam et al. (1973), с помощью регистрации кинетики поглощения адениннуклеотидов показано существование сайтов с разным сродством к адениннуклеотидам, которое, по всей видимости, может меняться в зависимости от метаболического состояния митохондрий и клетки.

Вышеизложенное говорит в пользу нашей рабочей гипотезы о том, что белки (АНТ и, вероятно, другие), формирующие мембранную пору для транспорта ДНК, имеют сайты с разным сродством не только к адениннуклеотидам, как это ранее показано, но в том числе и к ДНК. Это сродство, в свою очередь, может зависеть от длины молекулы ДНК, метаболического состояния митохондрий и других факторов.

В мембране митохондрий присутствует большое количество разнообразных белков, участвующих в переносе низко- и высокомолекулярных метаболитов: фосфолипидов, белков, нуклеиновых кислот и т.д. Во внутренней митохондриальной мембране существует целое семейство специфических белков-переносчиков MFC (от англ. Mitochondrial Carrier Family). Ранее было установлено, что процесс импорта ДНК осуществляется при участии порина (VDAC) в наружной митохондриальной мембране и адениннуклеотидтранслоказы (АНТ) во внутренней митохондриальной мембране (Koulintchenko et al., 2003; Клименко и др., 2011). Дальнейшие исследования показали, что транслокация ДНК через двойную мембрану митохондрий не ограничивается этими мембранными белками и, по всей видимости, происходит посредством нескольких альтернативных механизмов, при участии разнообразных белковых комплексов (Weber-Lotfi et al., 2015).

Исходя из нашей рабочей гипотезы о том, что транспорт ДНК в митохондрии происходит посредством не одного, а нескольких мембранных каналов, активность этого процесса может иметь сложную кинетическую зависимость от концентрации ДНК-субстрата. На рисунке 21 (а, б и в)

представлены различные варианты кинетики импорта ДНК в митохондрии, реализация каждого из которых может зависеть от конкретного задействованного механизма трансмембранного переноса молекулы ДНК. Мы предполагаем, что в случае сложного характера механизма импорта ДНК в митохондрии, происходящего с участием более чем одного транспортного белка, будет наблюдаться ступенчатый характер кинетики этого процесса (рис. 21, в). Результат исследования зависимости активности импорта ДНК в митохондрии от концентрации субстрата может служить важным аргументом, подтверждающим или опровергающим гипотезу о множественности путей митохондриального транспорта ДНК.

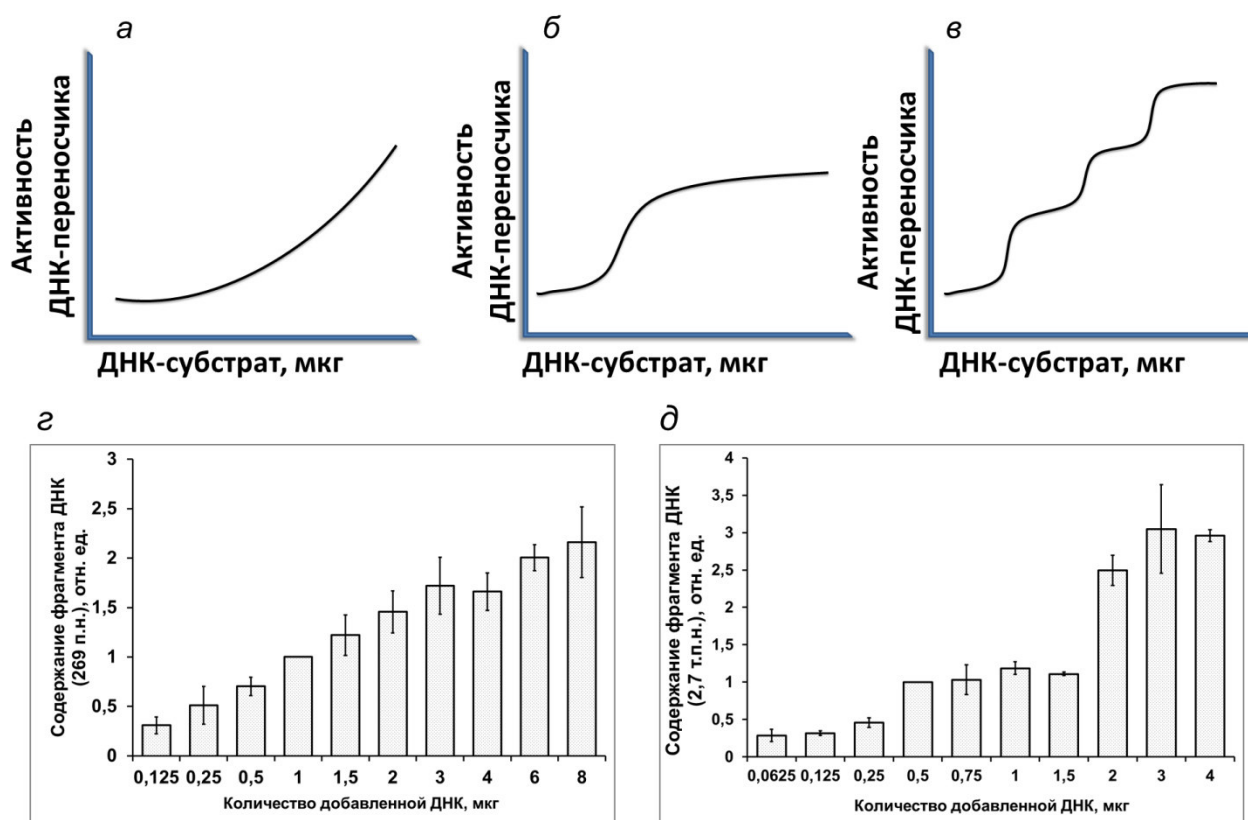


Рис. 21. Кинетика импорта ДНК в растительные митохондрии

а-в) Схематическое изображение типов кинетики импорта ДНК в митохондрии (зависимость активности импорта от концентрации ДНК): а) отсутствие насыщения процесса, импорт ДНК не зависит от специфичного транспортного пути; б) насыщение процесса, импорт ДНК осуществляется одним специфичным путем; в) ступенчатое насыщение процесса, импорт ДНК происходит при участии нескольких транспортных путей; г) и д) анализ кинетики импорта ДНК (г) малой, 269 п.н., или (д) средней, 2,7 т.п.н., длины в митохондрии *S. tuberosum* с использованием количественной ПЦР. Инкубацию ДНК (указано количество в каждой пробе) с митохондриями (100 мкг белка) проводили в течение 10 мин. МтДНК экстрагировали и анализировали с помощью количественной ПЦР. Представлено содержание фрагмента гена *GFP*, нормированное на содержание эндогенного гена *NAD4*. Количество субстрата в пробах «1 мкг» (г) и «0,5 мкг» (д) для фрагментов 269 п.н. и 2,7 т.п.н., соответственно, принято за условную единицу. Представлены результаты не менее 10 биологических повторностей. Допуски на диаграмме представляют среднеквадратичные ошибки.

Для проведения экспериментов по изучению кинетических параметров импорта ДНК в митохондрии были использованы следующие методические подходы: (1) получение с помощью ПЦР препаративных количеств двух субстратов ДНК размером 269 п.н. и 2,7 т.п.н., (2) выделение изолированных митохондрий из клубней картофеля, (3) импорт ДНК в системе *in organello*, (4) количественный анализ импортированной в растительные митохондрии ДНК (см. пункты 2.8.2, 3.1.2). Для инкубации с равным количеством изолированных митохондрий (100 мкг митохондриального белка) брали серию проб субстрата ДНК с увеличивающейся концентрацией, от 0,675 до 8 мкг. Инкубацию митохондрий с ДНК проводили в течение 10 минут. После ДНКазной обработки и отмывок, выделяли мтДНК и анализировали ее электрофоретическим разделением в агарозном геле. Согласно данным электрофореза (рис. 22), во всех выполненных экспериментах (15 экспериментов) митохондриальная ДНК была экстрагирована без признаков деградации, не фрагментирована, что позволяло использовать ее в дальнейшем анализе методом количественной ПЦР. Анализ уровня содержания импортированных субстратов ДНК, 269 п.н. и 2,7 т.п.н., проводили, используя специфические праймеры к последовательности гена *GFP*, которая входила в состав обоих фрагментов. Количество импортированной ДНК нормировали к количеству эндогенной ДНК, митохондриальному гену *NAD4*, определявшемуся в параллельной реакции.

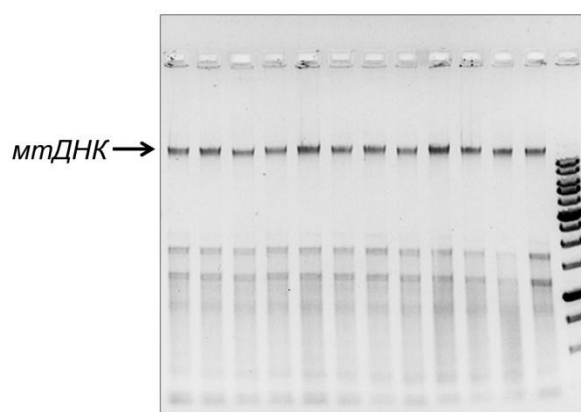


Рис. 22. Анализ качества митохондриальной ДНК, экстрагированной из митохондрий картофеля (*S. tuberosum*) после инкубации с ДНК и последующих обработок

На рисунке представлен результат типичного эксперимента по изучению кинетики импорта, полученный электрофоретическим разделением мтДНК в агарозном геле.

На рисунке 21 (з, д) представлены результаты, показывающие зависимость количества импортированных фрагментов ДНК от концентрации субстрата, использовавшейся для инкубации с митохондриями. В случае импорта фрагмента ДНК малой длины (269 п.н.) мы наблюдали практически полное отсутствие насыщения процесса по мере увеличения концентрации субстрата (рис. 21, з): количество поглощенной ДНК увеличивалось пропорционально количеству ДНК, добавленной в среду инкубации с митохондриями. В случае импорта фрагмента ДНК средней длины (2,7 т.п.н.) выявилась другая зависимость эффективности поглощения субстрата от его концентрации (рис. 21, д): при концентрациях от 0,063 до 0,25 мкг мы наблюдали незначительное увеличение количества поглощенной ДНК (плато 1); затем при концентрациях от 0,5 до 1,5 мкг происходило резкое увеличение уровня поглощения, в 2 раза, при этом, достигнутый уровень практически не менялся (плато 2), и, далее, при концентрациях 2-4 мкг – еще одно резкое увеличение уровня поглощения, в 2,5-3 раза, с последующей стабилизацией на одном уровне (плато 3). Наши данные, таким образом, показывают, что импорт двух фрагментов разной длины, малой и средней, происходит, по всей видимости, посредством различающихся механизмов: для импорта фрагмента 269 п.н. не происходит насыщения процесса в данных условиях (от 0,125 до 8 мкг ДНК на 100 мкг митохондриального белка в течение 10 мин) (рис. 21, а), для импорта фрагмента 2,7 т.п.н. характерно ступенчатое насыщение процесса (рис. 21, в).

Следует отметить, что сходный вывод можно сделать и на основании другого полученного нами результата, описанного в п. 3.1.2. Данные, представленные на рисунке (рис. 15, б), демонстрируют обратную зависимость эффективности импорта ДНК от количества добавленного в реакцию митохондриального белка. Можно сказать, что эффективность импорта ДНК усиливается с увеличением отношения количества ДНК, взятого для инкубации с митохондриями, к количеству митохондриального белка.

Полученные нами данные согласуются с гипотезой о субстрат-белковых взаимодействиях по типу ферментативных реакций, в которых перенос ДНК через митохондриальные мембраны играет роль эквивалента продукта реакции. Ступенчатый характер насыщения, обнаруженный для импорта ДНК размером 2,7

т.п.н., свидетельствует о том, что транспорт молекул ДНК средней длины осуществляется не только при участии классического пути с привлечением белковых переносчиков - VDAC во внешней и АНТ во внутренней митохондриальной мембранах (Koulintchenko et al., 2003). Можно предположить, что при насыщении конкретного пути импорта ДНК в процесс последовательно включаются другие, альтернативные способы транспортировки ДНК через двойную мембрану митохондрий с привлечением других белков-переносчиков. Принципиальным моментом при этом является то, что эти пока неидентифицированные белковые переносчики, скорее всего, имеют разное сродство к ДНК-субстрату средней длины.

Тот факт, что в ходе импорта увеличивающихся количеств ДНК малой длины (269 п.н.) не происходит насыщения процесса, говорит об отсутствии особой специфичности транспортного пути в отношении ДНК данного размера. Вероятно, ДНК малой длины в силу своих небольших размеров относительно легко может транслоцироваться через митохондриальную мембрану как посредством канала, формируемого VDAC и АНТ, так и посредством других каналов, без участия специфической рецепции поверхностными белками внешней мембраны. Наблюдаемая тенденция к выходу на плато кинетики процесса импорта ДНК малой длины (рис. 21, з) показывает, что, несмотря на линейный характер импорта, при значительном увеличении концентрации ДНК-субстрата, процесс, тем не менее, стабилизируется и может достигать своего насыщения.

3.3. Изучение роли мембранных белков митохондрий арабидопсиса в импорте ДНК разной длины

На основании результатов предыдущих исследований транспорта ДНК в митохондрии растений (Ibrahim et al., 2011; Weber-Lotfi et al., 2015; наши данные), очевидно, что набор участвующих в импорте ДНК белков не ограничивается порином в наружной митохондриальной мембране и адениннуклеотидтранслоказой во внутренней митохондриальной мембране, а сам процесс импорта ДНК разной длины и структуры может происходить с участием нескольких нерасшифрованных пока механизмов. Мы продолжили изучение механизмов импорта ДНК с использованием линий нокаут-мутантов арабидопсиса по белкам, имеющим транспортную или структурообразующую функцию в митохондриальной

мембране, применяя разработанный нами (пункт 3.1) комплексный подход к исследованию транспорта ДНК.

3.3.1. Получение гомозиготных линий мутантов *A.thaliana*

Для выполнения задачи по изучению роли кандидатных митохондриальных мембранных белков в транспорте ДНК в митохондриии нами была проведена подготовительная работа, включавшая этапы (1) заказа семян линий арабидопсиса, мутантных по избранным генам и получения гомозиготных растений этих линий, (2) фенотипической характеристики мутантных линий и последующего наращивания растительного материала, достаточного для постановки экспериментов. Таким образом получены несколько гомозиготных линий арабидопсиса (пункт 2.1.1.), названных *vdac1*, *vdac2*, *vdac3*, *vdac4*, *tspo*, *drp3a*, *drp3b*, *om47* и *mic60* в соответствии с обозначениями инактивированных в них вставкой Т-ДНК генов (описание функций кодируемых этими генами белков приведено ниже в соответствующих разделах результатов).

Показано, что растения линий *tspo*, *drp3a*, *drp3b* и *mic60* фенотипически не отличаются от растений дикого типа (Col-0). Для мутантной линии арабидопсиса *om47* была отмечена незначительная задержка цветения по сравнению с растениями дикого типа. В то время как растения мутантной линии *vdac3* также не отличались от дикого типа, растения линий *vdac1*, *vdac2* и *vdac4* характеризовались существенными фенотипическими отличиями. Характерными особенностями растений этих трех мутантных линий являлись замедленный рост и более позднее цветение, более складчатая форма листовой пластины, наличие некротических пятен на листьях, а также частичная стерильность. Степень выраженности фенотипа заметно варьировала, будучи наименьшей у растений линии *vdac1* и наибольшей у растений линии *vdac2*. Несмотря на крайне низкое количество образуемых исследуемыми мутантами семян (около 3-5 семян на растение для линий *vdac2* и *vdac4* при выращивании в стандартных условиях), путем модификации условий выращивания (использование света большей интенсивности, удаление первых образующихся цветоносных побегов), удалось получить достаточное количество семян растений линии *vdac1* для выделения митохондрий. Семян мутантных линий по генам *vdac2* и *vdac4* не было получено в количестве, достаточном для проведения экспериментов *in organello*, поэтому исследование

участия белков, кодируемых этими генами, в механизме импорта ДНК осуществляли в системе *in vivo* с использованием протопластов арабидопсиса (см. п. 2.5.2, 3.1.3).

3.3.2. Изучение участия в механизме импорта ДНК белка наружной мембраны митохондрий TSPO

Известно, что один из основных транспортеров внешней митохондриальной мембраны, VDAC, является многофункциональным белком. VDAC - компонент широко известной у животных митохондриальной поры мегапроницаемости (МПИМ). Предполагают, что митохондриальный бензодиазепиновый рецептор (МБР) (Елисеев, 2003), локализованный, в основном, в наружной митохондриальной мембране, может входить в состав МПИМ (Papadopoulos et al., 2006), или же, в определенных стрессовых условиях, способен формировать транзитную пору с участием олигомерных комплексов порина и АНТ. Аналог МБР у растений известен как TSPO (от англ. Tryptophan-rich Sensory Protein). У растений TSPO также был обнаружен в наружной мембране митохондрий (Lindemann et al., 2004), хотя данные о клеточной локализации этого белка, скорее, противоречивы (Guillamot et al., 2009) и, в отличие от животных, функции TSPO растительного происхождения остаются малоизученными (Vanhee et al., 2011).

Исходя из предположения о потенциальной способности растительного TSPO формировать комплексы с VDAC и АНТ (рис. 23), одной из задач работы было проверить гипотезу об участии TSPO в импорте ДНК в митохондрии растений.

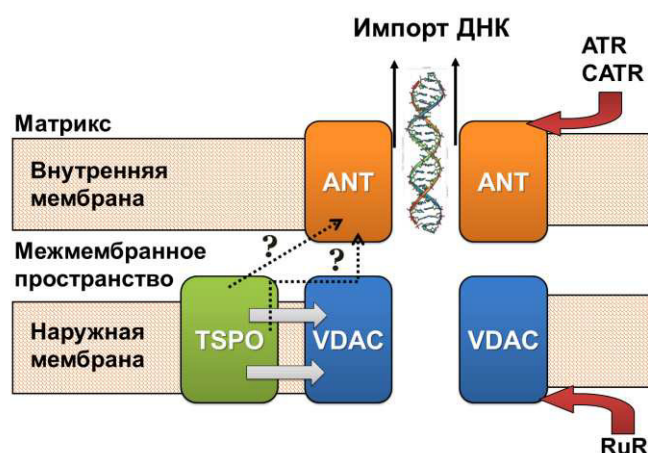


Рис. 23. Схема импорта ДНК в митохондрии

На рисунке представлено предположительное взаимодействие митохондриальных белков VDAC, ANT и TSPO в зонах контактов наружной и внутренней мембран. Указаны ингибиторы

транспортных белков - рутений красный (RuR), атрактилозид и карбоксиатрактилозид (ATR и CATR, соответственно).

С этой целью нами была проведена серия экспериментов по изучению эффективности импорта ДНК двух размерных классов (малой и средней длины) в митохондрии, изолированные из растений арабидопсиса с инактивированным геном *TSP0*. Для экспериментов использовали митохондрии, очищенные из 3-недельных проростков арабидопсиса дикого типа Col-0 и мутантной линии *tspo*. Выделенные митохондрии (в количестве 100 мкг митохондриального белка) инкубировали с флуоресцентно мечеными (содержащими краситель Cy3) фрагментами ДНК. После инкубации с ДНК, обработки ДНКазой и последующих отмывок митохондриальную ДНК экстрагировали и анализировали (1) посредством электрофоретического разделения в агарозном геле и визуализации флуоресценции импортированных ДНК-субстратов (рис. 24, а; 25, а), либо (2) с помощью ПЦР-РВ (рис. 24, б; 25, б, в). Все тестируемые в экспериментах по импорту фрагменты ДНК в своем составе содержали последовательности гена *GFP*, чужеродного митохондриальному геному, что позволяло проводить количественный анализ в ПЦР с помощью соответствующих специфических праймеров.

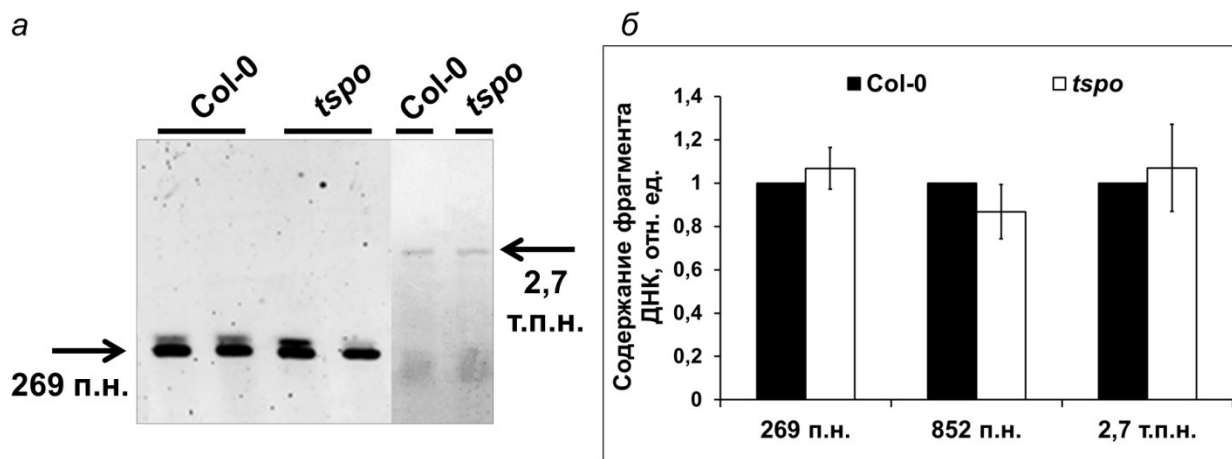


Рис. 24. Анализ импорта ДНК разной длины в митохондрии арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутанта (*tspo*) с использованием флуоресцентного анализа (а) и количественной ПЦР (б)

а) Электрофоретическое разделение митохондриальной ДНК после импорта флуоресцентно меченых фрагментов ДНК размером 269 п.н. и 2,7 т.п.н. Визуализация флуоресцентно меченых фрагментов проведена посредством сканирования флуоресценции; б) количественный ПЦР-анализ импортированных фрагментов ДНК, размером 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н., которые были экстрагированы из митохондрий после импорта вместе с митохондриальной ДНК. Количество импортированных фрагментов ДНК (последовательности гена *GFP*) нормировали на содержание в пробе митохондриального гена *NAD4*. Уровень импорта экзогенного фрагмента ДНК в митохондрии арабидопсиса из линии Col-0 принят за условную

единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграмме обозначают стандартные отклонения.

В первой серии экспериментов было проведено тестирование эффективности импорта в митохондрии субстратов ДНК длиной 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н., в количестве 500 нг. Показано, что импорт всех трех использованных ДНК-субстратов был одинаково эффективен в митохондриях мутантной линии *tspo* и дикого типа (рис. 24).

На следующем этапе исследования мы решили провести эксперимент, в котором для импорта в митохондрии арабидопсиса линий дикого типа и *tspo* была использована более высокая концентрация субстрата ДНК, добавленного в среду инкубации. На рисунке 25 представлены результаты эксперимента, в котором митохондрии инкубировали с 1 мкг ДНК фрагмента 269 п.н. или с 2 мкг ДНК фрагмента 852 п.н. Следует отметить, что при использовании повышенной концентрации ДНК в случае фрагмента размером 852 п.н. произошло снижение эффективности импорта (примерно в 2 раза) в митохондриях, изолированных из линии *tspo*, по сравнению с уровнем импорта в митохондриях дикого типа (рис. 25, а, б). При этом отсутствие в митохондриях белка TSPO не оказало влияния на импорт ДНК малой длины ни при использовании стандартной, ни повышенной концентраций ДНК, что было показано как с помощью количественного ПЦР-анализа (рис. 25, в), так и с применением флуоресцентного анализа импортированной ДНК (данные не приведены).

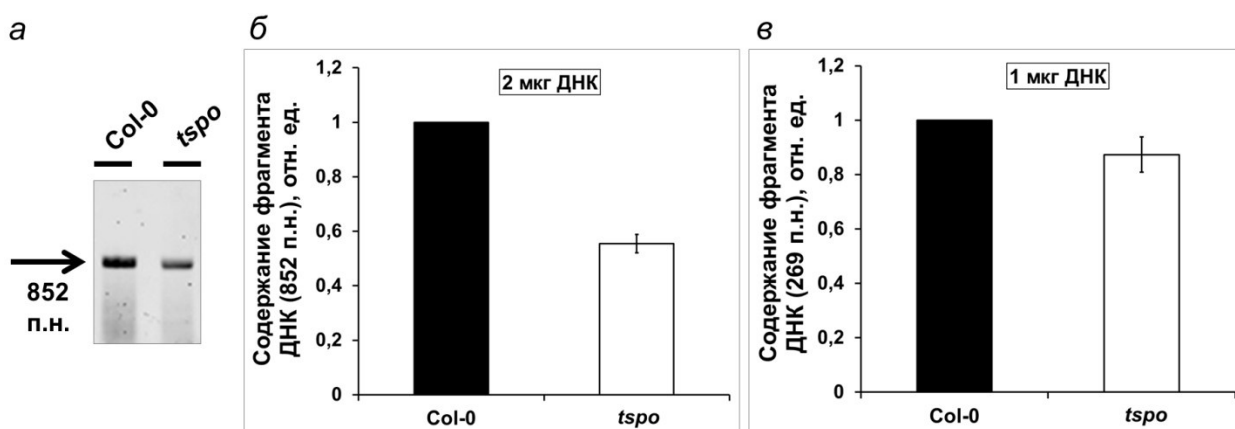


Рис. 25. Анализ импорта ДНК повышенной концентрации в митохондрии арабидопсиса дикого типа (Col-0) и нокаут-мутанта *tspo*

а) Результат флуоресцентного анализа импорта фрагмента ДНК размером 852 п.н., взятого в количестве 2 мкг; б) и в) количественный ПЦР-анализ импортированных фрагментов ДНК, размером 852 п.н.; б) и 269 п.н. (в). Представлено относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК).

Уровень импорта экзогенного фрагмента ДНК в митохондрии арабидопсиса из линии Col-0 принят за условную единицу. Представлены результаты не менее трех биологических повторностей. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения.

Исходя из полученных нами результатов по импорту ДНК малой и средней длины в митохондрии мутантной линии арабидопсиса, у которой отсутствует митохондриальный бензодиазепиновый рецептор МБР/TSPO, следует заключить, что роль этого белка наружной мембраны митохондрий в случае транспорта ДНК исследованной длины, скорее всего, незначительна, хотя и может отчасти быть специфичной в отношении размера импортируемых молекул. Если принять во внимание полученные нами результаты по кинетике импорта (пункт 3.2), которая показала, с одной стороны, неспецифичность импорта ДНК малой длины в растительные митохондрии, а с другой стороны ступенчатую зависимость интенсивности этого процесса от концентрации ДНК для молекул средней длины, можно предположить, что (1) TSPO, скорее всего, не является частью основного канала или поры, участвующей в транспорте ДНК через митохондриальную мембрану; (2) однако, этот белок может быть частью какого-то другого транспортного пути, который «подключается» к процессу переноса более крупных молекул ДНК в случае избыточного их количества в среде инкубации. Все эти наблюдения, тем не менее, связаны с использованной нами системой *in organello* и нуждаются в дополнительных исследованиях *in vivo*.

3.3.3. Изучение роли в механизме импорта ДНК изоформ VDAC

Участие VDAC в процессе импорта ДНК было установлено в самых первых работах по изучению импорта ДНК в митохондрии растений (Koulintchenko et al., 2003). В дальнейшем была подтверждена роль митохондриального порина в транспорте ДНК в митохондрии млекопитающих (Koulintchenko et al., 2003) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009). Для митохондрий человека показано, что порин может находиться не только в мономерном состоянии, но и формировать олигомерные комплексы (ди-, три-, тетрамерные и более) (Betaneli et al., 2012; Keinan et al., 2013; Shoshan-Barmatz et al., 2010). Полагают, что в олигомерном состоянии VDAC способен формировать поры значительно большего диаметра. Показано, что такие олигомерные комплексы VDAC характерны и для митохондриальной мембраны картофеля (Hoogenboom et al., 2007). Олигомеризация VDAC, очевидно, представляет собой

динамичный процесс, зависящий от многих факторов, в том числе, взаимодействия с различными другими белками. Известно, что во внешней мембране митохондрий арабидопсиса присутствует 4 изоформы VDAC, которые имеют различия в клеточной локализации, своих структурных компонентах и выполняемых функциях (Tateda et al., 2011).

Предыдущие исследования роли VDAC в импорте ДНК проводили с использованием ингибиторов - рутения красного (англ. Ruthenium Red, RuR), 4,4'-диизотиоциано-2,2'-стильбен-дисульфоновой кислоты (англ. 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid, DIDS) и специфичных антител. В рамках данной работы мы осуществили более детальное исследование участия VDAC в механизме импорта ДНК с помощью инсерционных мутантов с инактивированными функциями одной из четырех изоформ арабидопсиса: *vdac1*, *vdac2*, *vdac3*, *vdac4*.

3.3.3.1. Изучение участия изоформ VDAC в процессе импорта ДНК в системе *in organello*

Для проведения исследований в системе *in organello* были использованы две мутантные линии, *vdac1* и *vdac3*, поскольку для этих линий, в отличие от частично стерильных линий *vdac2* и *vdac4*, оказалось возможным выращивать достаточное для выделения митохондрий количество растительного материала. Для проведения экспериментов митохондрии изолировали из 3-недельных проростков арабидопсиса дикого типа и нокаут-мутантов *vdac1* и *vdac3*. В качестве субстратов импорта использовали флуоресцентно меченые фрагменты ДНК (полученные с помощью Cu^{2+} -содержащих праймеров) размером 269 п.н. (ДНК малой длины), 852 п.н. / 2,7 т.п.н. (ДНК средней длины), и 9 т.п.н. (ДНК большой длины). Анализ эффективности импорта проводили посредством электрофоретического разделения в агарозном геле и визуализации с помощью сканера флуоресценции (рис. 26, а, б), либо с помощью ПЦР-РВ (рис. 26, в, г).

Исходя из результатов сканирования флуоресценции и анализа в количественной ПЦР, митохондрии, выделенные из мутанта, характеризующегося отсутствием изоформы VDAC1, транспортировали ДНК с большей эффективностью в сравнении с митохондриями дикого типа (рис. 26, а, в). При этом, усиление активности митохондриального импорта у этого мутанта не выказало специфичности в отношении длины транспортируемой молекулы ДНК: для всех четырех тестируемых

субстратов (269 п.н., 852 п.н., 2,7 т.п.н. и 9 т.п.н.) мы наблюдали стимуляцию процесса. Импорт фрагмента 269 в митохондрии был несколько более эффективным (усиление в 5 раз) в сравнении с импортом в митохондрии дикого типа, чем импорт фрагментов средней и большой длин (активация в 2,5-3,5 раза).

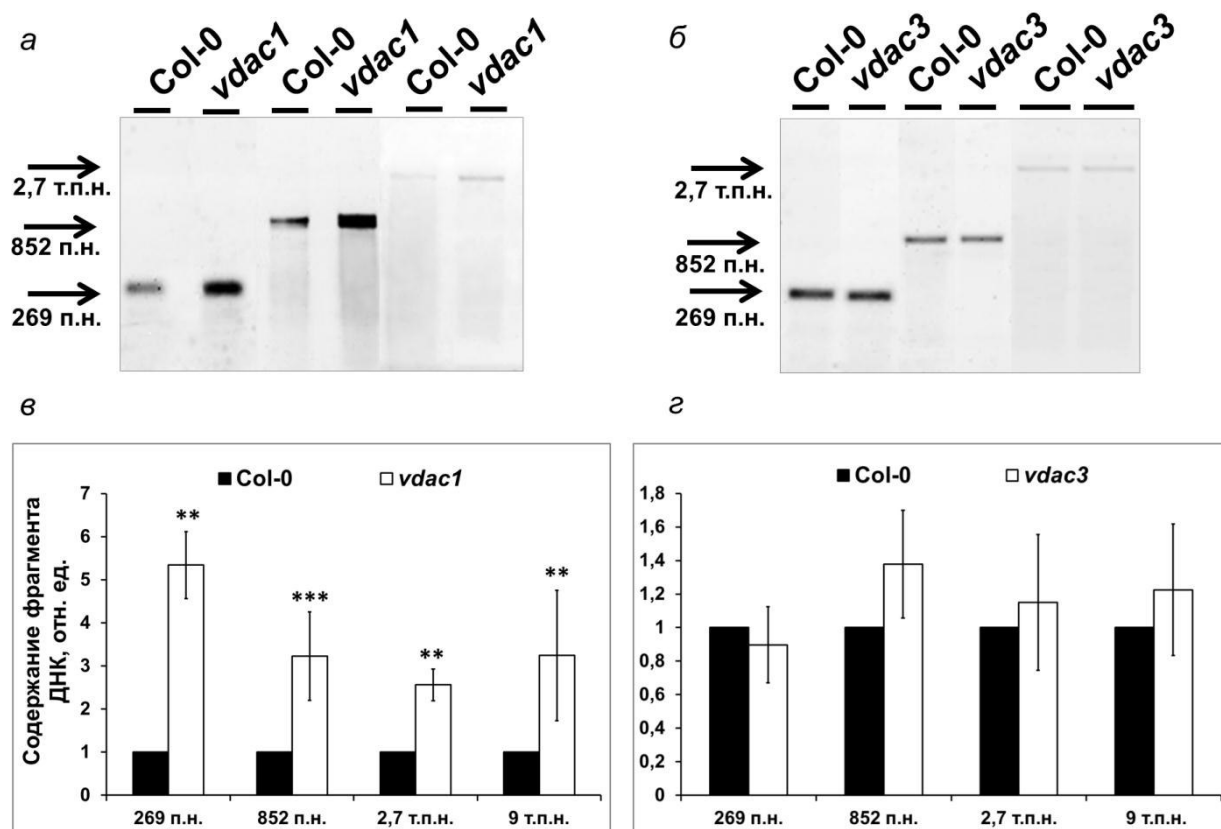


Рис. 26. Анализ импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутантов по изоформам VDAC (*vdac1* и *vdac3*)

(а, б) Представлен результат анализа импорта флуоресцентно меченой ДНК. Импорт ДНК размером 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. проводили в митохондриях, изолированных из проростков дикого типа (Col-0), нокаут-мутанта *vdac1* (в) и нокаут-мутанта *vdac3* (з). Визуализация флуоресцентно меченых фрагментов проведена с помощью сканера GE Healthcare; (в, з) анализ импорта ДНК разной длины с использованием ПЦР-РВ. В митохондриях, изолированных из проростков дикого типа и мутантов *vdac1* и *vdac3*, проводили импорт фрагментов ДНК размером 269 п.н., 852 п.н., 2,7 т.п.н. и 9 т.п.н. После импорта митохондриальную ДНК экстрагировали и использовали для анализа в количественной ПЦР. На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Представлены данные не менее 5 независимых биологических повторностей. Уровень импорта экзогенного фрагмента ДНК в митохондрии арабидопсиса из линии Col-0 принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения; ** – статистически значимые различия при $P \leq 0,01$ или 0,02, *** – при $P \leq 0,001$.

Для митохондрий, выделенных из нокаут-мутанта *vdac3*, мы наблюдали отсутствие каких-либо значимых изменений в эффективности импорта субстратов ДНК всех четырех тестируемых длин по сравнению с импортом этих молекул ДНК в митохондрии дикого типа. Это было показано с помощью обоих использовавшихся

для анализа методов: визуализацией флуоресценции (рис. 26, б) и количественной ПЦР (рис. 26, г).

3.3.3.2. Изучение участия изоформ VDAC в процессе импорта ДНК в системе *in vivo*

Исследования импорта ДНК в клетках животных и растений до настоящего времени оставались ограниченными системой изолированных митохондрий. На основе метода PEG-опосредованной трансформации протопластов арабидопсиса (Yoo et al., 2007) нами был разработан подход, позволяющий детектировать транспорт ДНК из цитоплазмы в митохондрии, происходящий в протопластах арабидопсиса (см. п. 3.1.3). Данный подход мы применили для продолжения исследований участия в импорте ДНК разной длины всех четырех изоформ митохондриального порина, с использованием протопластов, полученных из листьев растений дикого типа (Col-0) и четырех мутантных линий, у которых инактивирована одна из изоформ порина. В качестве субстрата импорта для трансформации одного образца протопластов была использована ДНК фрагмента длиной 2,7 т.п.н. в количестве 2,5 мкг.

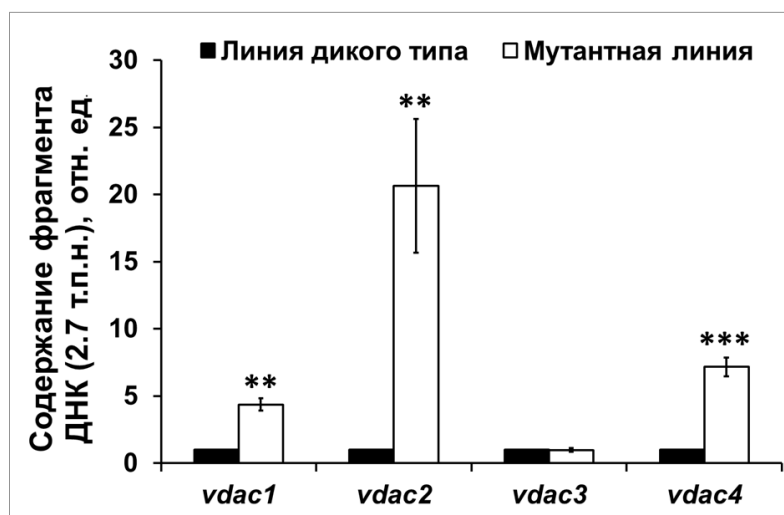


Рис. 27. Анализ импорта ДНК *in vivo* в митохондрии протопластов арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутантов по изоформам VDAC (*vdac1*, *vdac2*, *vdac3*, *vdac4*)

Протопласты трансформировали фрагментом ДНК размером 2,7 т.п.н. После инкубации в течение 20 ч и выделения митохондрий, мтДНК экстрагировали и использовали для анализа в количественной ПЦР (ПЦР-РВ). На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Представлены данные не менее трех независимых биологических повторностей. Уровень импорта фрагмента 2,7 т.п.н. в митохондрии арабидопсиса линии Col-0 принят за условную единицу. Допуски на диаграмме представляют среднеквадратичные ошибки; ** – статистически значимые различия при $P \leq 0,01$ или 0,02, *** – при $P \leq 0,001$.

Как следует из результата, представленного на рисунке 27, интенсивность транслокации ДНК в митохондриях в протопластах мутанта *vdac1* была выше интенсивности импорта, выявленного в митохондриях протопластов дикого типа, в 4-5 раз. Импорт ДНК в митохондриях протопластов *vdac3* оставался на уровне, показанном для дикого типа (рис. 27). Таким образом, данные по эффективности импорта ДНК для нокаут-мутантов *vdac1* и *vdac3*, полученные с помощью системы трансформации протопластов, полностью подтвердили результаты экспериментов с изолированными митохондриями.

При использовании для трансформации фрагментом 2,7 т.п.н. протопластов двух других мутантных линий арабидопсиса, *vdac2* или *vdac4*, мы также наблюдали стимуляцию митохондриального импорта ДНК по сравнению с его интенсивностью в линии дикого типа (рис. 27). При этом, если в митохондриях нокаут-мутанта *vdac4* импорт усиливался примерно в 7 раз, то в митохондриях линии *vdac2* его усиление было наиболее выраженным, в среднем почти в 20 раз (рис. 27).

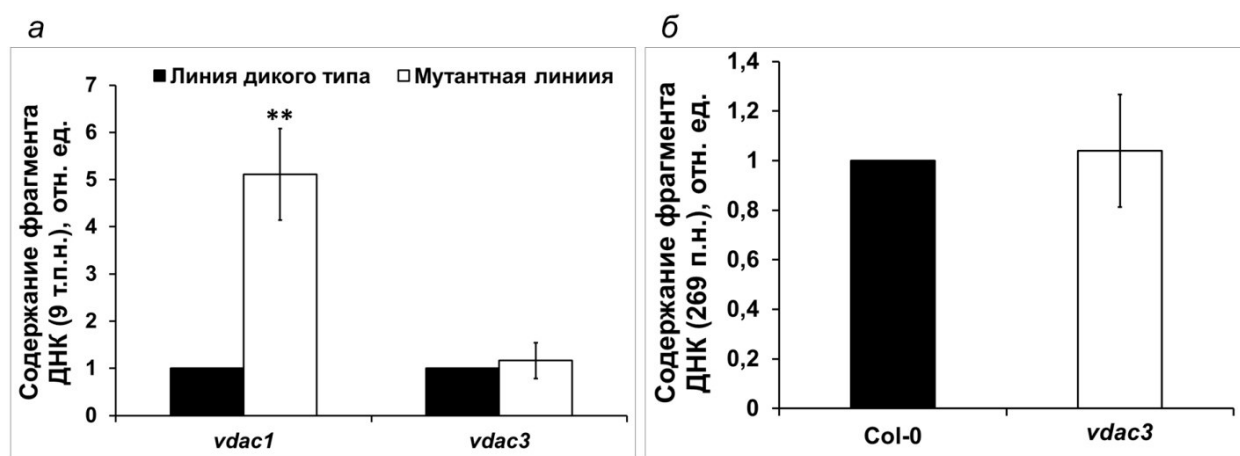


Рис. 28. Анализ импорта ДНК в митохондриях протопластов арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и мутантов по изоформам *VDAC* (*vdac1* и *vdac3*)

Протопласты трансформировали фрагментами ДНК размером 9 т.п.н. (а) и 269 п.н. (б). После инкубации в течение 20 ч и выделения митохондрий, мтДНК экстрагировали и использовали для анализа в количественной ПЦР. На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Представлены данные не менее трех независимых биологических повторностей. Уровень импорта экзогенного фрагмента ДНК в митохондриях арабидопсиса из линии дикого типа (*Col-0*) принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения; ** – статистически значимые различия при $P \leq 0,01$.

В следующей серии экспериментов для трансформации протопластов была использована ДНК другого размерного класса, имеющая длину 9 т.п.н. (рис. 28, а). Поскольку стимуляция митохондриального импорта ДНК средней длины была

показана в протопластах трех мутантных линий арабидопсиса, для этого исследования была выбрана линия *vdac1*, обладающая лучшей скоростью роста, по сравнению с мутантными линиями *vdac2* и *vdac4*. Для выяснения возможной роли изоформы VDAC3 в импорте ДНК разной длины наряду с субстратом длиной 9 т.п.н. был использован также фрагмент малой длины, 269 п.н.

Как следует из полученного результата (рис. 28, *а*), эффект стимуляции импорта в митохондриях протопластов *vdac1* сохранялся и для субстрата ДНК размером 9 т.п.н. Эффективность импорта ДНК как большой (9 т.п.н.), так и малой (269 т.п.н.) длины в митохондриях протопластов линии *vdac3* не отличалась от таковой в митохондриях протопластов линии дикого типа (рис. 28, *а*; рис. 28, *б*), свидетельствуя о том, что отсутствие изоформы VDAC3 в митохондриальной мембране не оказывает влияния на процесс импорта ДНК любой длины.

Таким образом, данные по импорту ДНК разной длины в митохондриях мутантных линий *vdac1* и *vdac3*, полученные в экспериментах *in organello*, были полностью подтверждены данными, полученными в экспериментах *in vivo*. Большая выраженность активации импорта, выявленная в экспериментах *in vivo*, может быть обусловлена влиянием каких-то клеточных факторов, которые могут усиливать процесс транслокации ДНК в митохондриях своим взаимодействием с белками внешней митохондриальной мембраны. Такого рода взаимодействие осуществляется, например, в контактных сайтах митохондриальной и эндоплазматической мембран.

В настоящее время сложно однозначно объяснить наблюдаемое нами явление стимуляции митохондриального импорта ДНК в отсутствие изоформ VDAC. Можно предположить, что транслокации ДНК в митохондриях способствует отсутствие барьерной функции порина в митохондриальной мембране. Известно, что из четырех изоформ порина наиболее важными для нормального роста и развития растительного организма являются VDAC2 и VDAC4, а наименее важна для митохондриальных функций изоформа VDAC3 (Tateda et al., 2011). Отсутствие белка VDAC2 или VDAC4 в мутантных линиях приводит к большему снижению мембранного потенциала, чем отсутствие белка VDAC1 или VDAC3. Все это говорит о том, что с внешней мембраной митохондрий мутантных линий *vdac2* и *vdac4* могут происходить значительные изменения вследствие (1) дестабилизации и

перестройки мембраны с последующим усилением проницаемости для молекул, (2) явления компенсации отсутствия этих белков в мембране митохондрий путем увеличения количества других мембранных белков. Последнее косвенно подтверждается нашими данными, полученными при анализе экспрессии генов, кодирующих изоформы VDAC (см. п. 3.3.5.3.).

По всей видимости, мы наблюдаем сложное взаимодействие не менее двух механизмов транслокации ДНК через митохондриальную мембрану. И роль поринов в этих механизмах может быть даже противоположной: в одном случае перенос молекул ДНК может происходить посредством поры, формируемой с участием VDAC (а также АНТ), и этот механизм способствует транслокации ДНК, в другом – определенные состояния VDAC могут препятствовать проникновению ДНК. При этом ДНК малой длины может переноситься в митохондрии посредством как предполагаемой поры VDAC-АНТ, так и посредством других переносчиков, в том числе фосфатного переносчика, а также механизма импорта тРНК (Weber-Lotfi et al., 2015).

3.3.3.3. Анализ экспрессии генов, кодирующих изоформы VDAC, в нокаут - мутантах по одной из его изоформ

Исходя из имеющихся в нашем распоряжении фактов, а именно: (1) в импорте ДНК в митохондрии участвует белок внешней митохондриальной мембраны VDAC (Koulintchenko et al., 2003, 2006; Weber-Lotfi et al., 2009); (2) в митохондриях арабидопсиса присутствуют четыре функциональные изоформы VDAC (Tateda et al., 2011); (3) отсутствие изоформ VDAC1, VDAC2 и VDAC4 приводит к значительной активации импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса - мы решили проанализировать уровни экспрессии кодирующих изоформы VDAC генов в мутантных линиях арабидопсиса, у которых отсутствует одна из изоформ этого белка. Для этих экспериментов были использованы линии мутантов арабидопсиса с инактивированными генами, кодирующими четыре изоформы митохондриального порина. Из 12-ти дневных проростков этих растительных линий была выделена РНК и использована для проведения ОТ-ПЦР с помощью праймеров, специфичных к последовательностям генов, кодирующих изоформы VDAC.

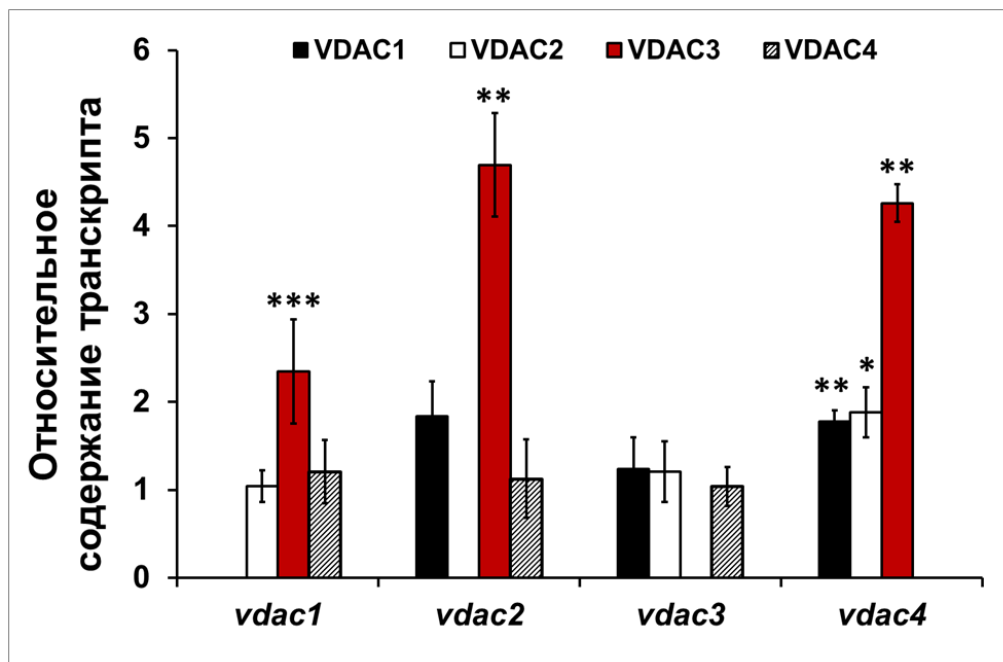


Рис. 29. Содержание транскриптов генов, кодирующих изоформы VDAC, в линиях арабидопсиса, мутантных по одной из его изоформ (*vdac1*, *vdac2*, *vdac3*, *vdac4*)

Представлены данные трех биологических повторностей. Для нормализации был использован ядерный ген *YLS8*. Уровень транскрипта в линии Col-0 принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения. * – статистически значимые различия при $P \leq 0,05$, ** – при $P \leq 0,01$ или $0,02$, *** – при $P \leq 0,001$.

На рисунке 29 представлены данные анализа уровней экспрессии генов изоформ митохондриального порина (VDAC1, VDAC2, VDAC3 и VDAC4) в исследуемых растительных линиях. Как упоминалось выше, из всех четырех изоформ VDAC наименее важной для митохондриальных функций является VDAC3 (Tateda et al., 2011). Наш анализ косвенно подтверждает это: в мутанте *vdac3* наименее всего выражен компенсаторный эффект усиления экспрессии других изоформ VDAC. Для VDAC2 и VDAC4 уровень экспрессии в мутанте *vdac3* остается на уровне дикого типа, уровень экспрессии VDAC1 увеличен незначительно, в 1,3 раза. Отсутствие VDAC2 и VDAC4 компенсируется, в основном, в обеих мутантных линиях, усилением экспрессии VDAC3 (в 4-4,5 раза), и отчасти (в 1,5-1,8 раз) активацией экспрессии VDAC1 и VDAC2 в мутанте *vdac4*. Данный результат согласуется с литературными данными о том, что клеточные функции изоформ VDAC2 и VDAC4 не являются комплементарными. При этом функции VDAC2 наиболее невосполнимы для клетки, о чем свидетельствуют и фенотипические характеристики мутантной линии *vdac2* (медленный рост и развитие, практически полная стерильность). Для линии *vdac1* характерна

небольшая стимуляция экспрессии VDAC4 и более значимая активация экспрессии VDAC3.

Активация экспрессии VDAC3 в линиях арабидопсиса, лишенных одной из изоформ порина (VDAC1, VDAC2 или VDAC4), может быть связана с включением клеточного механизма, направленного на компенсацию недостающего транспортного белка митохондриальной мембраны. Однако эта активация неспособна компенсировать мутантный фенотип линий *vdac2* и *vdac4*, имеющих значительные нарушения в развитии и фертильности (Tateda et al., 2011; наши данные). Является ли VDAC3 искомым ключевым фактором импорта во внешней митохондриальной мембране, остается неясным. Против этого предположения свидетельствуют данные, показывающие отсутствие снижения интенсивности импорта ДНК в митохондриях мутанта *vdac3*.

3.3.4. Изучение участия в механизме импорта ДНК белка наружной мембраны митохондрий OM47

Внешняя митохондриальная мембрана считается полупроницаемой благодаря наличию в своем составе белков с цилиндрической структурой β -типа, которые облегчают прохождение молекул размером до ~ 5 кДа (Hombler et al., 2012). Известно, что β -структурные белки в большом количестве присутствуют в клеточных мембранах грамотрицательных бактерий. В мембране они формируют ряды β -слоев в диапазоне от 8 до 24 (Fairman et al., 2011), и образуют поры, через которые происходит транспорт метаболитов. Интересно, что бактериальными геномами кодируются около 50 белков с β -цилиндрической структурой (Wimley, 2003); поэтому не удивительно, что после эндосимбиоза хлоропласты и митохондрии сохранили в структуре своих мембран некоторые из этих β -цилиндрических белков.

Митохондрии, как правило, содержат три типа β -цилиндрических белков. К ним относятся четыре изоформы VDAC, участвующие в обмене метаболитов (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011); две изоформы транслоказы наружной митохондриальной мембраны 40 (TOM40), главного канала, осуществляющего транспорт почти всех белков в митохондрии (Murcha and Whelan, 2015); и две изоформы субъединицы 50 (SAM50) мембранного комплекса, участвующего в сортировке и сборке белков с β -цилиндрической структурой и в процессе их встраивания в наружную митохондриальную мембрану (Murcha and Whelan, 2015).

Один из недавно исследованных белков наружной мембраны митохондрий арабидопсиса OM47 (от англ. 47 kDa Outer Membrane protein) (Duncan et al., 2011) привлек наше внимание в качестве потенциального кандидата на участие в механизме транслокации ДНК. Как и для других известных трансмембранных белков, участвующих в транспорте белков, нуклеиновых кислот и других метаболитов в митохондрии, для этого белка характерны наличие β -цилиндрической структуры и потенциальная способность к анионно-транспортной активности (Li et al., 2016). Известно также, что OM47 является одним из предполагаемых участников аппарата N-миристоилирования – посттрансляционной модификации, влияющей на ассоциацию цитоплазматических белков с мембранами (Boisson et al., 2003). Этот белок специфичен для растений (Gutiérrez et al., 2004). В работе Duncan et al. (2011) были высказаны предположения о том, что OM47 может играть весьма значимую роль во взаимодействии между цитоплазматическими белками и белками наружной митохондриальной мембраны. Показана потенциальная способность OM47 к осуществлению транспорта метаболитов, однако то, какими конкретно могут быть эти метаболиты, пока еще не определено (Li et al., 2016).

Исходя из вышеизложенных фактов, свидетельствующих о способности OM47 участвовать в транспорте различных метаболитов в митохондриях арабидопсиса, мы провели эксперименты, направленные на выяснение роли этого белка в механизме импорта ДНК, с использованием разработанного нами комплексного подхода изучения этого процесса *in organello* и *in vivo*.

Для инкубации с изолированными митохондриями растений дикого типа и мутантной линии *om47* использовали 500 нг флуоресцентно меченого субстрата ДНК размером 2,7 т.п.н. После инкубации с ДНК и ДНКазной обработки, наружную митохондриальную мембрану разрушали для удаления связанной, но не импортированной ДНК. Анализ ДНК, экстрагированной из полученных таким образом митопластов, проводили двумя способами: с помощью (1) флуоресцентного анализа в агарозном геле (рис. 30, а, левая часть рисунка), и (2) количественной ПЦР, позволяющий оценить относительное количество фрагмента импортированного ДНК-субстрата, нормированное на количество фрагмента митохондриального гена *NAD4* (рис. 30, а, правая часть рисунка).

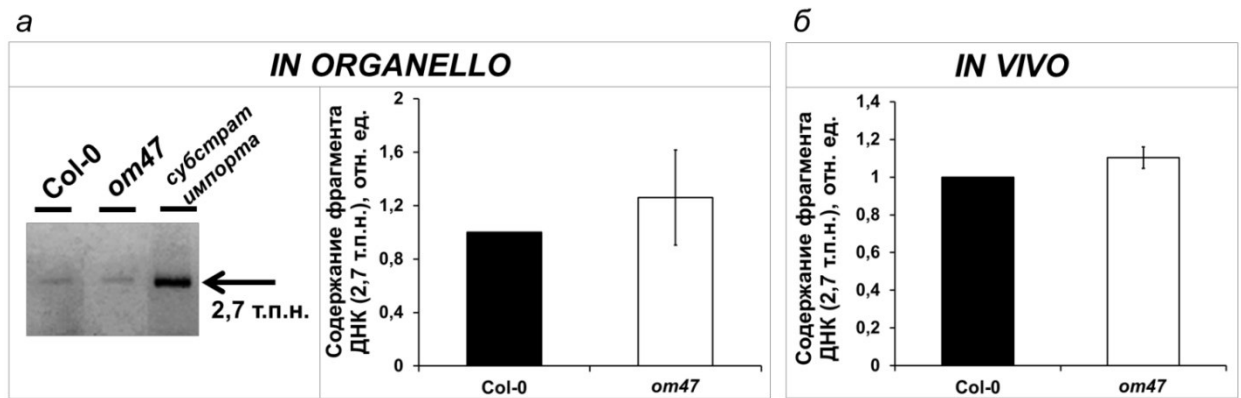


Рис. 30. Анализ импорта ДНК в митохондрии линий арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутанта *om47*, проведенного *in organello* (а) и *in vivo* (б)

(а – левая часть рисунка) Результат флуоресцентного анализа импорта фрагмента ДНК размером 2,7 т.п.н. После импорта в изолированные митохондрии флуоресцентно меченой ДНК, митохондриальная ДНК была экстрагирована и разделена в агарозном геле, субстрат импорта нанесен на гель в количестве 3 нг; (а – правая часть рисунка, и б) на графиках представлены результаты анализа импорта в количественной ПЦР. Показано относительное количество импортированной ДНК, нормированное к митохондриальному гену *NAD4*. Уровень импорта в линии Col-0 принят за условную единицу. Представлены данные не менее трех независимых биологических повторностей. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения.

Исходя из полученных данных (рис. 30, а), очевидно, что отсутствие в митохондриях белка ОМ47 не оказало существенного влияния на импорт ДНК в изолированные митохондрии арабидопсиса. В митохондрии *om47*, по сравнению с импортом в митохондрии дикого типа, импорт ДНК происходил с незначительной, в 1,3 раза, стимуляцией.

Далее мы провели эксперименты по изучению возможной роли ОМ47 в импорте ДНК в митохондрии протопластов с использованием системы, описанной в (пункт 3.1.3.). На рисунке 30 (б) представлены данные анализа эффективности импорта в митохондрии, выделенные из трансформированных протопластов, осуществленного с помощью ПЦР в реальном времени. Как следует из полученного результата, эффективность импорта экзогенной ДНК в митохондрии протопластов мутантной линии *om47* не отличалась от таковой в митохондрии дикого типа.

Таким образом, вне зависимости от способа проведения исследования митохондриального импорта ДНК (изолированные митохондрии или протопласты), мы не обнаружили значимости для данного процесса кандидатного белка внешней митохондриальной мембраны ОМ47. Совпадение результатов, полученных *in organello* (рис. 30, а) и *in vivo* (рис. 30, б) указывает на то, что даже с учетом своего возможного участия в формировании различных мембранных структур, например

таких, которые обеспечивают ассоциацию митохондрий с ЭР, отсутствие белка OM47 в митохондриальной мембране не приводит к каким-либо значимым изменениям в эффективности импорта ДНК в эти органеллы.

Следует отметить, что в работе (Li et al., 2016) была показана способность OM47 к комплементации функций VDAC в мутантном по этому белку штамме дрожжей. При этом не было выявлено какой-либо значимости OM47 для импорта белков-предшественников в экспериментах *in vitro* с использованием митохондрий арабидопсиса дикого типа и мутанта *om47*. На основании этих наблюдений, авторами было сделано заключение, что OM47, в отличие от двух других белков, содержащих β -цилиндрическую структуру, TOM40 и SAM50, не играет роли в импорте белка, но может играть сходную с VDAC роль в транспорте небольших метаболитов. Более того, было показано, что OM47 играет роль в старении листьев арабидопсиса, вероятно, обеспечивая восстановление и рециркуляцию продуктов распада хлоропластов путем транспортировки метаболитических интермедиатов из и внутрь митохондрий (Lu Li, 2016). Вполне возможно, что функции OM47 в транспортных процессах митохондрий при формировании проводящих каналов или участии в ассоциации митохондриальной мембраны с цитоплазматическими белками и другими клеточными органеллами специализированы на переносе низкомолекулярных метаболитов до ~ 5 кДа (Hornle et al., 2012), и не связаны с транспортом макромолекул, как белков, так и нуклеиновых кислот. Таким образом, исходя из совокупности литературных и наших данных, скорее всего, не удивительно, что исключение этого белка из состава митохондриальной мембраны не оказало критического влияния на процесс транспорта ДНК в митохондрии.

3.3.5. Изучение участия в механизме импорта ДНК белка внутренней мембраны митохондрий MIC60

Известно, что между различными клеточными органеллами постоянно происходит обмен метаболитами и сигнальными молекулами, и этот процесс опосредован формированием мембранных контактных сайтов (Kornmann, 2013). Типичным примером такого рода контактных сайтов является взаимодействие мембран эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Физиологическая роль мембранных контактов между ЭР и митохондриями не ограничивается обменом липидов и ионов кальция и может быть значительно шире. Например, в клетках

дрожжей и млекопитающих контакты ЭР с митохондриями способствуют их делению (Friedman et al., 2011). У дрожжей описаны два участвующих в формировании контактов ЭР и митохондрий мембранных комплекса: ERMES (от англ. ER mitochondria encounter structure), однозначно идентифицированный только у грибов (Lee and Hong, 2006), и структурообразующий белковый комплекс внутренней мембраны MICOS (от англ. mitochondrial inner membrane organizing system). Оба комплекса вовлечены не только в транспорт и обмен липидов, метаболитов и ионов, но также в импорт белков и поддержание структуры мтДНК (Murley et al., 2013).

До настоящего времени у растений не установлено существование комплекса MICOS, однако, проведенный недавно (Munoz-Gomez et al., 2015) филогенетический анализ выявил, что две субъединицы этого комплекса являются консервативными для всех эукариот. В арабидопсисе были идентифицированы гомологи этих двух субъединиц, MIC60 и MIC10 (At4g39690 и At1g22520). MIC60, подобно своему гомологу в дрожжах, локализуется во внутренней мембране, где взаимодействует с TOM40. Показано, что MIC60 способен дестабилизировать мембрану и может облегчать обмен липидов между мембранами ЭР и митохондрий (Michaud et al., 2016). Предполагают, что MIC60 может быть вовлечен в регуляцию транспорта липидов в митохондриях, способствуя стягиванию внешней мембраны с внутренней, в сайтах контакта, обогащенных кардиолипином, посредством TOM40. В отсутствие MIC60 контакты между внешней и внутренней мембранами нарушаются, кроме того, в мутанте *mic60* показано снижение содержания белка TOM40 (Michaud et al., 2016). По совокупности вышеизложенных данных, есть все основания предположить, что MIC60 играет роль не только в импорте различных метаболитов клетки и белков, но так же, с учётом факта природной компетентности митохондрий поглощать молекулы нуклеиновых кислот, и в импорте ДНК.

Изучение роли белка MIC60 в импорте ДНК в растительные митохондрии осуществляли двумя подходами: с использованием изолированных митохондрий (*in organello*) и митохондрий протопластов арабидопсиса (*in vivo*). Митохондрии изолировали из 3-недельных растений арабидопсиса дикого типа Col-0 и мутантной линии *mic60*. Выделенные митохондрии (100 мкг) инкубировали с флуоресцентно меченым субстратом ДНК размером 2,7 т.п.н. (500 нг). После инкубации с ДНК, обработки ДНКазой и последующих отмывок, митохондриальную ДНК

экстрагировали и анализировали посредством электрофоретического разделения в агарозном геле и визуализации с помощью сканера флуоресценции. На рисунке 31 (а, левая часть) представлены результаты экспериментов по импорту флуоресцентно меченой ДНК в митохондрии, изолированные из растений дикого типа и мутанта *mic60*. Кроме того, анализ количества импортированной ДНК в изолированные митохондрии арабидопсиса проводили с помощью ПЦР-РВ (рис. 31, а, правая часть рисунка). Этот же способ количественной оценки импортированной в митохондрии ДНК был использован при анализе препаратов митохондриальной ДНК, экстрагированной из митохондрий после процедуры импорта ДНК в трансформированных протопластах арабидопсиса (рис. 31, б).

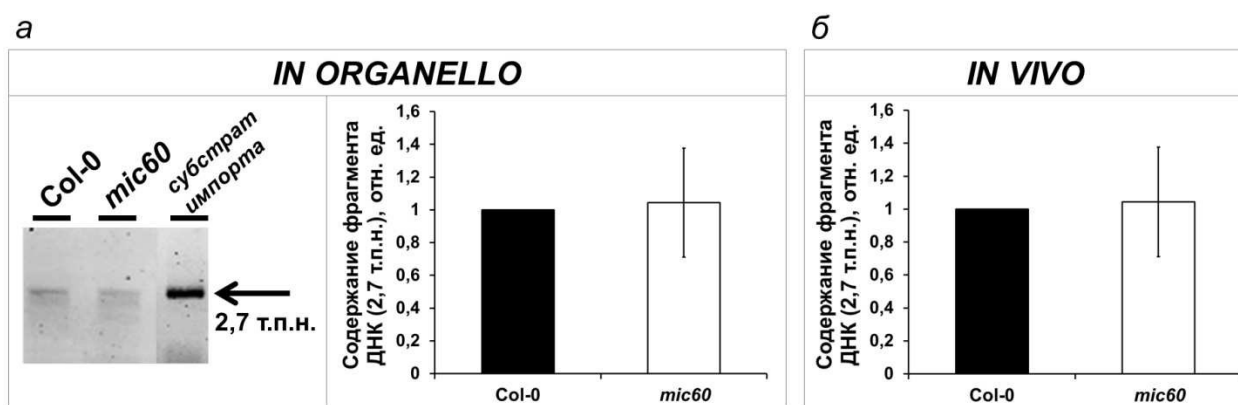


Рис. 31. Анализ импорта ДНК в митохондрии линий арабидопсиса дикого типа (Col-0) и мутанта *mic60*, проведенного *in organello* (а) и *in vivo* (б)

(а – левая часть рисунка) Результат флуоресцентного анализа импорта фрагмента ДНК размером 2,7 т.п.н. После импорта в изолированные митохондрии флуоресцентно меченой ДНК, мтДНК была экстрагирована и разделена в агарозном геле; субстрат импорта нанесен на гель в количестве 3 нг. (а – правая часть рисунка, и б) На графиках представлены результаты анализа импорта в количественной ПЦР. Показано относительное количество импортированной ДНК, нормированное к митохондриальному гену *NAD4*. Уровень импорта в линии Col-0 принят за условную единицу. Представлены данные не менее трех независимых биологических повторностей. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения.

Исходя из совокупности полученных данных, отсутствие в мембране митохондрий MIC60 не оказало влияния на импорт ДНК. Мы не наблюдали изменений в эффективности импорта ДНК в митохондрии *mic60* по сравнению с митохондриями Col-0 вне зависимости от способа проведения исследования митохондриального импорта ДНК - в изолированные митохондрии (рис. 31, а) или в митохондрии протопластов (рис. 31, б).

Таким образом, структурный белок MIC60, играющий роль в формировании контактных сайтов между митохондриальной мембраной и мембранами

эндоплазматического ретикулума, судя по полученному нами результату, не участвует в формировании какого-либо из транспортных путей, по которым ДНК транслируется в митохондрии.

3.3.6. Изучение возможной роли в механизме импорта ДНК белков DRP3A и DRP3B, участвующих в процессах деления митохондрий

Особенностью структурной организации хондриома растительной клетки является дискретность митохондриальной популяции (Logan, 2010). С использованием растений арабидопсиса было установлено наличие в растительной клетке аппарата деления митохондрий и идентифицировано несколько белковых участников этого процесса, характеризующихся взаимодополняющими функциями (Arimura et al., 2008; Fujimoto et al., 2009). В отличие от митохондриальной популяции в клетках животных и дрожжей, в растительной клетке аппарата слияния митохондрий не обнаружено. Исходя из этого, в нашем исследовании были использованы мутанты арабидопсиса, у которых нарушен процесс деления митохондрий. Ключевыми факторами в митохондриальном делении у арабидопсиса являются два белка, имеющие динамин-подобную структуру, DRP3A и DRP3B (Fujimoto et al., 2009; Aung and Hu, 2012). Как показано, эти белки функционально избыточны для митохондриального деления. Они локализуются на наружной поверхности митохондрий, а также в пероксисомах. Механизм их действия, как полагают, основан на их способности «стягивать» мембрану на последнем этапе деления. Инсерционные мутанты по генам этих белков, *drp3a* и *drp3b*, характеризуются тем, что их клетки содержат меньшее количество более длинных, по сравнению с клетками дикого типа, митохондрий. Целью следующего этапа нашего исследования стало изучение влияния структурно-функциональных изменений митохондрий на импорт ДНК *in organello* (на уровне изолированных митохондрий) и *in vivo* (в системе протопластов) с использованием мутантов арабидопсиса, у которых нарушены процессы деления этих органелл (*drp3a*, *drp3b*).

В изолированные из листьев арабидопсиса митохондрии, мутантные по белкам DRP3A или DRP3B, были импортированы фрагменты ДНК размером 2,7 т.п.н. (500 нг), несущие флуоресцентную метку в своем составе. Анализ проводили как с применением флуоресцентного анализа (рис. 32, левая часть рисунка; рис. 33,

а, левая часть рисунка), так и при помощи ПЦР-РВ (рис.32, правая часть; рис. 33, а, правая часть). Роль белка DRP3В исследовали также в системе *in vivo* с использованием протопластов арабидопсиса (рис.33, б).

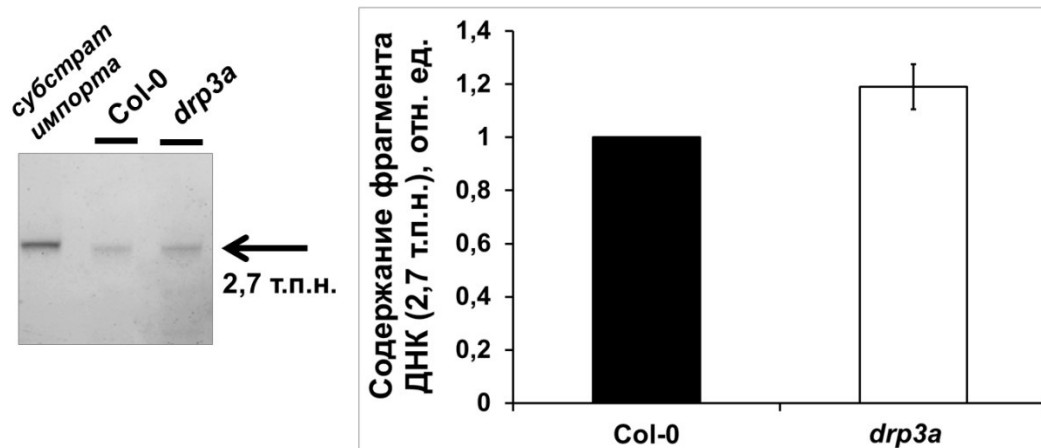


Рис. 32. Анализ импорта ДНК в митохондрии *A. thaliana* линий дикого типа (Col-0) и нокаут-мутанта *drp3a*

Левая часть рисунка: представлен результат анализа импорта флуоресцентно меченой ДНК. Импорт ДНК размером 2,7 т.п.н. проводили в митохондриях, изолированные из проростков дикого типа (Col-0) и мутанта *drp3a*. Визуализация флуоресцентно меченых фрагментов проведена с помощью сканера GE Healthcare; правая часть рисунка: представлен анализ импорта ДНК размером 2,7 т.п.н. с использованием ПЦР в реальном времени. На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Представлены данные не менее трех независимых биологических повторностей. Уровень импорта в линии Col-0 принят за условную единицу; допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения.

На рисунке 32 представлен результат анализа влияния отсутствия изоформы DRP3A в мембране митохондрий на процесс митохондриального импорта ДНК. Как видно из диаграммы (правая часть рисунка), эффективность импорта в митохондрии мутантной линии отличалась статистически незначимым отличием от таковой в митохондрии дикого типа (повышение в 1,2 раза). Интересно, что показатель величины дыхательного контроля (ДК) в митохондриях линии арабидопсиса с инактивированной функцией как DRP3A, так и DRP3B был несколько снижен (на 14 % и 9 %, соответственно) по сравнению с ДК митохондрий Col-0, однако статистически значимый результат показан только для *drp3a* ($P < 0,05$).

При анализе эффективности импорта ДНК в митохондрии линии арабидопсиса, мутантной по белку DRP3B, в экспериментах, проведенных в обеих используемых нами системах, *in organello* и *in vivo*, были получены сходные результаты (рис. 33). Согласно этим результатам, процесс импорта ДНК длиной

2,7 т.п.н. в митохондриях линии *drp3b* происходил с той же эффективностью, что и в митохондриях дикого типа (Col-0).

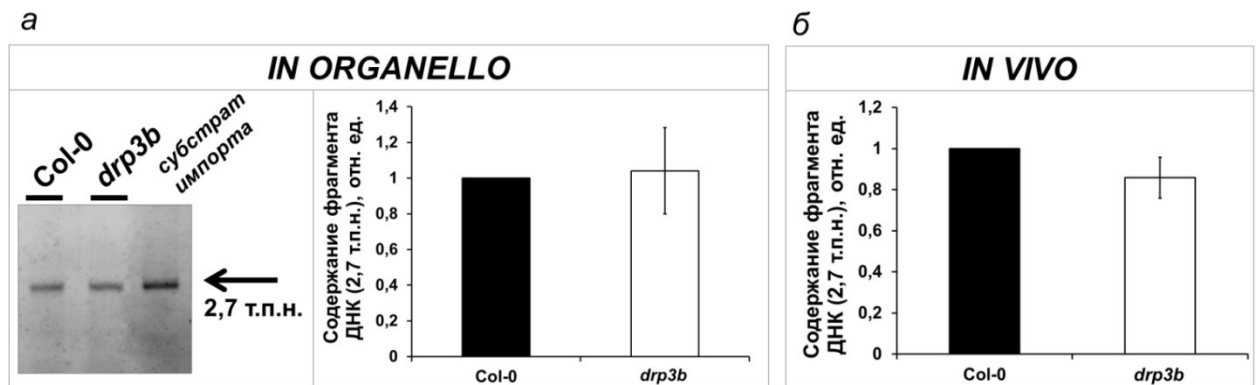


Рис. 33. Анализ импорта ДНК в изолированные митохондрии и митохондрии протопластов *A. thaliana* линий дикого типа (Col-0) и нокаут-мутанта *drp3b*

Представлен результат анализа импорта флуоресцентно меченой ДНК (а, левая часть рисунка). Импорт ДНК размером 2,7 т.п.н. проводили в митохондрии, изолированные из проростков дикого типа (Col-0) и мутанта *drp3b*. Визуализация флуоресцентно меченых фрагментов проведена с помощью сканера GE Healthcare. Представлен анализ импорта ДНК размером 2,7 т.п.н. с использованием ПЦР в реальном времени (а, правая часть рисунка, и б). На графике показано относительное количество детектированного фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к *NAD4* (митохондриальная ДНК). Представлены данные не менее трех независимых биологических повторностей. Уровень импорта в линии Col-0 принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения.

Исходя из полученных нами результатов, можно предположить, что изменение морфологии части митохондрий, а также частичная потеря способности к делению, вызываемая отсутствием одного из белков (DRP3A или DRP3B) не является существенным фактором процесса импорта ДНК в эти органеллы. Тем более, что экспрессия и локализация этих белков в тканях арабидопсиса может иметь определенную специфичность. Тем не менее, нельзя с уверенностью утверждать, что процессы деления митохондрий в клетках растений не вносят вклад в изменение структурной организации митохондриальной мембраны, которая может препятствовать или способствовать транспорту нуклеиновых кислот в митохондриальный матрикс. В работе Fujimoto et al. (2009) показано, что в двойном мутанте *drp3a/drp3b* гораздо более выражено удлинение митохондрий, они часто соединены друг с другом по сравнению с митохондриями в мутантах по одному из белков DRP3A или DRP3B. Двойной мутант отличается карликовостью, замедленным развитием, измененной морфологией листьев, хотя и остается фертильным и способным к завершению жизненного цикла. Также было показано, что гиперэкспрессия DRP3A или DRP3B в двойном мутанте *drp3a/drp3b* приводит к восстановлению формы митохондрий (Fujimoto et al., 2009). В связи с этим,

можно предположить, что в мутанте, лишенном функций DRP3A или DRP3B, происходит компенсация отсутствия одного из этих белков посредством гиперэкспрессии другого с восстановлением фенотипа растений и частичным восстановлением морфологии митохондрий. Таким образом, скорее всего, не удивительно, что отсутствие лишь одного из этих двух белков с динамин-подобной структурой, в силу избыточности или частичной компенсации функций, способствующих митохондриальному делению, не оказало какого-либо явного эффекта на импорт ДНК в митохондрии из листьев арабидописа. Изменение характера импорта ДНК вполне можно ожидать в митохондриях двойного мутанта *drp3a/drp3b*, поэтому использование этого мутанта могло бы стать интересным продолжением данного исследования.

3.4. Исследование зависимости эффективности импорта ДНК от гетерогенности популяции митохондрий

3.4.1. Получение митохондриальных фракций различных растительных объектов

Для изучения гетерогенности митохондриальной популяции широко используются методы разделения грубой фракции изолированных митохондрий в градиенте плотности сахарозы или перколла с целью выделения отдельных субпопуляций и их характеристики. Получение митохондриальных субпопуляций с помощью сахарозного градиента является классическим подходом, который применяли в самых ранних исследованиях в этой области. Так, Malhotra and Spencer (1973) выделили отдельные, зависящие от стадии прорастания, популяции митохондрий и других субклеточных частиц из семядолей гороха после центрифугирования их в градиенте плотности сахарозы. Также с применением сахарозного градиента выделяли лёгкую и тяжелую субпопуляции митохондрий при изучении митохондриального биогенеза во время прорастания семян кукурузы (Logan et al., 2001). В современных работах наряду с сахарозным градиентом находит свое применение также и метод разделения митохондрий в градиенте плотности перколла. С использованием ступенчатого градиента плотности перколла было выделено три субпопуляции митохондрий из эмбриональных масс двух видов хвойных (*Picea abies* и *Abies cephalonica*), характеризовавшихся разной степенью сопряженности дыхания и фосфорилирования (Petrussa et al., 2008).

При исследовании роли мембранных белков арабидопсиса в митохондриальном импорте ДНК наше внимание привлек интересный факт: иногда при центрифугировании грубой фракции изолированных митохондрий в ступенчатом градиенте перколла (50 % – 25 % – 18 %), мы наблюдали разделение основного митохондриального слоя в нижней части градиента на два независимых банды (рис. 34, а), условно обозначенные нами как верхняя и нижняя митохондриальные фракции. Любопытно, что ранее для митохондриальной фракции арабидопсиса не было показано существования митохондриальных субпопуляций согласно их локализации в толще градиента плотности. Лишь в недавнем исследовании Fuchs et al. (2016), в условиях стресса при воздействии на лист патогенными грибами было продемонстрировано существование двух субпопуляций митохондрий в пределах одной клетки: наряду с субпопуляцией типичных митохондрий, в местах вторжения патогенного гриба формировалась вторая митохондриальная субпопуляция, в мембране которой происходило накопление белка PEN2, способного формировать гомоолигомерные комплексы.

В наших исследованиях растения арабидопсиса выращивались в оптимальных условиях при отсутствии влияния каких-либо стрессовых факторов. Изначально мы предположили, что появление двух независимых митохондриальных фракций, наблюдаемых в градиенте плотности перколла, связано с ранней стадией развития проростков арабидопсиса, однако эта гипотеза не получила достоверного подтверждения. В дальнейшем предполагается продолжение поиска факторов, способствующих формированию в градиенте более одной фракции митохондрий (рН почвы, соотношение почвенных микро- и макро- элементов и т.д.).

Ввиду того, что грубая митохондриальная фракция арабидопсиса не всегда разделялась в градиенте плотности перколла на две отдельные субфракции, в результате чего не представлялось возможным провести все желаемые тесты для их характеристики, для исследования гетерогенности митохондриальной популяции растительной клетки мы привлекли два других растительных объекта, корнеплоды репы (*Brassica rapa*) и этиолированные проростки кукурузы (*Zea mays*).

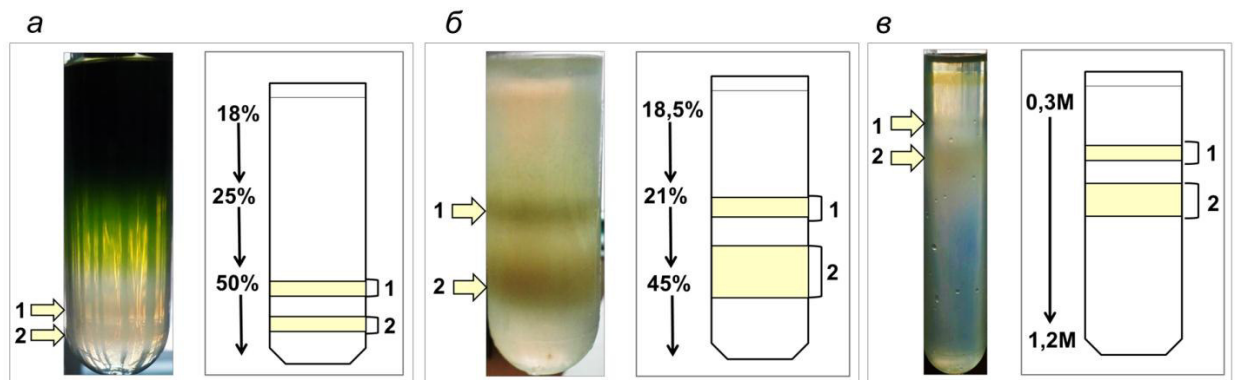


Рис. 34. Отбор митохондриальных фракций из листьев арабидопсиса, корнеплодов репы и этиолированных проростков кукурузы

Представлено типичное разделение в ступенчатом градиенте перколла (*а, б*) митохондрий из *A. thaliana* (*а*), *B. rapa* (*б*) и в линейном градиенте сахарозы (*в*) митохондрий, выделенных из *Z. mays*; 1 – верхняя митохондриальная фракция, 2 – нижняя митохондриальная фракция.

Растительный объект *B. rapa* был выбран согласно двум критериям: 1) большой выход и стабильность изолированных митохондрий, 2) протокол выделения митохондрий предполагает дифференциальное центрифугирование грубого митохондриального препарата с последующей очисткой в ступенчатом градиенте перколла (45 % – 21 % – 18,5 %), а появление митохондриальных субфракций арабидопсиса было отмечено именно в ступенчатом градиенте перколла. В результате при разделении грубой митохондриальной фракции нам удалось визуализировать два независимых митохондриальных банды – нижнюю (на границе между 45 % и 21 % перколла) и верхнюю (на границе между 21 % и 18,5 % перколла) митохондриальные фракции (рис. 34, *б*). Отобранные митохондриальные фракции отмывали от перколла в серии центрифугирований и использовали для дальнейшего исследования.

Критерием выбора третьего растительного объекта (этиолированные проростки *Z. mays*) для получения митохондриальных субпопуляций с целью их дальнейшей характеристики послужили литературные сведения, согласно которым при помощи классического сахарозного градиента удалось выделить субпопуляции кукурузы и частично их охарактеризовать (Lund et al., 1958, Logan et al., 2001). Однако, если в работе Lund et al. (1958) субпопуляции митохондрий получали из апикальной меристемы корня, в исследованиях Logan et al. (2001) наличие гетерогенной популяции было показано при изучении митохондриального биогенеза во время прорастания семян кукурузы. В этиолированных проростках кукурузы митохондриальных субпопуляций на настоящий момент продемонстрировано не было.

Для получения митохондриальных фракций из этиолированных проростков кукурузы грубую митохондриальную фракцию подвергали разделению в линейном градиенте сахарозы ($0,3 \text{ М} \rightarrow 1,2 \text{ М}$), в результате чего формировались две отдельных митохондриальных фракции (рис. 34, в). После отбора фракций митохондрии отмывали от избытка сахарозы и использовали для дальнейших исследований. Основной слой митохондрий всегда находился на уровне градиента плотности, соответствующем $0,54 - 0,6 \text{ М}$ сахарозы (рис. 34, в, 2). Второй слой с визуально меньшей плотностью митохондрий, условно обозначенный нами верхней митохондриальной фракцией, располагался в градиенте на уровне $0,48 \text{ М}$ сахарозы (рис. 33, в, 1).

Все полученные фракции были в дальнейшем исследованы с целью характеристики содержащихся в них митохондрий. На первом этапе нами была проведена оценка возможных различий в эффективности осуществляемого ими импорта ДНК.

3.4.2. Изучение эффективности импорта ДНК разной длины в митохондриальные фракции

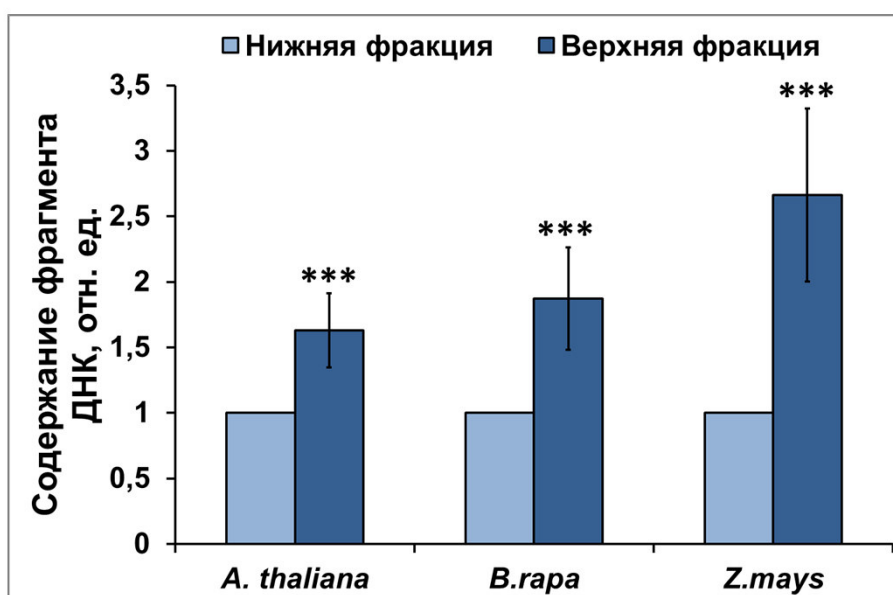
Инкубацию митохондрий ($100-200 \text{ мкг}$ митохондриального белка) с ДНК проводили в течение 30 минут. После ДНКазной обработки и серии отмывок митохондриальную ДНК экстрагировали и далее анализировали, количественно, с помощью ПЦР-РВ (рис. 35, а), и качественно, посредством электрофоретического разделения в агарозном геле (рис. 35, б).

По результатам ПЦР-анализа (рис. 35, а), очевидно, что для митохондрий верхней фракции всех трех растительных объектов, взятых в исследование, характерна определенная активация процесса митохондриального импорта ДНК по сравнению с уровнем импорта в митохондрии нижней фракции.

Исходя из данных электрофоретического анализа (рис. 35, б), содержание мтДНК в верхней и нижней митохондриальных фракциях арабидопсиса, репы и кукурузы не различалось, что свидетельствует о корректности полученных нами результатов. По всей видимости, повышение эффективности импорта в митохондриях верхней фракции происходит вследствие каких-то структурно-функциональных особенностей этой фракции, а не за счёт снижения количества

мтДНК, на которую проводилось нормирование при анализе с помощью ПЦР-РВ (см. рис. 15, б).

а



б

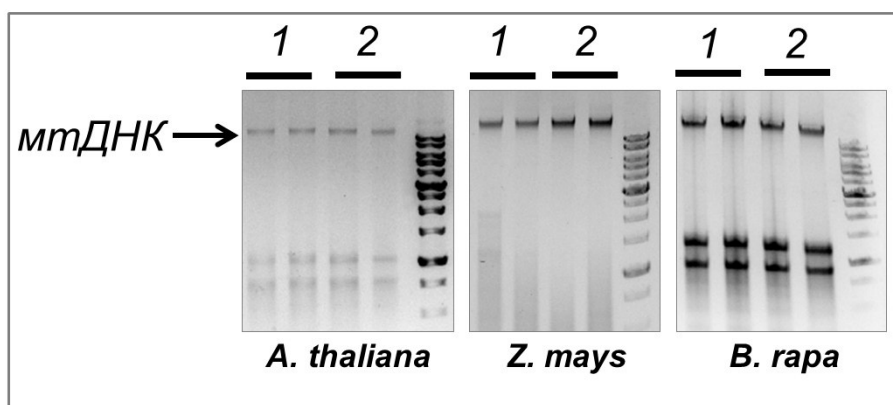


Рис. 35. Качественный и количественный анализ мтДНК, экстрагированной после импорта ДНК разной длины в митохондрии различных фракций

а) Эффективность импорта ДНК во фракции митохондрий *A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*. Количество импортированной ДНК нормировали к количеству эндогенной ДНК, митохондриальному гену *NAD4*. Эффективность импорта ДНК в нижнюю митохондриальную фракцию принята за условную единицу. Данные представлены по результатам не менее 8 биологических повторностей. Допуски на диаграммах представляют стандартные отклонения; *** – статистически значимые различия при $P \leq 0,001$; б) анализ качества митохондриальной ДНК, экстрагированной после импорта ДНК в нижнюю (1) и верхнюю (2) митохондриальные фракции *A. thaliana*, *B. rapa*, *Z. mays*.

Полученные результаты, демонстрирующие различия в эффективности импорта ДНК между двумя митохондриальными фракциями, вызвали у нас интерес в отношении поиска факторов, способствующих более интенсивному процессу транспорта ДНК в митохондрии верхней фракции.

3.4.3. Характеристика митохондриальных фракций

Благодаря ряду работ по изучению гетерогенности популяции митохондрий известно, что митохондрии двух разных субпопуляций могут обладать морфологическими и структурными различиями (Lund et al., 1958; Bakeeva et al., 1999; Logan et al., 2001; Logan, 2006; Бегунова и Векшин, 2015). С целью выявления особенностей морфологического строения митохондриальных фракций, выделенных из репы и кукурузы, мы провели анализ нескольких митохондриальных проб (не менее трех для одного вида) с помощью электронной микроскопии. На рисунке 36 представлены результаты этого анализа, демонстрирующие структурные особенности митохондрий нижней или верхней фракций.

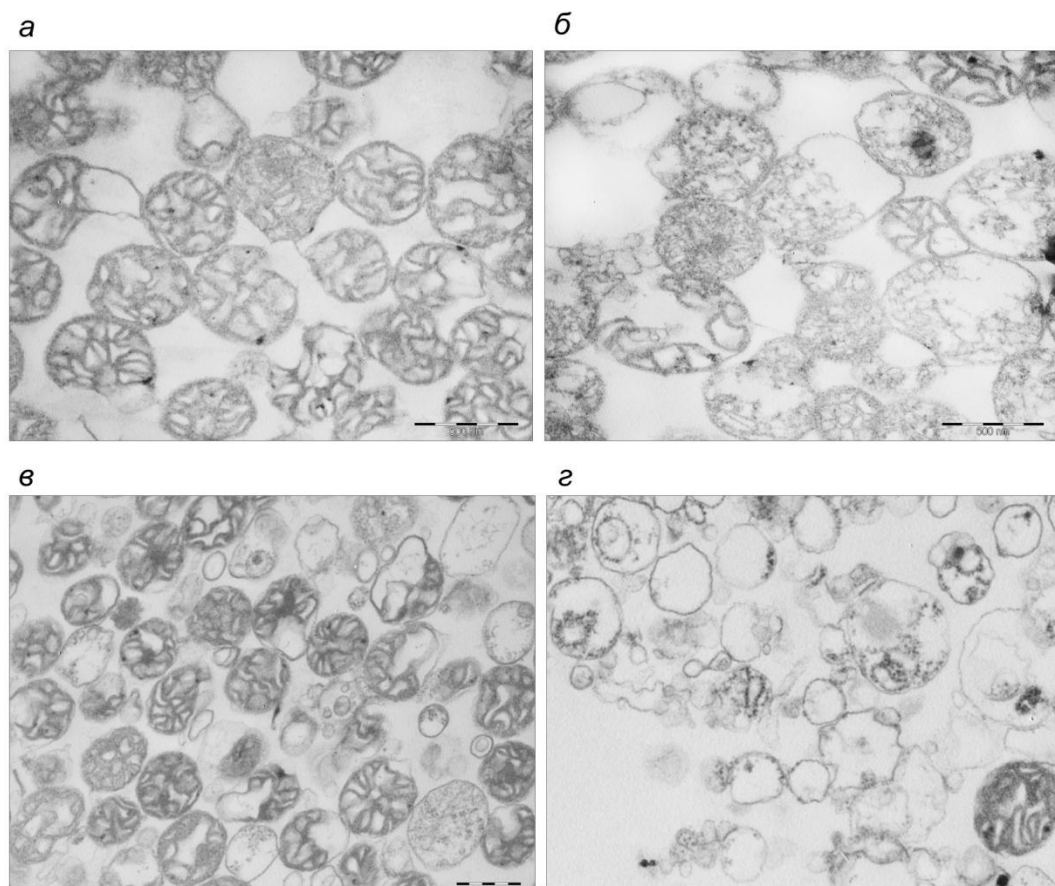


Рис. 36. Электронная микроскопия митохондриальных фракций репы (*B. rapa*) и кукурузы (*Z. mays*)

Представлены результаты микроскопического исследования нижней (а, в) и верхней (б, г) митохондриальных фракций *B. rapa* (а, б) и *Z. mays* (в, г). Масштаб: 500 нм.

Как видно из рисунка, для митохондрий верхней митохондриальной фракции (рис. 36, б и г) характерно отсутствие четко сформированной структуры крист в отличие от митохондрий нижней фракции (рис. 36, а и в), в составе которой

митохондрии с подобной структурой встречаются существенно реже. Эта особенность была в большей степени характерна для препаратов митохондрий верхней фракции кукурузы (рис. 36, з) по сравнению с митохондриальными препаратами репы (рис. 36, б).

Ранее, с помощью электронной микроскопии было показано, что морфологически митохондрии животных также различаются и делятся на два типа (Pollak and Munne, 1970). «Тяжелые» митохондрии имеют большое количество крист, а также митохондриальный матрикс с высоким содержанием белков, «легкие» митохондрии характеризуются маленькими, плохо сформированными межмембранными структурами. Ранее с помощью биохимических методов исследования изолированных митохондриальных фракций было установлено, что развитие крист связано с увеличением тканевого дыхания и скорости окисления и фосфорилирования (Lund et al., 1958). Результаты электронной микроскопии в некоторой степени согласуются с данными, полученными при оценке величины дыхательного контроля, которые будут приведены ниже (см. табл. 7).

Вполне возможно, что в отношении верхней митохондриальной фракции мы имеем дело с незрелыми органеллами – протомитохондриями. Группой австралийских ученых показано (Howell et al., 2006), что при созревании митохондрий из неструктурированных двойных мембран протомитохондрий образуются типичные митохондрии, богатые кристами и другими митохондриальными структурами, характерными для зрелых клеток растений.

Митохондрии могут различаться и по биоэнергетическим параметрам или выполняемым функциям. В работе Logan et al. (2001) были выделены две субфракции митохондрий, полученных из эмбрионов кукурузы. Авторы предположили, что гетерогенность митохондрий связана с разными энергетическими и/или метаболическими потребностями в тканевых и органных закладках эмбриона.

При изучении дыхательной активности митохондриальных фракций, полученных нами из листьев арабидопсиса, корнеплодов репы и этиолированных проростков кукурузы, было показано, что все изучаемые фракции поглощали кислород и характеризовались сопряжением дыхания и фосфорилирования. При добавлении протонофора СССР (карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон) во всех

тестируемых митохондриальных фракциях происходило разобщение дыхания и фосфорилирования. Абсолютные величины дыхательного контроля (ДК) митохондриальных фракций арабидопсиса составили 1,76 (верхняя фракция) и 1,58 (нижняя фракция), для кукурузы эти показатели были равны 2,23 для верхней фракции митохондрий и 2,64 для нижней. Наиболее высоким сопряжением обладали митохондриальные фракции репы: 2,57 и 2,99 для верхней и нижней фракций, соответственно. В таблице 7 приведены результаты оценки относительных величин дыхательного контроля и интактности нижней (1) и верхней (2) митохондриальных фракций *A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*. Статистически значимыми различиями по величине дыхательного контроля между верхней и нижней фракциями обладали митохондрии всех исследуемых видов (табл. 7).

Таблица 7

Характеристика митохондриальных фракций разных растительных видов

Вид растения	Коэффициент ДК		Р	Интактность внешней мембраны		Уровень импорта		Р
	1	2		1	2	1	2	
<i>A. thaliana</i>	100 %	89 %	≤0,02**	75-80 %		100 %	163 %	≤0,001***
<i>B. rapa</i>	100 %	84 %	≤0,02**	80-85 %		100 %	187 %	≤0,001***
<i>Z. mays</i>	100 %	81 %	≤0,05*	80-90 %		100 %	266 %	≤0,001***

Представлены относительные величины коэффициента дыхательного контроля (ДК), интактности и уровня импорта митохондриальных фракций, выделенных из *A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*. Представлены данные не менее трех (величина ДК) и восьми (уровень импорта) независимых биологических повторностей. Примечание: 1 – митохондрии нижней фракции, 2 – митохондрии верхней фракции; Р – уровень значимости различий между верхней и нижней фракциями; *, **, *** - статистически значимые различия.

Наименьшим снижением показателя ДК по сравнению с нижней фракцией обладали митохондрии верхней фракции, выделенные из проростков арабидопсиса (на 11 %). Наибольшее снижение было отмечено для митохондрий верхней фракции кукурузы (на 19 %), что не удивительно, принимая во внимание структурные особенности части митохондрий этой фракции (см. рис. 36, з). Ранее было показано, что митохондрии, находящиеся в нижних слоях градиента, часто имеют более высокий дыхательный контроль (Lund et al., 1958; Nishimura et al., 1982; Dai et al., 1998; Petruzza et al., 2008), чем митохондрии верхних слоев градиента. При этом интактность митохондриальных препаратов верхней и нижней фракций не отличалась для всех растительных объектов, и имела достаточно высокий показатель (80-90 %) (табл. 7).

Для митохондрий каждой фракции была проведена оценка активности фермента митохондриального матрикса сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Сукцинатдегидрогеназа у всех организмов прочно связана с внутренней мембраной митохондрий и является компонентом электрон-транспортной цепи (комплекс II). В цикле трикарбоновых кислот этот фермент катализирует реакции окисления/восстановления сукцината и фумарата. Ранее (Frisell et al., 1965) было показано, что митохондриальная популяция в клетке проявляет гетерогенность в отношении активности СДГ. Frisell et al. (1965) выделяли «тяжелую» и «легкую» митохондриальные фракции (в зависимости от коэффициента седиментации в градиенте сахарозы): фракция «тяжелых» митохондрий имела в 2 раза более высокий уровень активности сукцинатдегидрогеназы по сравнению с легкой фракцией. Однако, результаты оценки активности СДГ, полученные в рамках нашей работы, продемонстрировали отсутствие статистически значимых различий между фракциями (данные не показаны).

С целью дальнейшей характеристики митохондриальных фракций нами были проведены электрофорез в ПАА-геле в денатурирующих условиях (рис. 37) и анализ активности мембранных дыхательных комплексов с помощью метода BN-PAGE (рис. 38). При анализе электрофореграммы можно обнаружить некоторые различия в белковых спектрах различных митохондриальных фракций. Наблюдаемые различия связаны, скорее, не с изменениями в белковых спектрах фракций, а в количественном соотношении некоторых бандов (рис. 37).

Представленные на рисунке 38 результаты демонстрируют состав мембранных комплексов и активность комплексов I и II в митохондриальных фракциях *B. para* (рис. 38, а) и *Z. mays* (рис. 38, б). Существенных различий в активности основных мембранных комплексов митохондриальных фракций, выделенных из корнеплодов репы и кукурузы, не обнаружено. Исходя из окраски в Кумасси, состав мембранных комплексов нижней и верхней митохондриальных фракций также не отличается.

Обобщая описанные результаты, можно отметить, что, несмотря на отсутствие существенных различий по ряду тестированных параметров, характеризующих функциональное состояние нижней и верхней митохондриальных фракций, между ними имеются определенные различия. Происходящая в градиенте плотности дифференциация грубой митохондриальной фракции на две отдельные субфракции согласуется с их структурными особенностями. Для митохондриальной фракции

верхних слоев градиента (*B. rapa*, *Z. mays*) характерно наличие митохондрий с недоразвитой структурой внутренних мембран, что особенно выражено для этиолированных проростков кукурузы. Наиболее вероятно, что разные субпопуляции митохондрий в проростках кукурузы отображают стадии созревания протомитохондрий в зрелые митохондрии.

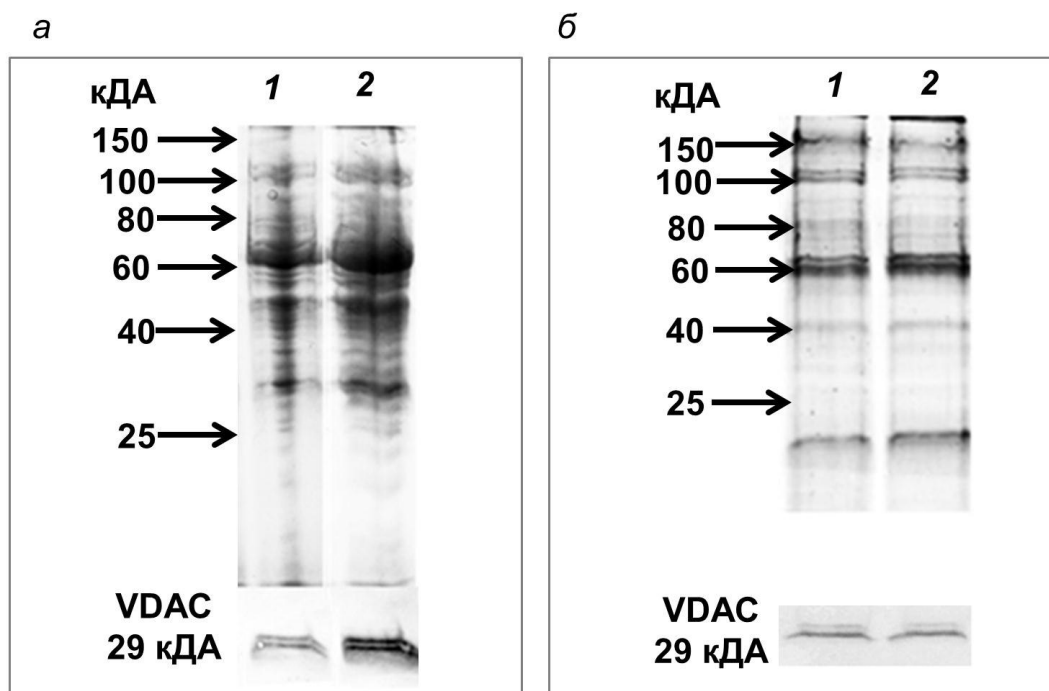


Рис. 37. Анализ профиля белков митохондриальных фракций

Представлены электрофореграммы белков верхней (1) и нижней (2) митохондриальных фракций, полученных из (а) корнеплодов репы (*B. rapa*) и (б) проростков кукурузы (*Z. mays*). После фракционирования в денатурирующем ПАА-геле митохондриальные белки были окрашены с помощью Кумасси R-250. В нижней части рисунков приведены результаты иммуноблоттинга митохондриальных белков репы (а) и кукурузы (б) с антителами против VDAC (Agrisera, США).

Митохондрии с недоразвитой структурой мембраны обладают меньшей способностью к сопряжению активности дыхательных комплексов с фосфорилированием, что коррелирует с различиями в показателях величины дыхательного контроля (ДК) для двух фракций. Соответственно, для митохондрий верхней фракции, скорее всего, характерен более низкий мембранный потенциал, что в случае импорта отрицательно заряженных молекул ДНК может способствовать более эффективной их транслокации через митохондриальную мембрану.

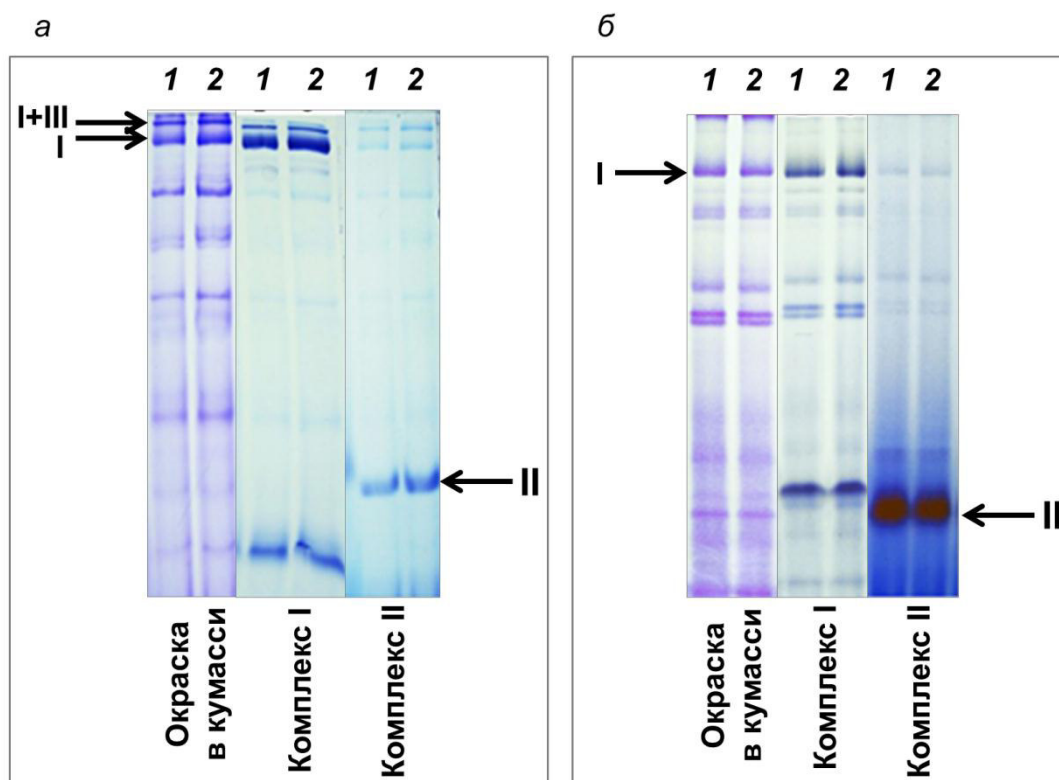


Рис. 38. Анализ содержания и активности мембранных комплексов в митохондриальных фракциях репы (*B. rapa*) и кукурузы (*Z. mays*)

Представлены результаты независимых экспериментов по определению активности мембранных дыхательных комплексов I и II с помощью BN-PAGE электрофореза в верхней (1) и нижней (2) митохондриальных фракциях *B. rapa* (а) и *Z. mays* (б). Показан состав мембранных комплексов, визуализированный окрашиванием с помощью Кумасси R-250 и активность комплексов I и II, определенная гистохимическими методами.

Следует также отметить, что согласно результату иммуноблоттинга митохондрий обеих исследуемых субфракций с использованием антител к VDAC, содержание митохондриального порина в верхней субфракции *B. rapa* снижено. Митохондрии верхней фракции импортируют ДНК с большей эффективностью, чем митохондрии нижней фракции. Как показано нами, отсутствие трех из четырех изоформ VDAC в митохондриях арабидопсиса также способствует большей эффективности импорта. Таким образом, исходя из всей совокупности полученных нами данных, следует, что эффективность импорта ДНК в значительной степени определяется структурной организацией двойной митохондриальной мембраны, которая в свою очередь существенно зависит как от количества изоформ порина, содержащихся во внешней мембране, так и от качества и степени зрелости внутренней мембраны.

Исходя из совокупности полученных нами данных, очевидно, что митохондрии, выделяемые из листьев арабидопсиса, корнеплодов репы и этиолированных

проростков кукурузы, представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую, как минимум, из двух митохондриальных субпопуляций. Эти субпопуляции располагаются в различных слоях градиента плотности (верхний и нижний слой митохондрий), одна из которых обладает более выраженной способностью импортировать ДНК. При выделении митохондрий эти субпопуляции располагаются в различных слоях градиента плотности. Мы полагаем, что усиление эффективности импорта в митохондрии верхней фракции не связано со снижением их интактности, поскольку этот показатель был достаточно высок для митохондрий обеих фракций (табл. 8). Тем не менее, нижняя митохондриальная фракция имела в своем составе, наряду с типичными митохондриями, органеллы со слабо развитой системой крист и характеризовалась некоторым снижением дыхательной активности по сравнению с нижней фракцией (табл. 8). Вероятно, эффективность импорта ДНК в значительной степени определяется структурной организацией двойной митохондриальной мембраны, которая существенно зависит от качества и степени зрелости внутренней мембраны. Еще один отличительный параметр, который коррелирует с уровнем импорта – расположение верхней, наиболее компетентной к импорту ДНК, фракции в градиенте. В зависимости от растительного объекта расположение этой фракции различно. При общей схожести градиента плотности перколла, верхняя фракция *A. thaliana* располагается в нижней части градиента (между 50 % и 25 % перколлом), в то время когда фракция *B. rapa* – в середине градиента (между 21 % и 18 % перколлом). Верхняя митохондриальная фракция *Z. mays* расположена в верхней части градиента (на уровне 0,48 М сахарозы). Обоснованность сравнения фракций сахарозного градиента и фракций, полученных в градиенте плотности перколла, определяется «основной» нижней фракцией, содержащей в основном митохондрии со зрелой системой внутренних мембран, над которой обычно располагаются митохондрии с менее плотной, неокончательно сформированной внутренней структурой (Pollak and Munne, 1970; Logan et al., 2001; Howell et al., 2006). Нами было отмечено, что чем выше в градиенте расположена верхняя митохондриальная фракция (см. рис. 34), тем сильнее выражены отличительные особенности структуры составляющих ее митохондрий (рис. 36) и тем больше различия в эффективности импорта в них ДНК (рис. 35, табл. 7). Можно предположить, что для митохондрий верхней и нижней фракций арабидопсиса характерна максимально сходная структура.

Представляется весьма вероятным, что по мере созревания митохондрий и усложнения структуры мембраны (появление крист), плотность органелл при их выделении и очистке в градиенте перколлы или сахарозы увеличивается, что мы и наблюдаем в наших экспериментах. Таким образом, можно предположить, что нижняя фракция митохондрий всегда будет содержать более зрелые митохондрии, а верхняя – менее зрелые, а их расположение в градиенте плотности будет отражать в некотором роде степень их структурных различий (рис. 36).

Эти наблюдения наталкивают на мысль, что одним из факторов эффективного импорта ДНК является разнообразие структуры митохондриальной популяции. Вполне возможно, что митохондриальная популяция состоит из митохондрий, специализированных на выполнении различных функций. Митохондрии содержат свою собственную ДНК, кодирующую небольшое количество жизненно важных генов, но эта роль как генетического хранилища мало совместима с ролью митохондрий в биоэнергетике, поскольку транспорт электронов приводит к образованию АФК, которые индуцируют повреждения в мтДНК (Logan, 2006). Мы предполагаем, что часть митохондрий верхней фракции, у которых плохо сформирована система внутренних мембран, может специализироваться на хранении генетического материала, в то время как митохондрии с полноценной структурой крист отвечают за выполнение митохондрией биоэнергетической функции. Последнее в определенной степени подтверждают наши результаты, полученные при оценке дыхательного контроля митохондрий верхней и нижней фракций. В то же время, митохондрии верхней фракции могут быть протомитохондриями (незрелыми формами митохондрий), для которых, как известно, характерно постепенное развитие внутренней структуры мембран (Howell et al., 2006).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы получены принципиально новые данные о факторах транспортной системы растительных митохондрий, участвующих в процессе импорта ДНК. Ранее было показано, что импорт ДНК происходит с участием порина (VDAC) во внешней и адениннуклеотидтранслоказы (АНТ) во внутренней мембранах митохондрий (Koulintchenko et al., 2003), однако этот процесс не ограничивается участием этих двух мембранных белков и, по всей видимости, происходит посредством нескольких альтернативных механизмов при участии разнообразных белковых комплексов (Weber-Lotfi et al., 2015). Исходя из этого, мы предположили, что активность процесса импорта ДНК может не только зависеть от функционирования специфических ДНК-переносчиков, которые еще предстоит идентифицировать, но и иметь сложную кинетическую зависимость от концентрации ДНК-субстрата, а также меняться в зависимости от метаболического состояния митохондрий в клетке. В свою очередь, метаболическое состояние митохондрий также может вносить вклад в характер процесса импорта ДНК ввиду того, что митохондриальная популяция часто представляет смесь неоднородных органелл, отличающихся по своим структурно-функциональным свойствам (Lund et al., 1958; Bakeeva et al., 1999; Logan et al., 2001; Logan, 2006; Бегунова и Векшин, 2015). В силу вышесказанного, в рамках данной работы была предпринята попытка приблизиться к пониманию механизма импорта ДНК, его закономерностей и факторов, влияющих на этот процесс. Для этого нами были исследованы особенности транспортной системы, участвующей в импорте ДНК в растительные митохондрии, включающие (1) кинетическую закономерность протекания процесса импорта ДНК разной длины, (2) участие ряда потенциальных белков-переносчиков митохондриальной мембраны и (3) зависимость процесса переноса ДНК внутрь митохондрий от структурно-функциональных особенностей субпопуляций этих органелл.

При изучении концентрационной зависимости импорта молекул ДНК разной длины в митохондрии картофеля был продемонстрирован разный характер этого кинетического параметра для фрагментов ДНК двух размерных классов. Для ДНК-субстратов малой длины показано отсутствие существования специфического переносчика ввиду того, что кинетика импорта субстрата этого размерного класса

имела линейную зависимость без выхода на плато. В противоположность этому, для субстратов ДНК средней длины был характерен ступенчатый характер зависимости интенсивности импорта от концентрации ДНК, что говорит в пользу высказанной ранее гипотезы о существовании множественных механизмов импорта (Weber-Lotfi et al., 2015): при каждом выходе кривой на плато, по всей видимости, происходит насыщение одного из транспортных путей и появление возможности подключения другого механизма. Кривая зависимости импорта ДНК средней длины от ее концентрации трижды выходила на плато, позволяя предположить участие в этом процессе нескольких транспортных путей.

С целью поиска специфичного переносчика молекул ДНК через митохондриальную мембрану, нами был исследован импорт ДНК в инсерционных мутантах арабидопсиса по белкам, имеющим потенциальную способность участвовать или оказывать влияние на этот процесс: белкам внешней мембраны TSPO, OM47, DRP3A и DRP3B, изоформам VDAC и белку внутренней митохондриальной мембраны MIC60 (табл. 8).

Таблица 8

Влияние инактивации изученных мембранных белков на импорт ДНК в митохондрии

Мутант ая линия <i>A.thaliana</i>	Характеристика белка, по гену которого получен нокаут-мутант			
	Структура	Функция	Локализация в клетке	Эффект отсутствия белка на импорт ДНК
<i>tspo</i>	α -спираль (Cui et al., 2016)	белок-рецептор с повышенным содержанием триптофана; связывание гема (Vanhee et al., 2011); ответ на абиотический стресс (Guillaumot et al., 2009)	внешняя митохондриальная мембрана (Cui et al., 2016), мембрана пластид (Cui et al., 2016) мембрана аппарата Гольджи (Vanhee et al., 2011), плазматическая мембрана (Schmid et al., 2005), мембрана ЭПР (Guillaumot et al., 2009)	для ДНК небольшого размера – нет; для ДНК средней длины – снижение при высоких концентрациях
<i>vdac1</i>	β -цилиндрическая (Tateda et al., 2011)	участник мембранного транспорта в митохондриях (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011; Zhang et al., 2015)	внешняя митохондриальная мембрана, плазмалемма (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011; Zhang et al., 2015)	активация

<i>vdac2</i>	β-цилиндрическая (Tateda et al., 2011)	участник мембранного транспорта в митохондриях (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011; Zhang et al., 2015)	внешняя митохондриальная мембрана, плазмалемма (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011; Zhang et al., 2015)	активация
<i>vdac3</i>	β-цилиндрическая (Tateda et al., 2011)	участник мембранного транспорта в митохондриях (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011; Zhang et al., 2015)	внешняя митохондриальная мембрана, плазмалемма (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011; Zhang et al., 2015)	не выявлен
<i>vdac4</i>	β-цилиндрическая (Tateda et al., 2011)	участник мембранного транспорта в митохондриях (Robert et al., 2012)	внешняя митохондриальная мембрана (Robert et al., 2012; Tateda et al., 2011; Zhang et al., 2015)	активация
<i>drp3a</i>	не определена	участие в делении митохондрий и пероксисом (Fujimoto et al, 2009; Aung et al, 2012)	внешняя митохондриальная мембрана, пероксисомы (Fujimoto et al., 2009; Aung and Hu, 2012)	не выявлен
<i>drp3b</i>	не определена	участие в делении митохондрий (Fujimoto et al, 2009, Aung et al, 2012)	внешняя митохондриальная мембрана, пероксисомы (Fujimoto et al., 2009; Aung and Hu, 2012)	не выявлен
<i>om47</i>	β-цилиндрическая (Li et al., 2016)	транспортировка метаболитических интермедиатов из и внутрь митохондрий (Li et al., 2016)	внешняя митохондриальная мембрана (Li et al., 2016)	не выявлен
<i>mic60</i>	не определена	субъединица митохондриального трансмембранного липопротеинового комплекса (МТЛ) (Michaud et al., 2016)	внутренняя митохондриальная мембрана (Michaud et al., 2016)	не выявлен

По результатам проделанной работы показано, что OM47, MIC60, DRP3A и DRP3B не принимают непосредственного участия в импорте ДНК. Для TSPO показано включение в процесс импорта в условиях повышенных концентраций ДНК среднего размера, что, возможно, имеет связь с показанной нами кинетикой импорта ДНК-субстратов средней длины. В отношении четырех изоформ порина для VDAC1, VDAC2 и VDAC4 показана зависимость процесса импорта ДНК от наличия или отсутствия этих белков в митохондриальной мембране. Эта зависимость, однако,

оказалась обратной - наблюдалась стимуляция импорта в мутантных по этим белкам линиях. При этом эти три мутантные линии имели фенотип, отличающийся от фенотипа линии дикого типа, причем наименьшие отличия выказывала линия *vdac1*, а наибольшие – линия *vdac2*. Интересно отметить, что чем важнее для клетки функция изоформ порина, тем сильнее выражена стимуляция импорта ДНК в митохондрии, характеризующиеся ее отсутствием. Мы предполагаем, что отсутствие одной из изоформ порина может компенсироваться повышением экспрессии других его изоформ, что косвенно подтверждается полученным нами результатом, показывающим повышение уровня транскрипции гена, кодирующего изоформу VDAC3, в линиях *vdac1*, *vdac2* и *vdac4*. Интересно отметить, что чем важнее для клетки инактивированная изоформа порина, тем сильнее выражена стимуляция импорта ДНК. Известно, что порины играют важную роль в импорте тРНК и различных метаболитов, поэтому возрастание содержания других изоформ порина может объясняться потребностью обеспечить митохондрию полным набором тРНК. При этом, вероятно, именно VDAC3, для которого в рамках нашей работы показано отсутствие влияния на процесс импорта ДНК, играет главную роль в компенсации отсутствия других изоформ VDAC, поскольку его экспрессия повышена в остальных мутантных линиях - *vdac1*, *vdac2* и *vdac4*.

Другая наша гипотеза, объясняющая стимулирующий эффект отсутствия одной из изоформ VDAC на импорт ДНК, берет за основу электрофизиологическое функционирование митохондриальных поринов. Дело в том, что проводимость VDAC строго зависит от мембранного потенциала, и формируемый им канал может находиться в открытом или закрытом состоянии (Kusano et al., 2009), тем самым регулируя поток метаболитов в митохондрию. Ограничение потока движения метаболитов через мембрану вызывается уменьшением напряжения в контактных сайтах внешней и внутренней митохондриальных мембран и увеличением потенциала внешней мембраны (до +60 мВ), что приводит к закрытию анионных каналов VDAC, локализованных вне контактных сайтов во внешней мембране митохондрий (Lemeshko, 2002). Электрофизиологические исследования белков VDAC из разных видов с использованием искусственных липидных бислоев выявили следующую закономерность: эти белки образуют высокопроводящие анион-селективные каналы, которые открыты при низких мембранных

потенциалах. Выше определенного значения (20–30 мВ), положительного или отрицательного, потенциала мембраны, каналы имеют тенденцию переключаться в состояния с низкой проводимостью, которые являются катион-селективными (Benz, 1994; Colombini et al., 1996). Хотя в реальных условиях, когда присутствуют ионы K, Na, Cl и т.д., мембранный потенциал внешней мембраны уменьшается из-за «эффекта электродинамического компартмента» (Lemeshko, 2000), его значение может, тем не менее, быть достаточно высоким, чтобы регулировать обмен метаболитов через внешнюю митохондриальную мембрану.

В работе Tateda et al. (2011) было показано, что во всех мутантных линиях *vdac* значения мембранного потенциала митохондрий были ниже, чем у линий дикого типа, причем отсутствие VDAC2 или VDAC4 приводили к большей потере мембранного потенциала митохондрий, чем отсутствие VDAC1 или VDAC3. Эти данные, возможно, объясняют показанный в рамках нашей работы эффект усиления импорта ДНК в митохондрии, в мембране которых отсутствует одна из изоформ VDAC: как было отмечено выше, снижение мембранного потенциала митохондрий приводит к открытию поры, формируемой при участии порина, и осуществлению анион-транспортной функции VDAC. Однако, это не объясняло бы отсутствие эффекта стимуляции импорта ДНК в митохондрии мутантной линии *vdac3*. Как оказалось, все каналы, формируемые изоформами VDAC, обладают разными проводящими свойствами, что было показано на митохондриях животных и дрожжей (Xu et al., 1999). При этом, VDAC1 и VDAC2 обладают высокой проводимостью и способностью открывать канал при высоком мембранном потенциале, в то время как у VDAC3, напротив, эти характеристики низкие (Colombini et al., 1996). Исходя из этого, можно предположить, что в первую очередь именно VDAC3 отвечает за открытие поры при снижении мембранного потенциала в мутантных линиях изоформ VDAC. С учетом полученных нами данных о повышенной экспрессии VDAC3 в мутантных линиях *vdac1*, *vdac2* и *vdac4*, мы предполагаем, что эффект активации импорта ДНК связан с открытым состоянием увеличенного количества VDAC3 во внешней митохондриальной мембране, вызванным снижением мембранного потенциала митохондрий в этих линиях (Tateda et al., 2011).

При изучении возможного влияния структурно-функциональных особенностей митохондриальных субпопуляций различных растительных объектов

(*A. thaliana*, *B. rapa*, *Z. mays*) на процесс импорта ДНК, нами было продемонстрировано, что та субпопуляция, которая образовывала в градиенте плотности отдельный банд, стабильно локализующийся выше основного слоя митохондрий, обладала повышенной способностью к поглощению экзогенной ДНК. Эта субпопуляция характеризовалась измененной или плохо развитой системой внутренних мембран и некоторым снижением величины дыхательного контроля. Мы полагаем, что эта субпопуляция содержит менее зрелые митохондрии, повышенная способность которых к импорту ДНК связана, скорее всего, со структурными особенностями мембраны этих органелл.

Важным результатом нашей работы стала разработка нового подхода для изучения импорта ДНК в системе *in vivo*, с активным привлечением которого проводилась большая часть наших исследований при использовании растений арабидопсиса. В результате установлено, что фрагменты ДНК размером 270–2700 п.н., трансфицированные в протопласты, импортируются из цитоплазмы в митохондрии с достаточно высокой интенсивностью. Помимо изучения механизмов переноса ДНК *in vivo*, данный подход может быть использован при разработке системы трансформации митохондриального генома растений. Подобная система может включать трансфекцию протопластов конструкциями, содержащими последовательности, обеспечивающие встраивание в мт-геном (Mileshina et al., 2011) и транскрипцию целевых последовательностей (Koulintchenko et al., 2003), регенерацию клеточной стенки, селективный отбор трансформированных клеток и получение из них целых растений.

ВЫВОДЫ

На основании результатов проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Показано, что при трансформации протопластов арабидопсиса в системе *in vivo*, ДНК активно поступает из цитоплазмы в митохондрии. Закономерности импорта ДНК, показанные в исследованиях в системе изолированных митохондрий, сохраняются *in vivo*.

2. Выявлена ступенчатая зависимость интенсивности поглощения митохондриями фрагментов средней длины (2,7 т.п.н.), но не малой длины (269 п.н.) от концентрации ДНК. Полученный результат свидетельствует о множественных механизмах транспорта ДНК в митохондрии, зависящих от длины транспортируемых молекул.

3. С использованием инсерционных мутантов арабидопсиса, у которых инактивирована одна из изоформ митохондриального порина, показано, что отсутствие VDAC1, VDAC2 или VDAC4 приводит к существенной стимуляции процесса импорта ДНК в митохондрии. Отсутствие изоформы VDAC3 влияния на митохондриальный импорт ДНК не оказывает. При этом, зависимости активности импорта в митохондрии линий, мутантных по любой из четырех изоформ, от длины импортируемой молекулы не выявлено. Показано, что отсутствие одной из изоформ в мутантных линиях *vdac1*, *vdac2* или *vdac4* приводит к усилению экспрессии VDAC3. На основании полученных результатов, мы предполагаем, что импорт ДНК в растительные митохондрии зависит как от свойств проводимости митохондриальной мембраны, так и от структурных перестроек, по-разному обеспечиваемых изоформами VDAC.

4. С использованием инсерционных мутантов арабидопсиса показано, что отсутствие белков, предположительно участвующих в транспорте метаболитов в митохондрии (OM47), в формировании контактных сайтов с митохондриальной мембраной (MIC60), в процессах деления митохондрий (DRP3A или DRP3B), не влияют на процесс импорта ДНК в растительные митохондрии. Мембранный белок TSPO может быть частью одного из механизмов импорта фрагментов средней длины в митохондрии арабидопсиса в условиях повышенных концентраций ДНК в среде инкубации.

5. Митохондрии, выделяемые из различных растительных организмов, представляют собой гетерогенную популяцию, содержащую, по всей видимости, органеллы на разных стадиях созревания. Менее зрелые митохондрии обладают более выраженной способностью к импорту ДНК. Эта способность связана, скорее всего, со структурными особенностями митохондриальной мембраны.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бегунова Е. А. Протомитохондрии клеток печени, их сходство и отличие от митохондрий / Е. А. Бегунова, Н. Л. Векшин // Биофизика. – 2015. – Т. 60. – В. 6. – С. 1109-1117.
2. Бельков В. И. Изучение ретроградной регуляции экспрессии генов глутаматдегидрогеназы *GDH1* и *GDH2 Arabidopsis thaliana* / Дисс. канд. биол. наук. – 2015. – 125 с.
3. Белякович А. Г. Изучение митохондрий и бактерий с помощью соли тетразолия п-НТФ / А. Г. Белякович // ОНТИ НЦБИ. – 1990. – 232 с.
4. Грабельных О. И. Влияние холодового шока на жирнокислотный состав и функциональное состояние митохондрий закаленных и незакаленных проростков озимой пшеницы / О. И. Грабельных, К. А. Кириченко, Т. П. Побежимова [и др.] // Биол. мембраны. – 2014. – Т. 31, № 3. – С. 204-217.
5. Диксон М. Ферменты / М. Диксон, Э. Уэбб // М.: Мир, 1982. – Т. 1. – С. 82-281.
6. Клименко Е. С. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР / Е. С. Клименко, В. А. Милейко, Е. С. Морозкин [и др.] // Биол. мембраны. – 2011. – Т. 28, № 3. – С. 199-205.
7. Клименко Е. С. Изучение особенностей импорта фрагментов ДНК разной длины в митохондрии *Solanum tuberosum* / Дисс. канд. биол. наук. – 2017. – 133 с.
8. Константинов Ю. М. Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды pBR322 в изолированных митохондриях кукурузы / Ю. М. Константинов, В. А. Подсосонный, Г. Н. Луценко [и др.] // Доклады АН СССР. – 1988. – Т. 298. – С. 502-504.
9. Константинов Ю. М. Транслокация бактериальных векторных плазмид в митохондрии проростков кукурузы / Ю. М. Константинов, В. А. Подсосонный, Г. Н. Луценко // Биохимия. – 1989. – Т. 54. – С. 154-158.
10. Шишмаков Д. А. Некоторые свойства протомитохондрий / Д. А. Шишмаков, Р. Л. Анисимов, Н. Л. Векшин // Биол. мембраны. – 2004. – Т. 21, № 5. – Р. 389-395.
11. Abdelnoor R.V. Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS / R.V. Abdelnoor, R. Yule, A. Elo [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100, N 10. – P. 5968-5973.

12. Adams K. L. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus / K. L. Adams, J. D. Palmer // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2003. – V. 29, N 3. – P. 380-395.
13. Al Bitar F. Sequence analysis, transcriptional and posttranscriptional regulation of the rice vdac family / F. Al Bitar, N. Roosens, M. Smeyers [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2003. – V. 1625, N 1. – P. 43-51.
14. Alfonzo J. D. Mitochondrial tRNA import – the challenge to understand has just begun / J. D. Alfonzo, D. Söll // *Biol. Chem.* – 2009. – V. 390, N 8. – P. 717-722.
15. Allen J. F. Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: colocation for redox regulation of gene expression / J. F. Allen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112, N 33. – P. 10231-10238.
16. Alverson A.J. Origins and recombination of the bacterial-sized multichromosomal mitochondrial genome of cucumber / Alverson, A. J., Rice, D. W., Dickinson, S. [et al.] // *Plant Cell*. – 2011. – V. 23, N 7. – P. 2499-2513.
17. Amunts A. The structure of the human mitochondrial ribosome / A. Amunts, A. Brown, J. Toots [et al.] // *Science*. – 2015. – V. 348, N 6230. – P. 95-98.
18. Andre C. Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes / C. Andre, A. Levy, V. Walbot // *Trends Genet.* – 1992. – V. 8, N 4. – P. 128-132.
19. Archibald J.M. Gene transfer: anything goes in plant mitochondria / J.M. Archibald, T. A. Richards // *BMC Biology*. – 2010. – V. 8, N 147. – P. 1-3.
20. Arimura S. *Arabidopsis* elongated mitochondria1 is required for localization of dynamin-related protein3a to mitochondrial fission sites / S. Arimura, M. Fujimoto, Y. Doniwa [et al.] // *Plant Cell*. – 2008. – V. 20, N 6. – P. 1555-1566.
21. Arimura S. Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution / S. Arimura, J. Yamamoto, G. P. Aida [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – V. 101, N 20. – P. 7805-7808.
22. Arrieta-Montiel M. P. Diversity of the *Arabidopsis* mitochondrial genome occurs via nuclear-controlled recombination activity / M. P. Arrieta-Montiel, V. Shedge, J. Davila [et al.] // *Genetics*. – 2009. – V. 183, N 4. – P. 1261-1268.
23. Aung K. Differential roles of *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP3A, DRP3B, and DRP5B in organelle division / K. Aung, J. Hu // *J. Integr. Plant Biol.* – 2012. – V. 54. – P. 921-931.

24. Bahamonde M. I. Voltage-dependent anion channel localises to the plasma membrane and peripheral but not perinuclear mitochondria / M. I. Bahamonde, M. A. Valverde // *Pflugers Arch.* – 2003. – V. 446, N 3. – P. 309-313.
25. Bain M. J. Organization resistance and respiration climacteric / M. J. Bain, F. V. Mercer // *Aust. J. Biol. Sci.* – 1964. – V. 17. – P. 78-85.
26. Bakeeva L. E. Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA inaging wheat coleoptiles / L. E. Bakeeva, M. D. Kirnos, N. I. Aleksandrushkina [et. al.] // *FEBS Letters.* – 1999. – V. 457, № 1. – P. 122-125.
27. Baker M. A. VDAC1 is a transplasma membrane NADH-ferricyanide reductase / M. A. Baker, D. J. Lane, J. D. Ly [et al.] // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279, N 6. – P. 4811-4819.
28. Battersby B. J. Influence of acclimation temperature on mitochondrial DNA, RNA, and enzymes in skeletal muscle / B. J. Battersby, C. D. Moyes // *J Exp Biol.* – 1998. – V. 275, N 3. – P. 905-912.
29. Benz R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins / R. Benz // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1197, N 2. – P. 167-196.
30. Bereiter-Hahn J. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria / J. Bereiter-Hahn, M. Vöth // *Microsc. Res. Tech.* – 1994. – V. 27. – P. 198-219.
31. Berl S. Compartmentation of amino acid metabolism / S. Berl, D. D. Clarke // *Handbook of Neurochemistry* (edit. by A. Lajtha). – 1969. – V. 2. – P. 447-472.
32. Betaneli V. The role of lipids in VDAC oligomerization / V. Betaneli, E. P. Petrov, P. Schwille // *Biophys J.* – 2012. – V. 102, N 3. – P. 523-531.
33. Bhushan S. *In vitro* and *in vivo* methods to study protein import into plant mitochondria / S. Bhushan, P. F. Pavlov, C. Rudhe, E. Glaser // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – V. 390. – P. 131-150.
34. Birky C. W. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models / C. W. Birky // *Annu. Rev. Genet.* – 2001. – V. 35. – P. 125-148.
35. Björkholm P. Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting / P. Björkholm, A. Harish, E. Hagström [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2015. – V. 112, N 33. – P. 10154-10161.

36. Blachly-Dyson E. VDAC channels / E. Blachly-Dyson, M. Forte // IUBMB Life. – 2001. – V. 52, N 3-5. – P. 113-118.
37. Bock R. The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants / R. Bock // Trends Plant Sci. – 2010. – V. 15, N 1. – P. 11–22.
38. Boesch P. Plant mitochondria possess a short-patch base excision DNA repair pathway / P.Boesch, N. Ibrahim, F. Paulus [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37, N 17. – P. 5690-5700.
39. Boesch P. Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria / P. Boesch , N. Ibrahim , A. Dietrich [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2010. – V. 38, N 5 – P. 1478-1488.
40. Boisson B. Unexpected protein families including cell defense components feature in the N-myristoylome of a higher eukaryote / B. Boisson, C. Giglione, T. Meinnel // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278, N 44. – P. 43418-43429.
41. Bok J. W. Possible benefits of *kalilo* plasmids to their *Neurospora* hosts / J. W. Bok, A. J. Griffiths // Plasmid. – 2000. – V. 43, N 2. – P. 176-180.
42. Bouzaidi-Tiali N. Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei* / N. Bouzaidi-Tiali, E. Aeby, F. Charrière [et al.] // EMBO J. – 2007. – V. 26, N 20. – P. 4302-4312.
43. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72, N 1-2. – P. 248-254.
44. Breidenbach R. W. Biogenesis of mitochondria in germinating peanut cotyledons. II. Changes in cytochromes and mitochondrial DNA / R. W. Breidenbach, P. Castelfranco, R. S. Criddle // Plant Physiol. – 1967. – V. 42, N 8. – P.1035-1041.
45. Brown R.H. Mitochondrial plasmids: DNA and RNA. / R.H. Brown, M. Zhang // The molecular biology of plant mitochondria (edit. by C. S. Levings, I. K. Vasil). – 1995. – P. 61-91.
46. Buettner R. Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform / R. Buettner, G. Papoutsoglou, E. Scemes [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2000. – V. 97, N 7. – P. 3201-3206.
47. Burger G. Parallels in genome evolution in mitochondria and bacterial symbionts / G. Burger, B. F. Lang // IUBMB Life. – 2003. – V. 55, N 4-5. – P. 205-212.

48. Campo M. L. Revisiting trends on mitochondrial mega-channels for the import of proteins and nucleic acids / M. L. Campo, P. M. Peixoto, S. Martinez-Caballero // J. Bioenerg. Biomembr. – 2017. – V. 49, N 1. – P. 75-99.
49. Chang S. Mitochondrial genome sequencing helps show the evolutionary mechanism of mitochondrial genome formation in *Brassica* / S. Chang, T. Yang, T. Du [et al.] // BMC Genomics. – 2011. – V. 12. – P. 497.
50. Cherry J. H. Nucleic acid, mitochondria and enzyme changes in cotyledons of peanut seeds during germination / J. H. Cherry // Plant Physiol. – 1963. – V. 38, N 4. – P. 440-446.
51. Christensen A.C. Mitochondrial DNA Repair and Genome Evolution / A.C. Christensen // Annual Plant Reviews. – 2018. – V. 50. – P. 11-32.
52. Colombini M. The published 3D structure of the VDAC channel: native or not? / M. Colombini // Trends Biochem Sci. – 2009. – V. 34, N 8. – P. 382-389.
53. Colombini M. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane / M. Colombini, E. Blachly-Dyson, M. Forte // Ion. Channels. – 1996. – V. 4. – P. 169-202.
54. Colombini M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol / M. Colombini // Mol Cell Biochem. – 2004. – V. 256, N 1-2. – P. 107-115.
55. Cui N. AtTSPO, a translocator protein, in stress responses in Arabidopsis / N. Cui, Z. Song, B. Yang [et al.] // Environmental and Experimental Botany. – 2016. – V. 129. – P. 13-22.
56. Cupp J. D. Minireview: DNA Replication in Plant Mitochondria / J. D. Cupp, B. L. Nielsen // Mitochondrion. – 2014. – V. 19PB. – P. 231-237.
57. Dai H. Population heterogeneity of higher-plant mitochondria in structure and function / H. Dai, Y. S. Lo, W. N. Jane [et al.] // Eur J Cell Biol. – 1998. – V. 75, N 2. – P. 198-209.
58. Darbandi-Tonkabon R. Neuroactive steroid interactions with voltage-dependent anion channels: lack of relationship to GABA(A) receptor modulation and anesthesia / R. Darbandi-Tonkabon, B. D. Manion, W. R. Hastings [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. – 2004. – V. 308, N 2. – P. 502-511.
59. De Vos K. J. Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission / K. J. De Vos, V. J. Allan, A. J. Grierson [et al.] // Curr. Biol. – 2005. – V. 15, N 7. – P. 678-683.

60. Delage L. The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA^{Val} import into mitochondria / L. Delage, A. M. Duchene, M. Zaepfel [et al.] // The Plant Journal. – 2003. – V. 34, N 5. – P. 623-633.
61. Dietrich A. A single base change prevents import of cytosolic tRNA(Ala) into mitochondria in transgenic plants / A. Dietrich, L. Maréchal-Drouard, V. Carneiro [et al.] // Plant J. – 1996. – V. 10, N 5. – P. 913-918.
62. Doolittle W. F. How big is the iceberg of which organellar genes in nuclear genomes are but the tip? / W. F. Doolittle, Y. Boucher, C. L. Nesbo [et al.] // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003. – V. 358, N 1429. – P. 39-57.
63. Douce R. The uniqueness of plant mitochondria / Douce R., Neuburger M. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1989. – V. 40. – P. 371-414.
64. Duchêne A. M. Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria / A. M. Duchêne, C. Pujol, L. Maréchal-Drouard // Curr Genet. – 2009. – V. 55, N 1. – P. 1–18.
65. Duncan O. Multiple lines of evidence localize signaling, morphology, and lipid biosynthesis machinery to the mitochondrial outer membrane of *Arabidopsis* / O. Duncan, N. L. Taylor, C. Carrie [et al.] // Plant Physiology. – 2011. – V. 157, N 3. – P. 1093-1113.
66. Elkeles A. Multiple cDNAs of wheat voltage-dependent anion channels (VDAC): isolation, differential expression, mapping and evolution / A. Elkeles, K. M. Devos, D. Graur [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1995. – V. 29, N 1. – P. 109-124.
67. Entelis N. A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* / N. Entelis, I. Brandina, P. Kamenski [et al.] // Genes Dev. – 2006. – V. 20, N 12. – P. 1609-1620.
68. Entelis N. S. 5S rRNA and tRNA import into human mitochondria: comparison of in vitro requirements / N. S. Entelis, O. A. Kolesnikova, S. Dogan [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, N 49. – P. 45642-45653.
69. Esser K. Plasmids of eukaryotes / K. Esser, U. Kuck, C. Lang-Hinrichs [et al.] // Fundamentals and Applications. – 1986. V. 1. – P. 7-55.
70. Fairman J. W. The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports / J. W. Fairman, N. Noinaj, S. K. Buchanan // Current Opinion in Structural Biology. – 2011. – V. 21, N 4. – P. 523-531.

71. Filée J. Evolution of DNA polymerase families: evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins / J. Filée, P. Forterre, T. Sen-Lin [et al.] // J Mol Evol. – 2002. – V. 54, N 6. – P. 763-773.
72. Flamand M.C. Sequence and transcription analysis of mitochondrial plasmids isolated from cytoplasmic male-sterile lines of *Vicia faba* / M. C. Flamand, J. P. Goblet, G. Duc [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1992. – V.19, N 6. – P. 913-923.
73. Forner J. Distant sequences determine 5'-end formation of cox3 transcripts in *Arabidopsis thaliana* ecotype C24 / J. Forner, B. Weber, C. Wierholter [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2005. – V. 33, N 15. – P. 4673-4682.
74. Friedman J. R. ER tubules mark sites of mitochondrial division / J. R. Friedman, L. L. Lackner, M. West [et al.] // Science. – 2011. – V. 334, N 6054. – P. 358-362.
75. Frisell W. R. Quantitative studies on the soluble compartments of light and heavy mitochondria from rat liver / W. R. Frisell, M. V. Patwardhan, C. G. Mackenzie // J Biol Chem. – 1965. – V. 240. – P. 1829-1835.
76. Fuchs R. Immobilized subpopulations of leaf epidermal mitochondria mediate PENETRATION2-dependent pathogen entry control in *Arabidopsis* / R. Fuchs, M. Kopischke, C. Klapprodt [et al.] // The Plant Cell. – 2016. – V. 28, N 1. – P. 130–145.
77. Fujimoto M. *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP3A and DRP3B are functionally redundant in mitochondrial fission, but have distinct roles in peroxisomal fission / M. Fujimoto, S. Arimura, S. Mano [et al.] // Plant J. – 2009. – V. 58, N 3. – P. 388-400.
78. Gandini C. L. Foreign plastid sequences in plant mitochondria are frequently acquired via mitochondrion-to-mitochondrion horizontal transfer / C. L. Gandini, M. V. Sanchez-Puerta // Sci Rep. – 2017. – V. 7, N 43402. – P. 1-8.
79. Garcia M. Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA / M. Garcia, T. Delaveau, S. Goussard [et al.] // EMBO Rep. – 2010. – V. 11, N 4. – P. 285-291.
80. Giezen M. Mitochondrion derived organelles in protists and fungi / M. Giezen, J. Tovar, C. G. Clark // A Survey of Cell Biology. International Review of Cytology. – 2005. – V. 244. – P. 175-225.
81. Graham J. M. OptiPrep density gradient solutions for nonmammalian organelles / J. M. Graham // The Scientific World Journal. – 2002. – V. 2. – P. 1638–1642.

82. Granville D. J. Mitochondria: regulators of cell death and survival / D. J. Granville, R. A. Gottlieb // *Scientific World J.* – 2002. – V. 2. – P. 1569-1578.
83. Grewe F. Comparative analysis of 11 *Brassicales* mitochondrial genomes and the mitochondrial transcriptome of *Brassica oleracea* / F. Grewe, P. P. Edger, I. Keren [et al.] // *Mitochondrion.* – 2014. – V. 19. – P. 135-143.
84. Gualberto J. M. The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance / J. M. Gualberto, D. Mileshina, C. Wallet [et al.] // *Biochimie.* – 2014. – V. 100. – P. 107-120.
85. Guillaumot D. The *Arabidopsis* TSPO-related protein is a stress and abscisic acid-regulated, endoplasmic reticulum-Golgi-localized membrane protein / D. Guillaumot, S. Guillon, T. Deplanque [et al.] // *Plant J.* – 2009. – V. 60, N 2. – P. 242-256.
86. Gutiérrez R. A. The Plant-Specific Database. Classification of Arabidopsis Proteins Based on Their Phylogenetic Profile / R. A. Gutiérrez, M. D. Larson, C. Wilkerson // *Plant Physiology.* – V. 135, N 4. – P. 1888-1892.
87. Handa H. Linear plasmids in plant mitochondria: peaceful coexistences or malicious invasions? / Handa H. // *Mitochondrion.* – 2008. – V. 8, N 1. – P. 15-25.
88. Handa H. Structural features and expression analysis of a linear mitochondrial plasmid in rapeseed (*Brassica napus L.*) / H. Handa, K. Itani, H. Sato // *Mol. Genet. Genom.* – 2002. – V. 267, N 6. – P. 797-805.
89. Hao W. Fine-scale mergers of chloroplast and mitochondrial genes create functional, transcompartmentally chimeric mitochondrial genes / W. Hao, J. D. Palmer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106, N 39. – P. 16728–16733.
90. Hao W. Gorgeous mosaic of mitochondrial genes created by horizontal transfer and gene conversion / W. Hao, A. O. Richardson, Y. Zheng [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – V. 7, N 50. – P. 21576-21581.
91. Haslam J. M. A requirement for mitochondrial protein synthesis for the formation of a normal adenine nucleotide transporter in yeast mitochondria / J. M. Haslam, M. Perkins, A. W. Linnane // *Biochem. J.* – 1973. – V. 134, N 4. – P. 935-947.
92. Hausner G. Fungal Mitochondrial Genomes, Plasmids and Introns / G. Hausner // *Applied Mycology and Biotechnology* (edit. by D.K. Arora, G.G. Khachatourians). Elsevier Science. – 2003. – V. 3. – P. 101-131.

93. Heinemeyer J. Blue-native gel electrophoresis for the characterization of protein complexes in plants / J. Heinemeyer, D. Lewejohann, H. P. Braun // *Methods Mol. Biol.* – 2007. – V. 355. – P. 343-352.
94. Holzmann J. RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme / J. Holzmann, P. Frank, E. Löffler [et al.] // *Cell.* – 2008. – V. 135, N 3. – P. 462-474.
95. Homble F. Plant VDAC: facts and speculations / F. Homble, E. M. Krammer, M. Prevost // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2012. – V. 1818, № 6. – P. 1486-1501.
96. Hong S. Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in *Arabidopsis* / S. Hong, S. Sahn, A. Lyu [et al.] // *Plant Cell Physiology.* – 2010. – V. 51, N 10. – P. 1694-1706.
97. Howell K. A. Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with promitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus / K. A. Howell, A. H. Millar, J. Whelan // *Plant Molecular Biology.* – 2006. – V. 60, N 2. – P. 201-223.
98. Huang J. Horizontal gene transfer in eukaryotes: the weak-link model / J. Huang // *Bioessays.* – 2013. – V. 35, N 10. – P. 868-875.
99. Ibrahim N. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement / N. Ibrahim, H. Handa, M. V. Koulintchenko [et al.] // *Pharmaceutical Research.* – 2011. – V. 28, N 11. – P. 2871-2882.
100. Jackson C. B. Heterologous expression from the human D-Loop *in organello* / C. B. Jackson, C. Zbindena, S. Gallati [et al.] // *Mitochondrion.* – 2014 – V. 17. – P. 67–75.
101. Janska H. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility / H. Janska, R. Sarria, M. Woloszynska [et al.] // *Plant Cell.* – 1998. – V. 10, N 7. – P. 1163-1180.
102. Johnston I. G. Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention / I. G. Johnston, B. P. Williams // *Cell Systems.* – 2016. – V. 2, N 2. – P. 101-111.
103. Jones D. G. The plant immune system / D. G. Jones, J. L. Dangl // *Nature.* – 2006. – V. 444, N 7117. – P. 323-329.

104. Kapushoc S. T. End processing precedes mitochondrial importation and editing of tRNAs in *Leishmania tarentolae* / S. T. Kapushoc, J. D. Alfonzo, M. A. Rubio [et al.] // J Biol Chem. – 2000. – V. 275, N 48. – P. 37907-37914.
105. Kawano S. Sexuality of mitochondria: fusion, recombination, and plasmids / S. Kawano, H. Takano, T. Kuroiwa // Int Rev Cytol. – 1995. – V. 161. – P. 49-110.
106. Keinan N. The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis / N. Keinan, H. Pahima, D. Ben-Hail [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2013. – V. 1833, N 7. – P. 1745-1754.
107. Kemble R. J. Classification of normal and male-sterile cytoplasms in maize. Electrophoretic analysis of DNA species in mitochondria / R. J. Kemble, R. E. Gunn, R. B. Flavell // Genetics. – 1980. – V. 95, N 2. – P. 461-458.
108. Kemble R. J. The *Brassica* mitochondrial DNA plasmid and large RNAs are not exclusively associated with cytoplasmic male sterility / R. J. Kemble, J. E. Carlson, L. R. Erickson [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1986. – V. 205, N 1. – P. 183-185.
109. Klein M. Physical mapping of the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by cosmid and YAC clones / M. Klein, U. Eckert-Ossenkopp, I. Schmiedeberg [et al.] // Plant J. – 1994. – V. 6, N 3. – P. 447-455.
110. Kleine T. DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis / T. Kleine, U. G. Maier, D. Leister // Annu. Rev. Plant Biol. – 2009. – V. 60. – P. 115-138.
111. Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier / M. Klingenberg // Biochimica et Biophysica Acta. – 2008. – V. 1778, N 10. – P. 1978-2021.
112. Kmiec B. Organellar oligopeptidase (OOP) provides a complementary pathway for targeting peptide degradation in mitochondria and chloroplasts / B. Kmiec, P. F. Teixeira, R. P. Berntsson [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – V. 110, N 40. – P. 3761-3769.
113. Knoop V. Mitochondrial genome evolution in the plant lineage / V. Knoop, U. Volkmar, J. Hecht [et al.] // Plant Mitochondria (edit. by F. Kempken). Advances in Plant Biology. – 2011. – P. 3-29.
114. Knoop V. Molecular biology of the plant mitochondrion / V. Knoop, A. Brennicke // CRC Crit Rev Plant Sci. – 2002. – V. 2, № 2. – P. 111-126.

115. Knoop V. The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective / V. Knoop // *Curr Genet.* – 2004. – V. 46, N 3. – P. 123-139.
116. Knopf C.W. Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases / C.W. Knopf // *Virus Genes.* – 1998. – V. 16, N 1. – P. 47-58.
117. Kohler R. H. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids / R. H. Kohler, J. Cao, W. R. Zipfel [et. al.] // *Science.* – 1997. – V. 276, N 5321. – P. 2039-2042.
118. Kolesnikov A. A. Diversity of mitochondrial genome organization / A. A. Kolesnikov, E. S. Gerasimov // *Biochemistry (Mosc).* – 2012. – V. 77, N 13. – P. 1424-1435.
119. Konstantinov Y. M. DNA import into mitochondria / Y. M. Konstantinov, A. Dietrich, F. Weber-Lotfi [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 2016. – V. 81, N 10. – P. 1044-1056.
120. Kornmann B. The molecular hug between the ER and the mitochondria / B. Kornmann // *Curr Opin Cell Biol.* – 2013. – V. 25, N 4. – P. 443-8.
121. Koulintchenko M. Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression / M. Koulintchenko, R. J. Temperley, P. A. Mason [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2006. – V. 15, N 1. – P. 143-154.
122. Koulintchenko M. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex / M. Koulintchenko, Y. Konstantinov, A. Dietrich // *EMBO J.* – 2003. – V. 22, N 6. – P. 1245-1254.
123. Kubo T. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations / T. Kubo, K. J. Newton // *Mitochondrion.* – 2008. – V. 8, N 1. – P. 5-14.
124. Kubo T. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA-cys (GCA) / T. Kubo, S. Nishizawa, A. Sugawara [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2000. – V. 28, N 13. – P. 2571-2576.
125. Kusano T. Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death / T. Kusano, C. Tateda, T. Berberich [et al.] // *Plant Cell Reports.* – 2009. – V. 28, N 9. – P. 1301-1308.
126. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227, N 5259. – P. 680-685.

127. Layton B. E. *In situ* imaging of mitochondrial outer membrane pores using atomic force microscopy / B. E. Layton, A. M. Sastry, C. M. Lastoskie [et al.] // *Biotechniques*. – 2004. – V. 37, N 4. – P. 564-573.
128. Lee C. M. The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal / C. M. Lee, J. Sedman, W. Neupert [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274, N 30. – P. 20937-20942.
129. Lee I. Diverse membrane-associated proteins contain a novel SMP domain / I. Lee, W. Hong // *FASEB J.* – 2006. – V. 20, № 2. – P. 202-206.
130. Lemeshko V. V. Model of the outer membrane potential generation by the inner membrane of mitochondria / V. V. Lemeshko // *Biophysical Journal*. – 2002. – V. 82 – P. 684-692.
131. Leon P. Expression of ORF1 of the linear 2.3 kb plasmid of maize mitochondria: product localization and similarities to the 130 kDa protein encoded by the S2 episome / P. Leon, C. O'Brien-Vedder, V. Walbot // *Curr. Genet.* – 1992. – V. 22, N 1. – P. 61-67.
132. Leon P. Molecular analysis of the linear 2.3 kb plasmid of maize mitochondria: apparent capture of tRNA genes / P. Leon, V. Walbot, P. Bedinger // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – V. 17, N 11. – P. 4089-4099.
133. Levings C. S. Nucleotide sequence of the S-2 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize / C. S. Levings, R. R. Sederoff // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1983. – V. 80, N 13. – P. 4055-4059.
134. Li F. W. Horizontal transfer of an adaptive chimeric photoreceptor from bryophytes to ferns / F.-W. Li, J. C. Villarreal, S. Kelly [et al.] // *PNAS*. – 2014. – V. 111, N 18. – P. 6672-6677.
135. Li L. Characterization of a novel β -barrel protein (AtOM47) from the mitochondrial outer membrane of *Arabidopsis thaliana* / L. Li, S. Kubiszewski-Jakubiak, J. Radomiljac [et al.] // *J Exp Bot.* – 2016. – V. 67, N 21. – P. 6061-6075.
136. Liere K. The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: composition, function, and regulation. / K. Liere, A. Weihe, T. Börner // *J Plant Physiol.* – 2011. – V. 168, N 12. – P. 1345-1360.
137. Lindemann P. A novel *Arabidopsis thaliana* protein is a functional peripheral-type benzodiazepine receptor / P. Lindemann, A. Koch, B. Degenhardt [et al.] // *Plant and cell physiology*. – 2004. – V. 45, N 6. – P. 723-733.

138. Lo Y. S. Characterization of the structure and DNA complexity of mung bean mitochondrial nucleoids / Y. S. Lo, L. J. Hsiao, N. Cheng [et al.] // *Mol Cells*. – 2011. – V. 31, N 3. – P. 217-224.
139. Logan D. C. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos / D. C. Logan, A. H. Millar, L. J. Sweetlove [et al.] // *Plant Physiol*. – 2001. – V. 125, N 2. – P. 662-672.
140. Logan D. C. Mitochondrial fusion, division and positioning in plants / Logan D. C. // *Biochem Soc Trans*. – 2010. – 38, N 3. – P. 789-795.
141. Logan D. C. The mitochondrial compartment / D. C. Logan // *Journal of Experimental Botany*. – 2006. – V. 57, N 6. – P. 1225-1243.
142. Lonsdale D. M. The plant mitochondrial genome: Homologous recombination as mechanism for generating heterogeneity / D. M. Lonsdale, T. Brears, T. P. Hodge [et al.] // *Philos. Trans*. – 1988. – V. 319. – 149-163.
143. Lund H. A. Biochemical and Cytological Changes Accompanying Growth and Differentiation in the Roots of *Zea mays* / H. A. Lund, A. E. Vatter, J. B. Hanson // *J. Biophysic and Biochem. Cytol*. – 1958. – V. 4, N 1. – P. 87-96.
144. Ma P.-F. Evidence for horizontal transfer of mitochondrial DNA to the plastid genome in a bamboo genus / P.-F. Ma, Y.-X. Zhang, Z.-H. Guo [et al.] // *Sci. Rep*. – 2015. – V. 5, N 11608. – P. 1-9.
145. MacKenzie J. A. Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane / J. A. MacKenzie, R. M. Payne // *J. Biol. Chem*. – 2004. – V. 279, N 11. – P. 9803-9810.
146. Malhotra S. S. Structural development during germination of different populations of mitochondria from pea cotyledons / S. S. Malhotra, M. Spencer // *Plant Physiol*. – 1973. – V. 52, N 6. – P. 575-579.
147. Marienfeld J. R. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* is composed of both native and immigration information / J. R. Marienfeld, M. Unseld, A. Brennicke // *Trends Plant Sci*. – 1999. – V. 4, N 12. – P. 495-502.
148. Matera J. T. Unique Changes in Mitochondrial Genomes Associated with Reversions of S-Type Cytoplasmic Male Sterility in Maizemar / J. T. Matera, J. Monroe, W. Smelser [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6, N 8. – e23405.

149. McDermott P. The mitochondrial genome of a cytoplasmic male sterile line of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) contains an integrated linear plasmid-like element / P. McDermott, V. Connolly, T. A. Kavanagh // Theor. Appl. Genet. – 2008. – V. 117, N 3. – P. 459-470.
150. Metelkin E. Mathematical modeling of mitochondrial adenine nucleotide translocase / E. Metelkin, I. Goryanin, O. Demin // Biophysical Journal. – 2006. – V. 90, N 2. – P. 423-432.
151. Meyer E. H. Isolation of mitochondria from plant cell culture / E. H. Meyer, A. H. Millar // Methods Mol. Biol. – 2008. – V. 425. – P. 163-169.
152. Michaud M. AtMic60 is involved in plant mitochondria lipid trafficking and is part of a large complex / M. Michaud, V. Gros, M. Tardif [et al.] // Curr Biol. – 2016. – V. 26, N 5. – P. 627-639.
153. Mikami T. Variation in organelle genome organization associated with male sterile cytoplasms in sugar beet / T. Mikami, T. Harada, Y. Kishima [et al.] // Gamma Field Symposia. – 1986. – V. 25. – P. 131–149.
154. Mileshina D. Transfection of plant mitochondria and *in organello* gene integration / D. Mileshina, M. Koulintchenko, Yu. Konstantinov [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2011. – V. 39, N 17. – e115.
155. Mishra N. C. Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death / N. C. Mishra, S. Kumar // Indian J. Exp. Biol. – 2005. – V. 43, N 1. – P. 25-34.
156. Morley S. A. Plant mitochondrial DNA / S. A. Morley, B. L. Nielsen // Front Biosci. – 2017. – V. 22. – P. 1023-1032.
157. Mower J. P. Horizontal acquisition of multiple mitochondrial genes from a parasitic plant followed by gene conversion with host mitochondrial genes / J. P. Mower, S. Stefanović, W. Hao [et al.] // BMC Biol. – 2010. – V. 8, N 1 – P. 150.
158. Mower J. P. Plant mitochondrial genome diversity: the genomics revolution / J. P. Mower, D. B. Sloan, A. J. Alverson // Plant genome diversity (edit. by J. F. Wendel, J. Greilhuber, J. Dolezel, I. J. Leitch). – 2012. – V. 1. – P. 123–144.
159. Muñoz-Gómez S. A. Ancient homology of the mitochondrial contact site and cristae organizing system points to an endosymbiotic origin of mitochondrial cristae / S. A. Muñoz-Gómez, C. H. Slamovits, J. B. Dacks [et al.] // Curr Biol. – 2015 – V. 25, N 11. – P. 1489-1495.

160. Murcha M. W. Isolation of intact mitochondria from the model plant species *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* / W. M. Murcha, J. Whelan // *Methods Mol Biol.* – 2015. – V. 1305. – P. 1-12.
161. Murcha M. W. Plant-specific preprotein and amino acid transporter proteins are required for tRNA import into mitochondria / M. W. Murcha, S. Kubiszewski-Jakubiak, P. F. Teixeira [et al.] // *Plant Physiology.* – 2016. – V. 172, N 4. – P. 2471-2490.
162. Murley A. ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast / A. Murley, L. L. Lackner, C. Osman [et al.] // *eLife.* – 2013. – V. 2. – e00422.
163. Nakamura Y. Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes / Y. Nakamura, T. Itoh, H. Matsuda [et al.] // *Nature Genetics.* – 2004. – V. 36, N 7. – P. 760-766.
164. Neuburger M. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll / M. Neuburger, E. P. Journet, R. Bligny [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1982. – V. 217, N 1. – P. 312-323.
165. Newton K. J. Maize mitochondria synthesize organ-specific polypeptides / K. J. Newton, V. Walbot // *PNAS.* – 1985. – V. 82, N 20. – P. 6879-6883.
166. Niazi A. K. Targeting nucleic acids into mitochondria: progress and prospects / A. K. Niazi, D. Mileshina, A. Cosset [et al.] // *Mitochondrion.* – 2013. – V. 13, N 5. – P. 548-558.
167. Niemann M. tRNAs and proteins use the same import channel for translocation across the mitochondrial outer membrane of trypanosomes / M. Niemann, A. Harsman, J. Mani [et al.] // *PNAS.* – 2017. – V. 114, N 37. – P. 7679-7687.
168. Nijtmans L. G. J. Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes / L. G. J. Nijtmans, N. S. Henderson, I. J. Holt // *Methods.* – 2002. – V. 26, N 4. – P. 327-334.
169. Nishimura M. Isolation and Characterization of Metabolically Competent Mitochondria from Spinach Leaf Protoplasts / M. Nishimura, R. Douce, T. Akazawa // *Plant Physiol.* – 1982. – V. 69, N 4. – P. 916-920.
170. Oda K. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: a primitive form of plant mitochondrial genome / K. Oda, K. Yamato, E. Ohta [et al.] // *J. Mol. Biol.* 1992. – V. 223, N 1. – P. 1-7.

171. Okada S. F. Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells / S. F. Okada, W. K. O'Neal, P. Huang [et al.] // *J Gen Physiol.* – 2004. – V. 124, N 5. – P. 513-526.
172. Oldenburg D. J. Size and structure of replicating mitochondrial DNA in cultured tobacco cells / D. J. Oldenburg, A. J. Bendich // *Plant Cell.* – 1996. – V. 8, N 3. – P. 447-461.
173. Oren Y. Transfer of noncoding DNA drives regulatory rewiring in bacteria / Y. Oren, M. B. Smith, N. I. Johns [et al.] // *PNAS.* – 2014. – V. 111, N 45. – P. 16112-16117.
174. Paillard M. Nucleotide sequence of the S-1 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize / M. Paillard, R. R. Sederoff, C. S. Levings // *EMBO J.* – 1985. – V. 4, N 5. – P. 1125-1128.
175. Palmer J. D. An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus *Brassica* / J. D. Palmer, C. R. Shields, D. B. Cohen [et al.] // *Nature.* – 1983b. – V. 301. – P. 725-728.
176. Papadopoulos V. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function / V. Papadopoulos, M. Baraldi, T. R. Guilarte [et al.] // *Trends Pharmacol.* – 2006. – V. 27, N 8. – P. 402-409.
177. Park S. Dynamic evolution of *Geranium* mitochondrial genomes through multiple horizontal and intracellular gene transfers / S. Park, F. Grewe, A. Zhu [et al.] // *New Phytol.* – 2015. – 208, N 2. – P. 570-583.
178. Petrucci E. Isolation of mitochondria from embryogenic cultures of *Picea abies* (L.) Karst. and *Abies cephalonica* Loud.: characterization of a K⁺_{ATP} channel / E. Petrucci, A. Bertolini, J. Krajn'á'kova [et. al.] // *Plant Cell Rep.* – 2008. – V. 27, N 1. – P. 137-146.
179. Pollak J. K. The isolation by isopycnic density-gradient centrifugation of two mitochondrial populations from livers of embryonic and fed and starved adult rats / J. K. Pollak, E. A. Munn // *Biochem J.* – 1970. – V. 117, N 5. – P. 913-919.
180. Preuten T. Fewer genes than organelles: extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells / T. Preuten, E. Cincu, J. Fuchs [et al.] // *Plant J.* – 2010. – V. 64, N 6. – P. 948-959.
181. Rappaport L. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function / L. Rappaport, P. Oliviero, J. L. Samuel // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – V. 184, N 1-2. – P. 101-105.

182. Remacle C. Genomics of Chloroplasts and Mitochondria, Advances in Photosynthesis and Respiration / C. Remacle, V. Larosa, T. Salinas [et al.] // Springer Science (edit. by R. Bock, V. Knoop). – 2012. – V. 35. – P. 443-458.
183. Rice D. W. An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters / D. W. Rice, J. D. Palmer // BMC Biol. – 2006. – V. 4, N 31. – P. 1-15.
184. Rice D. W. Horizontal transfer of entire genomes via mitochondrial fusion in the angiosperm *Amborella* / D. W. Rice, A. J. Alverson, A.O. Richardson [et al.] // Science. – 2013. – V. 342, N 6165. – P. 1468-1473.
185. Richardson A. O. Horizontal gene transfer in plants / A. O. Richardson, J. D. Palmer // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58, N 1. – P. 1-9.
186. Robert N. Voltage-dependent-anion-channels (VDACs) in *Arabidopsis* have a dual localization in the cell but show a distinct role in mitochondria / N. Robert, I. d'Erfurth, A. Marmagne [et al.] // Plant Mol Biol. – 2012. – V. 78, N 4-5. – P. 431-446.
187. Roman I. Direct measurement of VDAC-actin interaction by surface plasmon resonance / I. Roman, J. Figys, G. Steurs [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2006. – 1758, N 4. – P. 479-486.
188. Rostovtseva T. ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane / T. Rostovtseva, M. Colombini // J Biol Chem. – 1996. – V. 271, N 45. – P. 28006-28008.
189. Rostovtseva T. K. VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids / T. K. Rostovtseva, S. M. Bezrukov // J Bioenerg Biomembr. – 2008. – V. 40, N 3. – P. 163-170.
190. Rubio M. T. tRNA travels from the cytoplasm to organelles / M. T. Rubio, A. K. Hopper // Wiley Interdiscip Rev RNA. – 2011. – V. 2, N 6. – P. 802-817.
191. Rubio M.A. Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import / M. A. Rubio, J. J. Rinehart, B. Krett [et al.] // Proc. Nalt. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105, N 27. – P. 9186-9191.
192. Sabar M. Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis / M. Sabar, J. Balk, C. J. Leaver // Plant Journal. – 2005. – V. 44, N 5. – P. 893-901.

193. Sabirov R. Z. Genetic demonstration that the plasma membrane maxianion channel and voltage-dependent anion channels are unrelated proteins / R. Z. Sabirov, T. Sheiko, H. Liu [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2006. – V. 281, N 4. – P. 1897-1904.
194. Sakaguchi K. Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adenovirus / K. Sakaguchi // Microbiol. Rev. – 1990. – V. 54, N 1. – P. 66-74.
195. Saks V. A. Control of cellular respiration in vivo by mitochondrial outer membrane and by creatine kinase. A new speculative hypothesis: possible involvement of mitochondrialcytoskeleton interactions / V. A. Saks, A. V. Kuznetsov, Z. A. Khuchua [et al.] // J Mol Cell Cardiol. – 1995. – V. 27, N 1. – P. 625-645.
196. Salinas T. Recent advances in tRNA mitochondrial import / T. Salinas, A.-M. Duchêne, L. Maréchal-Drouard // Trends Biochem. Sci. – 2008. – V. 33, N7. – P. 320-329.
197. Salinas T. The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria / T. Salinas, A. M. Duchene, L. Delage [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – V. 103, N 48. – P. 18362-18367.
198. Salinas-Giegé T. tRNA biology in mitochondria / T. Salinas-Giegé , R. Giegé, P. Giegé // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – V. 16, N 3. – P. 4518-4559.
199. Sanchez-Puerta M. V. Involvement of plastid, mitochondrial and nuclear genomes in plant-to plant horizontal gene transfer / M. V. Sanchez-Puerta // Acta Soc Bot Pol. – 2014. – V. 83, N 4. – P. 317-323.
200. Sanchez-Puerta M. V. Unparalleled replacement of native mitochondrial genes by foreign homologs in a holoparasitic plant / M. V. Sanchez-Puerta, L. E. García, J. Wohlfeiler [et al.] // New Phytologist. – 2016. – V. 214, N 1. – P. 376–387.
201. Saumitou-Laprade P. A linear 10.4 kb plasmid in the mitochondria of *Beta maritima* / P. Saumitou-Laprade, G. Pannebecker, F. Maggouta [et al.] // Curr. Genet. – 1989. – V. 16, N 3. – P. 181-186.
202. Scherer B. The new atractyloside type compound as a high affinity ligand to the adenine nucleotide carrier / B. Scherer, K. Grebe, P. Riccio [et al.] // FEBS letters. – 1973. – V. 31, N 1. – P. 15-19.
203. Schmid M. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development / M. Schmid, T. S. Davison, S. R. Henz [et al.] // Nat Genet. – 2005. – V. 37, N 5. – P. 501-506.

204. Schneider A. Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation / A. Schneider // *Annu Rev Biochem.* – 2011. – V. 80. – P. 1033-1053.
205. Schultheiss H.-P. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by organ specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis / H.-P. Schultheiss, P. A. Berg, M. Klingenberg // *Clin. exp. Immunol.* – 1984. – V. 58, N 3. – P. 596-602.
206. Schultz R. A. Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues / R. A. Schultz, S. J. Swoap, L. D. McDaniel [et al.] // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273, N 6. – P. 3447-3451.
207. Schuster W. The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus / W. Schuster, A. Brennicke // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* – 1994. – V. 45. – P. 61-78.
208. Scott I. The missing link: inter-organellar connections in mitochondria and peroxisomes? / I. Scott, I. A. Sparkes, D. C. Logan // *Trends Plant Sci.* – 2007. – V. 12, N 9. – P. 380-381.
209. Seidman D. Mitochondrial membrane complex that contains proteins necessary for tRNA import in *Trypanosoma brucei* / D. Seidman, D. Johnson, V. Gerbasi [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2012. – V. 287, N 12. – P. 8892-8903.
210. Shore G.C. Apoptosis: it's BAK to VDAC / G.C. Shore // *EMBO Rep.* – 2009. – V. 10, N 12. – P. 1311-1313.
211. Shoshan-Barmatz V. Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo / V. Shoshan-Barmatz, N. Keinan, S. Abu-Hamad [et al.] // *Biochimica Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics.* – 2010. – V. 1797, N 6-7. – P. 1281-1291.
212. Shoshan-Barmatz V. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death / V. Shoshan-Barmatz, V. De Pinto, M. Zweckstetter [et al.] // *Mol Aspects Med.* – 2010. – V. 31, N 3. – N 227-285.
213. Sieber F. Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications / F. Sieber, A.-M. Duchêne, L. Maréchal-Drouard // *International Review of Cell and Molecular Biology.* – 2011. – V. 287. – P. 145-190.
214. Simeonova E. Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence / E. Simeonova,

- M. Garstka, J. Koziol-Lipińska, A. Mostowska // *Protoplasma*. – 2004. – V. 223, N 2-4. – P. 143-153.
215. Singer T. P. Studies on succinic dehydrogenase. V. Isolation and properties of the dehydrogenase from baker's yeast / T. P. Singer, V. Massey, E. B. Kearney // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1957. – V. 69. – P. 405-21.
216. Skippington E. Miniaturized mitogenome of the parasitic plant *Viscum scurruloideum* is extremely divergent and dynamic and has lost all *nad* genes / E. Skippington, T. J. Barkman, D. W. Rice [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2015. – V. 112, N 27. – P. 3515-3524.
217. Sloan D. B. History of plastid DNA insertions reveals weak deletion and at mutation biases in angiosperm mitochondrial genomes / D. B. Sloan, Z. Wu // *Genome Biol Evol.* – 2014. – V. 6, N 12. – P. 3210-3221.
218. Sloan D.B. Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates / D. B. Sloan, A. J. Alverson, J. P. Chuckalovcak [et al.] // *PloS Biol.* – 2012. – V. 10, N 1. – e1001241.
219. Small I. D. Stoichiometric differences in DNA molecules containing the *atpA* gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial diversity in maize / I. D. Small, P. G. Isaac, C. J. Leaver // *EMBO J.* – 1987. – V. 6, N 4. – P. 865-869.
220. Small I. *In vivo* import of a normal or mutagenized heterologous transfer RNA into the mitochondria of transgenic plants: towards novel ways of influencing mitochondrial gene expression? / I. Small, L. Marechal-Drouard, J. Masson [et al.] // *EMBO J.* – 1992. – V. 11, N 4. – P. 1291-1296.
221. Smart C. J. Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower / C. J. Smart, F. Moneger, C. J. Leaver // *Plant Cell*. – 1994. – V. 6, N 6. – 811-825.
222. Smith A.G. Nucleotide sequence and molecular characterization of a maize mitochondrial plasmid-like DNA / A. G. Smith, D. R. Pring // *Curr. Genet.* – 1987. – V. 12, N 8. – P. 617-623.
223. Smith D. R. Extending the limited transfer window hypothesis to inter-organelle DNA migration / D. R. Smith // *Genome Biol. Evol.* – 2011. – V. 3. – P. 743–748.
224. Smith D. R. Gene conversion shapes linear mitochondrial genome architecture / D. R. Smith, P. J. Keeling // *Genome Biol. Evol.* – 2013. – V. 5, N 5. – P. 905-912.

225. Smith D. R. Mitochondrion-to-plastid DNA transfer: it happens / D. R. Smith // *New Phytol.* – 2014. – V. 202, N 3. – P. 736-738.
226. Smith, D. R. Correlation between nuclear plastid DNA abundance plastid number supports the limited transfer window hypothesis / D. R. Smith, K. Crosby, R. W. Lee // *Genome Biol. Evol.* – 2011. – V. 3. – P. 365–371.
227. Solomos T. Biochemical and structural changes in mitochondria and other cellular components of pea cotyledons during germination / T. Solomos, S. S. Malhotra, S. Prasad [et al.] // *Can. J. Biochem.* – 1972. – V. 50, N 7. – P. 725-737.
228. Southworth D. Freeze-fracture of sperm of *Plumbago zeylanica* L. in pollen and *in vitro* / D. Southworth, G. Strout, S. D. Russell // *Sex. Plant Reprod.* – 1997. – V. 10, N 4. – P. 217-226.
229. Staehelin L. A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains / L. A. Staehelin // *Plant J.* – 1997. – V. 11, N 6. – P. 1151-1165.
230. Stahl A. Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants / A. Stahl, P. Moberg, J. Ytterberg [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2002. – V. 277, N 44. – P. 41931-41939.
231. Swart E. C. The *Oxytricha trifallax* mitochondrial genome / E. C. Swart, M. Nowacki, J. Shum [et al.] // *Genome Biol Evol.* – 2012. – V. 4, N 2 – P. 136-154.
232. Sweetlove L. J. Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana* / L. J. Sweetlove, N. L. Taylor, C. J. Leaver // *Methods in Molecular Biology.* – 2007. – V. 372. – P. 125-136.
233. Tan T. H. tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import / T. H. Tan, R. Pach, A. Crausaz [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 22, N 11. – P. 3707-3717.
234. Tan W. VDAC closure increases calcium ion flux / W. Tan, M. Colombini // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – V. 1768, N 10. – P. 2510-2515.
235. Tarasenko T. A. DNA import into plant mitochondria: complex approach for *in organello* and *in vivo* studies / T. A. Tarasenko, V. I. Tarasenko, M. V. Koulintchenko [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 2019. – V. 84(7). – P. 817-828.
236. Tarassov I. An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA / I. Tarassov, N. Entelis, R. P. Martin // *J. Mol. Biol.* – 1995. – V. 245, N 4. – P. 315-323.

237. Tateda C. Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis* / C. Tateda, K. Watanabe, T. Kusano [et al.] // J Exp Bot. – 2011. – V. 62, N 14. – P. 4773-4785.
238. Thomas C. M. The nucleotide sequence and transcription of minicircular mitochondrial DNA's associated with male-fertile and cytoplasmic malesterile lines of sugarbeet / C. M. Thomas // Nucleic Acids Res. – 1986. – V. 14, N 23. – P. 9353-9370.
239. Thomas C.M. Sugarbeet minicircular mitochondrial DNAs: high-resolution transcript mapping, transcript abundance and copy number determination / C.M. Thomas // Mol. Gen. Genet. – 1992. – V. 234, N 3. – P. 457-465.
240. Timmis J. N. / Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes / J. N. Timmis, M. A. Ayliffe, C. Y. Huang [et al.] // Nat Rev Genet. – 2004. – V. 5, N 2. – P. 123-135.
241. Treangen, T. J. Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes / T. J. Treangen, E. P. Rocha // PLoS Genet. – 2007. – V. 7. – e1001284.
242. Turmel M. The complete mitochondrial DNA sequence of *Mesostigma viride* identifies this green alga as the earliest green plant divergence and predicts a highly compact mitochondrial genome in the ancestor of all green plants / M. Turmel, C. Otis, C. Lemieux // Mol. Biol. Evol. – 2002. – V. 19, N 1. – P. 24-38.
243. Unseld M. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides / M. Unseld, J. R. Marienfeld, P. Brandt [et al.] // Nat. Genet. – 1997. – V. 15, N 1. – P. 57-61.
244. Vanhee C. A TSPO-related protein localizes to the early secretory pathway in *Arabidopsis*, but is targeted to mitochondria when expressed in yeast / C. Vanhee, S. Guillon, D. Masquelier [et al.] // J. Exp. Bot. – 2011. – V. 62, N2. – P. 497-508.
245. Vedel F. Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants / F. Vedel, M. Pla, V. Vitart [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 1994. – V. 32. – P. 601-618.
246. Verechshagina N. A. Import of proteins and nucleic acids into mitochondria / N. A. Verechshagina, Y. M. Konstantinov, P. A. Kamenski [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2018. – V. 83, N 6. – P. 643-661.

247. Vögtle F.-N. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability / F.-N. Vögtle, S. Wortelkamp, R. P. Zahedi [et al.] // *Cell*. – 2009. – V. 139, N 2. – P. 428–439.
248. Wahleithner J. A. Mitochondrial plasmid DNAs of broad bean: nucleotide sequences, complex secondary structures, and transcription / J. A. Wahleithner, D. R. Wolstenholme // *Curr. Genet.* – 1987. – V. 12, N 1. – P. 55-67.
249. Wallet C. The RECG1 DNA translocase is a key factor in recombination surveillance, repair, and segregation of the mitochondrial DNA in *Arabidopsis* / C. Wallet, M. Le Ret, M. Bergdoll [et al.] // *The Plant Cell*. – 2015. – V. 27, N 10. – P. 2907–2925.
250. Wandrey M. Molecular and cell biology of a family of voltage-dependent anion channel porins in *Lotus japonicas* / M. Wandrey, B. Trevaskis, N. Brewin [et al.] // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 134, N 1. – P. 182-193.
251. Wang D. Plastid sequences contribute to some plant mitochondrial genes / D. Wang, M. Rousseau-Gueutin, J. N. Timmis // *Mol Biol Evol.* – 2012. – V. 29, N 7. – P. 1707-1711.
252. Wang G. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import / G. Wang, E. Shimada, J. Zhang [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2012. – V. 109, N 13. – P. 4840-4845.
253. Warren J. M. Linear Plasmids and the Rate of Sequence Evolution in Plant Mitochondrial Genomes / J. M. Warren, M. P. Simmons, Z. Wu [et al.] // *Genome Biol Evol.* – 2016. – V. 8, N 2. – P. 364-374.
254. Weber-Lotfi F. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import / F. Weber-Lotfi, N. Ibrahim, P. Boesch [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – V. 1787, N 5. – P. 320-327.
255. Weber-Lotfi F. Nucleic acid import into mitochondria: new insights into the translocation pathways / F. Weber-Lotfi, M. V. Koulintchenko, N. Ibrahim [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – V. 1853, N 12. – P. 3165-3181.
256. Wehner N. High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of *Arabidopsis* transcription factor function / N. Wehner, L. Hartmann, A. Ehlert [et al.] // *Plant J.* – 2011. – V. 68, N 3. – P. 560-569.
257. Wiesner R. J. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues / R. J. Wiesner, J. C. Rüegg,

- I. Morano // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1992. – V. 183, N 2. – P. 553-559.
258. Wilson A. J. Chase Unique properties of a 1.36 kb circular DNA associated with *Sorghum* mitochondria / A. J. Wilson, R. E. Lloyd, C. K. Ragland [et al.] // Plant Science. – 1989. – V. 61, N 1. – P. 81-90.
259. Wilson S. B. Studies of electron transport in dry and imbibed peanut embryo / S. B. Wilson, W. D. Bonner // Plant Physiol. – 1971. — V. 48, N 3. – P. 340-344.
260. Wimley W. C. The versatile beta-barrel membrane protein / W. C. Wimley // Current Opinion in Structural Biology. – 2003. – V. 13, N 4. – P. 404-411.
261. Wintz H. Electroporation of small RNAs into plant protoplasts: mitochondrial uptake of transfer RNAs / H. Wintz, A. Dietrich // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – V. 223, N 1. – P. 204-210.
262. Wolstenholme D. R. Mitochondrial genome organization / D. R. Wolstenholme, C. M. R. Fauron // The molecular biology of plant mitochondria (edit. by C. S. Levings, I. K. Vasil). Kluwer Academic Publishers. – 1995. – P. 1-59.
263. Wu F.-H. Tape-*Arabidopsis* sandwich - a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method / F.-H. Wu, S.-C. Shen, L.-Y. Lee [et al.] // Plant Methods. – 2009. – V. 5, N 16. – P. 1-10.
264. Xi Z. Horizontal transfer of expressed genes in a parasitic flowering plant / Z. Xi, R. K. Bradley, K. J. Wurdack [et al.] // BMC Genomics. – 2012. – V. 13. – P. 227.
265. Xi Z. Massive mitochondrial gene transfer in a parasitic flowering plant clade / Z. Xi, Y. Wang, R. K. Bradley [et al.] // PLoS Genet. – 2013. – V. 9, N 2. – e1003265.
266. Yoo S. D. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis / S. D. Yoo, Y. H. Cho, J. Sheen // Nat Protoc. – 2007. – V. 2, N 7. – P. 1565-1572.
267. Young M. J. The evolutionary history of mitochondrial porins / M. J. Young, D. C. Bay, G. Hausner [et al.] // BMC Evolutionary Biology. – 2007. – V. 7, N 31. – P. 1-21.
268. Zabala G. An S1 episomal gene of maize mitochondria is expressed in male sterile and fertile plants of the S-type cytoplasm / G. Zabala, V. Walbot // Mol. Gen. Genet. – 1988. – V. 211, N 3. – P. 386-392.

269. Zara V. Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 and Hsp90 / V. Zara, A. Ferramosca, P. Robitaille-Foucher [et al.] // *Biochem. J.* – 2009. – V. 419, N 2. – P. 369-375.
270. Zhang M. *Arabidopsis* mitochondrial voltage-dependent anion channel 3 (AtVDAC3) protein interacts with thioredoxin m2 / M. Zhang, T. Takano, S. Liu [et al.] // *FEBS Lett.* – 2015. – V. 589, N 11. – P. 1207–1213.
271. Zorov D. B. Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these / D. B. Zorov // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – V. 1275, N 1-2. – P. 10-15.