

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

На правах рукописи



**Клименко Екатерина Сергеевна**

**Изучение особенностей импорта фрагментов ДНК разной  
длины в митохондрии *Solanum tuberosum***

03.01.05 физиология и биохимия растений

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
**доктор биологических наук, профессор**  
**Константинов Юрий Михайлович**

Иркутск – 2017

## **Оглавление**

Список сокращений.....	5
<b>Введение.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Обзор литературы.....</b>	<b>10</b>
1.1. Митохондриальный геном растений.....	10
1.1.1. Особенности структурной организации митохондриального генома растений.....	10
1.1.2. Пластичность и динамичность митохондриального генома растений.....	12
1.2. Митохондриальные плазмиды растений.....	14
1.2.1. Видовой состав митохондриальных плазмид растений.....	15
1.2.2. Структура митохондриальных плазмид растений.....	16
1.2.3. Функции митохондриальных плазмид .....	19
1.2.4. Происхождение митохондриальных плазмид.....	20
1.3. Роль горизонтального переноса генов в пластичности митохондриального генома растений.....	21
1.4. Импорт нуклеиновых кислот в митохондрии.....	24
1.4.1. Механизм импорта тРНК в митохондрии.....	25
1.4.2. Поиск путей трансформации митохондриального генома различных организмов.....	31
1.4.3. Явление природной компетенции митохондрий к поглощению ДНК.....	37
1.4.4. Участие импортированной ДНК в митохондриальных генетических процессах .....	40
1.4.5. Изучение механизма импорта ДНК в митохондрии различных организмов.....	43
1.4.6. Изучение специфичности импорта ДНК в митохондрии.....	48
<b>Выводы из литературного обзора.....</b>	<b>51</b>

<b>Постановка цели и задачи.....</b>	<b>52</b>
<b>2. Материалы и методы.....</b>	<b>54</b>
2.1. Объект исследования.....	54
2.2. Методы исследования.....	54
2.2.1. Выделение митохондрий из клубней картофеля.....	54
2.2.2. Оценка функционального состояния изолированных митохондрий.....	55
2.2.3. Обработка изолированных митохондрий трипсином.....	55
2.2.4. Обработка изолированных митохондрий протеиназой К.....	55
2.2.5. Получение митопластов.....	56
2.2.6. Амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции.....	56
2.2.7. Радиоактивно меченые олигонуклеотиды, использованные для импорта в митохондрии.....	58
2.2.8. Очистка олигонуклеотидов из полиакриламидного геля с помощью метода электроэлюции.....	58
2.2.9. Получение радиоактивно меченых субстратов для импорта ДНК в митохондрии.....	58
2.2.10. Получение флуоресцентно меченых субстратов ДНК для импорта в митохондрии.....	59
2.2.11. Импорт ДНК в митохондрии.....	59
2.2.12. Импорт олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН) в изолированные митохондрии картофеля.....	59
2.2.13. Фенольная экстракция нуклеиновых кислот из митохондрий.....	60
2.2.14. Экстракция тотальной митохондриальной ДНК с использованием метода термообработки митохондрий.....	60
2.2.15. Анализ эффективности импорта с использованием ПЦР-РВ.....	61
2.2.16. Выделение плазмидной ДНК.....	62
2.2.17. Электрофоретический анализ ДНК.....	63
2.2.18. Электрофоретический анализ ОДН-связывающих белков.....	63

2.2.19. Статистическая обработка данных.....	64
2.2.20. Анализ ДНК-связывающих свойств белков.....	64
2.3. Материалы.....	64
<b>3. Результаты и обсуждение.....</b>	<b>65</b>
3.1. Анализ импорта ДНК в изолированные митохондрии .....	65
3.1.1. Разработка метода анализа импорта ДНК в изолированные митохондрии с помощью ПЦР-РВ.....	65
3.1.2. Субстраты ДНК для изучения специфичности импорта в митохондрии с помощью ПЦР-РВ.....	67
3.2. Характеристика особенностей импорта ДНК малой, средней и большой длины в изолированные митохондрии растений.....	68
3.2.1. Конкурентные взаимоотношения в импорте ДНК малой, средней и большой длины.....	71
3.2.2. Роль поверхностных белков митохондриальной мембраны в механизме импорта ДНК малой, средней и большой длины.....	75
3.2.3. Участие в механизме импорта ДНК митохондриального порина (VDAC).....	79
3.2.4. Участие в механизме импорта ДНК белка внутренней мембраны митохондрий адениннуклеотидтранслоказы (АНТ).....	90
3.2.5. Тестирование возможного участия в импорте ДНК переносчика адениновых нуклеотидов ADNT1.....	95
3.2.6. Исследование транспорта ДНК с использованием метода аффинной модификации реакционноспособными олигодезоксирибонуклеотидами .....	98
3.2.7. Изучение влияния микросомальной фракции на импорт ДНК в реконструированной модельной системе.....	101
3.2.8. Выход импортированной ДНК из митохондрий картофеля (экспорт ДНК).....	106
<b>Заключение.....</b>	<b>109</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>113</b>

## Список использованных сокращений

АДФ – аденозиндифосфат

АНТ – адениннуклеотидтранслоказа

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфаты

м.п.н. – миллион пар нуклеотидов

мРНК – матричная РНК

мтДНК – митохондриальная ДНК

ОДН – олигодезоксирибонуклеотиды

ОРС – открытая рамка считывания

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНКаза – рибонуклеаза

рРНК – рибосомальная РНК

ТЕМЕД – N,N,N,N - тетраметилэтилендиамин

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

тРНК – транспортная РНК

ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность

ЭГТА – этилен гликоль-бис(2-аминоэтилэфир)- N,N,N',N'-тетрауксусная кислота

ЭДТА – динатриевая соль этилендиамин-N,N,N,N-тетрауксусной кислоты

СССР – карбонилцианид-М-хлорфенилгидразон

GFP – зеленый флуоресцентный белок (англ. green fluorescent protein)

SDS – sodium dodecyl sulfate (додecilсульфат натрия)

VDAC – Voltage Dependent Anion Channel (митохондриальный порин)

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Одним из условий нормального функционирования митохондрий эукариот является поддержание и экспрессия собственной полуавтономной генетической системы, доставшейся им в ходе эволюции от предкового эндосимбионта. Митохондриальный геном растений по сравнению с животными или грибами (16 – 100 т.п.н.) отличается существенно большими размерами (200 т.п.н. – 11 м.п.н.), а также высокой вариабельностью в размере и структурной организации даже у близкородственных видов (Kubo, Newton, 2008; Allen et al., 2007; Sloan et al., 2012). Несмотря на большие размеры, структурные гены в митохондриальном геноме составляют всего лишь 10 – 18%, в то время как для большей части нуклеотидных последовательностей их функции и происхождение остаются неизвестными (Kubo et al., 2000; Sloan et al., 2012). В результате полногеномного секвенирования генома митохондрий нескольких видов растений обнаружены многочисленные события включения чужеродной ДНК (ядерного, хлоропластного и неизвестного происхождения) в эти органеллы (Bergthorsson et al., 2003, 2004; Handa, 2003; Goremykin et al., 2009). Кроме этого, для митохондрий показана существенно более высокая частота горизонтального переноса генов (ГПГ) в сравнении с хлоропластами и ядром (Kleine et al., 2009; Mower et al., 2012).

Очевидно, что обнаруженный ранее механизм активного поглощения ДНК митохондриями (импорт ДНК) (Константинов и др, 1989; Koulintchenko et al., 2003) может рассматриваться как процесс, обеспечивающий ГПГ в митохондрии. Однако, вплоть до настоящего времени многие вопросы, связанные с феноменом природной компетентности митохондрий к поглощению ДНК, остаются недостаточно изученными. Так, практически не исследован вопрос о биохимических особенностях трансмембранного переноса молекул ДНК различной длины в митохондрии высших растений. В то же время ответ на него может дать важную информацию о возможном пути возникновения в

митохондриальном геноме растений вставок ДНК ядерного и/или хлоропластного происхождения, установленный размер которых варьирует от десятков п.н. до 9 и более т.п.н. (Goremykin et al., 2009). Наряду с внутриклеточным обменом генов между ДНК-содержащими органеллами (Kleine et al., 2009) возможно проникновение в митохондрии ДНК, оказавшейся в цитозоле в результате поглощения клетками ДНК из внеклеточной жидкости (кровь у млекопитающих, флоэмный и ксилемный сок у растений и др.) (Gahan, 2013; Брызгунова, Лактионов, 2015). В этом случае одним из возможных субстратов импорта ДНК в митохондрии может быть фрагментированная мультимерная ДНК, образующаяся в результате межнуклеосомной фрагментации ядерной ДНК в процессе апоптоза (Wyllie, 1980; Nagata et al., 2003). Наконец, остается малоизученным и механизм возможного переноса в митохондрии кольцевых и линейных плазмидоподобных ДНК разного размера («митохондриальных плазмид»), видоспецифические наборы которых обнаружены в составе митохондриального генома ряда высших растений (Leaver, Gray, 1982; Koulintchenko et al., 2012). При этом размер митохондриальных плазмид у разных видов может варьировать от 750 п.н. до 13500 п.н. (Koulintchenko et al., 2012). В связи с этим значительный теоретический и прикладной интерес представляет выяснение особенностей трансмембранного переноса молекул ДНК разной длины в растительные митохондрии. Детальное знание биохимических механизмов природной компетентности митохондрий может быть использовано в дальнейшем для разработки клеточных технологий направленной доставки генов в эти органеллы растений, животных и дрожжей в условиях *in vivo*.

**Целью настоящей работы** было изучение мембранных механизмов транспорта ДНК различной длины в митохондрии картофеля (*Solanum tuberosum*). Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать метод определения активности импорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля на основе количественной мультиплексной ПЦР.
2. Исследовать возможность конкурентных взаимоотношений путей импорта ДНК разной длины в системе изолированных митохондрий картофеля.

3. Изучить активность транспорта ДНК малой, средней и большой длины в митохондрии в условиях, ингибирующих и/или модулирующих активность таких факторов импорта, как порин/VDAC и адениннуклеотидтранслоказа.
4. Исследовать возможное участие митохондриального мембранного переносчика адениновых нуклеотидов ADNT1 в импорте ДНК в митохондрии.
5. Изучить влияние микросомальной фракции, изолированной из клубней картофеля, на импорт ДНК в митохондрии.

#### ***Основные положения, выносимые на защиту***

1. ДНК разных размерных классов малой (100 – 500 п.н.), средней (700 – 3000 п.н.) и большой длины ( $\geq 3500$  п.н.) переносится в митохондрии частично перекрывающимися, но не совпадающими полностью путями, с участием как известных (VDAC, АНТ), так и неидентифицированных белковых факторов импорта.
2. Из исследованных размерных классов только транспорт ДНК средней длины (700 – 3000 п.н.) осуществляется преимущественно с участием таких факторов импорта, как порин и адениннуклеотидтранслоказа (АНТ).

**Теоретическая и практическая ценность работы.** Впервые получены экспериментальные данные в пользу представлений о том, что трансмембранный перенос ДНК разных размерных классов осуществляется с использованием разных транспортных механизмов. Разработан метод определения активности импорта ДНК в изолированные митохондрии на основе количественной ПЦР, позволяющий добиться максимальной чувствительности и достоверности количественной детекции в широком диапазоне концентраций. Впервые установлено участие переносчика адениннуклеотидов ADNT1 в импорте в митохондрии молекул ДНК малой ( $\leq 100$  п.н.) и средней ( $\leq 1500$  п.н.) длины. Результаты диссертационной работы могут быть использованы в качестве теоретической основы для разработки эффективных стратегий и подходов адресной доставки ДНК в митохондрии растений *in vivo*. Материалы работы могут быть рекомендованы для использования в учебном процессе при

подготовке специалистов биологического и медицинского профиля в соответствующих высших учебных заведениях.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены и обсуждались на российских и международных съездах и конференциях, в том числе: International Conference for Plant Mitochondrial Biology (Hessen Hotelpark Hohenroda, Germany, 2011; Wroclow, Poland, 2015), V International Meeting "Early events in Human Pathologies" (Листвянка, Россия, 2012), "Хромосома 2012" (Новосибирск, Россия, 2012), First Meeting in the Frame of French-Siberian Centre of Research and Education "Nucleic Acid-Protein Interactions for Life Sciences" (Новосибирск, Россия, 2013), "Механизмы регуляции функций растительных органелл" (Иркутск, Россия, 2014), "Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology" (Новосибирск, Россия, 2015).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 196 библиографических источников, 189 из которых на иностранном языке. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста, содержит 6 таблиц и 27 рисунков.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Митохондриальный геном растений

#### 1.1.1. Особенности структурной организации митохондриального генома растений

Митохондрии – клеточные органеллы, обнаруженные в настоящее время практически у всех эукариот. Основной общеизвестной функцией митохондрий является синтез АТФ, однако, помимо этой важной функции, митохондрии вовлечены и в другие клеточные процессы у эукариот, включая процессы апоптоза, а также биосинтеза витаминов и кофакторов (Takashi, Tateda, 2013). Мутации в мтДНК могут быть причинами старения, заболеваний человека (Niazi et al., 2012), а также цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) растений (Gualberto et al., 2013).

Средний размер митохондриального генома покрытосемянных растений составляет 200 – 750 т.п.н. (Kubo, Newton, 2008), но для некоторых видов установлены и более значительные размеры. Так, анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК для представителей рода *Silene* (*Caryophyllaceae*) выявил самые большие в настоящее время митохондриальные геномы: 6,7 м.п.н. у *Silene noctiflora* и 11,3 м.п.н. у *Silene conica* (Sloan et al., 2012). Эти геномы возникли в результате быстрого увеличения количества некодирующих последовательностей в мтДНК. Предполагают, что геномы в структурном отношении представляют собой набор субгеномных кольцевых молекул ДНК или хромосом – 59 для *S. noctiflora*, а для *S. conica* и более 128, с размером хромосом от 44 до 192 т.п.н. Для сравнения, более типичный для растений митохондриальный геном *S. latifolia* представлен единственной хромосомой размером 253 т.п.н. (Sloan et al., 2012).

Однако, несмотря на большие размеры митохондриальных геномов растений, количество кодируемых ими генов по сравнению с митохондриальными геномами представителей других таксономических групп практически не отличается.

Первый полностью секвенированный митохондриальный геном высших растений *Arabidopsis thaliana* (экотип С24) имеет размер 367 т.п.н. и кодирует в общей сложности 32 белка, 3 рРНК (5S, 18S и 26S) и 22 тРНК (Gualberto et al., 2013, Unseld et al., 1997), в то время как мтДНК человека имеет размер 16,5 т.п.н. и кодирует 13 полипептидов, 2 рРНК (12S и 16S) и 22 тРНК (Anderson et al., 1981). Таким образом, несмотря на то, что митохондриальный геном *A.thaliana* больше митохондриального генома человека в 22 раза, общее количество структурных генов в нем лишь в 1,5 раза больше.

В митохондриальных геномах большинства высших растений идентифицировано около 50 – 60 генов, остальную часть занимают интроны и обширные межгенные участки. Так, например, митохондриальные геномы *S. latifolia* (253 т.п.н.) и *S. conica* (11.3 м.п.н.) имеют одинаковый набор 25 белок-кодирующих генов, в то время как геном *S.latifolia* содержит 9 генов тРНК, из которых в *S.conica* присутствует только 2 (Sloan et al., 2012).

Как и в других организмах, митохондриальный растительный геном кодирует ряд полипептидов, входящих наряду с субъединицами ядерного кодирования в комплексы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). Это несколько субъединиц комплексов ЭТЦ: I – НАДН-дегидрогеназного (NAD 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6, 7, 9); III – сукцинат-дегидрогеназного (COB); IV – цитохром с оксидазного (COX 1, 2, 3); V – F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-АТФазного комплекса (АТР 1, 6, 8, 9). Кроме того, митохондриальные геномы включают гены белков, вовлеченных в биогенез цитохрома с (ССМ В, ССМ FN, ССМ FC, ССМ С) и нескольких рибосомальных белков, а также рРНК (RPL 12, 15, 16, RPS 1 – 4, 7, 10 – 14, 19, RRN 5, 18, 26). Также присутствует несколько открытых рамок считывания (ОРС), консервативных для мт-геномов разных видов растений, в том числе ген MAT-R, кодирующий матуразо-подобный белок (Marienfeld et al., 1999; Kubo et al., 2000). Идентифицированные гены занимают незначительную часть генома, например, у *A. thaliana* они составляют лишь 10%, интроны и дубликации – 8% и 7% соответственно, последовательности ядерного и пластидного происхождения занимают до 5%, около 10% представляют собой предполагаемые открытые рамки считывания значительной

длины. Происхождение и функции основной части генома *A.thaliana*, что составляет около 60 %, остаются неизвестными (Gualberto et al., 2013; Unseld et al., 1997). В митохондриальном геноме *S.conica* межгенные последовательности неизвестного происхождения занимают 91.5% (10.3 м.п.н.) (Sloan et al., 2012).

### **1.1.2. Пластичность и динамичность митохондриального генома растений**

На основании данных рестрикционного анализа и секвенирования структуру митохондриального генома растений представляли как кольцевую молекулу ДНК или “мастер-хромосому”, содержащую полный набор митохондриальных генов (Gualberto et al., 2013). Долгое время преобладало мнение, что мтДНК лишена связанных с ней белков, однако ДНК не является “голой”, а упакована в нуклеопротеиновые частицы, называемые нуклеоидом (Kucej et al., 2007). Обнаружено, что в состав нуклеоида, ассоциированного с мембраной, могут входить факторы транскрипции, репликации, репарации и др., хотя состав этих белков полностью не установлен и, вероятно, может различаться между организмами (Gualberto et al., 2013).

У большинства видов растений последовательности митохондриальных генов эволюционируют медленно, и по сравнению с животными точечные мутации в них достаточно редки. Полагают, это связано с тем, что митохондрии растений содержат активную систему рекомбинации ДНК, которая позволяет корректировать и/или исключать из митохондриального генома мутантные копии генов (Gualberto et al., 2013; Warren et al., 2016). Действительно, многочисленные исследования показали, что митохондриальные геномы растений подвергаются обширной и высокочастотной гомологичной рекомбинации. В частности, частая и обратимая рекомбинация между большими повторами (которые могут иметь размер несколько т.п.н.) приводит к многократным преобразованиям конфигурации генома. Несмотря на различия в нуклеотидных последовательностях, размерах и количестве этих длинных повторов механизм рекомбинации у растений достаточно консервативен. У *A. thaliana* в рекомбинацию вовлечены две пары повторов размером 6,5 и 4,2 т.п.н. (Klein et al.,

1994), в *N. tabacum* присутствует три пары больших повторов 18, 6,9 и 4,7 т.п.н. (Sugiyama et al., 2005). Число участвующих в рекомбинации повторов может быть намного больше, как, например, в митохондриальном геноме пшеницы, где обнаружено 10 пар повторов (Ogihara et al., 2005).

Выявлен и другой промежуточный по размеру класс повторов (анг. ISRs-intermediate size repeats), размер которых составляет 50 – 600 п.н. Гомологичная рекомбинация между повторами этого типа происходит значительно реже и приводит к дальнейшим перестановкам. Эти низкочастотные события рекомбинации неаллельные и процесс асимметричен, поэтому происходит накопление только одного из ожидаемых продуктов рекомбинации, приводящее к дупликациям или делециям геномных последовательностей (Davila et al., 2011). Кроме того, описаны также незаконные процессы рекомбинации, включающие очень короткие гомологичные последовательности длиной всего нескольких нуклеотидов, которые могут привести к появлению химерных генов (Carradocia et al., 2010).

Помимо кольцевых молекул, в митохондриях растений встречаются и линейные субгеномные формы (Bendich et al., 1993). Так, например, у кукурузы (*Zea mays*) с ЦМС-S типом цитоплазмы митохондриальный геном существует в основном как набор линейных молекул, возникающий в результате рекомбинации митохондриальной хромосомы и линейной плазмиды, специфичной для ЦМС-S (Allen et al., 2007).

Тем не менее, концепция “мастер-хромосомы” по-прежнему актуальна, и вопрос, каким образом набор субгеномных молекул ДНК передается к следующему поколению, остается нерешенным.

Принимая во внимание, что в клетке млекопитающих может присутствовать тысячи копий мтДНК, количество копий мтДНК растений, вероятно, относительно ниже. В работе Preuten с соавторами (2010) с помощью количественной ПЦР анализировали копийность нескольких митохондриальных генов в *A. thaliana*. Авторами было установлено, что копийность исследованных генов значительно варьирует в различных органах растения, а также зависит от

стадии развития: самое высокое количество (приблизительно 280 копий на клетку) было показано для гена ATP 1 в зрелых (50-дневных) листьях арабидопсиса, минимальное значение – для гена COX 1 (примерно 40 копий на клетку в молодых листьях). Однако эти значения 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* (ATP 1, RPS 4, NAD 6 и COX 1), примерно 300 – 450 на клетку, было обнаружено в клетках меристемы корней, в то время как в листьях, цветах – только 80 – 140 копий (Preuten et al., 2010).

Таким образом, “мастер-хромосома”, вероятно, может присутствовать в органеллах лишь в небольшом количестве и на определенных стадиях развития, например, в активно делящихся клетках. Можно предположить также, что отдельные митохондрии растений содержат лишь часть генома или потенциально не содержат ДНК вообще (Preuten et al., 2010).

## **1.2. Митохондриальные плазмиды растений**

Многие виды растений в дополнение к основному митохондриальному геному содержат множество меньших молекул ДНК переменного размера (от 0,7 до 20 т.п.н.) и структуры (Handa, 2008; Warren et al., 2016). Их можно рассматривать как экстрахромосомные репликоны или плазмиды, способные реплицироваться независимо от основного митохондриального генома. В пользу этого свидетельствуют также данные о том, что копийность митохондриальных плазмид может быть несколько выше по сравнению с количеством молекул основного генома (Handa, 2008). В настоящее время охарактеризованы многочисленные мультимерные формы митохондриальных плазмид, что, вероятно, вызвано процессами гомологичной рекомбинации (Hallden et al., 1989). Наборы митохондриальных плазмид обычно видоспецифичны (Hanson et al., 1985). Для представителей рода *Silene* присутствие митохондриальных плазмид способствует дальнейшему усложнению геномной организации (Andersson-Seplitis et al., 2002). В некоторых случаях возможна интеграция плазмид в

основной митохондриальный геном, как например, для кукурузы с ЦМС-S типом цитоплазмы (Robison et al., 2005). Однако значительная часть митохондриальных плазмид не имеют существенной гомологии с последовательностями мтДНК, и поэтому не может рассматриваться в качестве субгеномных форм мтДНК. В этом отношении они напоминают митохондриальные плазмиды, найденные у некоторых видов грибов, таких как *Neurospora intermedia* или *Neurospora crassa*. Их присутствие или отсутствие не имеет корреляции с фенотипическими особенностями растений, но их содержание может изменяться в зависимости от стадии развития. Важно отметить, что появление плазмид и их копияемость находится под контролем ядра (Flamand et al., 1993).

### **1.2.1. Видовой состав митохондриальных плазмид растений**

Интенсивное изучение растительных митохондриальных плазмид началось в 1980-х годах (табл. 1). Предполагалось, что особенности их структурной организации позволят создать векторные конструкции для трансформации митохондриального генома растений. Однако в настоящее время существенных успехов в этой области пока не достигнуто.

**Таблица 1. Митохондриальные плазмиды высших растений**

Растения, виды	Размер плазмиды, т.п.н.	Структура плазмид	Литература
<i>Zea mays</i> (кукуруза)	5,45; 6,4; 7,46; 2,1; 2,3 1,4; 1,9	линейные кольцевые	Paillard et al., 1985 Ludwig et al., 1985. Leon et al., 1989,1992
<i>Zea diploperennis</i>	5,4; 7,4	линейные	Timothy et al., 1983
<i>Zea luxurians</i>	0,75; 5,4	линейные	Grace et al., 1994.
<i>Triticum aestivum</i> (пшеница)	0,3-6	кольцевые	Esser et al., 1986
<i>Triticum compactum</i> (пшеница)	0,3-6	кольцевые	Esser et al., 1986
<i>Vicia faba</i> (кормовые бобы)	1,48; 1,7	кольцевые	Wahleithner et al, 1988 Flamand et al., 1993
<i>Beta vulgaris</i> <i>var. maritima</i> (свекла)	1,3; 1,4; 1,44; 1,6 10,4	кольцевые линейная	Thomas et al., 1986, 1992 Saumitou-Laprade et al., 1989
<i>Chenopodium album</i> L (марь белая)	1,3	кольцевая	Backert et al.,1997, 1998
<i>Brassica campestris</i> (капуста)	11,3	линейная	Brown et al., 1989
<i>Brassica napus</i> (рапс)	11,6	линейная	Handa, 2008, 2002 Palmer et al.,1983
<i>Brassica rapa</i> (репа)	11,6	линейная	Handa, 2008 Turpen et al., 1987 Warren et al., 2016
<i>Daucus carota</i> (морковь)	9,2	линейная	Robison и Wolyn, 2005
<i>Heliantus annuus</i> (подсолнечник)	1,4; 1,8	кольцевые	Perez et al., 1988
<i>Lupinus albus</i> (люпин белый)	1,2; 1,4	кольцевые	Goracznik, Augustyniak, 1989
<i>Oenothera berteriana</i> (энотера)	6,3-13,5	кольцевые	Esser et al., 1986
<i>Sorghum bicolor</i> (сорго)	1,36; 1,7; 2,3; 5,3 5,7	кольцевые, линейные	Wilson et al., 1989 Pring et al., 1982

(По материалам работы Koulintchenko et al., 2012).

### 1.2.2. Структура митохондриальных плазмид растений

В зависимости от структуры митохондриальные плазмиды растений могут быть классифицированы на несколько типов: кольцевые и линейные ДНК-плазмиды, а также РНК-плазмиды. Кольцевые ДНК-плазмиды были обнаружены у многих растений (табл. 1). Их размер в среднем составляет 1 – 2,5 т.п.н., хотя выявлены плазмиды имеющие размер 9 т.п.н. и более (Brown et al., 1995; Bengtsson et al.,

1997). Обнаружено, что кольцевые плазмиды могут содержать области, гомологичные ядерной ДНК.

Несмотря на относительно небольшие размеры, растительные кольцевые ДНК-плазмиды содержат открытые рамки считывания (ОРС или ORF – англ. open reading frame) незначительной длины, хотя некоторые могут достигать размера 1 т.п.н. Было обнаружено, что эти ОРС в кольцевых плаزمидах транскрибируются, но функции этих транскриптов не установлены (Ludwig et al., 1985; Smith et al., 1987; de la Canal et al., 1991). Следует отметить, что некоторые различия в содержании кольцевых плазмид и их транскриптов были выявлены между фертильными и ЦМС линиями *Beta vulgaris* (Thomas et al., 1986).

С помощью биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей в кольцевых плазмидах 1,4 и 1,9 т.п.н. кукурузы (*Z. mays*) были выявлены области гомологии между этими плазмидами, характеризующиеся высоким содержанием АТ-оснований. АТ-богатые области плазмид расположены тандемно, причем плазида 1,9 т.п.н. имеет в составе 3 копии повтора, а плазида 1,4 т.п.н. – 2 копии. Эта АТ-богатая область гомологична нуклеотидной последовательности, которая в дрожжах охарактеризована как точка начала репликации *ori* (англ. origin) (Ludwig et al., 1985).

Было показано, что репликация кольцевых митохондриальных плазмид *mtp2* (1,7 т.п.н.) и *mtp3* (1,5 т.п.н.) из *Vicia faba* инициируется в определенном специфичном сайте (*ori*), близко расположенному к последовательности, которая образует структуру шпильки (Wahleithner, 1988). Асимметричный механизм репликации по типу катящегося кольца с характерными особенностями зарегистрирован для кольцевой плазмиды *Chenopodium album* *mp1* (1,3 т.п.н.) (Backert et al., 1997). Плазида *mp1* имеет сигма-подобную форму, представляющую собой кольцевую молекулу с длинным «хвостом» (Backert et al., 1998).

Линейные митохондриальные плазмиды встречаются реже, чем кольцевые формы, и их распространение ограничено несколькими видами растений. Так, например, плазида 11,6 т.п.н. присутствует в митохондриях только двух

представителей семейства крестоцветных (*Brassicaceae*), видах *Brassica rapa* и *Brassica napus* (Warren et al., 2016; Palmer et al., 1983; Handa, 2008). Линейные митохондриальные плазмиды были обнаружены также в *Beta vulgaris*, *Daucus carota*, *Sorghum bicolor* и *Zea mays*.

Размер линейных плазмид в среднем составляет от 2 до 12 т.п.н. (рис. 1). Линейные митохондриальные плазмиды обычно содержат концевые инвертированные повторы (КИП), 5'-концы которых связаны с терминальными белками (Handa, 2008). Такие структуры типа “invertron” сходны с различными классами митохондриальных плазмид грибов, вирусов, фагов и транспозонов (Sakaguchi et al., 1990). Терминальные белки, по всей вероятности, принимают участие в инициации репликации ДНК этих плазмид и играют определенную роль в стабилизации структуры плазмид, подобно теломерным участкам хромосом (Smith et al., 2013).

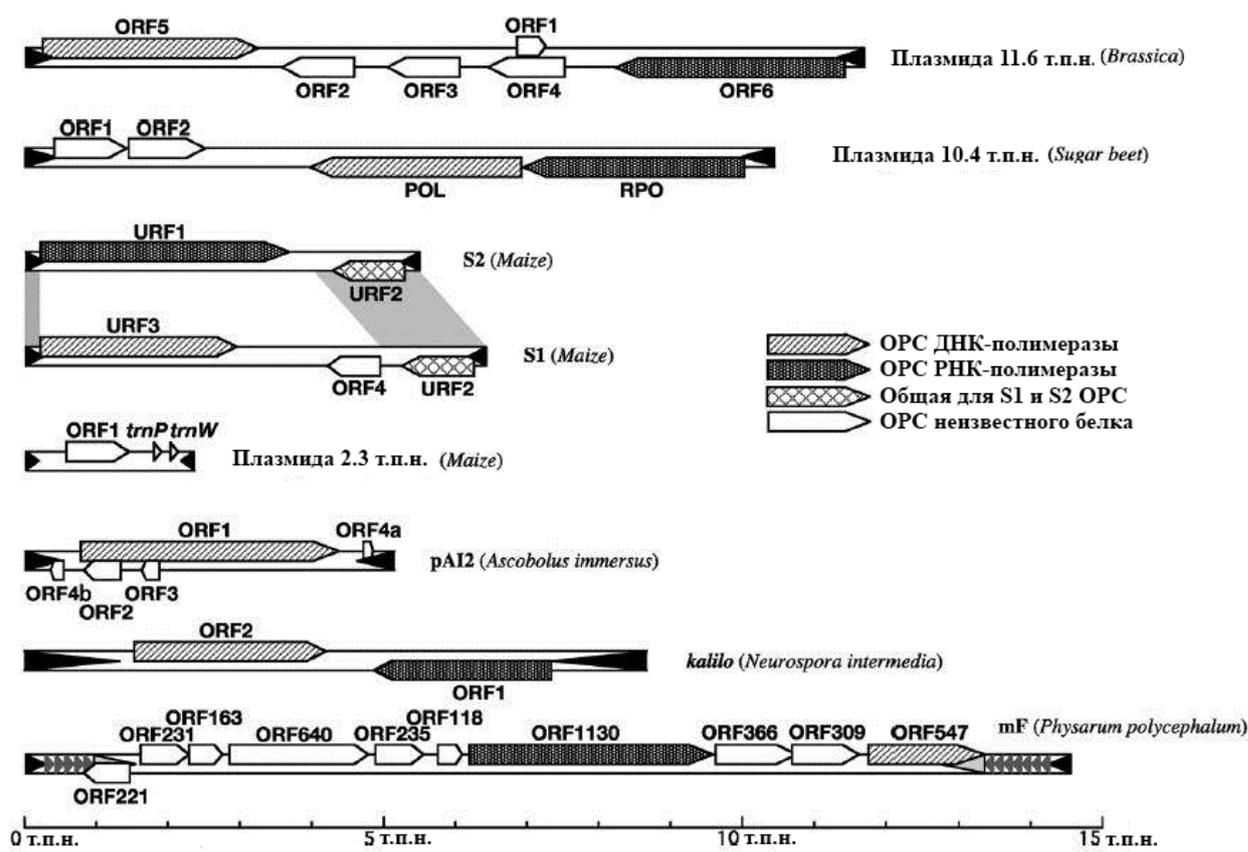


Рисунок 1. Линейные митохондриальные плазмиды растений. (Рисунок из работы Handa, 2008).

Пять линейных митохондриальных плазмид растений были изучены более детально: плазмиды кукурузы (*Z. mays*) S1 (Paillard et al., 1985), S2 (Levings et al., 1983) и 2,3 т.п.н. (Leon et al., 1989), 10,4 т.п.н. из *B. vulgaris* (Saumitou-Laprade et al., 1989) и 11,6 т.п.н. из *Brassica napus* (Handa et al., 2002). Концевые инвертированные повторы (КИП) этих плазмид имеют размеры от 170 п.н. (в 2,3 т.п.н. *Z. mays*) до 407 п.н. (в 10,4 т.п.н. *B. vulgaris*). Последовательности КИП различаются, за исключением плазмид S1 и S2, которые имеют идентичные концевые повторы (Handa, 2008).

### 1.2.3. Функции митохондриальных плазмид

Линейные митохондриальные плазмиды обычно содержат несколько ОРС, максимальное количество – 6 выявлено в плазмиде 11,6 т.п.н. *B. napus* (рис. 1). Некоторые из них кодируют ДНК-полимеразы или РНК-полимеразы, в то время как функции остальных транскриптов неизвестны (Warren et al., 2016). Присутствие генов ДНК- и РНК-полимераз в линейных митохондриальных плаزمидах согласуется с предположением, что эти плазмиды автономно реплицируются и транскрибируются (Warren et al., 2016; Zabala et al., 1988; Leon et al., 1992).

Помимо генов полимераз, также показана транскрипция одной из ОРС плазмиды 11,6 т.п.н. из *B. napus* (Handa et al., 2002) и ОРС1 плазмиды 2,3 т.п.н. *Z. mays* (Leon et al., 1992). Полипептид, кодируемый ОРС1 плазмиды 2,3 т.п.н., имеет область гомологии с РНК-полимеразой плазмиды S2, предполагают, что этот белок может ковалентно связываться с 5'-концами плазмиды 2,3 т.п.н. (Leon et al., 1992). Помимо ОРС1, плазмиды 2,3 т.п.н. имеет в своем составе два гена, кодирующие тРНК<sup>Pro</sup> и тРНК<sup>Trp</sup>. Первый ген, по всей видимости, является псевдогеном, в то время как второй кодирует единственную функциональную в митохондриях этого вида тРНК<sup>Trp</sup>, что может объяснять ее обязательное присутствие в митохондриях кукурузы (Leon et al., 1989).

Ранее предполагали, что существует определенная корреляция между интеграцией плазмид S1 и S2 в основной геном и формированием фенотипов

ЦМС и NCS (англ. non-chromosomal stripe – нехромосомно кодируемая пятнистость листьев) (Handa, 2008). Также было показано, что перестановки в мтДНК, содержащие повторы S1/S2, являются причиной реверсии ЦМС-S к фертильному фенотипу (Schardl et al., 1985; Newton et al., 1996). Однако эта реверсия не обязательно сопровождалась потерей плазмид S1/S2 (Matera et al., 2011). Точно так же ЦМС-фенотип у *Brassica napus* не всегда имеет однозначную зависимость от присутствия или отсутствия плазмиды 11,6 т.п.н. (Kemble et al., 1986).

В *Lolium perenne* линейная плазмидоподобная ДНК (LpCMSi, 9,6 т.п.н.), кодирующая ДНК- и РНК-полимеразы, в случае интеграции в митохондриальный геном способствовала появлению ЦМС-фенотипа, в то время как в других линиях она присутствовала в митохондриях как низкокопийный экстрахромосомный репликон (McDermott et al., 2008).

#### **1.2.4. Происхождение митохондриальных плазмид**

Митохондриальные плазмиды наследуются в большинстве случаев по материнской линии вместе с основным митохондриальным геномом. Тем не менее, отклонения от материнского наследования были выявлены для линейных плазмид 10,4 т.п.н. *Beta maritima* и 11,6 т.п.н. *Brassica napus* (Saumitou-Laprade et al., 1989; Erickson et al., 1989; Oshima et al., 2012).

Происхождение митохондриальных плазмид изучено недостаточно, однако их широкое распространение свидетельствует о том, что митохондриальные плазмиды могут играть какую-то определенную роль, возможно, в процессе обмена генетической информацией между ДНК-содержащими компартментами (Warren et al., 2016).

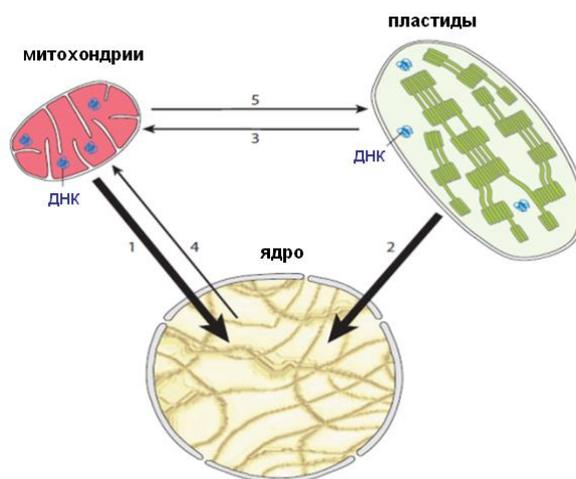
Некоторые общие черты «invertron»-структуры указывают на возможность общего вирусного происхождения митохондриальных плазмид. Подобные «invertron»-структуры были обнаружены у некоторых ДНК-вирусов, в частности, у бактериофага Ф29 и аденовируса (Handa, 2008). Таким образом, можно предположить, что митохондриальные плазмиды играют роль природных

векторных конструкций, участвуя в переносе генетической информации между ДНК-содержащими органеллами в клетке, а также, не исключено, между таксономически удаленными группами организмов.

### **1.3. Роль горизонтального переноса генов в пластичности митохондриального генома растений.**

Известно, что митохондрии и хлоропласты имеют симбиотическое происхождение. Большинство генов эндосимбионтов были перемещены в ядерный геном клетки-хозяина или потеряны в ходе дальнейшей эволюции эукариотической клетки (Gray, 1992; Martin, 2003). Благодаря масштабным полногеномным исследованиям в ядерном геноме растений были идентифицированы множество вставок митохондриальной ДНК (англ. NUMT – nuclear mitochondrial DNA) и ДНК хлоропластного происхождения (англ. NUPT – nuclear plastid DNA) (Richly и Leister, 2004). Так, например, вставки ДНК митохондриального происхождения размером 620 кб и 190 кб были идентифицированы во второй хромосоме *A. thaliana*, а также в 10-й и 12-й хромосомах риса (*Oryza sativa*) (Ueda, Kadowaki, 2012). Внутриклеточное перераспределение генетической информации из митохондрий в ядро показано для различных видов высших растений, причем в ядерном геноме встречаются как кодирующие митохондриальные последовательности, так и интроны (Brennicke et al., 1993). Анализ структуры вставки размером 190 кб в *A. thaliana* показал более 99,7 % ее сходства с исходной мтДНК, что позволило авторам предположить, что перенос в ядерный геном произошел сравнительно недавно (Shahid Masood et al., 2004; Stupar et al., 2001; Ueda et al., 2005). До настоящего времени механизм транслокации митохондриальных генов в ядерный геном и его биологическое значение остаются еще недостаточно изученными. Установлено, что в большинстве случаев перенос в ядро происходит на уровне молекул ДНК, а РНК-опосредованный перенос встречается достаточно редко (Ueda, Kadowaki, 2012).

В растительной клетке три компартмента, содержащих ДНК, и, исходя из этого, выявлено 5 типов внутриклеточного переноса генов: (1) от митохондрий к ядру (англ. Nuclear Mitochondrial DNA Sequences – NUMTs), (2) от пластид к ядру (англ. Nuclear Plastid DNA Sequences – NUPTs) (3) от пластид к митохондриям, (4) от ядра к митохондриям, (5) от митохондрий к пластидам (Kleine et al., 2009) (рис. 2).



**Рисунок 2. Внутриклеточное перераспределение генетической информации между органеллами в растительной клетке (англ. EGT – endosymbiotic gene transfer). Толщина стрелки на рисунке показывает интенсивность событий переноса генетической информации. (Рисунок из работы Kleine et al., 2009).**

По сравнению с митохондриями животных, типичный геном которых имеет компактную организацию и содержит сходный набор из 13 кодирующих белки генов, митохондриальный геном покрытосеменных растений, напротив, показывает значительные вариации в содержании генов. Исходя из этого, предполагают, что перенос генов от митохондрий к ядру для представителей покрытосеменных не закончен и продолжается в настоящее время. Согласно исследованиям Бреннике с соавторами (1993), процесс переноса генетической информации от митохондрий в ядро можно разделить на несколько этапов: (1) перемещение гена (выбор последовательности митохондриального генома, экспорт из митохондрий, импорт в ядро), (2) интеграция в ядерный геном (приобретение ядерного промотора, сигналов полиаденилирования и адресации в митохондрии) и (3) последующая инактивация оригинальной последовательности

в митохондриях. В митохондриальных геномах растений обнаружены многочисленные примеры различных эволюционных этапов, когда один и тот же ген, кодирующий функциональный митохондриальный белок, кодируется либо в митохондриях, либо в ядре. В последнем случае в митохондриальном геноме растений может сохраняться нефункциональная копия гена или же происходит ее утрата.

У представителей семейства бобовых были показаны различные стадии транслокации гена *COX 2* из митохондриального генома в ядерный. Так, например, функциональный ген *COX 2* в митохондриальном геноме обнаружен у гороха. В мтДНК сои выявлена полная копия данного гена, но эта копия не является функциональной. У вигны китайской в митохондриальном геноме ген *COX 2* не обнаружен, но соответствующий белковый продукт этого гена кодируется ядерным геномом (Adams et al., 1999; Covello и Gray, 1992; Nugent, Palmer, 1991).

Кроме внутриклеточного переноса генов между ДНК-содержащими компартментами, для митохондриального генома растений выявлены события межвидового переноса генов. Множественный перенос генов в митохондриальный геном произошел у примитивного цветкового растения *Amborella trichopoda*. Анализ нуклеотидных последовательностей мт-генома *A. trichopoda* размером 3,9 м.п.н. выявил обширные вставки мтДНК из других видов (зеленые водоросли, мхи, покрытосемянные растения) (Rice et al., 2013). Наряду с представителями рода *Silene* для этих видов характерны самые большие по размерам митохондриальные геномы. Увеличение размеров геномов, вероятно, происходило различными путями. Так, для представителей рода *Silene* увеличение генома связано с накоплением коротких повторяющихся последовательностей размером 30-53 п.н. (Sloan et al., 2012), а у *A. trichopoda* – с включением в состав мтДНК генов других видов (Rice et al., 2013).

Предполагают, что перенос генов у *A. trichopoda* может происходить в результате физических контактов с различными эпифитами и паразитами в условиях влажного тропического климата, а также с участием вирусов и

транспозонов. Включение в состав митохондриального генома «новых» генов может происходить различными способами, как при слиянии митохондрий разных видов, так и, возможно, при поглощении митохондриями чужеродной ДНК (импорт ДНК) (Rice et al., 2013).

Паразитирование одних организмов на других достаточно широко распространено в природе, поэтому процесс горизонтального переноса генов (ГПП), лежащий в основе межвидового переноса генетической информации, может являться, как и у бактерий, важным движущим фактором эволюции у многоклеточных организмов.

#### **1.4. Импорт нуклеиновых кислот в митохондрии**

Согласно литературным данным, митохондриальный протеом содержит тысячи белков, однако лишь малая их часть кодируется митохондриальным геномом. В среднем 98% митохондриальных белков имеют ядерное происхождение, транслируются на свободных полисомах в цитоплазме и импортируются в митохондрии (посттрансляционный импорт белков) (Michaud, Duchêne, 2012). Однако существует другая модель котрансляционного импорта, согласно которой трансляция осуществляется рибосомами, которые локализованы на поверхности митохондрий. Многочисленные экспериментальные данные показали, что мРНК, кодирующие белки митохондриальной локализации, детектируются на поверхности внешней мембраны митохондрий растений. Структура этих транскриптов содержит определенные мотивы (цис-элементы, расположенные преимущественно в 3' UTR-области), ответственные за связывание мРНК, кодирующей митохондриальные белки, с поверхностью внешней мембраны митохондрий (Michaud et al., 2014; Michaud, Duchêne, 2012).

Помимо белков, многие организмы импортируют в митохондрии также молекулы РНК. Это явление характерно для митохондрий организмов различных таксономических групп: дрожжей, простейших, растений и некоторых видов животных (млекопитающие). Впервые импорт тРНК был установлен у

*Tetrahymena* в 1967 г., в дальнейшем это явление было показано для дрожжей и растений (Michaud, Duchêne, 2012).

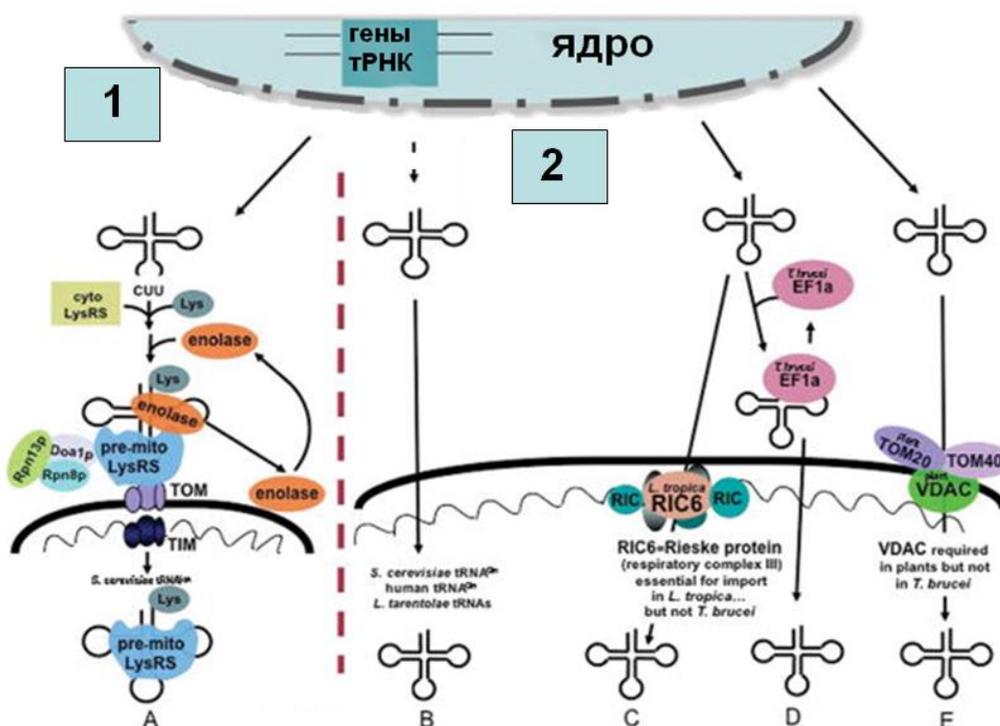
Механизм и специфичность импорта тРНК у представителей различных таксономических групп различаются. Так, например, в митохондриях простейших (*Leishmania tarentolae* и *Trypanosoma brucei*) импортируются все тРНК, у дрожжей – только 2 вида (тРНК<sup>Lys</sup> и тРНК<sup>Gln</sup>), у растений – до 50% (Rubio, Nopper, 2011; Michaud, Duchêne, 2012). Долгое время преобладало мнение, что в митохондриях млекопитающих в естественных условиях тРНК не импортируется, поскольку минимальный набор тРНК, необходимый для трансляции, кодируется собственным митохондриальным геномом. Однако с использованием метода ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в митохондриях человека и крысы были обнаружены тРНК<sub>CUG</sub><sup>Gln</sup> и тРНК<sub>UUG</sub><sup>Gln</sup> ядерного происхождения. Было также обнаружено, что изолированные митохондрии человека способны импортировать тРНК<sup>Gln</sup> *in vitro* (Rubio et al., 2008). Также можно отметить, что в митохондриях человека проникают РНК, входящие в состав РНКазы Р и МРР (сайт-специфичной эндорибонуклеазы), а также 5S рРНК (Doersen et al., 1985; Chang et al., 1987; Smirnov et al., 2010). Сравнительно недавно были обнаружены микроРНК (microRNA) в митохондриях некоторых клеточных линий человека (миобласты, *Hela* и др). Хотя происхождение и функции некодирующих РНК в митохондриях не всегда однозначно установлены, для некоторых из них предполагают ядерное кодирование и импорт в митохондрии (Dietrich et al., 2015).

#### **1.4.1. Механизм импорта тРНК в митохондрии**

Большая часть исследований транспорта РНК в митохондрии была до настоящего времени посвящена импорту тРНК. Механизмы импорта тРНК в митохондрии представителей разных таксономических групп существенно различаются (рис. 3). Даже в пределах одного вида, например, для *S. cerevisiae*, тРНК<sup>Lys</sup> и тРНК<sup>Gln</sup> импортируются в митохондрии разными путями. Исходя из этого, предполагают, что импорт тРНК в митохондрии в отличие от транспорта белков имеет полифилетическое происхождение.

Механизмы импорта тРНК условно можно разделить на два класса:

(1) процесс импорта тРНК происходит с участием компонентов аппарата импорта белков (ТОМ/ТИМ-комплексы, англ. translocase of the outer mitochondrial membrane; translocase of the inner membrane). Например, импорт тРНК<sup>Lys</sup>(CUU) в митохондрии *S. cerevisiae* происходит с участием цитозольных белковых кофакторов: энлазы, лизил-тРНК-синтетазы, предшественника митохондриальной лизил-тРНК-синтетазы и некоторых других (рис. 3 А). (2) импорт тРНК и белков в митохондрии происходит с участием различных белков или белковых комплексов (Рис. 3 В – Е). Из внутренней мембраны митохондрий *Leishmania tropica*, был выделен белковый комплекс, названный «комплекс, импортирующий РНК» (англ. RIC – RNA Import Complex). В его состав входят 11 основных субъединиц: RIC 1, 2, 3, 4А, 4В, 5, 6, 7, 8А, 8В, 9 (Rubio, Horper, 2011).



**Рисунок 3. Механизмы импорта тРНК в митохондрии.** А – Импорт тРНК<sup>Lys</sup>(CUU) в митохондрии дрожжей (*S. cerevisiae*); В – Импорт тРНК<sup>Gln</sup> в митохондрии дрожжей и человека, а также тРНК для *Leishmania tarentolae*; С – RIC -комплекс для *Leishmania tropica*; D – Импорт всех тРНК в митохондрии *Leishmania tropica* и *Trypanosoma brucei*; Е – Импорт тРНК в митохондрии растений. (Рисунок из работы Rubio, Horper, 2011).

Несмотря на значительные размеры митохондриального генома высших растений, обнаружено, что он не содержит всего набора генов тРНК (trn), необходимого для митохондриальной трансляции. В настоящее время доступны нуклеотидные последовательности митохондриальных геномов многих видов растений, сравнительный анализ которых позволил выявить значительные различия в числе и происхождении генов тРНК. Так, у покрытосемянных растений в митохондриальной трансляции участвуют несколько типов тРНК: собственно митохондриальные, тРНК хлоропластного происхождения и химерные тРНК (происхождение которых в митохондриальном геноме неизвестно), а также тРНК, которые импортируются в митохондрии из цитоплазмы и компенсируют недостающие тРНК (Michaud, Duchêne, 2012). Число импортируемых в митохондрии растений тРНК варьирует и составляет примерно  $1/3 - 1/2$  от общего количества тРНК в митохондриях растений. Так, например, в митохондрии картофеля импортируется 11, а в митохондрии пшеницы 16 тРНК, в то время как митохондриальными геномами этих растений кодируется соответственно 20 и 14 генов тРНК (Michaud, Duchêne, 2012). Тем не менее, точное число импортирующихся тРНК не всегда возможно оценить, а экспериментальные доказательства получены лишь для ограниченного количества видов растений. Для исследований импорта тРНК в митохондрии используется несколько стратегий, в которых либо определяют всю популяцию тРНК в высокоочищенных изолированных митохондриях, либо проводят систематический анализ импорта всех тРНК ядерного происхождения *in vitro*.

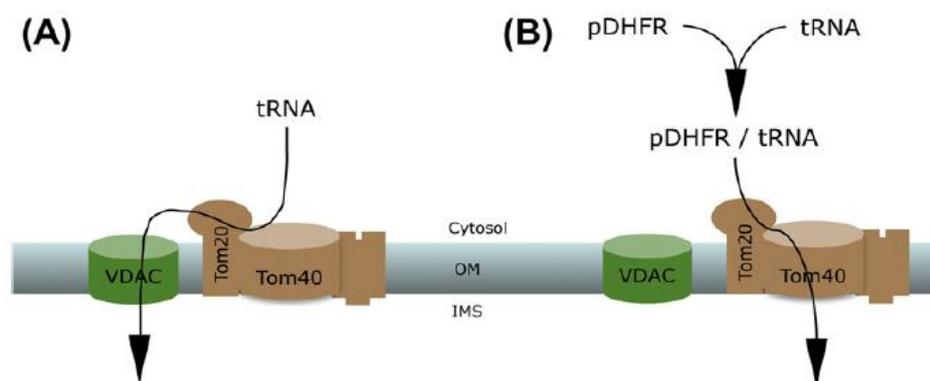
Процесс транспорта тРНК в митохондрии можно разделить на несколько этапов: 1) от ядра к поверхности митохондрий, 2) транслокация через митохондриальные мембраны. На начальном этапе после транскрипции, сплайсинга и различных модификаций зрелые тРНК экспортируются из ядра в цитоплазму. В цитоплазме тРНК не «свободны», а обычно связаны с компонентами трансляционного аппарата. Для импорта в митохондрии тРНК, вероятно, также должны связываться с белковыми факторами, которые

способствуют их транспорту к поверхности митохондрий (Michaud, Duchêne, 2012).

В растениях последовательности тРНК высоко консервативны, при этом число импортируемых тРНК достаточно сильно отличается, причем даже у близкородственных видов. Каким образом достигается специфичность импорта тРНК в растениях не до конца изучено. Были выявлены некоторые детерминанты, обеспечивающие импорт цитозольных тРНК, так, например, нуклеотидная позиция 73 в тРНК<sup>Ala</sup> в области акцепторного стебля, а также в области антикодона и D-петли для тРНК<sup>Val</sup> и тРНК<sup>Gly</sup> (Delage et al., 2003; Salinas et al., 2005).

Для всех изученных в настоящее время модельных организмов (дрожжи, простейшие и растения) было выявлено несколько общих закономерностей: (1) зависимость процесса импорта тРНК от присутствия АТФ, а также (2) участие чувствительных к протеазной обработке белков внешней мембраны митохондрий (Delage et al., 2003; Michaud, Duchêne, 2012; Rubio, Hopper, 2011).

Импорт белков и тРНК в митохондрии растений, вероятно, происходит разными путями, тем не менее, было показано, что в связывании тРНК участвуют некоторые субъединицы ТОМ-комплекса, а именно ТОМ20 и ТОМ40 (Salinas et al., 2006). Импорт тРНК подавлялся антителами к транспортному белку внешней митохондриальной мембраны порину или VDAC (англ. Voltage Dependent Anion Channel), а также рутением красным, исходя из чего было сделано заключение о ключевой роли этого белка в транслокации тРНК на уровне внешней мембраны (рис. 4 А). Белки ТОМ-комплекса в этом механизме импорта тРНК, вероятно, выполняют рецепторную функцию (Salinas et al., 2006).



**Рисунок 4. Схема предполагаемых механизмов импорта тРНК в изолированные растительные митохондрии.** Для изучения механизма импорта тРНК в изолированные митохондрии растений были разработаны две модельные системы *in vitro*. (А) Транслокация тРНК в митохондрии на уровне внешней мембраны происходит с участием VDAC; (В) Транслокация тРНК происходит в присутствии рDHFR и с участием TOM-комплекса. (Рисунок из работы Michaud, Duchêne, 2012).

Для более детального изучения взаимодействия порина с тРНК, группой исследователей (Salinas et al., 2014) были получены рекомбинантные белки VDAC. Согласно литературным данным, митохондрии картофеля (модельного растения для изучения импорта тРНК) имеют 2 основные изоформы порина: VDAC34 и VDAC36, имеющие между собой 75% гомологию. В работе Salinas с соавторами было выявлено, что рекомбинантно-экспрессированный белок VDAC36 связывается с тРНК *in vitro* примерно в 7,5 раз слабее, чем VDAC34 (Salinas et al., 2014). По всей видимости, эти 2 изоформы порина взаимодействуют с тРНК с разной эффективностью. Авторами также были получены мутантные белки, которые содержали делецию в определенных областях белковых молекул VDAC. Анализ связывания тРНК и рекомбинантных мутантных белков показал, что делеция в любом участке уменьшает процент связывания белка с тРНК. Первые 50 – 90 аминокислотных остатков N-концевого участка VDAC34 обеспечивают около 50% связывания. Почти все делеции других белковых доменов также значительно снижали эффективность связывания, что свидетельствует о важности в целом всей структуры этого порообразующего белка для транспорта тРНК в митохондрии (Salinas et al., 2014).

Важно отметить, что для некоторых организмов, например, дрожжей, процесс импорта в митохондрии тРНК<sup>Lys</sup> требует присутствия цитозольных кофакторов: энлазы, лизил-тРНК-синтетазы и некоторых других, которые способствуют транслокации РНК в митохондрии с участием аппарата импорта белков (Kamenski et al., 2010). При этом для растений было показано, что тРНК могут импортироваться в изолированные митохондрии с низкой эффективностью без участия каких-либо цитозольных белковых кофакторов.

Для проверки гипотезы существования белковых кофакторов импорта тРНК в митохондрии растений был сконструирован химерный белок на основе дигидрофолатредуктазы млекопитающих (англ. DHFR – Dihydrofolate Reductase), который обладает способностью неспецифично связываться с тРНК *in vitro* (Sieber et al., 2011). В структуру химерного белка была введена сигнальная последовательность для импорта в митохондрии MTS (англ. MTS – Mitochondrial Targeting Sequence). В присутствии в среде инкубации рDHFR (DHFR+MTS) эффективность импорта тРНК<sup>Ala</sup> в митохондрии увеличивалась в 10 – 20 раз. При этом антитела к порину не оказывали ингибирующего эффекта на процесс импорта тРНК, что свидетельствует о совместной транслокации РНК-белок, происходящий, вероятно, с участием ТОМ-комплекса (рис. 4 В). Было установлено также, что гибридный белок рDHFR способен связываться не только с тРНК, но и с мРНК (в экспериментах тестировали полноразмерный транскрипт гена *ATP9* картофеля). Импорт мРНК *ATP9* наблюдали только в случае присутствия в среде инкубации рDHFR, при этом после импорта было показано также и частичное редактирование мРНК (Sieber et al., 2011). На основании этих данных авторы работы предполагают существование дополнительных белковых кофакторов, способствующих более эффективной транслокации тРНК в митохондрии растений.

Механизм транслокации тРНК на уровне внутренней мембраны митохондрий растений остается изученным недостаточно. Также остается открытым и вопрос, какие белки/белковые комплексы участвуют в импорте тРНК в митохондрии растений.

Поскольку импорт тРНК в митохондрии представляет собой достаточно широко распространенное явление для организмов разных таксономических групп, этот феномен привлекает внимание, как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях. Большое количество заболеваний человека связано с мутациями в генах тРНК, и импорт соответствующих тРНК ядерного кодирования теоретически может компенсировать проявление и корректировать дисфункции митохондрий в таких случаях. Также на основе структуры тРНК, несущих определенные детерминанты импорта в митохондрии, создаются и тестируются различные конструкции для доставки РНК в митохондрии. Например, векторные конструкции, содержащие комплементарные последовательности, которые способны узнавать и блокировать транскрипцию или репликацию мутантных копий мтДНК и тем самым несколько изменять уровень гетероплазмы в клетках (Comte et al., 2013; Tonin et al., 2014).

В работе Val с соавторами было обнаружено, что в результате ядерной трансформации культуры клеток табака и *A.thaliana* в митохондрии импортировалась химерная тРНК (tRNA-like), в состав которой был введен специфичный для гена АТР9 рибозим. Трансгенез индуцибельной конструкцией позволил добиться снижения экспрессии митохондриального гена АТР9 *in vivo* (Val et al., 2011).

Однако, все эти стратегии коррекции мутаций в мтДНК не нашли пока широкого практического применения и, вероятно, находятся на стадиях разработки и тестирования в специфичных модельных системах.

#### **1.4.2. Поиск путей трансформации митохондриального генома различных организмов**

В настоящее время генетические дефекты в структуре митохондриального генома человека, приводящие к митохондриальным дисфункциям, интенсивно изучаются. Под общим названием «митохондриальные заболевания» собрана большая гетерогенная группа дефектов, характеризующаяся разнообразными симптомами. Степень фенотипического проявления митохондриальной

дисфункции во многом определяется уровнем митохондриальной гетероплазмы в клетке. Примерно у каждого 300-го человека встречаются мутации в мтДНК, некоторые из них могут приводить к развитию тяжелых наследственных заболеваний, поражающих в основном ткани с высокой метаболической активностью, в первую очередь мышечные ткани и нервную систему (Niazi et al., 2012). В настоящее время они считаются неизлечимыми и имеют только симптоматическое лечение.

По сравнению с человеком, для покрытосемянных растений известно не так много точечных мутаций в митохондриальном геноме, которые влияли бы на функцию митохондрий. Для митохондрий растений гораздо более распространенными являются перестройки в митохондриальном геноме, приводящие к появлению химерных генов, экспрессии с них абберантных белков, и, зачастую, к фенотипу ЦМС.

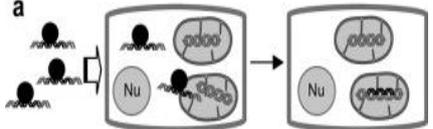
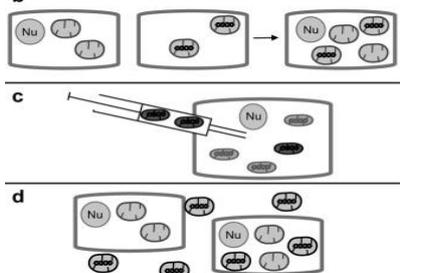
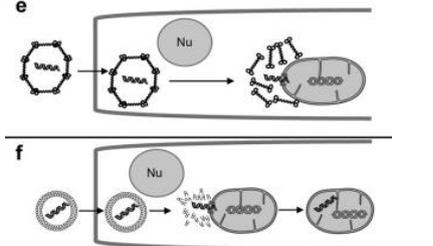
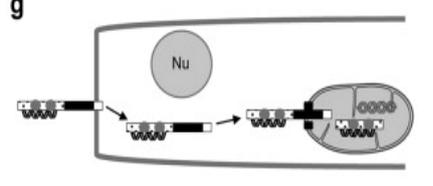
Феномен ЦМС представляется исключительно важным для селекции и сельского хозяйства. Для получения ЦМС-линий различных видов растений были предприняты попытки использовать стратегию аллотопической экспрессии. Ожидалось, что ядерная трансформация генетическими конструкциями с известными последовательностями, характерными для ЦМС (несущими дополнительно сигнальный пептид MTS для импорта в митохондрии) будет способствовать появлению ЦМС-фенотипа. Но эта стратегия не всегда дает воспроизводимые результаты (Kumar et al., 2012; Duroc et al., 2006). Следует отметить, что митохондриальные гены вносят существенный вклад в проявление других важных признаков: биологической продуктивности растений, устойчивости к засухе, холоду и различным патогенам.

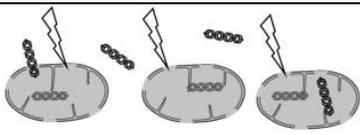
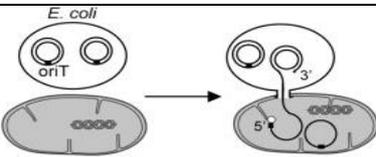
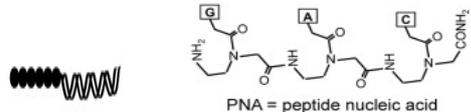
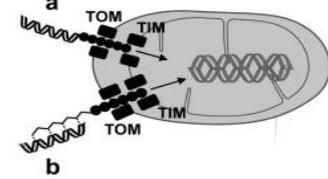
Поэтому вот уже более 30 лет ведется поиск методических приемов и стратегий, позволяющих направленно манипулировать структурой мтДНК. Основной общей целью таких исследований можно считать поиск стратегий направленной доставки в митохондрии молекул нуклеиновых кислот, которые либо несут определенные функциональные последовательности для экспрессии в органеллах, либо тем или иным способом препятствуют репликации или

экспрессии мутантных копий мтДНК. Важно отметить, что вводимая тем или иным способом экзогенная ДНК в митохондриальный компартмент должна сохраняться в ряду поколений, т.е. векторной конструкции необходимо обладать свойствами автономного репликона или же встраиваться в митохондриальный геном растений посредством рекомбинации.

К настоящему времени известны следующие методические подходы, которые исследователи использовали для изучения направленной доставки молекул нуклеиновых кислот в митохондрии (табл. 2).

**Таблица 2. Стратегии переноса ДНК в митохондрии**

Перенос ДНК в митохондрии <i>in vivo</i>	Схема экспериментов	Литература
Баллистическая трансформация мтДНК		Fox, 1988 Zhou, 2010 Remacle, 2006
Методы клеточной биологии. Получение клеточных цибридов (слияние клеток, микроинъекции митохондрий, коинкубация клеток и изолированных митохондрий)		King, 1992 Clark и Shay, 1982 Katrangi, 2007
Инкубация клеток с ДНК-содержащими комплексами (липосомы, DQasome, МИТО-Porter)		D'Souza, 2003
Инкубация клеток с комплексами ДНК-белок (MTD-TFAM)		Khan, 2004 Keeney, 2009

Стратегии переноса ДНК в изолированные митохондрии <i>in vitro</i>		
Электропорация изолированных митохондрий		Farre, 2002 Staudinger, 2003 Choury, 2004, 2005 Bolle, 2007
Конъюгация изолированных митохондрий и бактерий		Yoon и Koob, 2005
Инкубация митохондрии с комплексами ДНК-белок	 	Vestweber, 1989 Seibel, 1999 Flierl, 2003 Collombet, 1997 Yoon и Koob, 2003
Импорт ДНК (Инкубация изолированных митохондрий и ДНК)		Koulintchenko, 2003, 2006 Weber-Lotfi, 2009

(Таблица и рисунки из работы Mileshina et al., 2011).

1. Баллистические методы трансформации – бомбардировка клеток микрочастицами (инертный материал, обычно вольфрам или золото) с нанесенными на них молекулами ДНК. С применением этого подхода была проведена трансформация митохондриальных геномов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida glabrata*, а также одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Fox et al., 1988; Zhou et al., 2010; Remacle et al., 2006). Также можно отметить, что с использованием биобаллистики были получены хлоропластные трансформанты *C. reinhardtii* и табака (*Nicotiana tabacum*) (Newman et al., 1990; Svab et al., 1990).

Согласно литературным данным, применение баллистических методов для трансформации мтДНК животных и высших растений оказалось не эффективным и положительных результатов выявлено не было. Причиной неудач, очевидно, является тот факт, что митохондрии имеют гораздо меньший размер, чем хлоропласты, и в клетке присутствует обычно многочисленная популяция митохондрий (при этом каждая отдельная митохондрия может иметь несколько

копий мтДНК). Немаловажным фактором помимо этого является отсутствие маркерных генов, которые бы позволили осуществить селекцию митохондриальных трансформантов.

2. Методы клеточной биологии применяются для получения гибридных клеточных линий. Так, например, King и Attardi (1989) использовали клеточные линии человека  $\rho_0$  (митохондрии не содержат мтДНК) в качестве доноров цитоплазмы: митохондрии в такие клетки вводились с помощью микроинъекций. Гибридные клеточные линии, согласно исследованиям (King et al., 1992), можно также получить и в результате слияния двух клеток, одна из которых не содержит ядра, но несет митохондрии. Помимо этого, было установлено, что клетки млекопитающих способны поглощать изолированные митохондрии в результате простой коинкубации клеток и митохондрий (Clark, Shay, 1982; Katrangi et al., 2007).

В последние годы выявлен феномен межклеточного транспорта митохондрий в результате сокультивирования различных клеточных линий человека. Обнаружено, что митохондриальный транспорт сопровождается формированием особых межклеточных структур – туннельных нанотрубочек (ТНТ) (Плотников и др., 2015). Все эти стратегии получения гибридных клеток в настоящее время применялись, в основном, в фундаментальных исследованиях.

3. Группа подходов, основанная на использовании специальных частиц или везикул, способных связывать определенным образом ДНК и доставлять ее в клетки. К таким частицам можно отнести липосомы, катионные везикулы, содержащие деквалиний (DQAsome) и некоторые другие. Одним из существенных недостатков этой стратегии доставки ДНК в митохондрии является установленная в исследованиях вероятная токсичность частиц для клетки (D'Souza et al., 2003; Niazi et al., 2012; Milesina et al., 2011).

4. Группа подходов, основанная на использовании ДНК-связывающих белков в качестве векторных молекул для доставки ДНК в клетки. Ряд исследователей использовали белок MDT-TFAM, который содержит в своем составе домен, обеспечивающий его транспорт в клетки, транзитный сигнальный пептид для

импорта в митохондрии, а также митохондриальный фактор транскрипции TFAM, обладающий ДНК-связывающими свойствами. При помощи этой конструкции в митохондрии человека смогли доставить полногеномные молекулы мтДНК (Keeney et al., 2009; Thomas et al., 2011).

Помимо изучения возможных путей трансформации митохондрий *in vivo*, достаточно большое количество исследований было посвящено поиску эффективных стратегий доставки нуклеиновых кислот в изолированные органеллы (табл. 2):

1. Сравнительно большие по размерам молекулы ДНК вводили в изолированные митохондрии посредством метода электропорации. С использованием этого подхода было проведено исследование механизмов сплайсинга и редактирования РНК в растительных митохондриях. Была показана экспрессия вводимых в митохондрии конструкций (Farre, Araya, 2002).

2. Другой оригинальный подход основывался на представлении, что митохондрии имеют прокариотическое происхождение, и по этой причине, могут обладать способностью обмениваться генетическим материалом с бактериями. Yoon и Кооб (2005) разработали метод переноса экзогенных молекул ДНК в изолированные митохондрии млекопитающих посредством конъюгации митохондрий и бактерии (*E.coli*).

3. Импорт белков ядерного кодирования в митохондрии – сравнительно хорошо охарактеризованное явление, которое также было использовано для разработки стратегий доставки ДНК в органеллы. Так, в конце 80-х, согласно исследованиям (Vestweber et al., 1989) было показано, что изолированные митохондрии дрожжей способны импортировать комплексы ДНК-белок. Для экспериментов авторы использовали одноцепочечный и двуцепочечный фрагменты ДНК размером 24 п.н., 5'-концы которых были ковалентно связаны с С-концевым участком белка митохондриальной локализации. Было также показано, что изолированные митохондрии из печени крысы (*Rattus norvegicus*) способны импортировать химерные молекулы, состоящие из молекул ДНК размером 17 и 322 п.н. и N-концевого сигнального пептида. В этих исследованиях было обнаружено, что

комплексы ДНК-белок импортируются в митохондрии с участием компонентов аппарата импорта белков (ТОМ/ТИМ).

В исследованиях также тестировали возможность импортировать в митохондрии пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК или PNA – англ. peptide nucleic acid), синтетические молекулы, представляющие собой линейные полимеры полиамидов, замещённые по азоту аминоэтильной группы производными азотистых оснований. Полиамидный миметик нуклеиновых кислот обладает способностью связываться с РНК или одноцепочечными молекулами ДНК. Флуоресцентно меченые комплексы оцДНК/ПНК использовали для доставки ДНК в изолированные митохондрии мыши. В случае, когда комплексы оцДНК/ПНК содержали N-концевой сигнальный пептид, была показана митохондриальная локализация олигонуклеотидов как на уровне изолированных митохондрий, так и в клетках (Flierl et al., 2003).

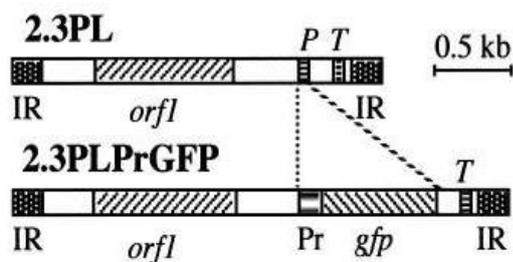
4. Еще одной стратегией доставки ДНК в изолированные митохондрии является импорт ДНК (или природная компетентность митохондрий) на основе предположения о бактериальном происхождении митохондрий (Koulintchenko et al., 2003, 2006; Weber-Lotfi et al., 2009).

#### **1.4.3. Явление природной компетентности изолированных митохондрий к поглощению ДНК**

В 80-е гг. сотрудниками нашей лаборатории была разработана модельная система для исследования транслокации, репликации и транскрипции ДНК в изолированных митохондриях растений (Константинов и др., 1988; 1989). С использованием данной модельной системы импорта ДНК *in organello* было установлено, что бактериальные векторы серии pBR (pBR327 и pBR322) способны не только импортироваться в изолированные митохондрии (выделенные из этиолированных проростков кукурузы), но и служить матрицей для синтеза ДНК. При этом эффективность транслокации и ДНК-синтеза для разных форм плазмидной ДНК различались. В дальнейшем, совместно с лабораторией Института Молекулярной Биологии Растений (Institut de Biologie

Moléculaire des Plantes, IBMP CNRS) в Страсбурге (Франция), были проведены более детальные исследования механизма транспорта ДНК в изолированные митохондрии растений. Было установлено, что митохондрии, изолированные не только из разных видов растений (картофель, кукуруза, цветная капуста, суспензионная культура табака) (Koulintchenko et al., 2003; Ibrahim et al., 2011), но и из млекопитающих (крыса, культура клеток человека) (Koulintchenko et al., 2006) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Weber-Lotfi et al., 2009) путем активного транспорта способны импортировать ДНК.

В работе Koulintchenko с соавт. (2003) эксперименты по импорту молекул ДНК в изолированные растительные митохондрии проводили, используя в качестве субстрата импорта митохондриальную линейную плазмиду 2,3 т.п.н. из мт-генома кукурузы (*Zea mays*) (рис. 5). Эта плазида содержит концевые инвертированные повторы размером 170 п.н. (КИП или TIR англ. – terminated inverted repeat), открытую рамку считывания размером 885 п.н. (*ORF1*) и два гена тРНК хлоропластного происхождения тРНК<sup>Pro</sup> (*P*) и тРНК<sup>Trp</sup> (*T*) (Koulintchenko et al., 2003).



**Рисунок 5. Модельный субстрат импорта ДНК на основе структуры митохондриальной плазмиды 2,3 т.п.н. кукурузы.** 2,3 PL – линейная плазида 2,3 т.п.н. из кукурузы (дикий тип) (Leon et al., 1989). Для исследования экспрессии импортируемой ДНК была создана конструкция 2.3PLPrGFP, в которой ген тРНК<sup>Pro</sup> (*P*) заменен маркерным геном *GFP* под контролем митохондриального промотора 18S рРНК картофеля и короткого 5'-фрагмента гена *ATP1* из табака (*Pr*) (Koulintchenko et al., 2003).

Эксперименты проводили по следующей схеме: изолированные митохондрии картофеля инкубировали с радиоактивно меченой ДНК, далее митохондрии

обрабатывали ДНКазой и несколько раз отмывали, после чего из митохондрий экстрагировали нуклеиновые кислоты и анализировали с помощью автордиографии. Эффективность импорта ДНК в изолированные митохондрии оценивалась исходя из предположения, что после полной транслокации радиоактивно меченых молекул ДНК через митохондриальные мембраны ДНК становится устойчивой к ДНКазной обработке. Были подобраны оптимальные условия для импорта ДНК в изолированные растительные митохондрии: инкубация в «минимальной среде», содержащей осмотический (0,4 М сахара) и буферный (40 мМ фосфат калия, рН 7,0) компоненты в течение 30 минут при 25°C.

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

**Таблица 3. Условия импорта ДНК в митохондрии, изолированные из различных организмов**

	<b>растения</b>	<b>млекопитающие</b>	<b>дрожжи</b>
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-НСl	40 мМ трис-НСl
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 (°С)	25	30	30
Время инкубации (минуты)	30	80	40

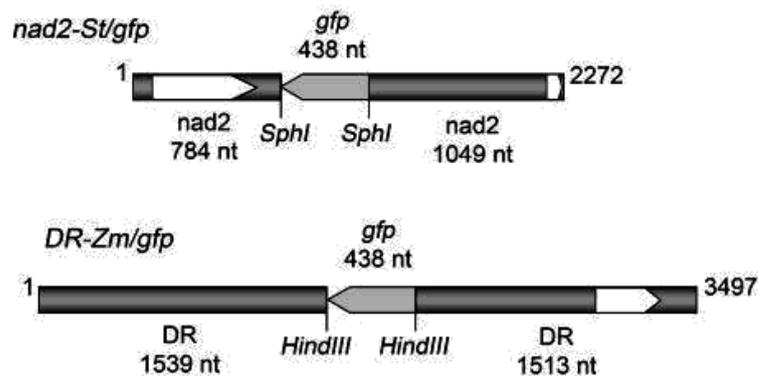
Как уже упоминалось выше (глава 1.2.), многие виды растений помимо основного митохондриального генома могут содержать набор небольших плазмидоподобных молекул ДНК. Можно предположить, что распространение митохондриальных плазмид происходило, в том числе, и благодаря феномену природной компетентности митохондрий к импорту ДНК.

#### **1.4.4. Участие импортированной ДНК в митохондриальных генетических процессах.**

Важно отметить, что экзогенная ДНК, импортированная в изолированные митохондрии различного происхождения, является функционально активной. Так, в работе (Koulintchenko et al., 2003) было показано, что при условии, если конструкция ДНК содержит определенные регуляторные элементы (рис. 5, 18S митохондриальный промотор картофеля), происходит экспрессия импортируемой ДНК (маркерного гена GFP). С использованием митохондрий, изолированных из печени крысы, было показано, что импортированная ДНК может служить матрицей для синтеза ДНК, а в случае наличия в ней промоторных элементов, характерных для мтДНК млекопитающих может транскрибироваться, и, более того, образующийся полицистронный продукт может подвергаться дальнейшим этапам созревания и процессинга (Koulintchenko et al., 2006). Эти процессы до сих пор остаются недостаточно изученными, и импорт ДНК в изолированные митохондрии представляется перспективным подходом для изучения роли промоторных элементов в механизмах митохондриальной экспрессии.

Другим принципиально важным моментом является то, что переносимые в митохондрии конструкции могут рекомбинировать с резидентной мтДНК растений (Mileshina et al., 2011). Для исследования возможности интеграции импортированной ДНК в основной митохондриальный геном были созданы конструкции, обладающие потенциальными интегративными свойствами *pad2-St/gfp* и *DR-Zm/gfp* (рис. 6). Авторы установили, что в случае, когда импортируемый субстрат содержал область гомологии с митохондриальным геномом, происходила ассоциация импортируемой ДНК с высокомолекулярной

мтДНК растений. В этих исследованиях использовали митохондрии, изолированные как из клубней картофеля, так и из суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum*). Импорт в митохондрии конструкции с интегративными свойствами *nad2-St/gfp* проводили в стандартных условиях. После обработки ДНКазой инкубацию митохондрий продолжали в буфере для синтеза ДНК (Mileshina et al., 2011) в течение 1 – 2 ч, после чего из них экстрагировали фракцию высокомолекулярной ДНК. Детекцию интеграции чужеродных последовательностей в митохондриальную ДНК проводили с использованием (1) электрофоретического разделения мтДНК в различных условиях, нативных и денатурирующих; (2) рестриционного анализа мтДНК после элюции ее из геля; (3) анализа рестрицированных и лигированных фрагментов мтДНК с помощью инвертированной ПЦР и праймеров к митохондриальному гену *NAD2* и к *GFP*. Для анализа прилегающих к последовательности гена *GFP* участков мтДНК амплифицированные фрагменты клонировали и секвенировали. Анализ рекомбинантных клонов позволил сделать выводы о том, что (1) последовательность репортерного гена *GFP* без дупликаций или делеций может встраиваться в мтДНК; (2) рекомбинация происходит по фланкирующим ген-репортер областям, размером примерно 0,5 – 0,6 т.п.н. с каждой стороны маркерного гена; (3) рекомбинация между импортируемой и митохондриальной ДНК растений может происходить и в отсутствие 100% гомологии между участками.



**Рисунок 6.** Схема конструкций ДНК для изучения интеграции чужеродной ДНК в мт-геном растений. 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 (Mileshina et al., 2011).

Так же как и для растительных объектов, в случае наличия в ДНК, импортируемой в митохондрии, изолированные из печени крысы, гомологии с мтДНК человека, при анализе экстрагированной после импорта мтДНК наблюдали сдвиг электрофоретической подвижности и ассоциацию импортируемой ДНК с высокомолекулярной мтДНК (Koulintchenko et al., 2006). В митохондриях млекопитающих рекомбинация в мтДНК является достаточно редким, по сравнению с растениями, событием, поэтому наблюдаемая ассоциация импортируемой ДНК с мтДНК отображает, по всей вероятности, формирование триплексных структур нуклеиновых кислот.

Модельную систему изолированных митохондрий (растений и человека) использовали также и для исследований механизмов репарации импортируемой ДНК (Boesch et al., 2009; 2010). Анализ импорта в изолированные митохондрии урацил-содержащих фрагментов ДНК различного размера выявил, что импортируемая ДНК полностью репарировались, включая вырезание урацила, вставку тимина и последующее лигирование.

#### 1.4.5. Изучение механизма импорта ДНК в митохондрии различных организмов

Анализ кинетических характеристик процесса импорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля выявил, что количество включившейся радиоактивно меченой плазмиды 2,3 т.п.н. увеличивается с течением времени и выходит на плато примерно через 30 мин инкубации (Koulintchenko et al., 2003). При анализе кинетических характеристик процесса импорта ДНК в митохондрии *S. cerevisiae* (Weber-Lotfi et al., 2009) установлено, что фаза насыщения импорта наступает после 40 минут инкубации изолированных митохондрий с ДНК.

Предобработка изолированных митохондрий трипсином или протеиназой К ингибировала импорт, что свидетельствовало об участии рецепторных белков в транспорте нуклеиновых кислот в митохондрии (Koulintchenko et al., 2003; 2006).

Поскольку рутений красный, а также специфичные антитела к порину, оказывали ингибирующее действие на процесс транспорта ДНК в изолированные митохондрии, было сделано заключение, что на уровне внешней мембраны транслокация ДНК происходит с участием порина (VDAC) (Koulintchenko et al., 2003). Также как и в растениях, в транслокации на уровне внешней мембраны митохондрий млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009) участвует порин (было выявлено ингибирующее действие специфичных антител, рутения красного и DIDS (англ. 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid; 4,4'-диизоциано-2,2'-стильбен-дисульфоновая кислота)).

Для изучения роли порина в транслокации ДНК на уровне внешней митохондриальной мембраны в работе Weber-Lotfi с соавторами (2009) использовали мутантные штаммы *Δpor1* и *Δpor2* *S. cerevisiae* (основные изоформы порина). Было выявлено, что по сравнению со штаммом дикого типа, оба мутанта *S. cerevisiae* менее эффективно импортируют ДНК. При этом POR2, согласно литературным данным, не обладает способностью формировать пору. Исходя из этого, авторы данной работы предположили, что либо обе изоформы порина формируют пору гетеродимерного состава, либо транслокация происходит с

участием POR1, а POR2 участвует в связывании ДНК. Помимо этого, также были проведены эксперименты с использованием митохондрий, изолированных из двойного мутантного штамма *Δpor – Δpor2*, который восстанавливал способность к импорту ДНК на уровне, сходном с диким типом. Было обнаружено, что у двойного мутанта происходила существенная реорганизация митохондриальных мембранных белков, в то время как у мутантов только по одной изоформе порина не было обнаружено существенных изменений. Авторы сделали предположение, что у двойного мутанта *Δpor1- Δpor2* формируются альтернативные компенсаторные пути транслокации ДНК на уровне внешней митохондриальной мембраны.

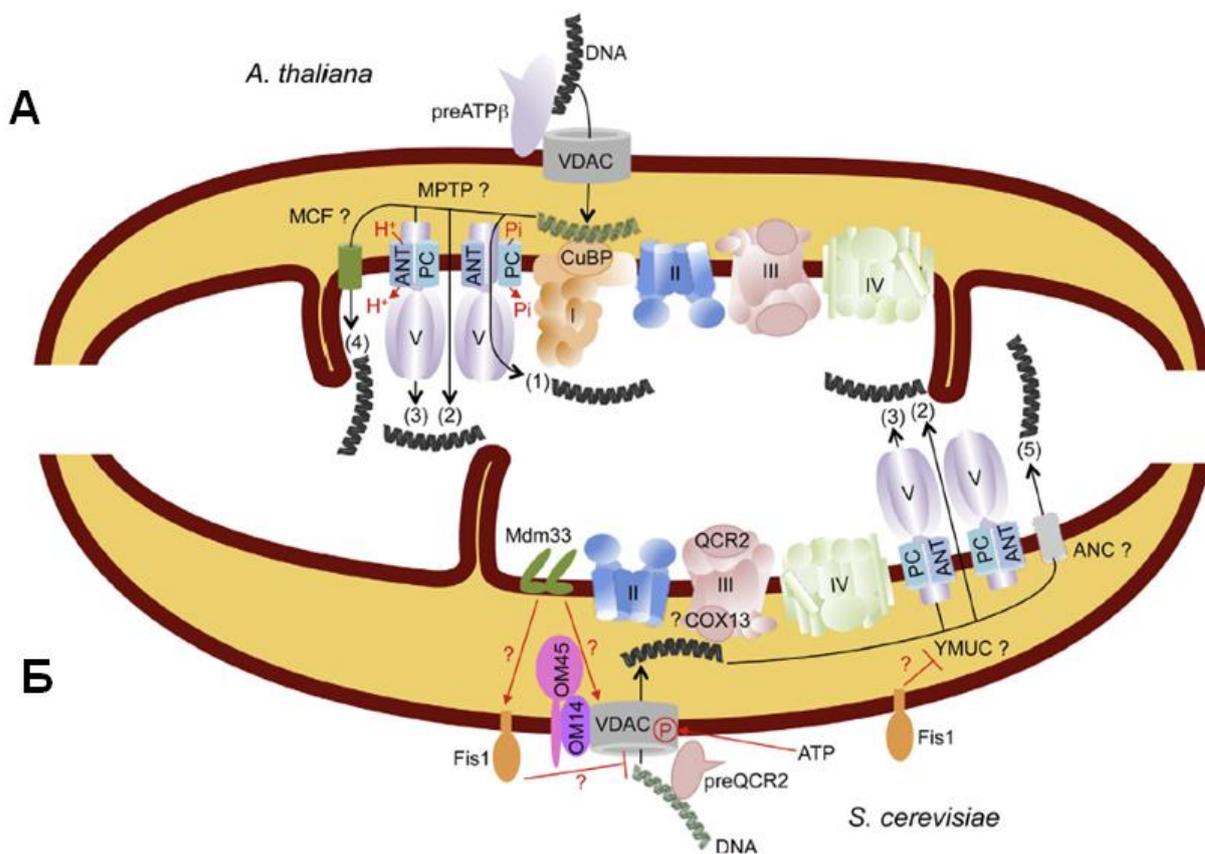
На уровне внутренней мембраны для митохондрий растений была установлена роль в импорте адениннуклеотидтранслоказы (АНТ): импорт ДНК существенно подавлялся атрактилозидом и карбоксиатрактилозидом, известными ингибиторами АНТ (Koulintchenko et al., 2003). При этом ингибирующего действия карбоксиатрактилозида на импорт ДНК в митохондрии человека установлено не было (Koulintchenko et al., 2006).

Одним из необходимых условий эффективного импорта ДНК является функциональное состояние изолированных митохондрий. Для экспериментов использовали только митохондрии с высоким значением дыхательного контроля, что обычно свидетельствует о высоком сопряжении митохондрий и целостности митохондриальных мембран. Импорт ДНК в митохондрии, очевидно, является активным процессом, зависящим от функционального состояния митохондрий: такие разобщители окислительного фосфорилирования, как СССР (карбонилцианид-М-хлорфенилгидразон) и олигомицин оказывали ингибирующее влияние на импорт ДНК в митохондрии растений (Koulintchenko et al., 2003). Импорт ДНК в изолированные митохондрии человека и дрожжей стимулировался в присутствии миллимолярных концентраций АТФ (2 мМ) (Koulintchenko et al., 2006; Weber-Lotfi et al., 2009).

В ходе дальнейших исследований последней декады был проведен более детальный анализ участников процесса импорта ДНК в митохондрии с

использованием мутантов дрожжей и арабидопсиса (Weber-Lotfi et al., 2015). С помощью протеомного анализа флуоресцентно меченых (цианином) мембранных белков, основанного на их экранировании в присутствии ДНК (размером 114 п.н.), был выявлен ряд кандидатов, которые потенциально могут участвовать в импорте ДНК в митохондрии этих организмов. Помимо порина, в исследованиях, выполненных на растениях, была выявлена  $\beta$ -субъединица  $F_1F_0$ -АТФ-синтазы (preАТФ $\beta$ ), предшественник которой ассоциирован с внешней мембраной митохондрий и, очевидно, вследствие этого, способен выполнять рецепторные функции в транспорте ДНК в митохондрии (рис. 7). В митохондриях растений также обнаружена субъединица комплекса I, кодируемая геном At2G27730, которая представляет собой Cu-связывающий белок, ассоциированный с внутренней митохондриальной мембраной. С помощью биоинформатических подходов было показано, что этот белок обладает ДНК-связывающей активностью.

Согласно представленной на рисунке 7 модели, импорт ДНК в митохондрии растений может происходить на поверхности внешней мембраны с участием предшественника  $\beta$ -субъединицы  $F_1F_0$ -АТФ-синтазы (preАТФ $\beta$ ) и порина, транслокация ДНК через внешнюю мембрану – посредством порина (VDAC) и, далее в межмембранном пространстве, с участием Cu-связывающего белка (CuBP), транслокация через внутреннюю мембрану – с участием некоторых компонентов МРТР суперкомплекса (англ. МРТР – mitochondrial permeability transition pore).



**Рисунок 7. Модель механизма транслокации ДНК в изолированные митохондрии растений (А – *A. thaliana*) и дрожжей (Б – *S.cerevisiae*). А – preATPβ – предшественник  $\beta$ -субъединицы  $F_1F_0$ -АТФ-синтазы; CuBP – Cu-связывающий белок; ANT – адениннуклеотидтранслоказа; PC – фосфатный переносчик; MCF – семейство митохондриальных анионных переносчиков. Б. – preQCR2 – предшественник субъединицы комплекса III Qcr2; VDAC (Por1p), Om14p. – белки внешней мембраны митохондрий, COX13 – субъединица комплекса IV, ANC – переносчик адениннуклеотидов, YMUC – аналог поры MPTP *S.cerevisiae* (Рисунок из работы Weber-Lotfi et al., 2015).**

Ранее VDAC и ANT рассматривались в качестве основных компонентов митохондриальной поры сдвига проницаемости (MPTP) у млекопитающих (Zamzami и Kroemer, 2001) и, вероятно, также в растительных митохондриях (Vianello et al., 2012). Этот широко известный процесс обычно возникает как реакция на различные стрессовые факторы, а также играет роль в развитии апоптоза (Bernardi и Di Lisa, 2015; Halestrap и Richardson, 2015; Morciano et al., 2015). Важно отметить, исходя из полученных в настоящее время данных, что

транспорт ДНК в изолированные митохондрии растений происходит с участием VDAC и АНТ, но не сопровождается при этом открыванием поры МРТР и не демонстрирует типичных характеристик этого процесса.

В экспериментах, проведенных на мышах с инактивированным геном АНТ, было выявлено, что у млекопитающих МРТР может существовать и в отсутствие основных изоформ ANT1/ANT2 (Kokoszka et al., 2004). Таким образом, АНТ, один из предполагаемых структурных компонентов поры, не является единственным белком внутренней мембраны, участвующим в формировании МРТР, и, при определенных условиях, в формировании поры, возможно, участвуют некоторые другие представители семейства митохондриальных анионных переносчиков MCF (англ. Mitochondrial Carrier Family). В целом многие аспекты функционирования МРТР, несмотря на многочисленные усилия исследователей, все еще остаются изученными недостаточно и требуют проведения дополнительных исследований.

Для митохондрий дрожжей ДНК-связывающая активность была обнаружена у таких мембранных белков как субъединица комплекса III Qcr2 и субъединица комплекса IV Cox13, а также белков внешней мембраны Por1p (VDAC1) и Om14p (рис. 7). Для митохондрий дрожжей также показано взаимодействие VDAC с некоторыми компонентами комплекса, участвующего в транспорте белков ядерного кодирования, а именно с TIM22 и TIM18 (Weber-Lotfi et al., 2015).

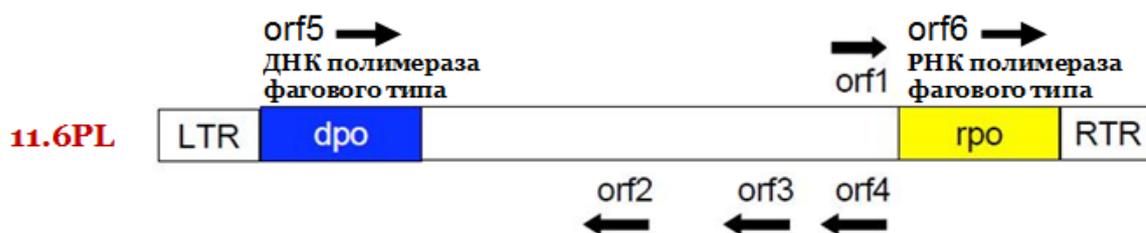
Обобщая литературные данные, можно сделать вывод, что для представителей различных групп организмов механизмы импорта ДНК в изолированные митохондрии, по всей видимости, различаются. Полученные данные свидетельствуют о том, что импорт ДНК в митохондрии может быть опосредован участием нескольких динамично формирующихся транспортных каналов/пор в митохондриальной мембране. Различная доступность для нуклеиновых кислот этих транспортных каналов может быть обусловлена как функциональным состоянием митохондрий, так и видоспецифичными особенностями исследуемых организмов.

#### 1.4.6. Изучение специфичности импорта ДНК в митохондриях

Ранее, с использованием изолированных митохондрий картофеля и радиоактивно меченых субстратов ДНК, было обнаружено, что в митохондриях растений наиболее эффективно импортируются линейные двухцепочечные молекулы ДНК сравнительно небольшого размера (в пределах нескольких т.п.н.), независимо от их нуклеотидной последовательности (Koulintchenko et al., 2003). При исследовании особенностей импорта в митохондриях млекопитающих (культура клеток человека, печень крысы) было выявлено, что в них могут импортироваться также и одноцепочечные молекулы ДНК (Koulintchenko et al., 2006).

В дальнейших исследованиях (Ibrahim et al., 2011) было показано, что эффективность импорта линейных молекул ДНК имеет зависимость от длины молекул. В работе Ibrahim с соавторами использовали фрагменты ДНК от 1 до 12,4 т.п.н. Для инкубации с митохондриями картофеля было взято одинаковое количество молекул каждого фрагмента. Было выявлено, что эффективность импорта ДНК с увеличением длины молекул снижается, однако, для некоторых размерных классов, тестируемых в импорте фрагментов ДНК, в этой зависимости были обнаружены исключения. Например, фрагмент размером 6,4 т.п.н. импортировался эффективнее, чем 4,9 т.п.н., в то же время субстрат ДНК размером 12,4 т.п.н. (pBINPLUS) в этих экспериментах не детектировался в митохондриях (Ibrahim et al., 2011).

В работе Ibrahim с соавторами (2011) для экспериментов использовали два субстрата импорта сходной длины – митохондриальную плазмиду 11,6 т.п.н. из *Brassica napus/rapa* (рис. 8) и вектор pBINPLUS размером 12,4 т.п.н. Тестирование этих субстратов выявило, что изолированные митохондрии репы импортируют митохондриальную плазмиду 11,6 т.п.н., но не вектор pBINPLUS.



**Рисунок 8.** Линейная плазмида (11,6 т.п.н.) из митохондрий рапса и репы (*Brassica napus/rapa*). LTR и RTR – концевые инвертированные повторы, размером 327 п.н., dpo – ДНК-полимераза фагового типа, gro – РНК-полимераза фагового типа, orf1 – 4 – открытые рамки считывания. (Структура линейной плазмиды 11, 6 *Brassica napus/rapa* из работы Handa, 2008).

Транслокация полноразмерной плазмиды 11,6 т.п.н. происходила именно в митохондриальный матрикс, т. к. сходное количество этого субстрата детектировалось также и в митопластах. Дальнейшие исследования позволили установить, что некоторые структурные особенности митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н., а именно, наличие концевых инвертированных повторов (КИП) обеспечивают более эффективный импорт в растительные митохондрии. Таким образом, было сделано заключение, что с увеличением длины фрагментов ДНК импорт становится специфичным в отношении наличия в молекуле определенных структурных особенностей (КИП), и что, вероятно, могут существовать и какие-то другие мотивы в последовательности ДНК, которые будут способствовать большей эффективности транспорта ДНК в митохондрии (Ibrahim et al., 2011).

Тем не менее, это свойство КИП плазмидоподобных ДНК характерно, вероятно, только лишь для митохондрий растений, поскольку в изолированные митохондрии человека (клеточной линии HepG2) субстраты 10,9 т.п.н. (-КИП) и 11,6 т.п.н. (+КИП) импортировались примерно с одинаковой эффективностью, и зависимости от наличия или отсутствия КИП для них установлено не было (Ibrahim et al., 2011). Следует также отметить, что роль КИП, по всей видимости, важна лишь для субстратов относительно большой длины (>5 т.п.н.), поскольку для фрагментов ДНК с размерами 0,8 – 1,5 т.п.н. различий в эффективности

импорта ДНК в растительные митохондрии в зависимости от присутствия или отсутствия КИП плазмиды 11,6 т.п.н. обнаружено не было (Ibrahim et al., 2011). Данные исследования (Ibrahim et al., 2011) свидетельствуют о том, что импорт ДНК может зависеть также и от структурных особенностей ДНК, в частности от наличия в ее составе КИП митохондриальных плазмид, но эта особенность характерна лишь для молекул ДНК большого размера.

С учетом того, что, как показано в ряде исследований, транслокация ДНК и тРНК в митохондрии растений на уровне внешней мембраны происходит с участием порина, пути импорта нуклеиновых кислот, очевидно, могут пересекаться. С целью выявления возможных конкурентных взаимоотношений проводился анализ эффективности импорта ДНК в изолированные митохондрии растений в присутствии в среде инкубации молекул тРНК (Weber-Lotfi et al., 2015). Для экспериментов использовали тРНК<sup>Ala</sup> (в норме импортируется в митохондрии) и тРНК<sup>Met</sup> (не импортируется в митохондрии). В случае использования в качестве субстрата импорта фрагмента ДНК размером 0,27 т.п.н. был выявлен эффект стимуляции (до 200 %) импорта ДНК в присутствии в среде инкубации 0,5 – 2 молярного избытка любой из тестируемых тРНК, при этом 10-кратный избыток тРНК снижал эффективность импорта. На импорт субстрата большего размера (2,7 т.п.н.) присутствие в среде импорта молекул тРНК оказывало более сложное воздействие: при 1-молярном избытке присутствие тРНК снижало эффективность импорта данного фрагмента в 2 раза, при 2- и 10-молярном избытке происходила стимуляция процесса в 1,5 раза. Направленность обнаруженного эффекта (как стимуляция, так и торможение) обусловлена, скорее всего, связыванием тРНК с какими-то определенными белками на митохондриальной поверхности.

Исходя из данных, полученных в этой работе с использованием конкурентного ингибирования, следует, что механизм импорта малых фрагментов ДНК в митохондрии растений, по всей видимости, имеет определенные отличия по сравнению с импортом более длинных субстратов и, в отличие от последнего, может пересекаться с механизмом импорта тРНК (Weber-Lotfi et al., 2015).

## Выводы из литературного обзора

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов дает основания предполагать, что предки высших растений, вероятно, обладали сравнительно компактным митохондриальным геномом (Turmel et al., 2002). Согласно литературным данным, митохондриальный геном современных высших растений имеет значительно больший размер (200 т.п.н. – 11 м.п.н). Лишь 10 – 18% митохондриальной ДНК составляют гены, кодирующие белки или структурные РНК, при этом для половины и более последовательностей (50 – 90%) функции и происхождение остаются неизвестны (Kubo, Newton, 2008; Sloan et al., 2012). В настоящее время установлено, что горизонтальный перенос генов достаточно активно происходит в растительных митохондриях, причем частота этого процесса значительно выше по сравнению с другими органеллами высших эукариот (Mower et al., 2012). Вполне вероятно, что «избыточное» количество ДНК в митохондриальном геноме растений может быть связано со способностью этих органелл к поглощению и интеграции в свой геном чужеродных последовательностей ДНК.

Несмотря на то, что гипотеза о возможности замещения поврежденных или мутантных копий мтДНК посредством транспорта интактных молекул мтДНК была сформулирована достаточно давно (Zorov, 1996), особо значимых успехов в области создания технологий манипулирования мтДНК с целью направленной модификации генома этих органелл пока не было достигнуто ни для животных, ни для высших растений.

## Постановка цели и задачи

В последнее десятилетие было обнаружено, что во внеклеточных биологических жидкостях у всех исследованных организмов постоянно присутствуют циркулирующие нуклеиновые кислоты (Gahan, 2013; Gahan et al., 2008; Peters и Pretorius, 2011; Брызгунова и Лактионов, 2015). Для высших растений предполагают, что нуклеиновые кислоты во внеклеточной среде могут иметь как экзогенное (бактерии, вирусы, грибы, различные паразитические и эпифитные организмы), так и эндогенное происхождение. Причем в последнем случае нуклеиновые кислоты могут появляться в межклеточной среде как в результате разрушения клеток (апоптоз, некроз, элиминация ядерной ДНК в результате процесса дифференцировки клеток), так и, возможно, благодаря существованию специализированных механизмов секреции нуклеиновых кислот клетками (Gahan, 2013; Брызгунова, Лактионов, 2015).

Вполне логично предположить, что в горизонтальном переносе генов в митохондриальный геном растений определенную роль может играть природный механизм активного поглощения циркулирующей ДНК митохондриями (Koulintchenko et al., 2003).

Проводившиеся в последние годы исследования позволяют предположить, что эффективность и механизм импорта ДНК в изолированные митохондрии растений может зависеть от длины импортируемых молекул ДНК. Важно отметить, что в проводимых ранее исследованиях импорта ДНК в растительные митохондрии (Константинов и др, 1989; Koulintchenko et al., 2003) использовался ограниченный набор субстратов. В данной работе предпринята попытка охарактеризовать импорт ДНК разной длины, условно разбитых на группы субстратов малой (100 – 500 п.н.), средней (700 – 3000 п.н.) и большой длины (3700 – 6000 п.н.).

В пользу важности изучения импорта в митохондрии ДНК таких размерных классов в настоящее время свидетельствуют три группы фактов: (1) установленные методами геномики размеры вставок чужеродного происхождения в митохондриальный геном высших растений, варьирующие по размеру от 62 п.н. до 9106 п.н. и более (Goremykin et al., 2009); (2) размеры образующихся при

апоптозе (мультимеры на основе фрагмента 180 п.н.) фрагментов ДНК (Wyllie, 1980; Nagata et al., 2003), которые потенциально способны быть субстратами импорта ДНК в митохондрии; (3) наличие в митохондриях целого ряда высших растений видоспецифического набора кольцевых и линейных митохондриальных плазмид длиной от 750 п.н. до 13500 п.н. (Koulintchenko et al., 2012), которыми эти органеллы *in vivo* возможно способны обмениваться друг с другом.

Исходя из этого, **целью настоящей работы** было изучение мембранных механизмов транспорта ДНК различной длины в митохондрии картофеля (*Solanum tuberosum*).

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать метод определения активности импорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля на основе количественной мультиплексной ПЦР.
2. Исследовать возможность конкурентных взаимоотношений путей импорта ДНК разной длины в системе изолированных митохондрий картофеля.
3. Изучить активность транспорта ДНК малой, средней и большой длины в митохондрии в условиях, ингибирующих и/или модулирующих активность таких факторов импорта, как порин/VDAC и адениннуклеотидтранслоказа.
4. Исследовать возможное участие митохондриального мембранного переносчика адениновых нуклеотидов ADNT1 в импорте ДНК в митохондрии.
5. Изучить влияние микросомальной фракции, изолированной из клубней картофеля, на импорт ДНК в митохондрии.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1. Объект исследования**

Для экспериментов использовали модельное растение для изучения импорта нуклеиновых кислот в митохондрии *S. tuberosum*. Клубни картофеля – удобный источник для получения достаточного количества митохондрий. Схема экспериментов представлена на рисунке 9.

### **2.2. Методы исследования**

#### **2.2.1. Выделение митохондрий из клубней картофеля**

Выделение митохондрий из клубней картофеля осуществляли методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности перколла (Neuburger et al., 1982). Очищенные клубни картофеля гомогенизировали с использованием соковыжималочного аппарата (Moullinex, Франция). Полученный картофельный сок смешивали с 3х-кратным буфером [900 мМ сахара, 90 мМ пирогосфат натрия, 6 мМ ЭДТА, 0,9 % (в/о) БСА, 2,4 % (в/о) ПВП-25, 9 мМ цистеин, 15 мМ глицин, 6 мМ β-меркаптоэтанол, рН 7,5]. После фильтрации через нейлоновую и марлевую ткань полученный растительный экстракт подвергали двум циклам центрифугирования, при низкой скорости вращения (1500 x g), а далее при высокой (16000 x g), с промежуточным ресуспендированием митохондриального осадка с использованием гомогенизатора Поттера (стекло-тефлон) и среды промывания (СП) [300 мМ сахара, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, 0,1% (в/о) БСА, 5 мМ глицин, рН 7,5]. Для дальнейшей очистки митохондриальной фракции использовали градиент плотности перколла. Суспензию митохондрий наносили в центрифужные пробирки с буфером [30% (о/о) перколл, 300 мМ сахара, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, 0,1% (в/о) БСА, 5 мМ глицин, рН 7,5] и центрифугировали при 40000 x g в течение 60 минут. Митохондриальную фракцию отбирали из нижней части формирующегося градиента плотности перколла и затем дважды промывали СП. Концентрацию белка в финальной суспензии митохондрий определяли согласно

протоколу (Bradford, 1976) или спектрофотометрически при длине волны 210 и 420 нм (Noble J.E, Bailey M. J., 2009).

### **2.2.2. Оценка функционального состояния изолированных митохондрий**

Анализ функциональной активности изолированных митохондрий (30-50 мкг белка) и определение дыхательного контроля проводили полярографическим методом с использованием платинового кислородного электрода и ячейки Oxytherm system («Hansatech»). Коэффициент дыхательного контроля митохондрий определяли, измеряя скорость потребления кислорода по отношению его потребления в «активном состоянии» в присутствии АДФ (100-200 мкМ) к скорости в «пассивном состоянии» после истощения АДФ, используя в качестве субстрата дыхания сукцинат (10 мМ) и глутамат (5 мМ), в электродном буфере [0,3 М сахараза, 10 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% БСА] (Douce, 1985).

### **2.2.3. Обработка изолированных митохондрий трипсином**

Обработку митохондрий трипсином (50 мкг/мл) проводили в течение 10 мин на льду. После обработки в митохондриальную суспензию добавляли 500 мкл среды промывания (СП), содержащей дополнительно ингибитор трипсина из соевых бобов (1 мг/мл), и проводили инкубацию 12 мин на льду, затем митохондрии осаждали центрифугированием и дважды промывали СП.

### **2.2.4. Обработка изолированных митохондрий протеиназой К**

Обработку митохондрий протеиназой К (0,5 мкг/мкл) проводили в течение 15 мин на льду. После обработки митохондриальную суспензию разбавляли до 500 мкл средой промывания, дополнительно содержащей 1 мМ PMSF, проводили инкубацию 10 мин на льду, далее митохондрии осаждали центрифугированием и дважды промывали в СП.

## **2.2.5. Получение митопластов**

Для разрушения внешней мембраны митохондрий использовали осмотический шок. Осадок митохондрий ресуспендировали в 1 мл 5 мМ фосфата калия (рН 7,5) инкубировали на льду 1 мин, затем полученные митопласты осаждали центрифугированием и однократно промывали в буфере СП.

## **2.2.6. Амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции**

Для амплификации модельных фрагментов ДНК размером от 109 до 3000 п.н. использовали стандартную Taq-полимеразу (Thermo Scientific). Амплификацию проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя фермента, в финальном объеме реакционной смеси 25-50 мкл с 0,2 мМ смеси дНТФ, 10 пмоль каждого праймера и 10-100 нг плазмидной ДНК (табл. 4).

Амплификацию ДНК проводили в следующем температурном режиме: предварительная денатурация в течение 3 мин, при 94°C (1 цикл), денатурация при 94°C – 30 сек, отжиг праймеров при 50-55°C – 30 сек, элонгация при 72°C – 30 сек – 2 мин (35 циклов), финальная элонгация: 72°C – 5 мин.

Для амплификации ДНК размером 3700 – 6000 т.п.н. использовали набор реактивов и полимеразу Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific). Реакцию проводили в объеме 50 мкл с 100 нМ смеси дНТФ, 20 пмоль каждого праймера, 10 – 100 нг плазмидной ДНК и 2,5 ед. акт. полимеразы. Реакция амплификации включала следующие этапы: начальная денатурация при 94°C – 2 мин (1 цикл), [денатурация – 94°C – 30 сек, отжиг праймеров при 55°C – 45 сек, элонгация при 68°C – 4 мин (10 циклов) ], [денатурация: 94°C – 30 сек, отжиг праймеров: 58°C – 45 сек, элонгация: 68°C – 6 мин (10 циклов)], [денатурация: 94°C – 30 сек, отжиг праймеров: 60°C – 45 сек, элонгация: 68°C – 7 мин (10 циклов)], финальная элонгация: 68°C – 10 мин. Для получения субстратов импорта ДНК были использованы олигонуклеотиды, приведенные в таблице 4.

**Таблица 4. Используемые в работе олигонуклеотиды**

<b>Пары праймеров</b>	<b>Последовательность (5'→3')</b>	<b>Размер фрагмента, п.н. (ДНК-матрица для ПЦР)</b>
gfp(2)Rev gfp(2)For	CGGGGCATGGCACTCTTGA CTGTTCCCTTGGCCACACT	<b>109</b> (pCK/GFP/PRmt, pBsGFP)
gfpLc gfp(2)Rev	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACT CGGGGCATGGCACTCTTGA	<b>269</b> (pCK/GFP/PRmt, pBsGFP)
gfp(2)Rev M13-For	CGGGGCATGGCACTCTTGA CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	<b>350</b> (pBsGFP)
gfp(2)For gfpR100	CTGTTCCCTTGGCCACACT TGTGGACAGGTAATGGTTGTCTGGT	<b>449</b> (pCK/GFP/PRmt, pBsGFP)
gfp(2)For gfpR400	CTGTTCCCTTGGCCACACT ACTCAAGAAGGATCATGTGATCTCTC	<b>507</b> (pCK/GFP/PRmt, pBsGFP)
gfpLc gfpR400	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACT ACTCAAGAAGGATCATGTGATCTCTC	<b>667</b> (pCK/GFP/PRmt, pBsGFP)
gfpLc gfpRc	ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACT TTATTTGTATAGTTCATCCATGCCAT	<b>717</b> (pCK/GFP/PRmt, pBsGFP)
gfp(2)For 2,3(2989) Rev	<b>Cy3</b> -CTGTTCCCTTGGCCACACT <b>Cy3</b> -ACGCTCTGTAGGATTTGAACC	<b>850</b> (pCK/GFP/PRmt)
M13-Rev M13-For	AGCGGATAACAATTTACACAC CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	<b>1000</b> (pBsGFP)
2,3ORF-1105 gfpR400	AGGGTAGCGTCCATGATGCT ACTCAAGAAGGATCATGTGATCTCTC	<b>1540</b> (pCK/GFP/PRmt)
M13-Rev M13-RevRev	AGCGGATAACAATTTACACAC GTGTGAAATTGTTATCCGCT	<b>3700</b> (pBsGFP)
M13-Rev M13-RevRev	AGCGGATAACAATTTACACAC GTGTGAAATTGTTATCCGCT	<b>6000</b> (pCK/GFP/PRmt)

Продукты амплификации анализировали в 1% агарозном геле, как описано в разделе 2.3.17, с последующей очисткой, с использованием наборов QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) или GeneJET<sup>TM</sup> PCR Purification Kit (Thermo Scientific), согласно протоколу и рекомендациям производителей.

### **2.2.7. Радиоактивно меченые олигонуклеотиды, использованные для импорта в митохондрии**

Радиоактивную метку [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] АТФ (Биоссет, Новосибирск, Россия) вводили в олигонуклеотиды (0,5 – 0,7 о. е.) с помощью T4-полинуклеотидкиназы 15 ед. акт. (Fermentas), инкубировали 60 минут при 37°C.

### **2.2.8. Очистка олигонуклеотидов из полиакриламидного геля с помощью метода электроэлюции**

Очистку радиоактивно меченых олигонуклеотидов от продуктов реакции проводили с использованием метода электроэлюции из полиакриламидного геля на ДЕАЕ-целлюлозу в буфере 1/20 ТБЕ в течение 60 минут при напряжении 200 В. Затем олигонуклеотиды элюировали раствором 3 М перхлората лития. Осаждали 10 объемами ацетона с 2% перхлоратом лития с последующим центрифугированием при 14000 x g 10 минут. Полученный осадок промывали ацетоном, высушивали и растворяли в воде.

### **2.2.9. Получение радиоактивно меченых субстратов для импорта ДНК в митохондрии**

Для получения радиоактивно меченых субстратов импорта проводили один цикл ПЦР, включавший этап элонгации в течение 15 мин, в объеме реакционной смеси 50 мкл, содержащей 100 мкКи [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]дЦТФ (3000 Ки/ммоль), 2,5 ед. акт. полимеразы Expand High Fidelity polymerase (ROCHE) и соответствующих праймеров (без «холодного» дЦТФ), в качестве матрицы использовали 50 нг немеченой ДНК. Далее проводили финальную элонгацию в течение 5 мин с добавлением 0,2 mM «холодного» дЦТФ. По окончании реакции не включившийся в синтез [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]дЦТФ удаляли посредством гель-фильтрации через колонку с Sepharose G-50.

### **2.2.10. Получение флуоресцентно меченых субстратов ДНК для импорта в митохондрии**

Флуоресцентно меченый фрагмент ДНК размером 850 п.н. получали с помощью ПЦР (раздел 2.2.6.), в качестве праймеров использовали 2 олигонуклеотида, содержащих на 5'-конце флуоресцирующую группу (Су3) (табл. 4).

### **2.2.11. Импорт ДНК в митохондрии**

Импорт ДНК в митохондрии проводили согласно описанному ранее протоколу (Koulintchenko et al., 2003). Суспензию митохондрий (200 мкг белка в одной пробе) готовили в 20 мкл буфера импорта, содержащего 0,4 М сахарозы, 40 мМ фосфата калия, рН 7,0. В среду инкубации к митохондриям добавляли определенное количество (5 – 250 мкг/мл) молекул ДНК. Инкубацию митохондрий с ДНК проводили в стандартных условиях (термостатируемый шейкер) при температуре 25°C и постоянном мягком покачивании (350 rpm) в течение 40 мин. После инкубации митохондрии отмывали от избытка ДНК в среде инкубации. Для этого добавляли 1 мл среды промывания [300 мМ сахароза, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, 0,1% (в/о) БСА, 5 мМ глицин, рН 7,5] с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 11000 об/мин, снова ресуспендировали в исходном объеме буфера импорта (20 мкл) и добавляли ДНКазу I (1 ед. акт./проба) (Thermo Scientific) и хлорид магния до конечной концентрации 10 мМ. ДНКазную обработку проводили в течение 20 мин при 25°C, затем дважды промывали СП, дополнительно содержащей 10 мМ ЭДТА и 10 мМ ЭГТА.

### **2.2.12. Импорт олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН) в изолированные митохондрии картофеля**

Для получения ОДН с AP-сайтами ОДН (GGCGGAUTTTATCGTAGTCG, 0,5 о.е.), обрабатывали 2 – 3 ед. активности урацил-ДНК-гликозилазы (Fermentas) при

37°C в течение 60 минут, осаждали и растворяли в исходном количестве воды, измеряли концентрацию ОДН.

Для импорта в изолированные митохондрии использовали ОДН, содержащие AP-сайт (одноцепочечные или двуцепочечные олигонуклеотиды). После импорта ОДН в изолированные митохондрии в течение 60 минут и отмывок митохондрии ресуспендировали в 20 мкл буфера импорта, затем для восстановления ковалентной связи ДНК-белок проводили обработку боргидратом натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) до конечной концентрации 0,4 мг/мл, инкубировали 10 минут. Затем снова отмывали дважды СП.

Далее проводили электрофоретическое разделение ДНК-белковых комплексов в 10 – 20% ПААГ с последующим анализом эффективности связывания ОДН с митохондриальными белками (пункт 2.3.18).

### **2.2.13. Фенольная экстракция нуклеиновых кислот из митохондрий**

Экстракцию митохондриальной ДНК проводили с использованием буфера [10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, 1 % (в/о) SDS, pH 7,5] и равного объёма фенола. Нуклеиновые кислоты, содержащиеся после центрифугирования в водной фазе, осаждали этанолом. После центрифугирования осадок растворяли в воде и разделяли электрофоретически в 1 % (в/о) агарозном геле, с последующим переносом на нейлоновую мембрану (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences) в растворе 0,4 M NaOH. Для апуринизации ДНК перед переносом гель инкубировали в 0,25 M HCl в течение 15 мин, а затем в 0,4 M NaOH, в течение 30 мин. Для анализа эффективности импорта ДНК полученные мембраны использовали для радиоавтографии, экспонируя их с рентгеновской пленкой (Fuji X-Ray Film).

### **2.2.14. Экстракция митохондриальной ДНК с использованием метода термообработки митохондрий**

Экстракцию ДНК из митохондрий для ПЦР-РВ анализа проводили с использованием метода термообработки. Полученные осадки митохондрий ресуспендировали в 5 мкл буфера [1% NP-40, 25 мкM EDTA, протеиназа K (0,03

мкг/мкл)]. Инкубировали пробы 12 мин при 55°C, после этого добавляли 45 мкл воды и прогревали при 98°C в течение 10 минут. Затем осаждали центрифугированием при 14000 g в течение 20 мин и отбирали супернатант. Эффективность транспорта ДНК в митохондриях оценивали при помощи метода ПЦР-РВ.

### **2.2.15. Анализ эффективности импорта с использованием ПЦР в реальном времени**

Активность транспорта ДНК в митохондриях определяли методом количественной ПЦР (ПЦР-РВ) с использованием TaqMan-зондов. Для дизайна праймеров и зондов использовали программное обеспечение PrimerExpress (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов («Синтол», «Евроген», Россия) представлены в таблице 5.

Реакцию проводили в объеме 15 мкл. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 1,5 мкл 10× буфера для Taq-полимеразы (650 mM трис-HCl, pH 8,8, 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5% Tween 20), 1,5 мкл каждого из четырех дНТФ (10 mM), MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 6 mM, 1 ед. акт. Taq-полимеразы (Thermo Scientific), праймеры до конечной концентрации 0,6 мкМ, зонд до конечной концентрации 0,3 мкМ, 2,5 мкл раствора ДНК. Амплификацию проводили в следующем режиме: 95°C – 4,5 мин, 1 цикл; 95°C – 15 сек, 59°C – 15 сек, 40 циклов на CFX96 или iCycler5 (Bio-Rad).

Для построения калибровочных графиков использовали препараты ДНК рекомбинантных плазмид, содержащих соответствующую вставку (ампликоны gfp, cox2, LINE1) или ампликоны, очищенные элюцией из геля. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad) по оптической плотности  $A_{260}$ . Чистоту препарата оценивали по соотношению  $A_{260}/A_{280}$ .

Данные анализировали с помощью программного обеспечения CFX 96 или iQ5 (Bio-Rad). Все измерения проводили в двух-трех повторностях. Количество *GFP* нормализовали на количество митохондриального маркерного гена (*COX2*).

Для всех использованных праймеров эффективность амплификации составляла более 98 %.

**Таблица 5. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресценных зондов**

Олигонуклеотид		Нуклеотидная последовательность
<i>COX2</i>	Rev	5'-AGCCTGCAATGTCCGATAAC-3'
	For	5'-ACCATTCGGAAGGTTACTG-3'
	Проба	FAM~5'-TGGTATACAACCTTTGGACCTAACAGCCGGC-3'~FQ
<i>GFP(2)</i>	Rev	5'-CGGGGCATGGCACTCTTGA-3'
	For	5'-CTGTTCCCTTGGCCACACT-3'
	Проба	Cy5~5'-TGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGA-3'~BHQ2
<b>LINE-element</b>	Rev	5'-TTGTAGGTCACCTCAGGACTTGC-3'
	For	5'-TTCAACAAGAAGAGCTAACTATCC-3'
	Проба	((5,6)-Tamra)-5'-TGCACCCAATACAGGAGCACCCAGATTCA-3'-BHQ2

### 2.2.16. Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли из бактериальных клеток *E.coli*, используя наборы QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) или GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), согласно рекомендациям фирмы-изготовителя.

### **2.2.17. Электрофоретический анализ ДНК**

Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в горизонтальной камере в 1 % агарозном геле, содержащем 0,005 – 0,05 мкг/мл бромистого этидия, с использованием буфера ТАЕ. По окончании электрофореза осуществляли анализ и документирование с помощью прибора Gel Doc XR System (Bio-Rad).

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК размером менее 100 п.н. или ОДН осуществляли в 16 – 20 % ПААГ (20:1) с 8 М мочевиной в буфере ТБЕ в вертикальной камере.

### **2.2.18. Электрофоретический анализ ОДН-связывающих белков**

Анализ ДНК-белковых комплексов осуществляли с помощью метода SDS-DISC-электрофореза. Для заливки геля использовали набор стекол размером 10x12 см, прокладки толщиной 1,3 мм, прибор для формирования градиентного геля и перистальтический насос. Для приготовления растворов с различной концентрацией акриламида использовали 30 % раствор акриламида и N,N-метиленбисакриламида (30:1).

20 % разделяющий гель [0,375 М трис-НСl (рН 8,8); 0,1 % SDS; 0,001 % ТЕМЕД и 0,06 % персульфата аммония];

10 % разделяющий гель [0,375 М трис-НСl (рН 8,8); 0,1 % SDS; 0,001 % ТЕМЕД и 0,06 % персульфата аммония];

4,5 % концентрирующий гель [0,125 М трис-НСl (рН 6,8); 0,1 % SDS; 0,001 % ТЕМЕД; 0,06 % персульфата аммония];

Буфер нанесения [20% β-меркаптоэтанол; 0,125 М трис-НСl (рН 6,8); 5% глицерин; 1% SDS; 0,01% бромфеноловый синий].

Трис-глициновый буфер [25 мМ трис-НСl, 0, 1% SDS, 192 мМ глицин].

Образцы перед нанесением прогревали в термостате при 98°C в течение 10 минут. Электрофорез проводили при 70 В в течение 30 мин, затем при 250 В в течение 2,5 ч в трис-глициновом буфере. После окончания электрофореза гель сушили при 70°C под вакуумом с последующей радиоавтографией.

### **2.2.19. Статистическая обработка данных**

Все эксперименты проводились не менее чем в трех независимых повторностях. Статистическую обработку осуществляли с помощью программы SigmaPlot 12.5. Полученные данные представлены в виде средней арифметической  $\pm$  стандартное отклонение. С использованием критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk) оценивали нормальность распределения. Для доказательства наличия значимых различий между средними проводили анализ с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### **2.2.20. Анализ ДНК-связывающих свойств белков**

Анализ ДНК-связывающих свойств белков проводили с использованием биоинформатической программы BindN software (<http://bioinformatics.ksu.edu/bindn/>).

## **2.3. Материалы**

В работе были использованы следующие реактивы: перколл (GE Healthcare), БСА, ЭГТА (Amresco), поливинилпирролидон (ПВП-25) (Fluka), пирофосфат натрия, цистеин, акриламид, N,N- метиленбисакриламид, TEMED (N,N,N,N - тетраметилэтилендиамин), надсерноокислый аммоний, трипсин, ингибитор трипсина из соевых бобов, рутений красный, карбоксиатрактилозид, танниновая кислота, пиридоксаль-5-фосфат, Nonidet P-40, реактив Бредфорда, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), перхлорат лития (Sigma), ЭДТА, глицин, хлорид калия, фосфаты калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), сахароза, агароза для электрофореза,  $\beta$ -меркаптоэтанол, фенол (Helicon), протеиназа К (СибЭнзим), атрактилозид («Calbiochem»), Taq-полимераза, Long PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Анализ импорта ДНК в изолированные митохондрии

##### 3.1.1. Разработка метода анализа импорта ДНК в изолированные митохондрии с помощью ПЦР-РВ

Как уже упоминалось выше (глава литературного обзора 1.3.4.), сотрудниками нашей лаборатории была разработана модельная система *in organello*, позволяющая изучать механизм транслокации ДНК («импорта ДНК») в изолированные митохондрии (Koulintchenko et al., 2003). Можно отметить, что подобные модельные системы используют также и для изучения механизма импорта белков и тРНК (Duncan et al., 2015; Michaud, Duchêne, 2012).

Эксперименты по импорту ДНК в митохондрии растений в данной работе проводились согласно схеме, представленной на рисунке 9.

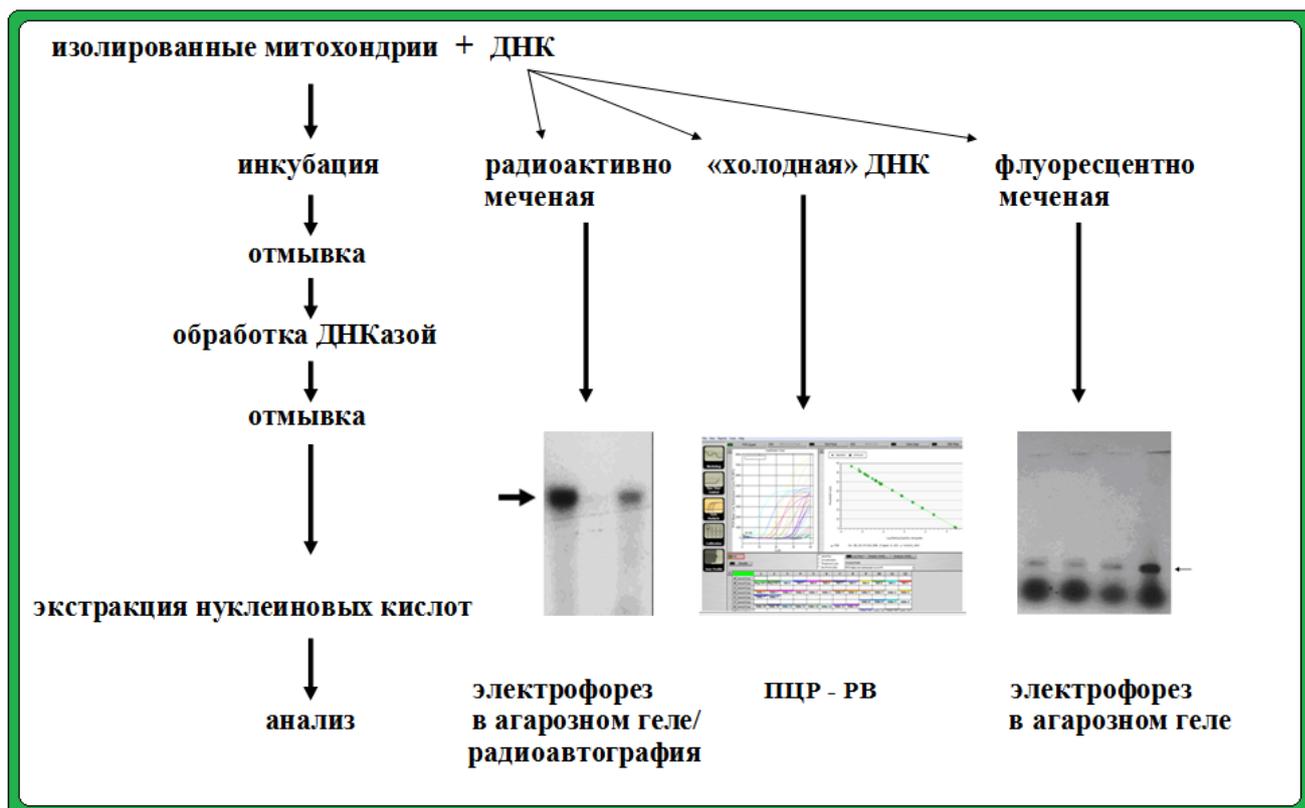


Рисунок 9. Схема экспериментов по импорту ДНК в митохондрии. На рисунке представлены три способа анализа эффективности импорта ДНК в изолированные митохондрии растений с использованием радиоактивно и флуоресцентно меченых субстратов импорта ДНК, а также метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Для экспериментов использовали функциональные митохондрии, изолированные из клубней картофеля (*S. tuberosum*). Инкубацию ДНК с митохондриями проводили в стандартных условиях (см. раздел 2.3.11. Материалы и методы) согласно протоколу, описанному в (Koulintchenko et al, 2003), с некоторыми модификациями: перед обработкой ДНКазой проводилась дополнительная отмывка митохондрий, позволяющая удалить не импортированную в митохондрии ДНК. После транслокации в митохондриальный матрикс ДНК становится устойчива к обработке ДНКазой.

Ранее эксперименты по импорту в митохондрии проводили в основном с использованием [<sup>32</sup>P]-радиоактивно меченых субстратов ДНК. После инкубации радиоактивно меченой ДНК с митохондриями и последующих обработок экстрагированную митохондриальную ДНК разделяли электрофоретически в агарозном геле и переносили на нейлоновую мембрану для последующей экспозиции с рентгеновской пленкой. Анализ импорта ДНК с помощью радиоавтографии позволяет визуализировать полноразмерные молекулы импортированной ДНК, качественно и с высокой чувствительностью оценить влияние тех или иных эффекторов на импорт ДНК. Тем не менее, проведение экспериментов с использованием радиоактивных изотопов имеет ряд недостатков. В частности, радиоактивность может быть опасна для здоровья, труднодоступной для заказа, требует для работы с ней специальных, лицензируемых условий. Помимо этого, период полураспада радиоактивного изотопа <sup>32</sup>P составляет всего 14 дней, поэтому субстраты необходимо метить регулярно каждые 1-2 недели.

В данной работе для изучения процесса импорта ДНК в изолированные митохондрии впервые был применен метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Экстрагированную после инкубации с модельными фрагментами ДНК анализируют в двух или трех повторностях в присутствии двух пар праймеров и флуоресцентных зондов, специфичных для генов *GFP* (GenBank: U73901.1) и *COX2* из митохондриального генома картофеля (GenBank: DQ185064.1). Для этих двух генов нами были оптимизированы условия проведения мультиплексной ПЦР-РВ. Параллельный анализ уровней амплификации *GFP* и

митохондриального гена *COX2* позволяет оценить в каждом образце количество, как импортированной ДНК, так и общей мтДНК и затем провести нормирование. Следует отметить следующие преимущества данного метода. Метод ПЦР-РВ позволяет (1) увеличить скорость анализа образцов, (2) использовать большое количество субстратов импорта ДНК, получаемых в результате стандартной реакции ПЦР, (3) проводить количественную оценку влияния на процесс разных агентов и ингибиторов, (4) изучать его кинетические характеристики. Таким образом, данный подход может быть использован в исследованиях механизма транспорта ДНК.

Для выделения тотальной ДНК из митохондрий с целью последующего анализа эффективности импорта ранее использовали метод фенольной экстракции. Однако этот метод не всегда удобен для работы с большим количеством образцов и может иметь низкую воспроизводимость, поэтому мы разработали метод выделения ДНК из митохондрий с использованием их термообработки (см. раздел 2.3.14. Материалы и Методы). Такой способ пробоподготовки повышает выход ДНК на 30 – 40% по сравнению с фенольным методом, увеличивает скорость анализа, и, как показали последующие эксперименты, экстрагированная таким образом ДНК не содержит примесей, ингибирующих ПЦР-РВ.

### **3.1.2. Субстраты ДНК для изучения специфичности импорта в митохондрии с помощью ПЦР-РВ**

Ранее было выявлено, что в митохондрии растений наиболее эффективно импортируются линейные двуцепочечные молекулы ДНК сравнительно небольшого размера (в пределах нескольких т.п.н.), независимо от их нуклеотидной последовательности (Koulintchenko et al., 2003). Поэтому в качестве модельных субстратов импорта использовали амплифицированные с помощью ПЦР фрагменты ДНК различной длины, от 109 до 6000 п.н., не содержащие концевые инвертированные повторы (КИП), характерные для митохондриальных линейных плазмид. Для амплификации использовали

генетические конструкции pCK/GFP/PRmt или pBsGFP (см. раздел 2.2.6.). Все субстраты импорта содержали фрагмент гена *GFP* (109 п.н.), что позволяло проводить их детекцию в митохондриях с помощью ПЦР.

Все использовавшиеся в данной работе субстраты импорта условно разделили на три размерных класса: малые (100 – 500 п.н.), средние (700 – 3000 п.н.) и большие (3700 – 6000 п.н.) фрагменты ДНК.

Помимо количественного метода анализа в работе также была предпринята попытка использовать флуоресцентно меченые молекулы ДНК в качестве субстратов импорта. Флуоресцентно меченые субстраты получали с помощью ПЦР, в качестве праймеров использовали два олигонуклеотида, содержащие на 5'-конце флуоресцирующую группу (Cy3). Некоторые эксперименты в данной работе были проведены с использованием флуоресцентно меченых молекул ДНК, что позволяет сделать вывод о потенциальной возможности использования флуоресцентно меченых субстратов для дальнейших исследований механизма транспорта ДНК в митохондрии.

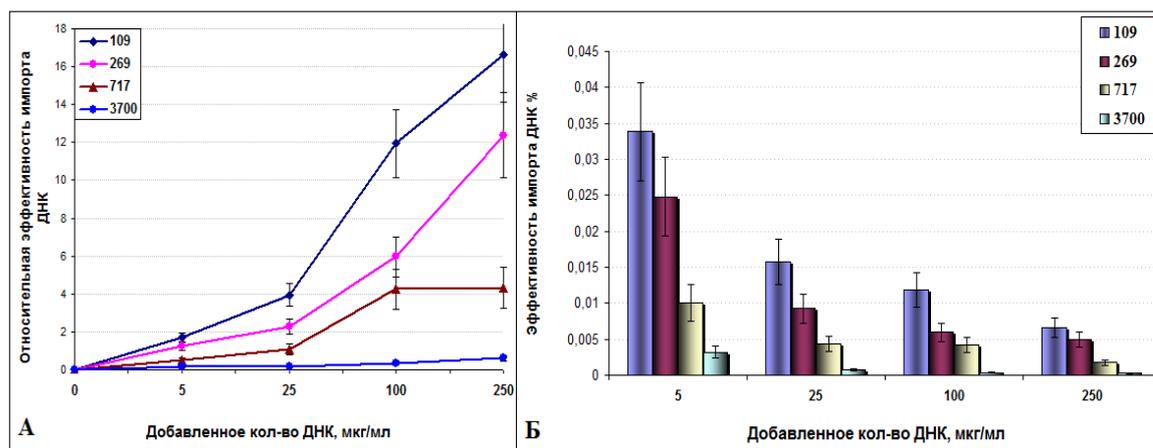
### **3.2. Характеристика особенностей импорта ДНК малой, средней и большой длины в изолированные митохондрии растений**

В ходе проводившихся в последнее время исследований предположено, что механизм и эффективность импорта ДНК в изолированные митохондрии растений, вероятно, отличаются в зависимости от длины и структуры импортируемых молекул ДНК (Weber-Lotfi et al., 2015).

Для исследования количественных характеристик импорта мы использовали фрагменты ДНК: 109, 269, 717 и 3700 п.н. Для инкубации с изолированными митохондриями ДНК брали в количестве от 5 до 250 мкг/мл, время инкубации ДНК с митохондриями составляло 40 минут. Анализ проводили с использованием метода количественной ПЦР.

Исходя из полученных в экспериментах данных (рис. 10 А), видно, что при использованных концентрациях ДНК малых фрагментов (длиной 109 – 269 п.н.)

не происходило насыщения процесса импорта. Процесс импорта малых фрагментов ДНК в изолированные митохондрии картофеля характеризовался практически линейной зависимостью увеличения количества поглощенных молекул ДНК от количества присутствующих в среде инкубации. Для молекул ДНК средней длины (717 п.н.) насыщение процесса импорта происходило при концентрации ДНК в среде инкубации выше 100 мкг/мл ( $\leq 0,22$  рМ).



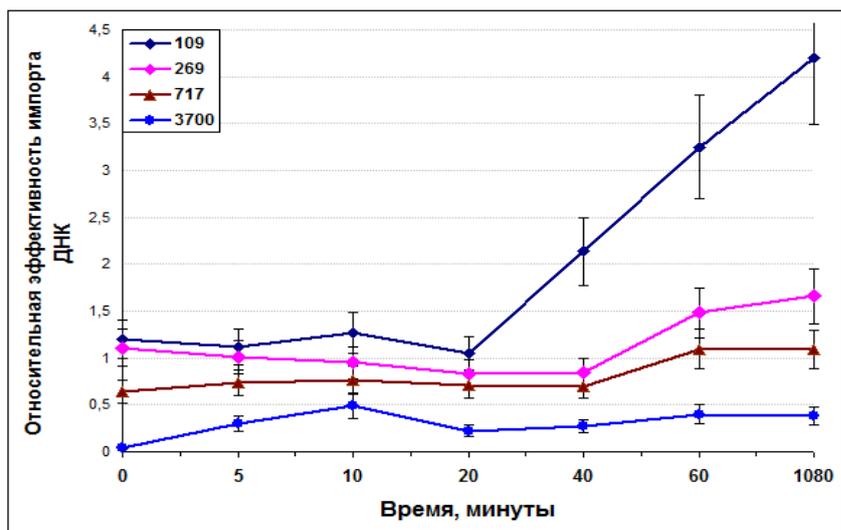
**Рисунок 10. Концентрационная зависимость митохондриального импорта ДНК разной длины. (А)** Зависимость эффективности импорта от концентрации ДНК в среде инкубации (в мкг/мл); **(Б)** Зависимость эффективности импорта ДНК от количества молекул, добавленных в среду инкубации с митохондриями (в процентах от общего количества ДНК в среде инкубации). Импорт ДНК разной длины проводили в изолированные митохондрии *S. tuberosum*. Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. На графиках указаны размеры импортируемых молекул ДНК. Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Оценивая эффективность импорта, т.е. процент импортированных молекул от общего количества ДНК, добавленного к митохондриям, можно отметить, что с увеличением длины субстрата эффективность импорта снижается (рис. 10 Б). Эффективность импорта малого фрагмента длиной 109 п.н. при концентрации ДНК в среде инкубации 5 мкг/мл в среднем составляла более 0,03 %, однако с увеличением длины молекул ДНК эффективность снижалась: для фрагмента 269 п.н. она составляла 0,025 %, для 717 п.н. – 0,01 %, для 3700 п.н. – менее 0,005 %.

В целом, наши результаты подтверждают данные, полученные ранее с использованием радиоактивно меченых субстратов импорта ДНК (Koulintchenko et al., 2003; Ibrahim et al., 2011) о том, что эффективность импорта с увеличением длины фрагмента ДНК снижается. Следует также отметить, что с увеличением концентрации ДНК в среде инкубации эффективность митохондриального импорта снижается для субстратов импорта ДНК всех тестируемых длин (рис. 10 Б). По всей вероятности, избыток молекул ДНК в среде инкубации снижает эффективность импорта, поскольку возникает конкуренция за ДНК-связывающие сайты белков-переносчиков, количественное содержание которых является лимитирующим фактором протекания процесса транспорта ДНК в митохондрии. Так, например, для фрагмента длиной 109 п.н., в случае использования для инкубации с митохондриями 5 мкг/мл ДНК, эффективность импорта составляла более 0,03 %, а в случае 250 мкг/мл – менее 0,005 %. Сходная тенденция уменьшения эффективности импорта с увеличением концентрации ДНК в среде инкубации наблюдалась для всех тестируемых в данных экспериментах фрагментов ДНК.

Для исследования кинетических характеристик процесса импорта мы использовали фрагменты ДНК, размер которых составлял от 109 до 3700 п.н. В среду инкубации к изолированным митохондриям картофеля добавляли определенное количество ДНК (25 мкг/мл, что составляло примерно 0,014 – 0,14 пМ/мкл в зависимости от размера импортируемой молекулы). Затем отбирали аликвоты в определенные временные интервалы от 5 до 1080 минут (в течение ночи). Анализ зависимости импорта от времени соинкубации ДНК и изолированных митохондрий картофеля выявил характерные особенности процесса транспорта малых фрагментов ДНК. Так, например, для фрагмента 109 п.н. с увеличением времени инкубации насыщения процесса импорта не происходит, но, в то же время, для пары фрагментов ДНК, длина которых составляет 717 – 3700 п.н., наблюдается выход на плато примерно после 60 минут, и дальнейшая инкубация не приводит к значительному повышению количества ДНК, импортированной в митохондрии (рис. 11). Ранее было обнаружено, что

количество импортированной радиоактивно меченой плазмиды 2,3 т.п.н. увеличивается с течением времени и выходит на плато примерно после 30 мин инкубации изолированных митохондрий с ДНК (Koulintchenko et al., 2003). В экспериментах также выявлено, что импорт ДНК сравнительно небольшой длины (от 109 до 717 п.н.) в митохондрии происходит относительно быстро, в первые минуты инкубации изолированных митохондрий с молекулами ДНК.



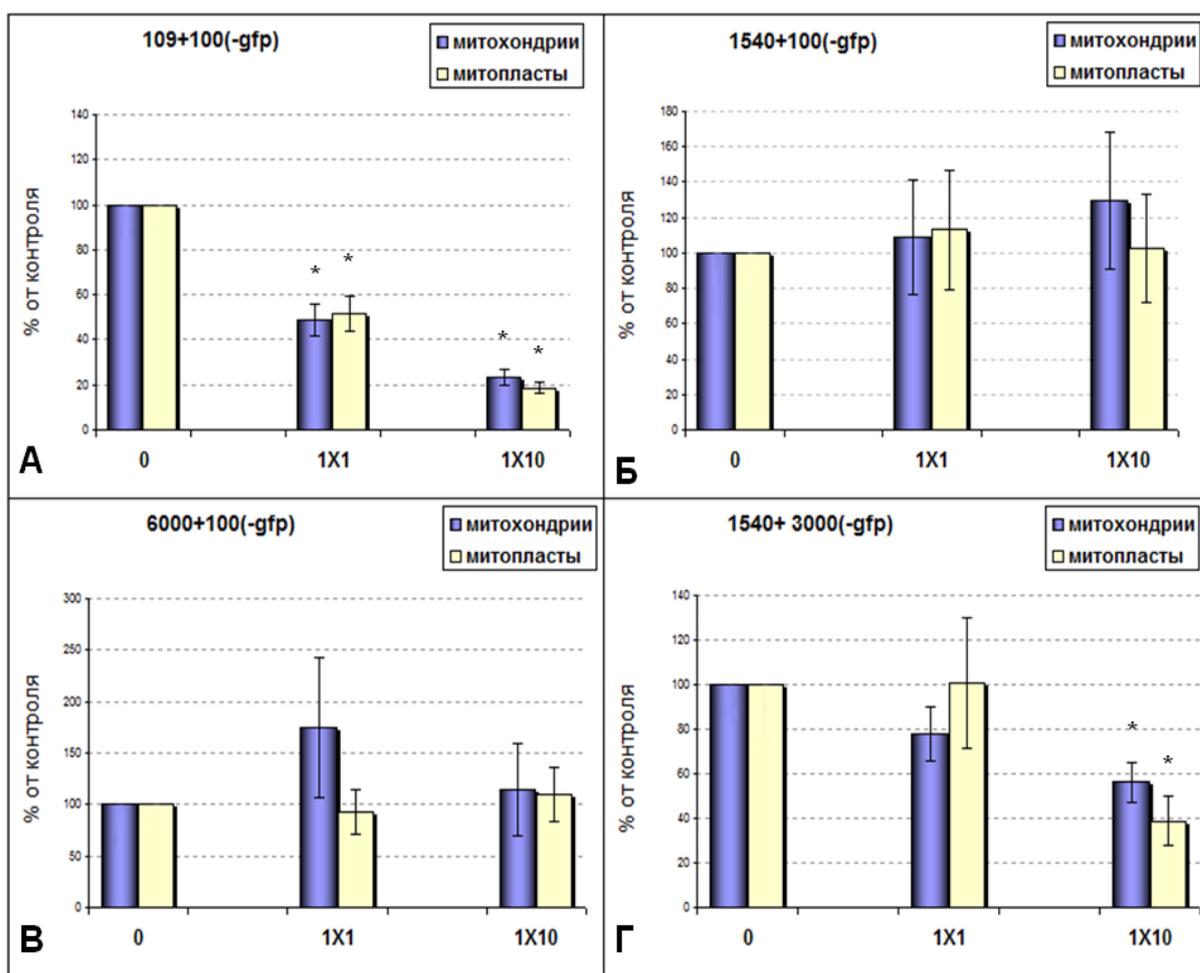
**Рисунок 11. Кинетическая зависимость эффективности импорта в изолированные растительные митохондрии от длины импортируемых молекул ДНК.** Импорт ДНК разной длины проводили в изолированные митохондрии *S. tuberosum*. Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. Концентрация ДНК в среде инкубации - 25 мкг/мл. На графиках указаны размеры импортируемых молекул ДНК. Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

### 3.2.1. Конкурентные взаимоотношения в импорте ДНК малой, средней и большой длины

В разделе 3.2. данной работы было показано, что избыток ДНК в среде инкубации может снижать эффективность импорта (рис. 10 Б). Транспорт молекул в клетки и клеточные органеллы носит насыщаемый характер обычно в том случае, если он опосредован специфическими переносчиками, количество которых является лимитирующим фактором. Известно, что ингибирование транспорта ДНК веществами полианионной природы может быть связано с тем,

что, вероятно, любые полианионы конкурируют за сайты связывания мембранных переносчиков, осуществляющих перенос нуклеиновых кислот через биологические мембраны (Konstantinov et al., 1988).

Поскольку, как уже упоминалось выше, количественный анализ с использованием метода ПЦР-РВ основывался на детекции ампликона *GFP* длиной 109 п.н., это давало возможность использовать любые молекулы ДНК, не содержащие этот фрагмент гена *GFP*, в качестве конкурентной ДНК. Для изучения возможных конкурентных взаимоотношений в процессе импорта ДНК разных размерных классов в растительные митохондрии мы проводили импорт ДНК в обычных условиях, либо в присутствии молекул конкурентной ДНК. Для экспериментов использовали фрагменты ДНК размером 109 п.н., 1540 п.н. и 6000 п.н., содержащие фрагмент гена *GFP*. Помимо этих фрагментов в среду инкубации также добавляли молекулы ДНК длиной 100 п.н. или 3000 п.н., (без *GFP*), взятые в равной концентрации (25 мкг/мл) или в 10-кратном избытке (250 мкг/мл) (рис. 12). В качестве конкурентной ДНК использовали фрагменты плазмиды pBluescript II KS (+), амплифицированные с помощью ПЦР.



**Рисунок 12.** Характеристика конкурентных взаимоотношений импорта ДНК малой, средней и большой длины в митохондриях *S. tuberosum*. Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. Для импорта использовали субстраты ДНК, содержащие фрагмент гена *GFP*: 109 п.н. (А), 1540 п.н. (Б и Г), 6000 п.н. (В). Для конкурентного ингибирования использовали фрагменты с длиной 100, 3000 п.н. (на рисунке обозначены как [-*GFP*]). Эффективность импорта одного фрагмента с *GFP* в митохондриях (контроль) принята за сто процентов. Варианты импорта: 0 (контроль) – импорт одного фрагмента с *GFP* (концентрация 25 нг/мкл); 1x1 – импорт двух субстратов с *GFP* и без *GFP*, взятых в равных концентрациях (25 мкг/мл); 1x10 – импорт субстрата с *GFP* в присутствии конкурентной ДНК, взятой в концентрации 250 мкг/мл. Митопласты были получены после импорта ДНК в митохондриях и обработки их ДНКазой. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Анализ активности импорта в интактных митохондриях (у которых присутствуют обе, внешняя и внутренняя митохондриальные мембраны) позволяет детектировать всю, в том числе связанную с митохондриальными

мембранными белками и находящуюся в межмембранном пространстве, ДНК. Параллельно в данных экспериментах также проводили анализ эффективности импорта ДНК в митохондриях. После импорта и ДНКазной обработки внешнюю митохондриальную мембрану разрушали посредством осмотического шока, что позволяло определить количество ДНК, импортированной в митохондриальный матрикс.

Были получены следующие результаты:

- (1) Эффективность импорта ДНК малого фрагмента 109 п.н. (25 мкг/мл) в присутствии в среде инкубации 10-кратного избытка (250 мкг/мл) конкурентной ДНК малого размера (100 п.н.) была существенно снижена по сравнению с контролем, причем, как в митохондриях, так и в митохондриях (рис. 12 А).
- (2) Наличие в среде инкубации конкурентной ДНК малой длины (25 – 250 мкг/мл) не приводит к снижению эффективности процесса импорта тестируемых фрагментов средней (1540 п.н.) и большой длины (6000 п.н.) в митохондриальный матрикс (митохондриях) (рис. 12 Б и В).
- (3) Для фрагментов ДНК длиной 1540 п.н. присутствие в среде инкубации конкурентной ДНК близкого размерного класса (3000 п.н.) в количестве 25 – 250 мкг/мл способствовало снижению эффективности импорта фрагмента 1540 п.н. как в митохондриях, так и в митохондриях (рис. 12 Г).

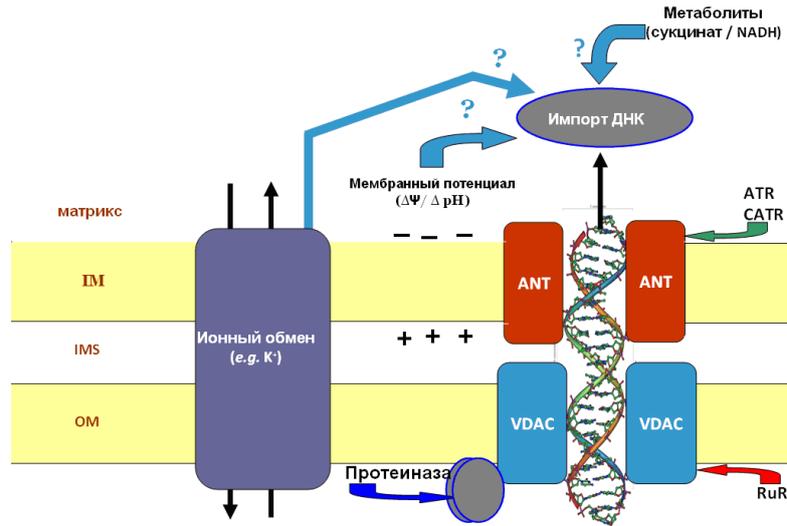
Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ДНК малой и средней длины импортируется в митохондриях частично перекрывающимися, но не совпадающими полностью путями. Не исключено, что импорт в митохондриях ДНК малой длины (100 п.н.) может эффективно осуществляться с участием ряда альтернативных белковых переносчиков и/или мембранных каналов.

В данных экспериментах было обнаружено, что присутствие в среде инкубации конкурентной ДНК малой длины (100 п.н.) может усиливать эффективность связывания более длинных молекул ДНК (1540 п.н. и 6000 п.н.) с белками внешней мембраны. Как уже упоминалось выше (глава 1.3.4.), в работе Weber-Lotfi с соавторами (2015) было обнаружено, что стимулирующее действие

на импорт ДНК могут оказывать некоторые концентрации тРНК (Weber-Lotfi et al., 2015). Как известно, пути транслокации тРНК и ДНК в митохондрии растений могут пересекаться, и на уровне внешней мембраны происходят с участием порина. Исходя из результатов, представленных в работе (Weber-Lotfi et al., 2015), а также в данных экспериментах с использованием конкурентного ингибирования, следует, что механизм импорта малых фрагментов ДНК, по всей вероятности, имеет определенные отличия по сравнению с импортом более длинных субстратов.

### **3.2.2. Роль поверхностных белков митохондриальной мембраны в механизме импорта ДНК малой, средней и большой длины**

Известно, что в процессе транспорта различных молекул в митохондрии важную роль играют поверхностные белки внешней митохондриальной мембраны, обладающие способностью к специфическому связыванию транспортируемых молекул. Исходя из этого, такие белки определяют как «рецепторные». Ранее, согласно исследованиям Koulintchenko с соавторами было обнаружено, что предобработка изолированных митохондрий растений и животных протеазами (трипсин, протеиназа К), приводящая к удалению поверхностных мембранных белков, полностью ингибирует процесс импорта ДНК в изолированные митохондрии (Koulintchenko et al., 2003; 2006). Исходя из этого, предполагается, что узнавание и связывание с соответствующими рецепторными белками внешней мембраны митохондрий является ключевым этапом в процессе транслокации нуклеиновых кислот в митохондрии (рис. 13).



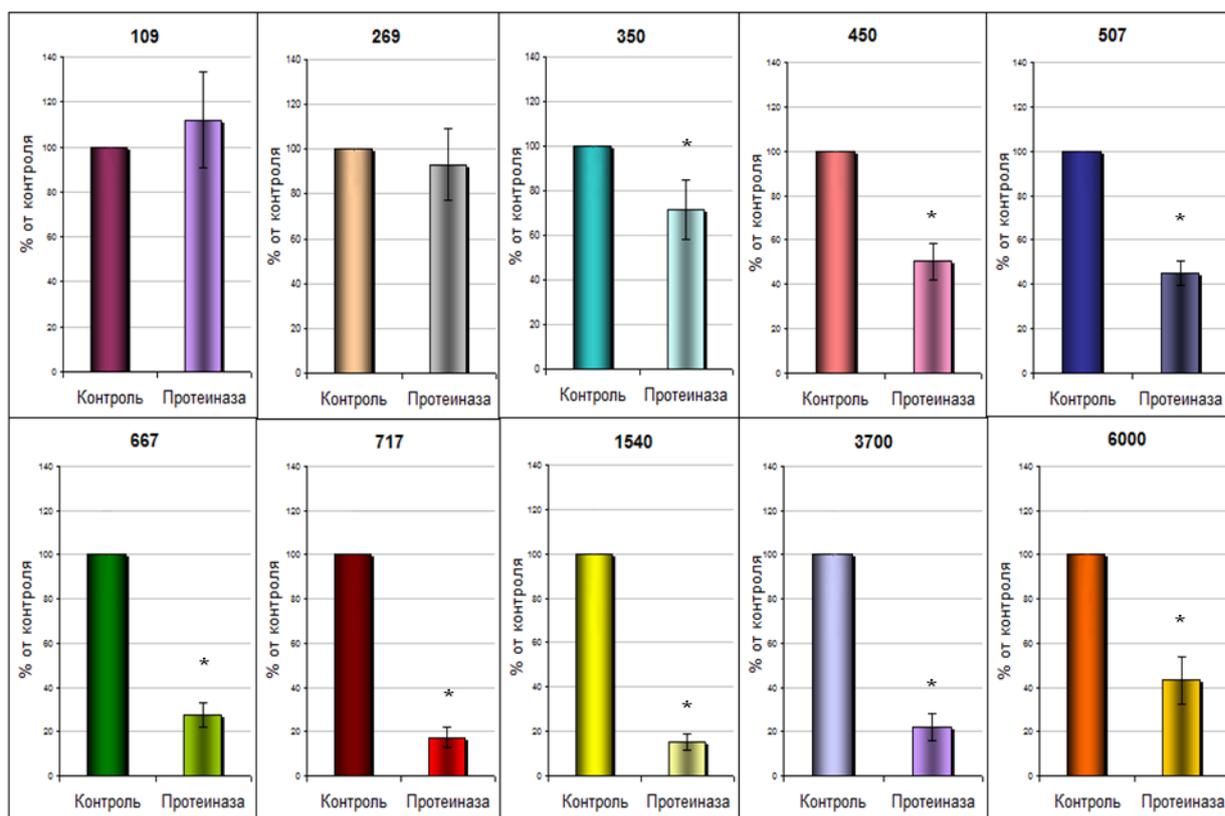
**Рисунок 13. Схематическое представление механизма импорта ДНК в растительные митохондрии (По материалам работы Koulintchenko et al., 2003).**

С целью исследования роли поверхностных белков внешней мембраны в механизме транспорта ДНК разных размерных классов нами были проведены эксперименты с использованием охарактеризованных ранее эффекторов и ингибиторов митохондриального импорта ДНК. Для инкубации с фрагментами ДНК разной длины были использованы митохондрии, предобработанные протеиназой K (см. раздел 2.3.4.). Такая обработка способствует удалению экспонированных на внешней поверхности митохондрий белков и может служить маркером их участия в транспорте молекул ДНК. Для экспериментов были использованы 10 фрагментов ДНК размером от 109 до 6000 п.н. Анализ импорта проводили с помощью метода количественной ПЦР.

Как видно из представленных на рисунке 14 данных, предобработка митохондрий протеиназой K практически не оказывала ингибирующего эффекта на транспорт фрагментов ДНК малой длины (109 – 269 п.н.), но в то же время существенно снижала импорт фрагментов ДНК от 450 до 6000 п.н. – в 2 – 4 раза по сравнению с контролем (рис. 14).

Результаты, полученные в отношении фрагментов средней и большой длины (717 – 3700 п.н.) согласуются с данными, показанными ранее в работе

(Kouintchenko et al., 2003). Как уже упоминалось выше, в исследовании в качестве основного субстрата импорта использовали митохондриальную плазмиду размером 2,3 т.п.н. и было обнаружено, что импорт ДНК субстрата данной длины полностью подавляется предобработкой изолированных митохондрий трипсином.



**Рисунок 14. Роль поверхностных белков наружной мембраны митохондрий в импорте ДНК разной длины.** На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК фрагментов разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum*, предобработанные протеиназой К (0,5 мкг/мкл). Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. Эффективность импорта ДНК в необработанные протеиназой К митохондрии (контроль) принята за сто процентов. Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом (Протеиназа) статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

В данной работе нами впервые показано, что роль поверхностных мембранных белков в импорте ДНК не является универсальной. Очевидно, что, если для импорта ДНК средней длины необходимо связывание с определенными

рецепторными белками наружной мембраны митохондрий, то для импорта ДНК малой длины (109 – 269 п.н.) такой зависимости не наблюдается.

В разделе 3.2.1. данной работы было показано, что в отличие от транспорта ДНК малой длины (109 – 269 п.н.) для фрагментов ДНК средней и большой длины (717 – 3700 п.н.) характерно достаточно быстрое насыщение процесса (рис. 10 и 11), что согласуется с результатом по ингибированию импорта обработкой протеиназой К. Стадия насыщения импорта ДНК средней и большой длины, вероятно, наступает в первую очередь по причине занятости всех доступных ДНК-связывающих сайтов рецепторных белков. Таким образом, транспорт ДНК средней и большой длины, по всей видимости, нуждается в наличии на внешней мембране рецепторных белков, доступное количество которых лимитирует процесс, но эти рецепторные белки не участвуют в транспорте ДНК малой длины, что свидетельствует о существовании различий в механизме импорта ДНК разного размера.

В настоящее время известно, что пути транслокации тРНК и ДНК в митохондрии растений пересекаются и на уровне внешней мембраны импорт происходит с участием порина (Salinas et al., 2006; Kouintchenko et al., 2003). В работе Salinas с соавторами (2006) с использованием специфичных антител для порина, было обнаружено, что предобработка различными концентрациями трипсина не приводит к деградации этого основного транспортного белка наружной мембраны митохондрий *S. tuberosum*. Рецепторные функции в импорте тРНК в изолированные митохондрии *S. tuberosum* могут выполнять чувствительные к обработке трипсином субъединицы TOM20 и TOM40, входящие в состав сложноорганизованного комплекса, основной функций которого является импорт белков из цитоплазмы (Salinas et al., 2006).

С помощью протеомного подхода в работе Weber-Lotfi с соавторами (2015) был проведен поиск белков, выполняющих рецепторную функцию в транспорте фрагментов ДНК в митохондрии растений (с использованием культуры клеток арабидопсиса). Была выявлена  $\beta$ -субъединица  $F_1F_0$ -АТФ-синтазы, предшественник которой ассоциирован с внешней мембраной митохондрий и,

очевидно, вследствие этого способен связываться с ДНК и выполнять рецепторные функции. Однако роль данного белка в импорте ДНК в изолированные митохондрии растений остается малоизученной.

Таким образом, судя по всему, процесс транслокации молекул ДНК малой длины через митохондриальные мембраны может происходить альтернативным установленному ранее механизму импорта молекул ДНК средней длины ( $\leq 3000$  пн) путем (Kouintchenko et al., 2003). Это следует из того, что в отличие от механизма импорта субстратов средней длины, для транспорта субстратов малой длины в митохондрии характерно (1) отсутствие стадии насыщения процесса импорта в зависимости от концентрации ДНК или от времени инкубации в среде с изолированными митохондриями картофеля; (2) отсутствие необходимости первоначального связывания молекул ДНК с поверхностными рецепторными белками наружной мембраны митохондрий.

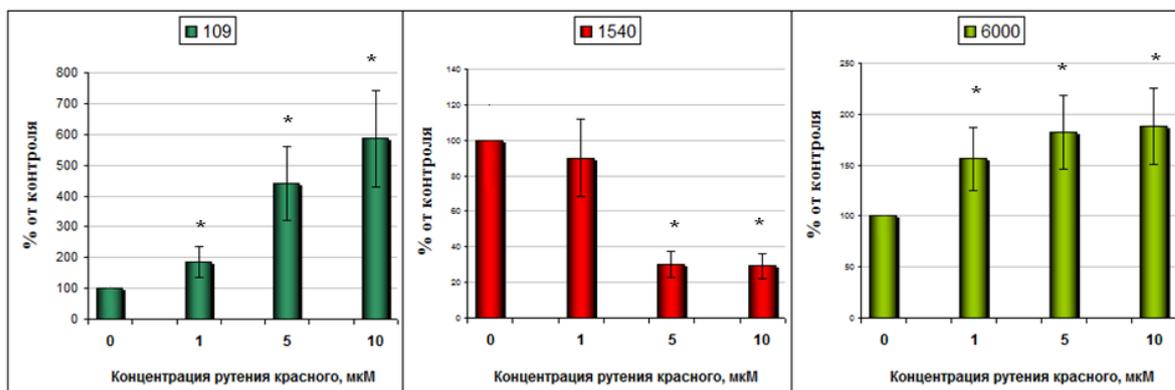
### **3.2.3. Участие в механизме импорта ДНК митохондриального порина (VDAC)**

Ранее с использованием рутения красного и специфичных антител было показано, что к транспорту ДНК в растительные митохондрии причастен зависимый от потенциала анионный канал VDAC (англ. Voltage-Dependent Anion Channel) или порин, локализованный в наружной мембране (Kouintchenko et al., 2003). Участие VDAC в процессе импорта ДНК было установлено также, с помощью ингибиторного анализа, для митохондрий млекопитающих (Kouintchenko et al., 2006), и, посредством генетического анализа мутантов, для митохондрий *S. cerevisiae* (Weber-Lotfi et al., 2009). Помимо порина в процессе транслокации ДНК через митохондриальные мембраны растений участвует адениннуклеотидтранслоказа (АНТ): VDAC и АНТ являются компонентами митохондриальной поры МРТР (англ. МРТР – mitochondrial permeability transition pore), способной формировать канал в зонах контакта наружной и внутренней мембран митохондрий (рис. 13) (Kouintchenko et al., 2003).

Согласно литературным данным, комплексное гексавалентное соединение рутения, содержащее аминокгруппы  $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_4-\text{O}-\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$ ,

является агентом, модулирующим транспортную активность порина, основного транспортного белка внешней мембраны митохондрий (Keinan et al., 2010, 2013; Shoshan-Barmatz et al., 2010; Salinas et al., 2006; Zaid et al., 2005). Для дрожжей (Por1p) и млекопитающих (mVDAC1) были выявлены сайты (для млекопитающих 4, а для дрожжей 3), по которым происходит взаимодействие порин-рутений. Установлено, что в связывании с рутением участвуют определенные остатки глутамата, расположенные на обращенной к цитоплазме поверхности порина в 1 и 3 цитозольных петлях (Israelson et al., 2008).

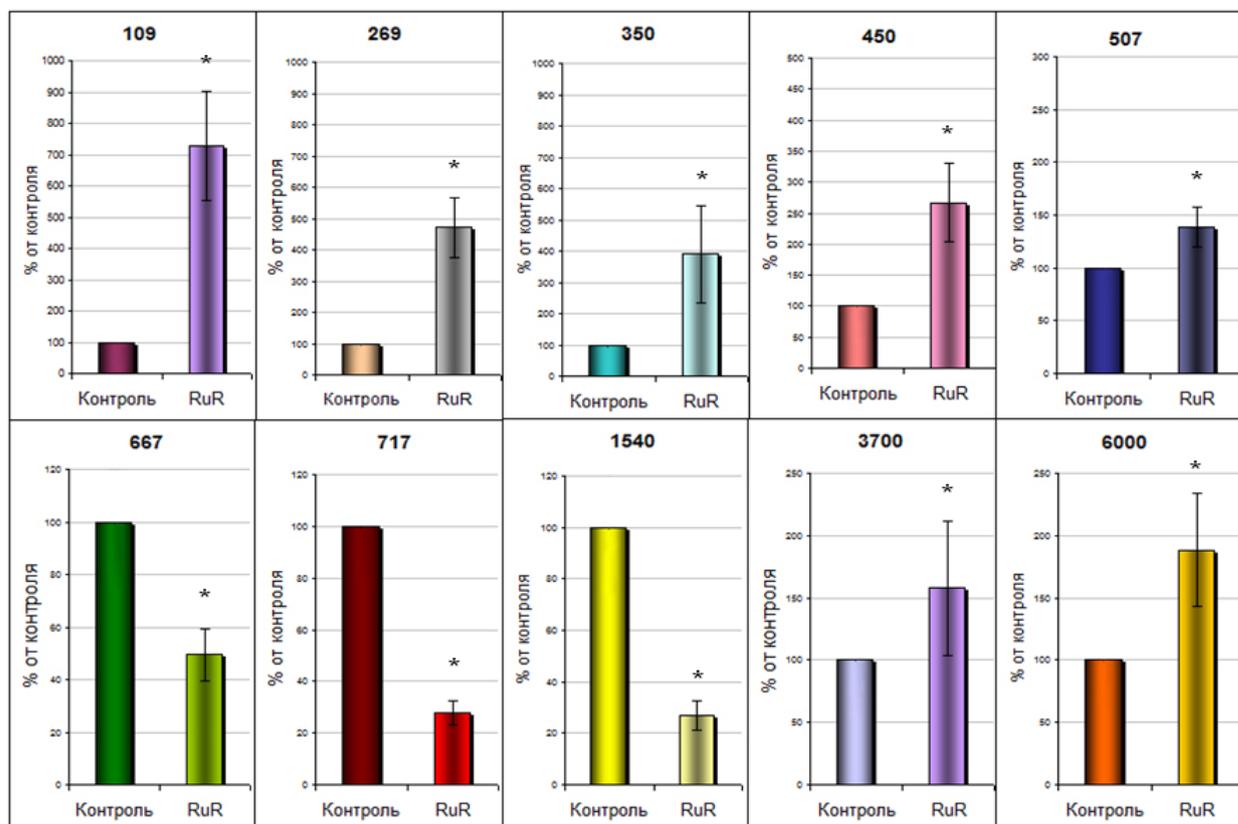
Для выявления возможных различий в механизме импорта ДНК разных размерных классов мы изучили влияние на этот процесс ингибитора порина рутения красного (англ. RuR – Ruthenium Red). Для экспериментов использовали митохондрии картофеля, обработанные различными концентрациями рутения красного: 1, 5 и 10 мкМ. В качестве субстратов импорта добавляли в среду инкубации к митохондриям фрагменты ДНК размером 109 п.н., 1540 п.н. или 6000 п.н. Как следует из данных проведенного анализа, процесс импорта молекул ДНК малой длины (109 п.н.) в митохондрии не подавляется действием рутения красного. Напротив, этот агент может существенно усиливать (примерно в 2 – 7 раз) эффективность импорта ДНК малой длины (рис. 15). Активность импорта ДНК средней (1540 п.н.) длины в митохондрии картофеля снижается в присутствии 5 – 10 мкМ рутения красного в 2-3 раза. В то же время на активность импорта субстратов большой длины (6000 п.н.) рутений красный, как и для малых фрагментов (109 п.н.), оказывает небольшое стимулирующее действие (примерно в 1,5 – 2 раза).



**Рисунок 15. Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S.tuberosum* имеет различающуюся чувствительность к действию ингибиторов митохондриальных мембранных переносчиков (VDAC). На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК в присутствии ингибитора VDAC – рутения красного (1, 5, 10 мкМ). Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. Эффективность импорта ДНК в необработанные рутением митохондрии (0) принята за сто процентов. Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом (RuR) статистически значимы ( $p < 0,05$ ).**

Для более детального изучения наблюдаемого стимулирующего или ингибирующего эффекта рутения красного на импорт малых, средних и больших субстратов импорта были проведены эксперименты, в которых изолированные митохондрии картофеля инкубировали в присутствии этого эффектора VDAC с большим количеством фрагментов ДНК разного размера (от 109 п.н. до 6000 п.н.). В результате проведенных экспериментов установлено, что действие рутения красного вызывает стимуляцию импорта субстратов ДНК в пределах от 100 до 507 п.н. (примерно в 3 – 7 раз) (рис. 16). При этом активирующее действие этого агента с увеличением длины импортируемой молекулы ДНК имеет тенденцию снижаться. Так, например, если для малого субстрата длиной 109 п.н. стимулирующий эффект рутения красного, в среднем, был 7-кратным, то для субстрата размером 450 п.н. наблюдали приблизительно 2-кратную стимуляцию импорта.

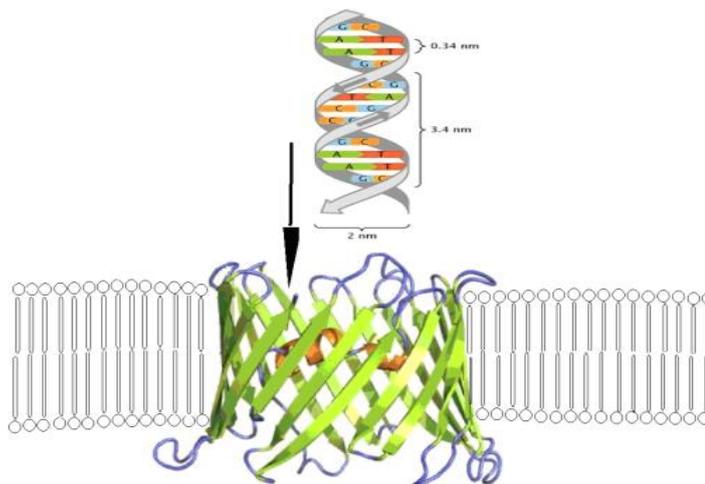
Импорт фрагментов ДНК длиной 667 – 1540 п.н. в присутствии рутения красного снижался по сравнению с контролем в 2 – 3 раза, что согласуется с ранее полученными экспериментальными данными для субстратов сходного размера (Koulintchenko et al., 2003). Импорт молекул ДНК длиной от 3700 – 6000 п.н. при обработке изолированных митохондрий рутением красным, как и для малых фрагментов, несколько стимулировался по сравнению с необработанными митохондриями (примерно в 1,5 – 2 раза).



**Рисунок 16.** Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S.tuberosum* имеет различающуюся чувствительность к действию ингибиторов митохондриальных мембранных переносчиков (VDAC). На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК разной длины в присутствии ингибитора VDAC – рутения красного (5 мкМ). Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. Эффективность импорта ДНК в необработанные рутением митохондрии принята за сто процентов (контроль). Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом (RuR) статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Важно отметить, что эффект стимуляции импорта ДНК рутением красным был выявлен впервые. Согласно литературным данным, этот агент, в основном, оказывал ингибирующее действие на процесс импорта ДНК, а также тРНК, в изолированные митохондрии растений, на основании этого факта был сделан вывод, что импорт ДНК и тРНК происходит с участием порина (Koulintchenko et al., 2003; Salinas et al., 2006).

Известно, что VDAC способен формировать во внешней мембране митохондрий поры/каналы, сопоставимые с размером двуцепочечной ДНК (Weber-Lotfi et al., 2015). Также было показано, что очищенный порин (у млекопитающих) в реконструированной системе липидного бислоя способен участвовать в транспорте двуцепочечной ДНК размером 633 п.н. (Szabo et al., 1998). Однако, каким образом происходит взаимодействие порина с ДНК, пока остается малоизученным. В соответствии с современными представлениями, вторичная структура основного транспортного белка внешней мембраны достаточно консервативна у всех исследованных эукариотических объектов. С использованием рентгеноструктурных и ЯМР-методов анализа установлена 3D-структура порина (рис. 17). Согласно этой модели, 19 антипараллельных  $\beta$ -слоев формируют структуру поры, N-концевой аминокислотный участок образует  $\alpha$ -спираль, которая располагается внутри поры и, по всей вероятности, регулирует ее проницаемость. Поры могут иметь ряд различных конформационных состояний. Диаметр пор VDAC может достигать 3 – 4 нм – при полностью открытом состоянии, и 1,8 нм – при закрытом (Salinas et al., 2014).



**Рисунок 17. Схема механизма транслокации ДНК на уровне внешней мембраны с участием порина.** (3D-модель VDAC из работы Salinas et al., 2014).

Для объяснения полученных результатов можно предположить, что рутений красный изменяет или фиксирует конформацию VDAC, и это состояние каким-то образом влияет на импорт ДНК, причем эти изменения оказывают противоположный эффект на процесс транслокации ДНК разных размерных групп.

Следует упомянуть, что сходный неоднозначный эффект был выявлен ранее для участвующего в импорте белка-переносчика – адениннуклеотидтранслоказы (АНТ). Такие ингибиторы АНТ, как карбоксиатрактилозид и бонкрековая кислота, оказывали противоположные эффекты на процесс импорта ДНК (Koulintchenko et al., 2003). Авторы данной работы предположили, что ДНК-связывающий участок этого транспортного белка внутренней мембраны митохондрий может быть доступен либо с внешней стороны («с» конформация, от англ. «cytosolic»), либо с внутренней («m» конформация, от англ. «matrix»). Блокирование «с» конформации адениннуклеотидтранслоказы атрактилозидом ингибирует транспорт ДНК, в то время как блокирование «m» конформации бонгкрековой кислотой оказывает на импорт ДНК стимулирующее действие. По этой причине, нельзя исключить, что аналогичная ситуация, когда изменение пространственной структуры белка различными модулирующими агентами

влияет на проницаемость поры для молекул ДНК, возможна и для белка внешней мембраны митохондрий порина.

В настоящее время известно, что в митохондриях картофеля преобладают две изоформы порина – VDAC34 и VDAC36 (или POM34 и POM36), имеющие между собой 75% гомологию (Heins et al., 1994; Salinas et al., 2014). С использованием биоинформатической программы BindN software мы провели анализ и выявили, что основные изоформы порина VDAC34 и VDAC36 картофеля обладают ДНК-связывающими свойствами (рис. 18)

На основании проведенного анализа можно отметить, что определенное количество потенциальных ДНК-связывающих сайтов расположено в N-концевом домене, который, согласно литературным данным, формирует  $\alpha$ -спираль (первые 50 аминокислотных остатков N-концевого участка). Таким образом, этот белковый домен может играть важную роль в связывании ДНК. В работе Salinas с соавторами (2014) было выявлено, что N-концевой участок VDAC 34 достаточно важен для связывания с тРНК, поскольку только этот участок рекомбинантного белка обеспечивает примерно 50% от общего связывания порин-тРНК.

## VDAC34

### Overview

Sequence:	MGKGPGLYTEIGKKARDLLYKDYQSDHKFSITTYSPIGVVITSSGSKKGD LFLADVNTQL
Prediction:	-----
Confidence:	458433511256217934832323153130480003744650802800558998794216
Sequence:	KNKNVTTDIKVDTNSNLFTTITVDEAAPGLKTIILSFRVDPQRSGKLEVQYLHDYAGICTS
Prediction:	-----
Confidence:	110051137265231245128398898657015417195230140668438573877401
Sequence:	VGLTANPIVNFSGVVGVTNIIALGTDVDFDTKTGDFTKCNAGLSFTNADLVASLNLNKNKGD
Prediction:	-----
Confidence:	435162588371666725888763461561103142042555141388998283624164
Sequence:	NLTASYHTVSPLTSTAVGAEVNHSFSTNENIITVGTQHRLDPLTSVKARINNFGKASAL
Prediction:	-----
Confidence:	150308010572511157798831231144478265124075271158485114617067
Sequence:	LGHEWRPKSLFTVSGEVDTKSVDKGAKFGLALALKP
Prediction:	-----
Confidence:	983550311530817487222741772676886714

## VDAC36

### Overview

Sequence:	MVKGPGLYSDIGKKARDLLYRDYVSDHKFTVTTYSTTGVAITASGLKKGELFLADVSTGL
Prediction:	-----+-----+++-----
Confidence:	470433611356217934830428244140498800834670403411858878581135
Sequence:	KNKNIITDVKVDINSNVYTTITVDEPAPGLKTIFSFVVPDQKSGKVELQYLHEYAGINTS
Prediction:	-----+-----+-----
Confidence:	110041237265121251116288888647117539998542150667438573877311
Sequence:	IGLTASPLVNFSGVAGNNIVALGTDLSFDTATGNFTKCNAGLSFSSSDLIASLALNDKGD
Prediction:	-----+-----+-----
Confidence:	444160367371567744166662461551673141832533130113688498849284
Sequence:	TVSASYHTVVKPVNTAVGAELTHSFSSNENTLTIGTQHLLDPLTTVKARVNSYGGKASAL
Prediction:	-----+-----+-----+-----+-----+-----
Confidence:	150318010582712168686710141023315156145987582158394080386076
Sequence:	IQHEWRPKSLFTISGEVDTRAIEKSAKIGLAVALKP
Prediction:	-----+-----
Confidence:	963550311530817487217643171776886714

**Рисунок 18. Анализ ДНК-связывающих свойств мембранных митохондриальных белков *S. tuberosum* VDAC34 и VDAC36.** Анализ *in silico* проводился с использованием программы BindN software. ДНК-связывающие сайты отмечены красным цветом «+», цифры от 0 (низкая) до 9 (высокая) обозначают степень вероятности наличия ДНК-связывающих свойств.

Важно также упомянуть, что, согласно литературным данным (Salinas et al., 2014), рекомбинантные белки VDAC34 и VDAC36 с разной эффективностью взаимодействуют с двуцепочечной ДНК, и, что весьма интересно, VDAC36 связывается с двуцепочечной ДНК примерно в 7 – 8 раз слабее. Вероятно, ключевую роль в процессе связывания с молекулами ДНК играет доступность ДНК-связывающих сайтов порина и их определенное пространственное расположение.

В экспериментальных условиях обработка изолированных митохондрий рутением, возможно, приводит к изменению конформации порина, но, тем не менее, связывание ДНК с порином все равно происходит. При связывании с порином вероятно, что импортируемая в митохондрии ДНК может быть достаточно устойчива к ДНКазной обработке. Известно, что внутренний диаметр

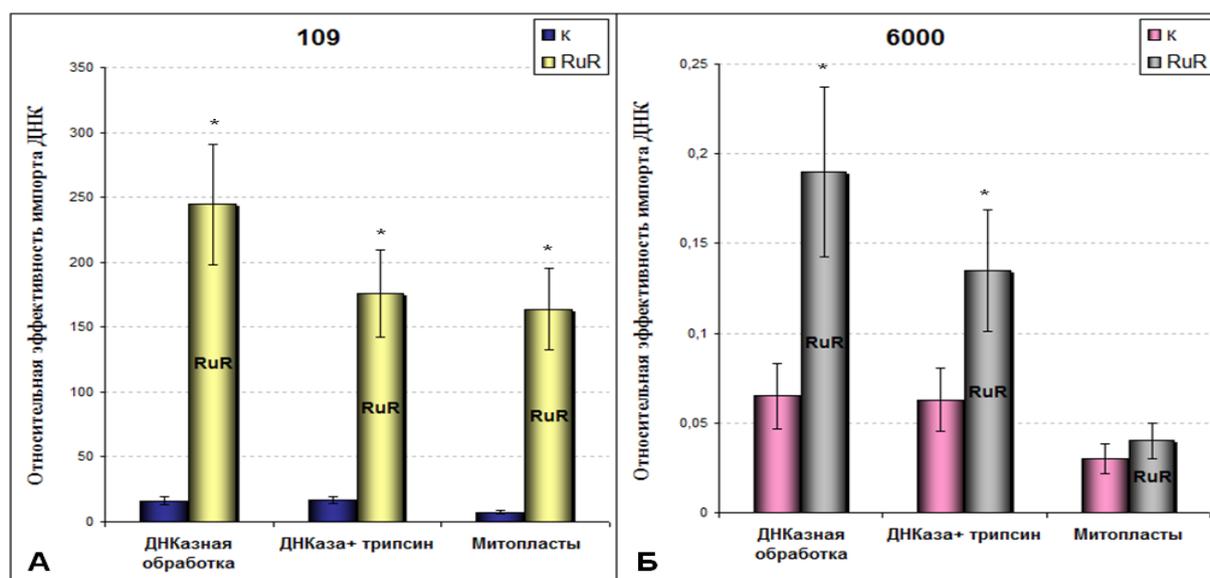
пор VDAC может обеспечивать транспорт метаболитов с молекулярной массой примерно 3 – 6 кДа (Hoogenboom et al., 2007). Находясь в центре поры, молекулы ДНК, связанные с этим белком внешней мембраны, могут быть экранированы, защищены от действия ДНКазы I (молекулярная масса этого белка составляет примерно 30 – 31 кДа). Исходя из этого, можно предположить, что при связывании ДНК с порином, дальнейшая транслокация ДНК внутрь митохондрий может быть затруднена в случае изменения конформации белка. По этой причине, обработка митохондрий рутением может приводить к «излишнему налипанию», связыванию этих фрагментов ДНК с белками внешней мембраны, а не дальнейшей транслокации ДНК в митохондриальный матрикс.

Следует также отметить, что по сравнению с другими организмами состав митохондриальных мембран растений в настоящее время изучен относительно плохо. Так, например, согласно исследованиям Duncan с соавторами (2011) в составе внешней мембраны митохондрий арабидопсиса было обнаружено 42 белка, причем 27 из них оказались ранее неизвестными, т.е. их локализация во внешней мембране митохондрий арабидопсиса показана впервые. По этой причине функции некоторых белков во внешней мембране митохондрий растений остаются до сих пор не исследованными, что не исключает возможности их участия в импорте ДНК.

Для выявления специфичности действия ингибитора на импорт ДНК разной длины были проведены дополнительные эксперименты. Митохондрии после импорта ДНК, помимо обработки ДНКазой, (1) были подвергнуты дополнительной обработке трипсином, (2) из них получали митопласты, что позволило проанализировать количество ДНК, импортировавшееся в митохондриальный матрикс.

Обработка митохондрий трипсином, удаляющим только поверхностные рецепторные белки наружной мембраны, после проведения импорта в них ДНК размером 109 или 6000 п.н., незначительно снимала стимулирующий эффект рутения красного на активность транслокации ДНК тестируемых длин (109 и 6000 п.н.), что в некоторой степени подтверждает гипотезу «излишнего налипания»,

хотя эффект стимуляции импорта все равно сохранялся по сравнению с необработанными рутением митохондриями. Анализ эффективности импорта ДНК в митопластах, полученных после проведения инкубации этих фрагментов с митохондриями, показал, что активация импорта малого фрагмента ДНК длиной 109 п.н. остается практически такой же значительной, в то время как для субстрата длиной 6000 п.н. уровень эффективности транспорта становится сопоставимым с эффективностью импорта ДНК в необработанные рутением митохондрии (рис. 19 Б).



**Рисунок 19. Специфичность действия рутения красного, ингибитора митохондриального порина (VDAC) на импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S.tuberosum*.** Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. На графиках представлены результаты анализа активности импорта фрагментов ДНК длиной 109 и 6000 п.н. в присутствии 5 мкМ рутения красного в митохондриях, подвергнутые после импорта ДНК дополнительным обработкам. ДНКазная обработка – стандартный протокол обработки митохондрий после импорта; ДНКазы + трипсин – дополнительная обработка митохондрий после импорта трипсином (10 мкг/мл); митопласты – после импорта и ДНКазной обработки внешнюю митохондриальную мембрану разрушали посредством осмотического шока. \* – различия между контролем (К) и исследуемым вариантом (RuR) статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, полученные в экспериментах данные позволяют сделать вывод, что, вероятно, для данных субстратов импорта существуют альтернативные (помимо порина) пути транслокации на уровне внешней мембраны митохондрий.

Широко известно, что порин является многофункциональным белком и выполняет в митохондриях разнообразные функции. В настоящее время выявлено, что помимо мономерного состояния, порин (VDAC) в митохондриях человека может формировать олигомерные комплексы (ди-, три-, тетрамерные и более). Предполагают, что в таком олигомерном состоянии VDAC способен формировать поры значительно большего диаметра (Zalk et al., 2005; Keinan et al., 2013; Betaneli et al., 2012; Shoshan-Barmatz et al., 2010). Важно отметить, что с использованием методов атомно-силовой микроскопии (англ. AFM - Atomic Force Microscopy) было показано, что такие олигомерные комплексы VDAC существуют также в нативной мембране митохондрий картофеля (Hoogenboom et al., 2007). Наиболее интересен также факт, что олигомеризация VDAC является динамичным процессом и, как было показано в некоторых работах, степень олигомеризации этого белка возрастает при действии на культуру клеток человека определенных химических соединений и стрессовых воздействий. Были выявлены некоторые агенты, способствующие повышению степени олигомеризации порина, такие как, например, стауроспорин, куркумин, цисплатин и  $As_2O_3$  (Shoshan-Barmatz et al., 2013; Keinan et al., 2010, 2013). Кроме того, VDAC способен активно взаимодействовать с различными другими белками, что не исключает вероятность формирования пор/каналов гетеродимерного состава. Так, согласно литературным данным, возможным компонентом поры МРТР является митохондриальный бензодиазепиновый рецептор – МБР (MBR) (Зоров и др., 1996; Елисеев, 2003), локализованный, главным образом, в наружной митохондриальной мембране (Papadopoulos et al., 2006; Guillaumot et al., 2009; Vanhee et al., 2011). MBR, названный сравнительно недавно также TSPO (англ. Tryptophan-rich Sensory Protein) в определенных стрессовых условиях способен формировать транзитную пору (олигомерные комплексы с порином и АНТ в

зонах контакта двух митохондриальных мембран). Ранее, было выдвинуто предположение, что именно с участием этого комплекса (TSPO – VDAC – АНТ) может осуществляться транспорт ДНК в митохондриях животного происхождения (Зоров и др., 1996). У растений для белка TSPO также показана митохондриальная локализация (Lindemann et al., 2004), но, в отличие от животных, функции этого белка остаются пока малоизученными (Vanhee et al., 2011).

Подводя итог проделанным экспериментам, направленным на изучение механизма транслокации молекул ДНК на уровне внешней мембраны митохондрий растений, можно сделать заключение, что процесс импорта ДНК в митохондрии на уровне внешней мембраны может быть опосредован участием нескольких динамично формирующихся транспортных каналов/ пор во внешней митохондриальной мембране. Причем, вероятно, порин может входить в состав этих олиго/гетеродимерных белковых комплексов, участвующих в формировании каналов во внешней мембране митохондрий растений. Анализируя полученные экспериментальные данные, вполне логично предположить, что процесс транслокации молекул ДНК на уровне внешней мембраны митохондрий растений варьирует в зависимости от длины молекулы и может происходить посредством не одного, как предполагалось ранее, а нескольких механизмов. Также нельзя исключить, что существуют определенные регуляторные механизмы, когда модуляция проницаемости пор VDAC различными агентами приводит к активации работы или формированию альтернативных путей переноса ДНК.

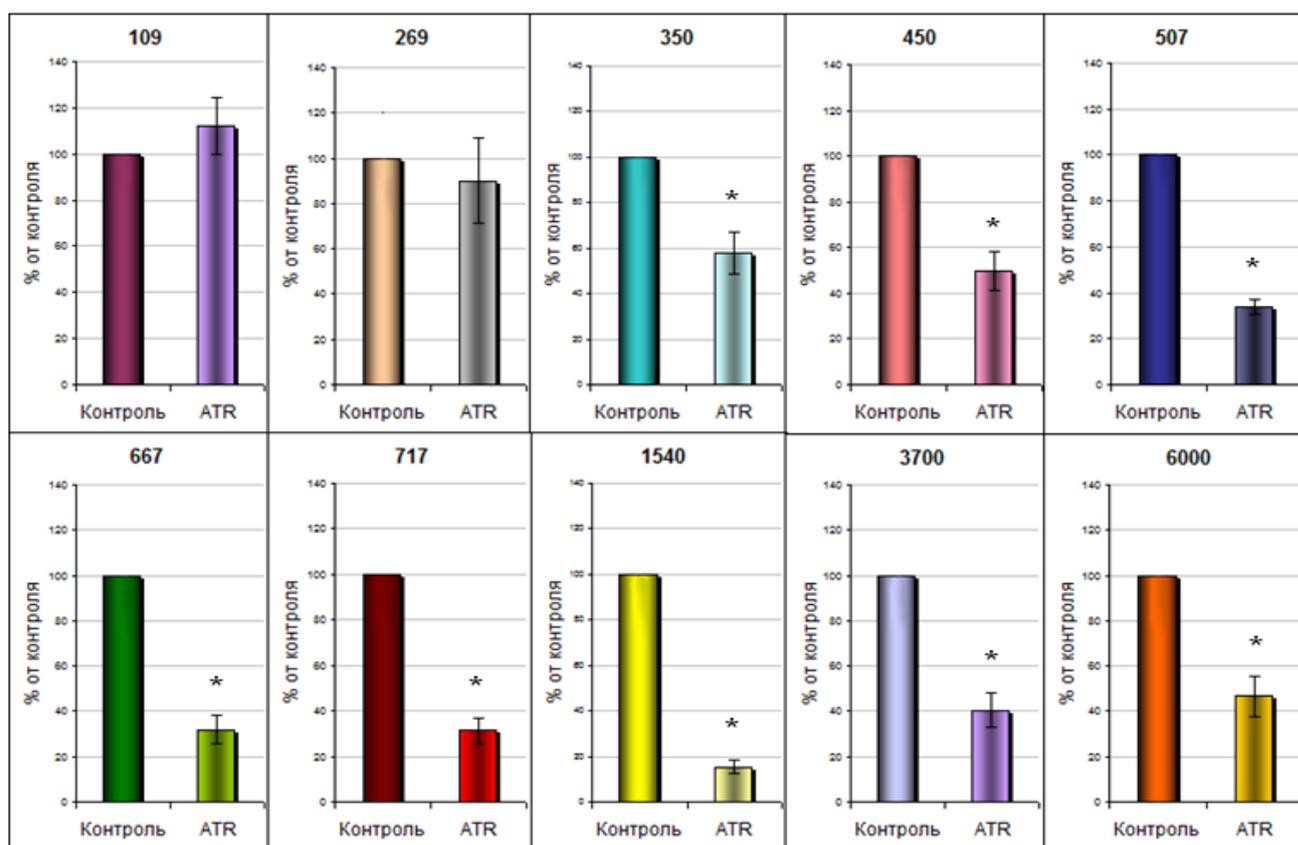
#### **3.2.4. Участие в механизме импорта ДНК белка внутренней мембраны митохондрий адениннуклеотидтранслоказы (АНТ)**

Транслокация макромолекул через поляризованную внутреннюю мембрану митохондрий остается в настоящее время сложным и недостаточно изученным вопросом. Совокупность экспериментальных данных, полученных ранее в системе *in organello*, с использованием радиоактивно меченых субстратов, убедительно доказала участие в импорте ДНК в растительных митохондриях

специфичного мегаканала, формируемого с участием порина во внешней мембране и адениннуклеотидтранслоказы (АНТ) во внутренней (Koulintchenko et al., 2003). Исходя из этого, следующим этапом работы стало тестирование вовлеченности АНТ в механизм импорта ДНК разных размерных классов.

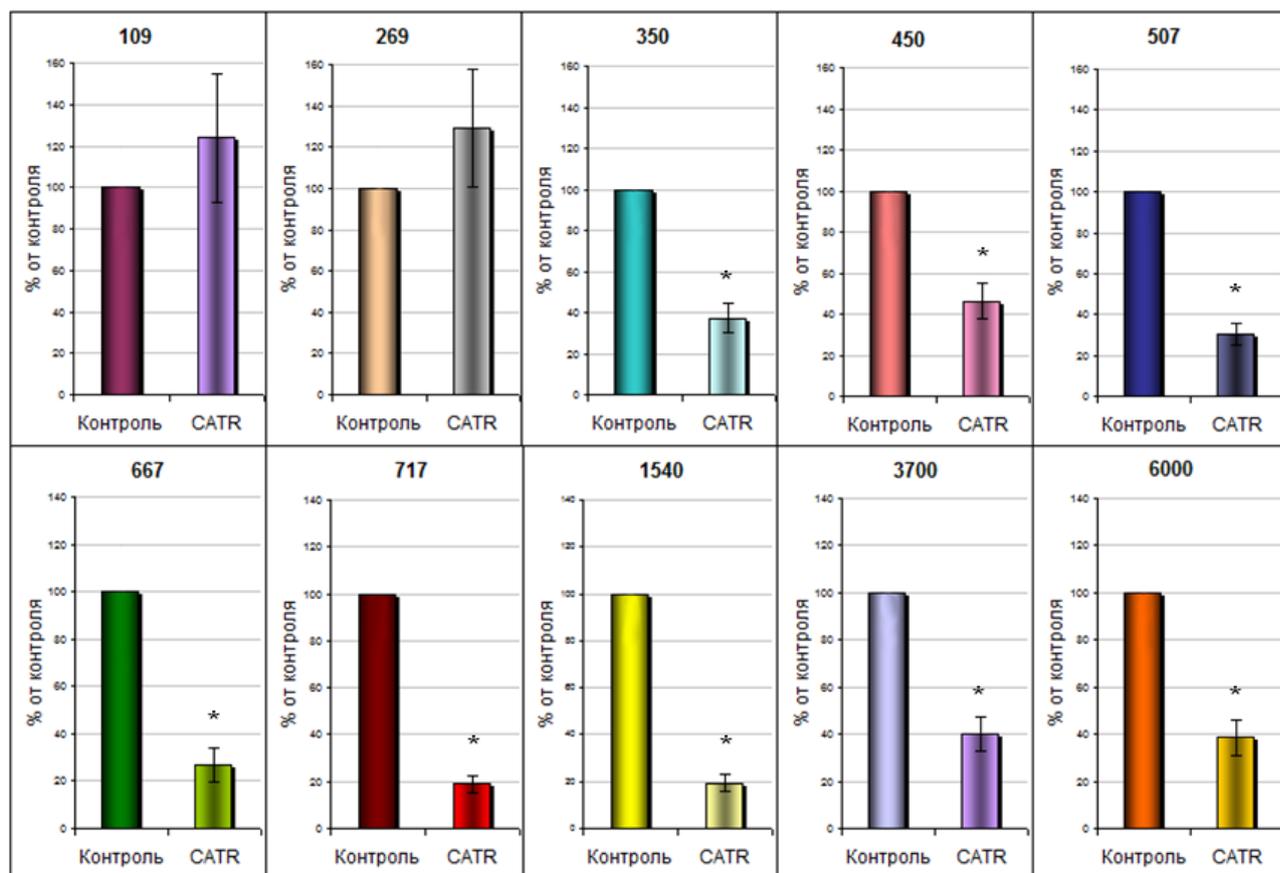
Для проведения этих экспериментов перед импортом ДНК мы обрабатывали изолированные митохондрии картофеля атрактилозидом (англ. ATR – atractyloside) и карбоксиатрактилозидом (англ. CATR – carboxyatractyloside). Атрактилозид и карбоксиатрактилозид – гликозиды растительного происхождения и, согласно литературным данным, являются высокоспецифичными ингибиторами АНТ, оказывающими свое действие со стороны межмембранного пространства (Palmieri et al., 2011; Klingenberg, 2008).

В качестве субстратов для экспериментов использовали фрагменты ДНК размером от 109 п.н. до 6000 п.н. Как следует из полученных данных, оба агента, модулирующие транспортную активность АНТ, оказывали на импорт ДНК в системе изолированных митохондрий сходное действие (рис. 20, 21).



**Рисунок 20. Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* имеет различную чувствительность к действию атрактилозида (ингибитора адениннуклеотидтранслоказы).** Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК в присутствии ингибитора АНТ – атрактилозида (100 мкМ). Анализ эффективности импорта проводился с использованием ПЦР-РВ. Эффективность импорта ДНК в необработанные митохондрии принята за сто процентов (контроль). Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом (АТР) статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

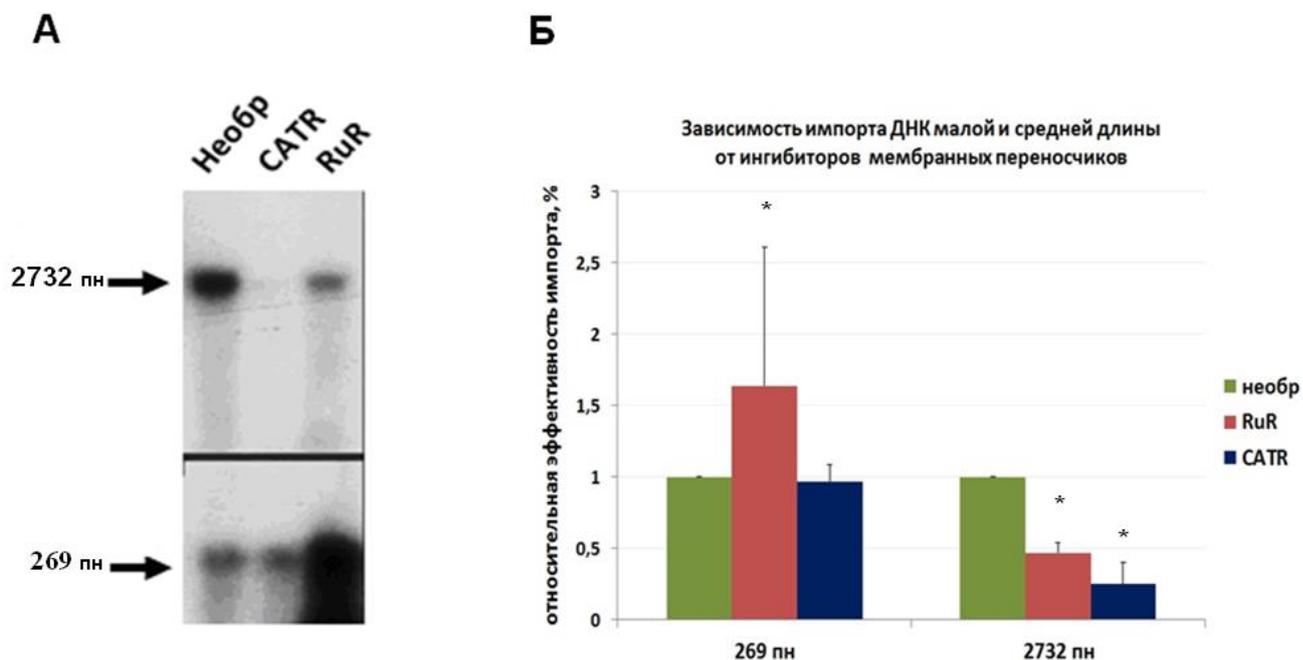
Было обнаружено, что атрактилозид и карбоксиатрактилозид вызывают снижение активности импорта ДНК размером от 350 п.н. до 6000 п.н. в 2 – 5 раз, что согласуется с данными, полученными ранее с использованием субстрата на основе плазмиды 2,3 т.п.н. (Koulintchenko et al., 2003). Однако тестируемые агенты не оказывали ингибирующего эффекта на импорт в митохондрии картофеля ДНК малой длины (109 – 269 п.н.).



**Рисунок 21.** Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* имеет различную чувствительность к действию карбоксиатрактилозида (ингибитора адениннуклеотидтранслоказы). На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК в присутствии ингибитора АНТ – карбоксиатрактилозида (10 мкМ). Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. Эффективность импорта ДНК в необработанные митохондрии принята за сто процентов (контроль). Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Эксперименты по импорту в митохондрии картофеля в присутствии ингибиторов VDAC и АНТ были проведены также и с использованием двух радиоактивно меченых субстратов ДНК малой (269 п.н.) и средней (2732 п.н.) длины. Было выявлено, что рутений красный оказывает стимулирующий эффект на импорт субстрата размером 269 п.н. в митохондрии картофеля, как и в случае использования «холодной» ДНК (анализ в ПЦР-РВ) (рис. 22).

Предобработка митохондрий карбоксиатрактилозидом не влияла на импорт малого фрагмента, но, в то же время, полностью ингибировала транспорт субстрата, размер которого составлял 2732 п.н. Рутений красный оказывал ингибирующее действие на транспорт субстрата размером 2732 п.н. (рис. 22), что для субстрата данной длины согласуется с полученными ранее данными (Koulintchenko et al., 2003).



**Рисунок 22.** Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* имеет различающуюся чувствительность к действию ингибиторов митохондриальных мембранных переносчиков (VDAC и АНТ). Анализ активности импорта проводили с использованием радиоактивно меченых субстратов размером 269 и 2732 п.н. Импорт ДНК в изолированные митохондрии проводили в необработанные ингибиторами митохондрии (Необр), в присутствии ингибитора АНТ – карбоксиатрактилозида (CATR, 10 мкМ) и ингибитора VDAC – рутения красного (RuR, 5 мкМ). **(А)** Авторадиограммы мембран, на которые с агарозного геля была перенесена ДНК, экстрагированная после инкубации ДНК с митохондриями *S. tuberosum*. Стрелками отмечена миграция в геле субстратов импорта. **(Б)** Графическое представление эффективности импорта ДНК в присутствии ингибиторов по результатам не менее трех повторностей экспериментов. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

На основании полученных экспериментальных данных, можно предположить, что участие АНТ в импорте является: (1) определяющим на уровне внутренней мембраны для субстратов размером 350 – 6000 п.н.; (2) необязательным для молекул ДНК малой длины (109 – 269 п.н.). Фрагменты этого размерного класса, по-видимому, транспортируются альтернативными белками-переносчиками, локализованными во внутренней мембране митохондрий.

Таким образом, установленное различие в механизмах импорта ДНК разной длины в митохондрии растений может быть связано с вовлечением в импорт нескольких транспортных каналов, формируемых с участием белков как наружной, так и внутренней митохондриальных мембран. Это следует из результатов ингибиторного анализа импорта ДНК с использованием эффекторов деятельности митохондриального порина (VDAC), основного транспортного белка наружной мембраны (рутения красного) и переносчика адениновых нуклеотидов (АНТ) (атратиозида / карбоксиатратиозида), во внутренней мембране. В отличие от механизма импорта субстратов средней длины, который происходит посредством транспортного канала, формируемого этими классическими митохондриальными переносчиками, импорт молекул ДНК малой длины может происходить (1) независимо от участия АНТ на уровне внутренней мембраны; (2) с участием порина на уровне наружной мембраны, но в составе транспортных каналов, формируемых им и другими белками внутренней мембраны.

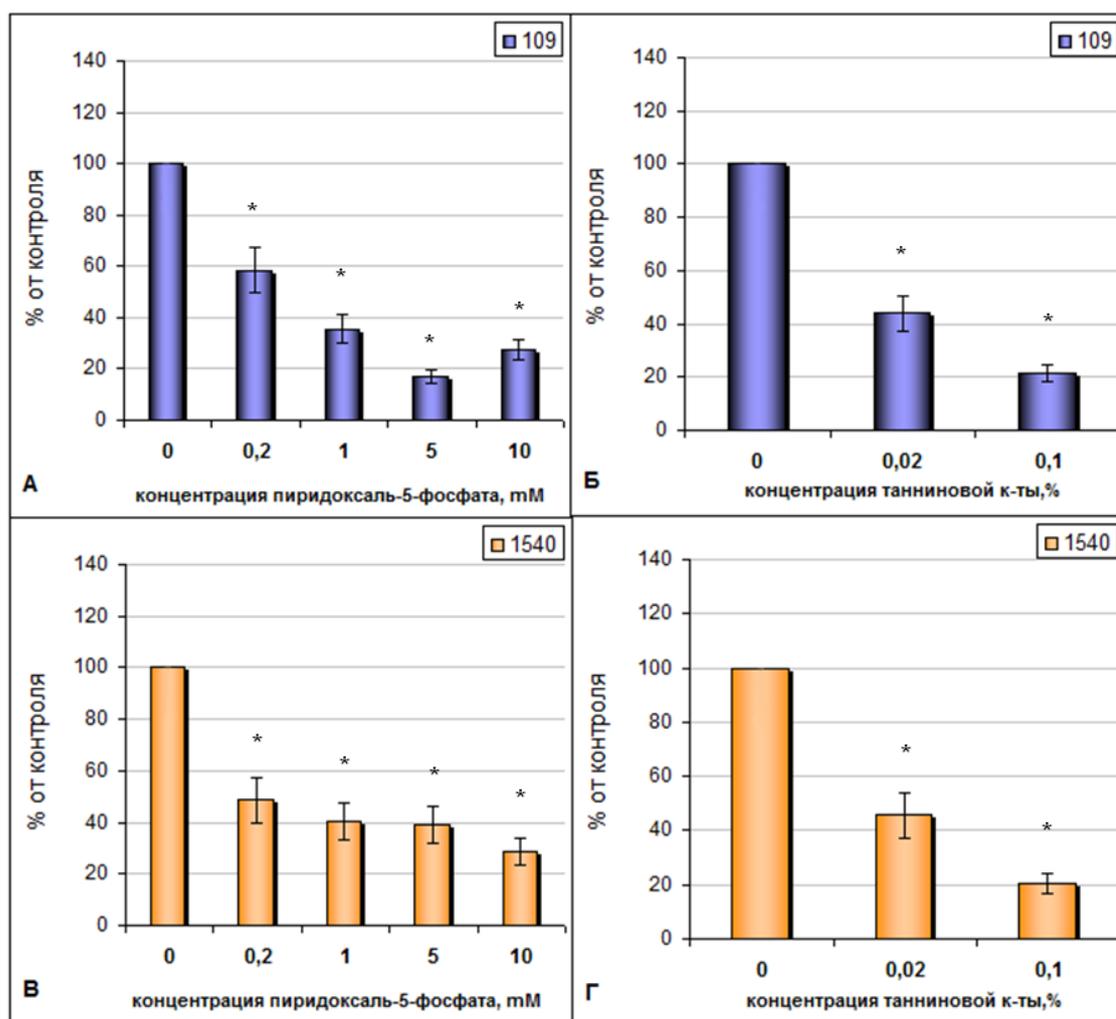
### **3.2.5. Исследование возможного участия в импорте ДНК переносчика адениновых нуклеотидов ADNT1**

Как следует из вышеизложенных экспериментальных данных, импорт малых фрагментов ДНК может осуществляться с участием альтернативных мембранных переносчиков. В поисках других потенциальных кандидатов среди известных митохондриальных транспортных белков внутренней мембраны, которые могли бы участвовать в импорте ДНК разной длины, мы исследовали влияние ингибиторов еще одного представителя переносчиков адениннуклеотидов ADNT1

(англ. novel adenine nucleotide transporter) локализованного во внутренней мембране митохондрий (Palmieri et al., 2008).

Palmieri с соавторами было обнаружено, что ADNT1 отличается сравнительно узкой субстратной специфичностью и является переносчиком только для адениновых нуклеотидов. Но, в отличие от адениннуклеотидтранслоказы (АНТ), ADNT1 участвует в переносе преимущественно АМФ и АТФ, транспортируя АДФ с меньшей эффективностью. С помощью метода реконструкции рекомбинантного белка ADNT1 в липосомах, авторами был проведен поиск потенциальных ингибиторов этого транспортного белка и выявлена его чувствительность к танниновой кислоте (англ. – Tannic acid) и пиридоксаль-5-фосфату. Исходя из литературных данных, мы провели тестирование возможного участия ADNT1 в импорте ДНК с использованием изолированных митохондрий картофеля, предобработанных различными концентрациями танниновой кислоты или пиридоксаль-5-фосфата. Было установлено, что при обработке митохондрий раствором танниновой кислоты в концентрации 0,02% интенсивность импорта ДНК как малой, так и средней длины снижается примерно в 2 раза (рис. 23 Б; Г). При увеличении концентрации в среде инкубации до 0,1% активность импорта ДНК малой и средней длины уменьшается в 4 раза.

Предобработка изолированных митохондрий картофеля пиридоксаль-5-фосфатом приводила к снижению эффективности импорта ДНК средней длины при всех используемых концентрациях (от 0,2 до 10 мМ) до 3 раз. Максимальное снижение активности импорта фрагмента ДНК малой длины (109 п.н.) до 4 раз наблюдали при концентрации пиридоксаль – 5-фосфата 5 мМ (рис. 23 В).



**Рисунок 23.** Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* проявляет чувствительность к влиянию ингибиторов переносчика адениннуклеотидов ADNT1. На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК длиной 109 и 1540 п.н. в присутствии ингибиторов ADNT1 – танниновой кислоты (Б, Г) и пиридоксаль-5-фосфата (А, В). Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. Указаны использовавшиеся для тестирования концентрации ингибиторов. Относительная эффективность импорта ДНК в необработанные митохондрии принята за сто процентов (контроль – 0). Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

На основании полученных экспериментальных данных можно предположить, что ADNT1 также принимает участие в процессе импорта ДНК. Однако особой специфической роли этого белка в импорте фрагментов малой длины в наших экспериментах выявлено не было. Скорее всего, ADNT1, также как АНТ,

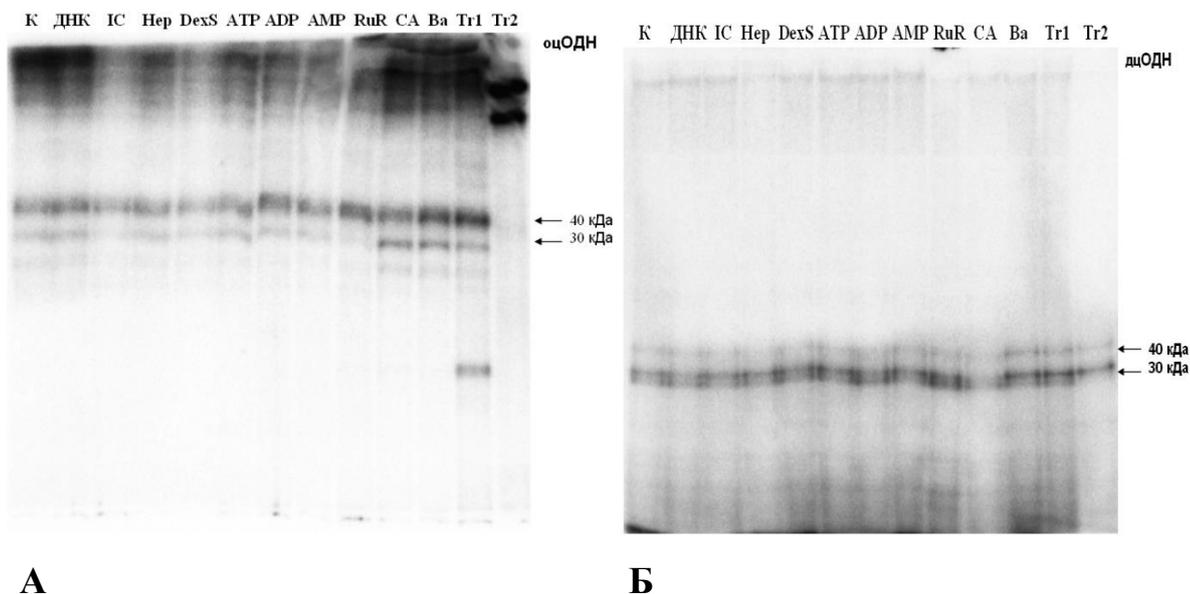
совместно с VDAC участвует в формировании пор/каналов, доступных для транспорта ДНК любого размера, и представляет собой определенный альтернативный механизм импорта. Следует отметить, что ADNT1 до сих пор остается сравнительно малоизученным транспортным белком внутренней мембраны. Для подтверждения участия этого белка и исследования его вклада в процесс импорта фрагментов ДНК разных размерных классов в дальнейших исследованиях можно использовать мутантную линию арабидопсиса с инактивированным геном ADNT1 (At4g01100) (Palmieri et al., 2008).

### **3.2.6. Исследование транспорта ДНК с использованием метода аффинной модификации реакционноспособными олигонуклеотидами**

Для изучения механизма транспорта ДНК в изолированные митохондрии растений мы предприняли попытку исследовать процесс взаимодействия экзогенной ДНК с митохондриальными белками методами аффинной модификации реакционноспособными олигонуклеотидами. Аффинная модификация представляет собой современный протеомный подход для изучения разнообразных аспектов ДНК-белковых взаимодействий. Особенностью этого подхода является то, что ДНК-зонд содержит реакционноспособную группу, активируя которую тем или иным способом, можно получить ковалентную сшивку нуклеиновая кислота-белок (Ходырева, Лаврик, 2011). В комбинации с масс-спектрометрическими подходами или методами флуоресцентной микроскопии аффинная модификация позволяет изучать механизмы транспорта ДНК в клетках и идентифицировать участвующие в этом процессе белки (Laktionov et al., 1999; 2003; Shelobanov et al., 2004).

В предварительных экспериментах было выявлено, что из числа олигонуклеотидов, несущих уридин на 5'-конце, в центре или на 3'-конце молекулы, наиболее подходящим реагентом для проведения экспериментов является олигонуклеотид с остатком уридина в 7-м положении. Поэтому для дальнейших экспериментов по изучению процесса транспорта ДНК в изолированные митохондрии был использован олигонуклеотид

GGCGGAUTTTATCGTAGTCG, а также двуцепочечный олигонуклеотид (состоящий из оцОДН и комплементарного олигонуклеотида (CGACTACGATAAAAATCCGCC). Олигонуклеотиды метили радиоактивно с использованием  $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{АТФ}$  и киназы.



**Рисунок 24. Влияние ингибиторов и конкурентов транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии на аффинную модификацию митохондриальных белков реакционноспособными одноцепочечными (оц) ОДН (А) и двуцепочечными (дц) ОДН (Б).** Электрофоретический анализ ДНК-белковых комплексов проводили в 10 – 20% ПААГ с последующей радиоавтографией. К – контроль (инкубация митохондрий с ОДН в течение 1 часа без добавления ингибиторов или конкурентов импорта); ДНК – с добавлением конкурентного ДНК-субстрата (100 мкг/мл); IC – с добавлением аналога двуцепочечной РНК poly(I:C), (50 мкг/мл); Hep – с добавлением гепарина (50 мкг/мл); Dex – с добавлением полианиона декстрана (10 мкг/мл); ATP, ADP, AMP – с добавлением конкурентных субстратов адениннуклеотидтранслоказы АТФ, АДФ и АМФ; RuR – с добавлением ингибитора порина - рутения красного (10 мкМ); CA – с добавлением ингибитора АНТ карбоксиатрактилозида (10 мкМ); Ba – с добавлением ингибитора АНТ бонгкрековой кислоты (20 мкМ), Tr1 – предобработка митохондрий трипсином, Tr2 – обработка митохондрий трипсином после аффинной модификации.

Затем, для получения реакционноспособных производных, олигонуклеотиды обрабатывали урацил-ДНК гликозилазой. С помощью щелочного гидролиза было

показано, что более 95% олигонуклеотидов содержат AP-сайт (апуриновый/апиримидиновый сайт), что позволило сделать вывод, что такой ОДН может быть использован для экспериментов по аффинной модификации митохондриальных белков. В составе AP-сайта первый атом углерода дезоксирибозы или рибозы способен образовывать основание Шиффа с первичными аминогруппами белков. Образование основания Шиффа обычно обратимый процесс. Для стабилизации, восстановления ковалентной связи белок-ДНК проводят обработку боргидратом натрия (Ходырева, Лаврик, 2011).

Инкубацию изолированных митохондрий картофеля с реакционноспособными олигонуклеотидами проводили в буфере импорта ДНК в течение часа. Затем проводили электрофоретическое разделение ДНК-белковых комплексов в 10 – 20% ПААГ с последующим анализом эффективности связывания при помощи радиоавтографии. Оценочная константа диссоциации нуклеопротеиновых комплексов составляла 0,3 – 0,6 мкМ.

Как следует из представленных на рисунке 24 данных, с одноцепочечным фрагментом ДНК связывается большее количество митохондриальных белков, но некоторые белки с примерной молекулярной массой 30-40 кДа, вероятно, участвуют в транспорте как оцОДН, так и дцОДН. При инкубации дцОДН с митохондриями в присутствии потенциальных конкурентов и ингибиторов транспорта эффекты тестируемых агентов на связывание ДНК с митохондриальными белками выражены значительно слабее по сравнению с оцОДН. Небольшое ингибирующее действие на связывание оказывал карбоксиатрактилозид по сравнению с контрольными необработанными митохондриями.

Предобработка трипсином не влияла на спектр белков в случае двуцепочечного фрагмента ДНК, но для одноцепочечного субстрата приводила к появлению низкомолекулярного белка, что, вероятно, свидетельствует о рецептор-опосредованном механизме транспорта одноцепочечных олигонуклеотидов.

Как следует из полученных результатов, механизм связывания олигонуклеотидов с белками митохондриальных мембран *S. tuberosum* существенно отличается в зависимости от структуры. Исходя из полученных в экспериментах с использованием подхода аффинной модификации реакционноспособными ОДН данных, можно предположить, что связывание двуцепочечных фрагментов ДНК небольшого размера (20 п.н.) происходит без начального этапа взаимодействия с поверхностными рецепторными белками наружной мембраны митохондрий, что было также показано нами для транспорта двуцепочечных фрагментов ДНК малой длины (109 – 269 п.н.) с использованием ПЦР-РВ анализа.

### **3.2.7. Изучение влияния микросомальной фракции на импорт ДНК в реконструированной модельной системе**

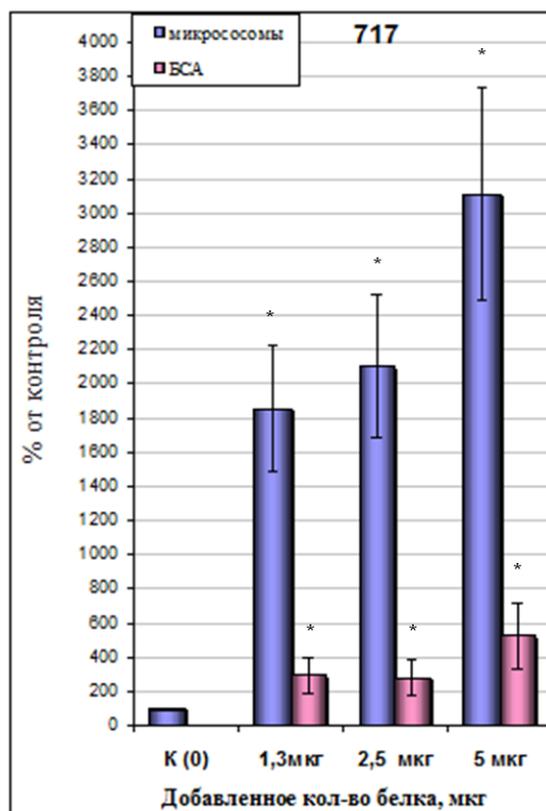
Феномен митохондриального транспорта ДНК был выявлен и продолжает изучаться в основном на уровне изолированных органелл. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в изучении механизма импорта ДНК с использованием данной модельной системы, ранее в исследованиях не предпринималось попыток изучить влияние тесных внутриклеточных контактов митохондрий с другими органеллами, имеющими место *in vivo* (Camara et al., 2010; Elbaz и Schuldiner, 2011). Обнаружено, что порин (VDAC), митофьюзины (англ. mitofusins) и белок IP<sub>3</sub>R (англ. inositol triphosphate receptor) обеспечивают специфические взаимодействия между митохондриями и ЭР в клетках животных (de Brito и Scorrano, 2008; Merlwirth и Langer, 2008; Szabadkai и Duchon, 2008). Структурные взаимодействия митохондрий и ЭР оказывают значительное влияние на морфологию митохондрий, процессы слияния и деления митохондрий, репликацию мтДНК, передачу различного рода сигналов и разнообразных ионов (в особенности ионов кальция), а также импорт белков и фосфолипидов в митохондрии (Kornmann et al., 2009, 2010; Wiedemann et al., 2009).

В данной работе впервые была предпринята попытка осуществить реконструкцию внутриклеточных взаимодействий митохондрий и

эндоплазматического ретикулума с целью изучения влияния мембран ЭР на импорт ДНК. Для этого импорт ДНК в системе *in organello* проводили в присутствии общей микросомальной фракции (фрагментированных мембран ЭР). Ранее подобный способ реконструкции внутриклеточных взаимодействий между митохондриями и ЭР был использован для изучения транспорта липидов в изолированные митохондрии дрожжей и млекопитающих (Kuchler et al., 1986; Simbeni et al., 1990; Vance et al., 1990; Achleitner et al., 1999; Emoto et al., 1999).

Для инкубации с митохондриями картофеля использовали фрагмент ДНК размером 717 п.н., включающий в себя последовательность гена *GFP*.

Микросомальную фракцию получали путем центрифугирования постмитохондриального супернатанта при 100000 g. Для контроля специфичности влияния белков микросомальной фракции на импорт ДНК использовали идентичное количество бычьего сывороточного альбумина (БСА). Импорт ДНК в митохондрии картофеля (для экспериментов использовали стандартное количество – 200 мкг митохондриального белка в каждой пробе) проводили в присутствии увеличивающегося количества белков микросомальной фракции (1,3; 2,5 и 5 мкг).

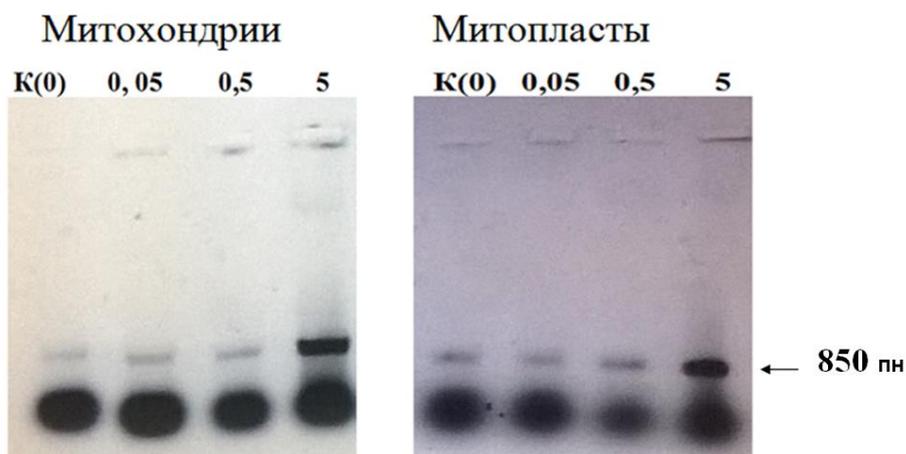


**Рисунок 25. Импорт ДНК в изолированные митохондрии *S. tuberosum* в присутствии белков микросомальной фракции.** На графике представлены результаты анализа эффективности импорта фрагмента ДНК длиной 717 п.н. в присутствии белков нативной микросомальной фракции (1,3; 2,5 и 5 мкг) и БСА. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. \* – различия между контролем и исследуемым вариантом статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Нами был обнаружен значительный стимулирующий эффект микросомальной фракции на активность импорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля (рис. 25). Добавление в среду инкубации БСА также приводило к определенной активации импорта ДНК, в особенности, при тестировании в экспериментах максимального количества белка (5 мкг) стимулирующий эффект составлял 3 – 4 раза. Однако белки нативной микросомальной фракции оказывали на импорт ДНК намного более значительный стимулирующий эффект (рис. 25). Степень активации импорта была пропорциональна количеству белков этой фракции:

присутствие 1,3 – 2,5 мкг микросомальных белков в среде инкубации усиливало импорт ДНК в среднем в 18 – 20 раз, а 5 мкг – в 30 раз.

Эксперименты по реконструкции внутриклеточных взаимодействий митохондрий и ЭР проводили также с использованием флуоресцентно меченого фрагмента ДНК размером 850 п.н. (рис. 26). Присутствие нативной микросомальной фракции (для экспериментов использовали концентрации 0,05; 0,5; 5 мкг белка) вызывало повышение эффективности транспорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля по сравнению с контролем. Для того, чтобы оценить эффективность транспорта ДНК через внутреннюю мембрану, мы получали митопласты, подвергая митохондрии после импорта осмотическому шоку 5 мМ фосфатом калия, с последующей обработкой ДНКазой. Присутствие 5 мкг белков микросомальной фракции в среде инкубации оказывало активирующий эффект на импорт субстрата размером 850 п.н., при этом сходное количество ДНК было детектировано в образцах, полученных как из митохондрий, так и из митопластов, что указывает на то, что стимуляция импорта белками ЭР способствует проникновению ДНК через обе митохондриальные мембраны.



**Рисунок 26.** Анализ импорта ДНК в митохондрии и митопласты *S. tuberosum* в присутствии белков микросомальной фракции. Импорт флуоресцентно меченой ДНК (850 п.н.) в изолированные митохондрии картофеля проводили в присутствии белков общей микросомальной фракции: К (0) – контроль (без белков микросомальной фракции); 0,05; 0,5; 5 – с добавлением соответствующего количества белков микросомальной фракции (в мкг).

Как было показано ранее, импорт фрагментов ДНК данной длины (717 – 850 п.н.) происходит преимущественно с участием АНТ и порина, а также белков, выполняющих рецепторную функцию. Однако на основании данных экспериментов можно предположить, что помимо митохондриальных белков в процессе импорта ДНК в митохондрии растений, вероятно, могут участвовать также и белки эндоплазматического ретикулума.

По данным предыдущих исследований было известно, что изолированные митохондрии растений обладают способностью импортировать молекулы ДНК без участия каких-либо кофакторов цитозольного происхождения. В растениях состав подобных структурно-функциональных белковых комплексов между ЭР и митохондриями пока не идентифицирован, однако предполагается их существование (Murtha et al., 2014; Корес et al., 2010). Несмотря на то, что в настоящее время практически отсутствует информация о составе этих белковых комплексов в растениях, можно предположить, что в растительной клетке действительно существуют определенные взаимодействия в зонах контакта двух мембранных структур, и что эти сайты участвуют в процессах обмена между ЭР и митохондриями различных метаболитов, белков, мембранных липидов, а также, не исключено, ДНК. Следует отметить, что данный подход реконструкции внутриклеточных взаимодействий и проведение дальнейших исследований с его помощью могут способствовать более глубокому пониманию механизма транспорта ДНК в митохондрии, который, вероятно, также происходит *in vivo*.

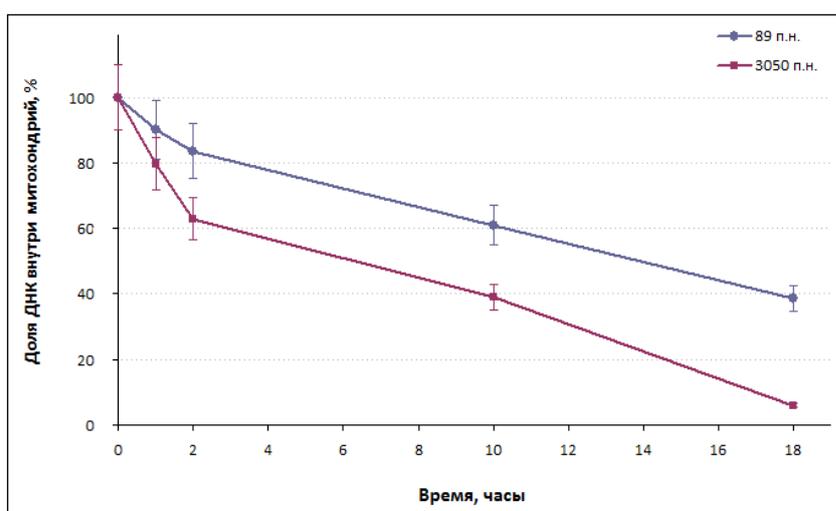
### **3.2.8. Выход импортированной ДНК из митохондрий картофеля (экспорт ДНК)**

Помимо изучения механизмов импорта ДНК в митохондрии картофеля мы предприняли попытку выявить с использованием подхода количественной ПЦР обратный процесс, т.е. выход импортированной ДНК из митохондрий или «экспорт» ДНК.

Для этого сначала проводили импорт ДНК в стандартных условиях, а далее, после обработки ДНКазой и отмывки, инкубировали изолированные митохондрии

определенное время в стандартных условиях. Для импорта были использованы два субстрата: ампликон LINE1 размером в 89 п.н. (фрагмента повтора *LINE1* человека (GenBank AC225821.2 (9599 – 9687)) и линейаризованная рекомбинантная плазида рBluescript II KS (+) размером 3050 п.н., которая содержала в своем составе в качестве вставки последовательность LINE1. Как видно из представленных на рисунке 27 данных, характер экспорта малых и средних субстратов различается. Так, после 18 часов инкубации субстрат длиной 3050 п.н. практически полностью экспортируется из митохондрий картофеля, в то время как около 40% малого фрагмента (89 п.н.) остается внутри митохондрий.

Наблюдаемый эффект может определяться низкой константой связывания средних фрагментов ДНК с митохондриальными белками растений, что и позволяет средним фрагментам более эффективно транспортироваться из растворов с низкой концентрацией. Также нельзя исключить вероятность того, что, как и в импорте, так и в экспорте ДНК в зависимости от длины субстрата могут принимать участие различные белки. Как следует из полученных результатов, транспорт малого субстрата размером 89 п.н., по всей вероятности, в меньшей степени зависит от эффективности связывания с белками, выполняющими транспортную функцию, и определяется только концентрацией ДНК в среде инкубации.



**Рисунок 27. Временная зависимость экспорта ДНК из изолированных митохондрий картофеля.** Данные представлены в виде процентного отношения количества ДНК внутри

митохондрий после инкубации от количества в нулевой момент времени. Анализ активности экспорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

С использованием метода количественной ПЦР мы впервые показали, что импорт ДНК в изолированные митохондрии растений является обратимым процессом и, вероятно, существует определенное динамическое равновесие между импортом и экспортом ДНК в изолированные митохондрии растений. Следует отметить, что подход ПЦР-РВ – единственный способ анализа для выявления событий митохондриального экспорта ДНК, поскольку использование в экспериментах радиоактивно меченых субстратов из-за низкой чувствительности данного метода анализа оказалось малоинформативным.

Согласно современным представлениям, различные изменения активности транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии могут играть важную роль в возникновении болезней и старения при изменении физиологического состояния организма. Выявлены многочисленные случаи выхода фрагментов митохондриальной ДНК из митохондрий мыши, связанные с открытием поры МРТР под влиянием избыточного накопления кальция в органеллах (Patrushev et al., 2004, 2006; García и Chávez, 2007).

В настоящее время выявлено, что в ходе эволюционного процесса значительная часть митохондриальных генов растений была перемещена в ядерный геном (Gray, 1992; Martin, 2003). Благодаря многочисленным исследованиям в ядерном геноме растений были идентифицированы значительные количества вставок митохондриальной ДНК (англ. NUMT – nuclear mitochondrial DNA)(Richly и Leister, 2004). Предполагается, что этот процесс внутриклеточного переноса генетической информации из митохондрий в ядро незакончен и продолжается в настоящее время.

В данной работе впервые показана возможность выхода из интактных митохондрий гетерологичной ДНК, предварительно поглощенной изолированными митохондриями картофеля. При этом мы исходим из гипотезы

об обратимости импорта ДНК в митохондрии, поскольку одним из вероятных биологических назначений этого процесса может быть обмен генетическим материалом между отдельными митохондриями в клетке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проводимых ранее работах по изучению импорта ДНК в растительные митохондрии (Константинов и др, 1989; Koulintchenko et al., 2003) в качестве субстратов преимущественно использовались бактериальные плазмиды серии pBR и линейная митохондриальная плазида кукурузы 2,3 т.п.н. В настоящей работе впервые была предпринята попытка детально охарактеризовать импорт существенно расширенного набора субстратов, условно разделенных нами на группы ДНК малой (100 – 500 п.н.), средней (700 – 3000 п.н.) и большой длины ( $\geq 3500$  п.н.). В пользу актуальности исследования особенностей импорта в митохондрии ДНК таких размерных классов в настоящее время свидетельствуют результаты определения размеров вставок чужеродного происхождения в митохондриальный геном высших растений, варьирующих по размеру от 62 п.н. до 9106 п.н. и более (Goremykin et al., 2009), а также наличие в митохондриях целого ряда высших растений видоспецифического набора кольцевых и линейных митохондриальных плазмид длиной от 750 п.н. до 13500 п.н. (Koulintchenko et al., 2012), которыми эти органеллы *in vivo* вероятно обмениваются друг с другом. В связи с этим в настоящей работе с использованием количественной ПЦР проведено комплексное исследование механизмов импорта молекул ДНК разной длины в изолированные митохондрии картофеля. На основании полученных данных предположено, что процесс связывания и транслокации ДНК через митохондриальные мембраны растений отличается в зависимости от длины импортируемого фрагмента ДНК.

С использованием ингибиторного анализа впервые показано (табл. 6), что транспорт малых модельных фрагментов ДНК ( $\leq 300$  п.н.) может эффективно осуществляться с участием некоторых пока еще не идентифицированных белковых переносчиков внутренней и внешней мембраны митохондрий растений. В то же время транспорт фрагментов ДНК средней длины (700 – 3000 т.п.н.) происходит с участием митохондриального порина, адениннуклеотидтрансферазы и рецепторных белков.

В работе впервые продемонстрировано участие в процессе импорта ДНК в митохондрии недавно открытого переносчика адениннуклеотидов ADNT1. Как следует из полученных в работе данных, переносчик ADNT1 участвует, по всей вероятности, в импорте ДНК любой длины (табл. 6).

Таким образом, получены данные о существовании множественных путей переноса ДНК разной длины в митохондрии растений. ДНК малой (100 – 500 п.н.), средней (700 – 3000 п.н.) и большой длины ( $\geq 3500$  п.н.) импортируется в митохондрии растений частично перекрывающимися, но не совпадающими полностью путями.

В системе изолированных митохондрий картофеля впервые была показана возможность выхода (экспорта) импортированной ДНК малой и средней длины. Существование контролируемого механизма выхода ДНК, по всей вероятности, может рассматриваться как процесс, обеспечивающий перенос генетической информации как между отдельными митохондриями в клетке, так и механизм появления сайтов интеграции митохондриальных последовательностей в ядерном геноме.

В целом, полученные в работе новые сведения, характеризующие мембранные механизмы импорта ДНК разной длины в митохондрии представляют не только теоретический интерес, но важное прикладное значение, поскольку должны учитываться при создании клеточных технологий направленной доставки генетических конструкций в эти органеллы в условиях *in vivo*. Неразрешимой пока для высших растений проблемой, при решении которой можно использовать природную компетентность митохондрий к поглощению ДНК, является разработка эффективного метода генетической трансформации митохондрий. Данный метод можно будет использовать как для клонирования целевых генов в этих органеллах, так и создания новых типов ЦМС. Одним из очевидных преимуществ создания трансмитохондриомных растений является возможность жесткого контроля их распространения во внешней среде.

**Таблица 6. Анализ механизма импорта ДНК разных размерных групп с использованием ингибиторного анализа**

Белки	Ингибиторы	Фрагменты ДНК, п.н.										
		109	269	350	450	507	667	717	1540	2732	3700	6000
<b>VDAC</b>	<b>RuR</b>	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑
<b>ANT</b>	<b>ATR</b>	≈	≈	↓	↓	↓	↓	↓	↓	н.о.	↓	↓
	<b>CATR</b>	≈	≈	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>ADNT1</b>	<b>PLP</b>	↓	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	↓	н.о.	н.о.	н.о.
	<b>TAN</b>	↓	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	↓	н.о.	н.о.	н.о.
<b>Белки-рецепторы</b>	<b>Протеиназа К</b>	≈	≈	↓	↓	↓	↓	↓	↓	н.о.	↓	↓

≈ – нет эффекта; ↓ – снижение; ↑ – активация; н.о. – не определяли;

**RuR** – рутений красный; **ATR** – атрактилозид; **CATR** – карбоксиатрактилозид;

**PLP** – пиридоксаль-5-фосфат; **TAN** – танниновая кислота.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан высокочувствительный метод определения активности импорта ДНК в изолированные митохондрии с помощью количественной ПЦР, позволяющий проводить кинетические исследования переноса ДНК в эти органеллы.
2. С использованием конкурентного ингибирования показано, что транспорт молекул ДНК малой ( $\leq 100$  п.н.) и средней ( $\leq 3000$  п.н.) длины в митохондрии происходит с участием ДНК-проводящих мембранных каналов, образуемых разными белками-переносчиками.
3. Установлена важная роль поверхностных белков, VDAC во внешней и ANT во внутренней митохондриальных мембранах, в импорте ДНК длиной от 700 до 3000 п.н., импорт ДНК других размерных классов может происходить с участием других мембранных белков.

4. Локализованный во внутренней митохондриальной мембране белок-переносчик ADNT1 может принимать участие в импорте молекул ДНК как малой (109 п.н.), так и средней (1540 п.н.) длины.
5. Мембраны микросомальной фракции оказывают стимулирующее влияние на импорт ДНК средней длины (700 – 850 п.н.) в митохондрии, что может служить указанием на вероятные взаимодействия этих органелл при транспорте нуклеиновых кислот в митохондрии *in vivo*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брызгунова, О.Е. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции / О.Е. Брызгунова, П.П. Лактионов // Биомедицинская химия. – 2015. – т. 61(4). – с. 409-426.
2. Зоров Д.Б. Митохондриальный транспорт нуклеиновых кислот. Участие бензодиазепинового рецептора / Д.Б. Зоров // Биохимия. – 1996. – т. 61. – с. 1320-1332.
3. Елисеев, А.А. Регуляция биосинтеза тетрапирролов и изопреноидов интегральными мембранными рецепторами семейства МБР/TspO / А.А. Елисеев // Успехи биологической химии. – 2003. – т. 43. – с. 329-364.
4. Константинов, Ю.М. Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды рBR322 в изолированных митохондриях кукурузы / Ю.М. Константинов, В.А. Подсосонный, Г.Н. Луценко // Доклады АН СССР. – 1988. – т. 298. – с. 502-504.
5. Константинов, Ю.М. Транслокация бактериальных векторных плазмид в митохондрии проростков кукурузы / Ю.М. Константинов, В.А. Подсосонный, Г.Н. Луценко и др. // Биохимия. – 1989. – т. 54. – с. 154-158.
6. Плотников, Е.Ю. Межклеточный транспорт митохондрий / Е. Ю. Плотников, В.А. Бабенко, Д.Н. Силачев и др. // Биохимия. – 2015. – т. 80. – с. 642-650.
7. Ходырева, С.Н. Аффинная модификация в протеомном исследовании ансамблей репарации ДНК / С.Н. Ходырева, О.И. Лаврик // Биоорганическая химия. – 2011. – т. 32. – с. 91-107.
8. Achleitner, G. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact / G. Achleitner, B. Gaigg, A. Krasser et al. // Eur J Biochem. – 1999. – V. 264. – P. 545-553.
9. Adams, K.L. Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial cox2 genes in legumes / K.L. Adams, K.

- Song, P.G. Roessler et al. // Proc Natl Sci USA. – 1999. – V. 96 (24). – P. 13863-13868.
10. Allen, J.O. Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize / J.O. Allen, C.M. Fauron, P.Minx et al. // Genetics. – 2007. – V. 177. – P. 1173-1192.
  11. Anderson, S. Sequence and organization of the human mitochondrial genome / S. Anderson, A.T. Bankier, A.T. Barrell B.G. et al. // Nature. – 1981. – V. 290. – P. 457-465.
  12. Andersson-Ceplitis, H. Evolutionary dynamics of mitochondrial plasmids in natural populations of *Silene vulgaris* / H. Andersson-Ceplitis // Evolution. – 2002. – V. 56. – P. 1592-1598.
  13. Backert, S. Unique features of the mitochondrial rolling circle-plasmid mp1 from the higher plant *Chenopodium album* (L.) / S. Backert, K. Meissner, T. Borner et al. // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25. – P. 582-589.
  14. Backert, S. In vitro replication of mitochondrial plasmid mp1 from the higher plant *Chenopodium album* (L.): a remnant of bacterial rolling circle and conjugative plasmids? / S. Backert, M. Kunnimalaiyaan, T. Borner et al. // J. Mol. Biol. – 1998. – V. 284. – P. 1005-1015.
  15. Bengtsson, B.O. The population genetics of plant mitochondrial plasmids / B.O. Bengtsson, H. Andersson // J. Theor. Biol. – 1997. – V.188. – P. 163-176.
  16. Bergthorsson, U. Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants / U. Bergthorsson, K.L. Adams, B. Thomason et al. // Nature. – 2003. – V. 424. – P. 197-201.
  17. Bergthorsson, U. Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella* / U. Bergthorsson, A.O. Richardson, G.J. Young et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. – V. 101. – P.17747-17752.
  18. Bendich, A.J. Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure / A.J. Bendich // Curr. Genet. – 1993. – V. 24. – P. 564-588.

19. Betaneli, V. The role of lipids in VDAC oligomerization / V. Betaneli, E. P.Petrov, P. Schwille // *Biophys J.* – 2012. – V. 102(3). – P. 523-531.
20. Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection/ P. Bernardi, F. Di Lisa // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* – 2015 – V. 78. – P. 100-106.
21. 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. – P. 5690-5700.
22. 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 – P. 1478-1488.
23. Bolle, N. Plastid mRNAs are neither spliced nor edited in maize and cauliflower mitochondrial *in organello* systems / N. Bolle, I. Hinrichsen, F. Kempken // *RNA.* – 2007. – V. 13. – P. 2061-2065.
24. 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. – P.248-254.
25. Brennicke, A. The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of gene transfer in higher plants / A. Brennicke, L. Grohmann, R. Hiesel et al. // *FEBS Letters.* – 1993. – V. 325. – P. 140-145.
26. de Brito, O.M. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria / O.M. de Brito, L. Scorrano // *Nature.* – 2008. – V. 456(7222). – P. 605-610.
27. Brown, R.H. Mitochondrial plasmids: DNA and RNA. *The Molecular Biology of Plant Mitochondria* / R.H. Brown, M. Zhang // Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. – 1995. – P. 61-91.
28. Camara, A. Potential Therapeutic Benefits of Strategies Directed to Mitochondria / A. Camara, E. J. Lesnefsky, D.F. Stowe // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – V. 13. – P. 279-347.
29. De la Canal, L. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a mitochondrial plasmid from a cytoplasmic male-sterile line of sunflower / L. de la

- Canal, D. Crouzillat, M.C. Flamand et al. // Theor. Appl. Genet. – 1991. – V. 81. – P. 812-818.
30. Cappadocia, L. Crystal structures of DNA Whirly complexes and their role in Arabidopsis organelle genome repair / L. Cappadocia, A. Marechal, J.S. Parent et al. // Plant Cell. – 2010. – V. 22. – P. 1849-1867.
31. Chang, D. D. A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA / D.D. Chang, D.A. Clayton // Science. – 1987. – V. 235. – P. 1178-1184.
32. Choury, D. Different patterns in the recognition of editing sites in plant mitochondria / D. Choury, J.C.Farre, X. Jordana et al. // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32. – P. 6397-6406.
33. Choury, D. Gene expression studies in isolated mitochondria: *Solanum tuberosum* rps10 is recognized by cognate potato but not by the transcription, splicing and editing machinery of wheat mitochondria / D. Choury, J.C. Farre, X. Jordana et al. // Nucleic Acids Res. – 2005. – V. 33. – P. 7058-7065.
34. Chelobanov, B.P. Isolation of nucleic acid binding proteins: an approach for isolation of cell surface, nucleic acid binding proteins / B.P. Chelobanov, P. P. Laktionov, M.V. Kharkova et al. // Ann N Y Acad Sci. – 2004.– V. 1022. – P. 239-243.
35. Clark, M.A. Mitochondrial transformation of mammalian cells / M.A. Clark, J.W. Shay // Nature. – 1982. – V. 295. – P. 605-607.
36. Collombet, J.M. Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. A novel approach toward gene correction for mitochondrial disorders / J.M. Collombet, V.C. Wheeler, F. Vogel et al. // J Biol Chem. – 1997. – V. 272. – P. 5342-5347.
37. Comte, C. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome / C. Comte, Y. Tonin, A.M. Heckel-Mager et al. // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – P. 418-433.

38. Covello, P.S. Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome C oxidase (*cox 2*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer / P.S. Covello, M.W. Gray // *The EMBO J.* – 1992. – V.11. – P. 3815-3820.
39. Davila, J.M. Double-strand break repair processes drive evolution of the mitochondrial genome in *Arabidopsis* / J.M. Davila, M.P. Arrieta-Montiel, Y. Wambold et al. // *BMC Biol.* – 2011. – V.9. – P. 64-68.
40. Delage, L. The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA(Val) import into mitochondria / L. Delage, A. M. Duchêne, M. Zaepfel et al. // *The Plant Journal.* – 2003. – V. 34. – P. 623-633.
41. Delage, L. In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum* / L. Delage, A. Dietrich, A. Cosset et al. // *Molecular and Cellular Biology.* – 2003. – V. 23. – P. 4000-4012.
42. Dietrich, A. Organellar non-coding RNAs: Emerging regulation mechanisms / A. Dietrich, C. Wallet, R.K. Iqbal, J.M. Gualberto et al. // *Biochimie.* – 2015. – V.117. – P. 48-62.
43. Doersen, C.J. Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity / C.J. Doersen, C. Guerrier-Takada, S. Altman et al. // *J. Biol. Chem.* – 1985. – V. 260. – P. 5942-5949.
44. D'Souza, G.G. DQAsome-mediated delivery of plasmid DNA toward mitochondria in living cells / G.G. D'Souza, R. Rammohan, S.M. Cheng et al. // *J Control Release.* – 2003. – V. 92. – P.189-197.
45. 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(3). – P. 1093-113.

46. Duncan, O. In vitro and in vivo protein uptake studies in plant mitochondria / O. Duncan, C. Carrie, Y. Wang et al. // *Methods in Molecular Biology* (Clifton N. J). – 2015. – V. 1305. – P. 61-81.
47. Duroc, Y. Nuclear expression of a cytoplasmic male sterility gene modifies mitochondrial morphology in yeast and plant cells / Y. Duroc, C. Gaillard, S. Hiard et al. // *Plant Sci.* – 2006. – V. 170. – P. 755-767.
48. Douce, R. The uniqueness of plant mitochondria / R. Douce, M. Neuburger // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1989. – V. 40. – P. 371-414.
49. Elbaz, Y. Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites / Y. Elbaz, M. Schuldiner // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2011. – V. 36. – P. 616-623.
50. Emoto, K. Isolation of a chinese hamster ovary cell mutant defective in intramitochondrial transport of phosphatidylserine / K. Emoto, O. Kuge, M. Nishijima et al. // *Proc Natl Acad Sci.* – 1999. – V.96. – P.12400-12405.
51. Erickson, L. The Brassica mitochondrial plasmid can be sexually transmitted. Pollen transfer of a cytoplasmic genetic element / L. Erickson, R. Kemble, E. Swanson // *Mol. Gen. Genet.* – 1989. – V. 218. – P. 419-422.
52. Esser, K. Plasmids of of Eukaryotes *Fundamentals and applications/* K. Esser // *Heidelberg Science Library.* – 1986. – P. 342.
53. Farré, J.C. RNA splicing in higher plant mitochondria: determination of functional elements in group II intron from a chimeric cox II gene in electroporated wheat mitochondria / J.C. Farré, A. Araya // *Plant J.* – 2002. – V. 29. – P. 203-213.
54. 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. – P. 913-923.
55. Flamand, M.C. Variant mitochondrial plasmids of broad bean arose by recombination and are controlled by the nuclear genome / M.C. Flamand, G. Duc, J.P. Goblet et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – V. 21. – P. 5468-5473.

56. Flierl, A. Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment *via* import sequence-conjugated peptide nucleic acid / A. Flierl, C. Jackson, B.Cottrell et al. // *Mol Ther.* – 2003. – V. 7. – P. 550-557.
57. Fox, T.D. Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA / T.D. Fox, J.C. Sanford, T.W. McMullin // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1988. – V. 85. – P. 7288-7292.
58. Gahan, P.B. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments / P.B. Gahan, R. Swaminathan // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 2008. –V. 1137. – P. 1-6.
59. Gahan, P. Circulating nucleic acids: possible inherited effects / *Biological Journal of the Linnean Society.* – 2013. –V. 110. – P. 931-948.
60. García, N. Mitochondrial DNA fragments released through the permeability transition pore correspond to specific gene size / N. García, E. Chávez // *Life Sciences.* – 2007. – V. 81. – P. 1160-1166.
61. Goremykin, V.V. Mitochondrial DNA of *Vitis vinifera* and the issue of rampant horizontal gene transfer / V.V. Goremykin, F. Salamimi, R. Velascoand et al. // *Molecular Biology and Evolution.* – 2009. –V. 26. – P. 99-110.
62. Grace, K.S. R-type plasmids in mitochondria from a single source of *Zea luxurians* teosinte / K.S. Grace, J.O. Allen, K.J. Newton // *Curr. Genet.* – V. 25. – P. 258-264.
63. Gray, M.W. The endosymbiont hypothesis revisited / M.W. Gray // *International Review of Cytology.* – 1992. –V. 141. – P. 233-357.
64. Gualberto, J.M. The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance / J.M. Gualberto, D. Milesina, C. Wallet et al. // *Biochimie.* – 2013. – V.100. – P. 107-120.
65. 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. // *The Plant Journal.* – 2009. – V.60. – P. 242-256.
66. Halestrap, A.P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury / A.P. Halestrap, A.P.

- Richardson // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2015. – V.78. – P. 129-141.
67. 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. – P. 797-805.
68. Handa, H. Linear plasmids in plant mitochondria: peaceful coexistences or malicious invasions? / Handa H. // *Mitochondrion*. – 2008. – V. 8. – P. 15-25.
69. Handa, H. The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.) comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana* / Handa H. // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V.31. – P. 5907-5916.
70. Hallden, C. Minicircle variation in Beta mitochondrial DNA / C. Hallden, C. Lind, T. Bryngelsson // *Theor. Appl. Genet.* – 1989. – V.77. – P. 337-342.
71. Hanson, M.R. Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lesson from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in Plants / M.R. Hanson, M.F. Conde // *Intern. Rev. Cytol.* – 1985. – V. 94. – P. 213-267.
72. Heins, L. Biochemical, molecular and functional characterization of porin isoforms from potato mitochondria / L. Heins, H. Mentzel, A. Schmid et al. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 26402-26410.
73. Hoogenboom, B.W. The supramolecular assemblies of voltage-dependent anion channels in the native membrane / B.W. Hoogenboom, K. Suda, A. Engel et al. // *J Mol Biol.* – 2007. – V. 370. – P. 246-255.
74. 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. – P. 2871-2882.
75. Israelson, A. Mapping the ruthenium red-binding site of the voltage-dependent anion channel-1 / A. Israelson, H. Zaid, S. Abu-Hamad, E. Nahon et al. // *Cell Calcium*. – 2008. – V. 43. – P. 196-204.
76. Kamenski, P. tRNA mitochondrial import in yeast: Mapping of the import determinants in the carrier protein, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA

- synthetase / P. Kamenski, E. Smirnova, O. Kolesnikova et al. // *Mitochondrion*. – 2010. – V. 10. – P. 284-293.
77. Katrangi, E. Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human rho0 cells can improve respiratory function / E. Katrangi, G. D'Souza, S.V. Boddapati et al. // *Rejuvenation Res.* – 2007. – V. 10. – P. 561-570.
78. Keeney, P.M. Mitochondrial gene therapy augments mitochondrial physiology in a Parkinson's disease cell model / P.M. Keeney, C.K. Quigley, L.D. Dunham et al. // *Hum Gene Ther.* – 2009. – V. 20. – P. 897-907.
79. Keinan, N. Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis / N. Keinan, D. Tyomkin, V. Shoshan-Barmatz // *Molecular and Cellular Biology*. – 2010. – V. 30. – P. 5698-5709.
80. 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. – P. 1745-1754.
81. 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. – P. 183-185.
82. Khan, S.M. Development of mitochondrial gene replacement therapy / S.M. Khan, J.P. Bennett // *J Bioenerg Biomembr.* – 2004. – V. 36. – P. 387-393.
83. King, M.P. Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes / M.P. King, Y. Koga, M. Davidson et al. // *Mol Cell Biol.* – 1992. – V. 12. – P. 480-490.
84. 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. – P. 447-455.

85. Kleine, T. DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis / T. Kleine, U. G. Maier, D. Leister // *Annual Review of Plant Biology*. – 2009. – V. 60. – P. 115-138.
86. Klingenberg, M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – V. 1778. – P. 1978-2021.
87. Kokoszka, J.E. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore / J.E. Kokoszka, K.G. Waymire, S.E. Levy et al. // *Nature*. – 2004. – V. 427 – P. 461-465.
88. Konstantinov, Y.M. Inhibition of adenine nucleotide translocation in maize seedling mitochondria by anionic detergents / Y.M. Konstantinov, V.A. Podsozny, G.N. Lutcenko // *Physiol. Plantarum*. – 1988. – V. 72. – P. 403-406.
89. Kopec, K.O. Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria / K.O. Kopec, V. Alva, A. N. Lupas // *Bioinformatics*. – 2010. – V. 26. – P. 1927-1931.
90. Kornmann, B. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology / B. Kornmann, P. Walter // *J Cell Sci*. – 2010. – V. 123. – P. 1389-1393.
91. Kornmann, B. An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen / B. Kornmann, E. Currie, S. R. Collins et al. // *Science*. – 2009. – V. 325. – P. 477-481.
92. Koulintchenko, M. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex / M. Koulintchenko, Y. Konstantinov, A. Dietrich // *EMBO J*. – 2003. – V. 22. – P. 1245-1254.
93. Koulintchenko, M. Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression / M. Koulintchenko, R.J. Temperley, P.A. Mason, A. Dietrich et al. // *Hum. Mol. Genet*. – 2006. – V. 15. – P. 143-154.
94. Koulintchenko, M. Mitochondrial genetic transformation via biotechnological approaches or natural competence mechanism: do we have a choice? / M.V.

- Koulintchenko, A. Dietrich, Yu.M. Konstantinov // Biopolymers and Cell. – 2012. – P. 261-266.
95. Kubo, T. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations / T. Kubo, K.J. Newton // Mitochondrion. – 2008. – V. 8. – P. 5-14.
  96. Kubo, T. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA<sup>cys</sup>(GCA) / T. Kubo, S. Nishizawa, A. Sugawara et al. // Nucleic Acids Res. – 2000. – V. 28. – P. 2571-2576.
  97. Kucej, M. Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids / M. Kucej, R.A. Butow // Trends Cell Biol. – 2007. – V. 17. – P. 586-592.
  98. Kuchler, K. Subcellular and submitochondrial localization of phospholipid-synthesizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Kuchler, G. Daum, F. Paltauf et al. // J Bacteriol. – 1986. – V. 165. – P. 901-910.
  99. Kumar, P. An evolutionarily conserved mitochondrial *orf108* is associated with cytoplasmic male sterility in different alloplasmic lines of *Brassica juncea* and induces male sterility in transgenic *Arabidopsis thaliana* / P.Kumar, N. Vasupalli, R. Srinivasan // J Exp Bot. – 2012. – V. 63. – P. 2921-2932.
  100. Laktionov, P.P. Characterisation of membrane oligonucleotide-binding proteins and oligonucleotide uptake in keratinocytes / P.P. Laktionov, J.E. Dazard, E. Vives et al. // Nucleic Acids Res. – 1999. – V. 27. – P. 2315-2324.
  101. Laktionov, P.P. Cell surface oligonucleotide-binding proteins of human squamous carcinoma A431 cells / P.P. Laktionov, B.P. Chelobanov, M.V. Kharkova et al. // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2003. – V. 22. – P. 1715-1719.
  102. Leaver, G. Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. Annu. Rev / Leaver G., Gray H. // Plant Physiol. – 1982. – V. 33. – P. 390-395.
  103. 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. – P. 4089-4099.
  104. 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. – P. 61-67.
105. 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. U.S.A.* – 1983. – V. 80. – P. 4055-4059.
106. 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. – P. 723-733.
107. Lonsdale, D.M. The mitochondrial genome of plants / D.M. Lonsdale, J.M. Grienenberger // *Cell Organelles*, Springer-Verlag, New York. – 1992. – P. 181-218.
108. Ludwig, S.R. The nucleotide sequence of a mitochondrial replicon from maize / S.R.Ludwig, R.F. Pohlman, J. Vieira et al. // *Gene.* – 1985. – V. 38. – P. 131-138.
109. 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. – P. 495-502.
110. Martin, W. Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2003. – V. 100. – P. 8612-8614.
111. 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. – P. 459-470.
112. Merkwirth, C. Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria / C. Merkwirth Langer // *Cell.* – 2008. – V. 135. – P. 1165-1167.
113. Michaud, M. Macromolecules trafficking to plant mitochondria / M. Michaud, A.M. Duchêne // *Advances in Botanical Res.* – 2012. – V. 63. – P. 347-422.
114. Michaud, M. Targeting of cytosolic mRNA to mitochondria: naked RNA can bind to the mitochondrial surface / M. Michaud, L. Maréchal-Drouard, A.M. Duchêne // *Biochimie.* – 2014. – V. 100. – P. 159-166.

115. 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. – e115.
116. Mileshina, D. Mitochondrial transfection for studying organellar DNA repair genome maintenance and aging / D. Mileshina, N. Ibrahim, P. Boesch et al. // *Mech Ageing Dev*. – 2011. – V. 132. – P. 412-423.
117. Morciano, G. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury / G. Morciano, C. Giorgi, M. Bonora et al. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2015. – V. 78 – P. 142-153.
118. Mower, J.P. The role of horizontal transfer in shaping the plant mitochondrial genome / J.P. Mower, K. Jain, N.J. Hepburn // *Advances in Botanical Res*. – 2012. – V. 63. – P. 41-64.
119. Murcha, M.W. The plant mitochondrial protein import apparatus – The differences make it interesting / M.W. Murcha, Y. Wang, R. Narsai et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2014. – V. 1840. – P. 1233-1245.
120. Nagata, S. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis / S. Nagata, H. Nagase, K. Kawane et al. // *Cell Death and Differentiation*. – 2003. – V. 10. – P. 108-116.
121. 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. – P. 312-323.
122. Newman, S.M. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events / S.M. Newman, J.E. Boynton, N.W. Gillham N.W. et al. // *Genetics*. – 1990. – V. 126. – P. 875-888.
123. Newton, K.J. Involvement of S2 episomal sequences in the generation of NCS4 deletion mutation in maize mitochondria / K.J. Newton, J.M. Mariano, C.M. Gibson et al. // *Dev. Genet*. – 1996. – V. 19. – P. 277-286.

124. Niazi, A.K. Targeting nucleic acids into mitochondria: progress and prospects / A.K. Niazi, D. Mileshina, A. Cosset et al. // *Mitochondrion*. – 2013. – V. 13. – P. 548-558.
125. Noble, J.E. Quantion of protein / J.E. Noble, M.J. Bailey // *Methods in Enzymology*. – 2009. – V. 463. – P. 73-95.
126. Nugent, J.M. RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution / J.M. Nugent, J.D. Palmer // *Cell*. – 1991. – V. 66. – P. 473-481.
127. Ogihara, Y. Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome / Y. Ogihara, Y. Yamazaki, K. Murai et al. // *NucleicAcids Res.* – 2005. – V. 33. – P. 6235-6250.
128. Oshima, M. The identification of quantitative trait loci that control the paternal inheritance of a mitochondrial plasmid in rapeseed (*Brassica napus* L.) / M. Oshima, H. Handa // *Genes Genet. Syst.* – 2012. – V. 87. – P. 19-27.
129. 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. – P. 1125-1128.
130. Palmer, J.D. An unusual mitochondrial DNA plasmid in the genus *Brassica* / J.D. Palmer, C.R. Shields, D.B. Cohen et al. // *Nature* – V. 301. – P. 725-728.
131. Palmieri, L. Identification and Characterization of ADNT1, a Novel Mitochondrial Adenine Nucleotide Transporter from *Arabidopsis* / L. Palmieri, A. Santoro, F. Carrari et al. // *Plant Physiology* – 2008. – V. 148. – P. 1797-1808.
132. Palmieri, F. Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights / F. Palmieri, C.L. Pierri, A. De Grassi et al. // *The Plant Journal*. – 2011. – V. 66. – P. 161-181.
133. 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. Sci.* – 2006. – V. 27. – P. 402-409.

134. Patrushev, M. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments / M. Patrushev, V. Kasymov, V. Patrusheva et al. // Cell. Mol. Life Sci. – 2004. – V. 61. – P. 3100-3103.
135. Patrushev, M. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice / M. Patrushev, V. Kasymov, V. Patrusheva et al. // Mitochondrion. – 2006. – V. 6. – P. 43-47.
136. Peters, D.L. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA – a new paradigm in genetic behaviour / D.L. Peters, P.J. Pretorius // Clin Chim Acta. – 2011. – V.412 – P. 806-811.
137. 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. – P. 948-959.
138. Remacle, C. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes / C. Remacle, P. Cardol, N. Coosemans et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – V. 103. – P. 4771-4776.
139. Richly, E. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes / E. Richly, D. Leister // Molecular Biology and Evolution. – 2004. – V. 21. – P. 1081-1084.
140. 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. – P. 1468-1743.
141. Robison, M.M. A mitochondrial plasmid and plasmid-like RNA and DNA polymerases encoded within the mitochondrial genome of carrot (*Daucus carota* L.) / M.M. Robison, D.J. Wolyn // Curr. Genet. – 2005. – V. 47. – P. 57-66.
142. Rubio, M.A. Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles / M.A. Rubio, A.K. Hopper // Wiley Interdiscip Rev RNA. – 2011. – V. 2. – P. 802-817.
143. 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 Natl Acad Sci USA. – 2008. – V. 105. – P. 9186-9191.

144. Sakaguchi, K. Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses / K. Sakaguchi // *Microbiol. Rev.* – 1990. – V. 54. – P. 66-74.
145. Salinas, T. Sequence dependence of tRNA(Gly) import into tobacco mitochondria / T. Salinas, C. Schaeffer, L. Marechal-Drouard et al. // *Biochimie.* – 2005. – V. 87. – P. 863-872.
146. Salinas, T. The voltage-dependent anion channel a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria / T. Salinas, A.M. Duchêne, L. Delage et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2006. – V. 103. – P. 18362-18367.
147. Salinas, T. Molecular basis for the differential interaction of plant mitochondrial VDAC proteins with tRNAs / T. Salinas, S. El Farouk-Ameqrane, E. Ubrig et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – P. 9937-9948.
148. 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. – P. 181-186.
149. Schardl, C.L. Mitochondrial DNA rearrangements associated with fertile revertants of S-type male-sterile maize / C.L. Schardl, D.R. Pring, D.M. Lonsdale // *Cell.* – 1985. – V. 43. – P. 361-368.
150. Seibel, M. Processing of artificial peptide-DNA-conjugates by the mitochondrial intermediate peptidase (MIP) / M. Seibel, C. Bachmann, J. Schmiedel et al. // *Biol Chem.* – 1999. – V. 380. – P. 961-967.
151. Shahid Masood, M. The complete nucleotide sequence of wild rice (*Oryza nivara*) chloroplast genome: first genome wide comparative sequence analysis of wild and cultivated rice / M. Shahid Masood, T. Nishikawa, S. Fukuoka et al. // *Gene.* – 2004. – V. 340. – P. 133-139.
152. 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(6-7). – P. 1281-1291.
153. Shoshan-Barmatz, V. Oligomerization of the mitochondrial protein VDAC1: from structure to function and cancer therapy / V. Shoshan-Barmatz, D. Mizrachi, N. Keinan // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2013. – V. 117. – P. 303-334.
154. Sieber, F. A protein shuttle system to target RNA into mitochondria / F. Sieber, A. Placido, S. El Farouk-Ameqrane et al. // *Nucleic Acids Res*. – 2011. – V. 39. – e96.
155. Simbeni, R. Intramitochondrial transfer of phospholipids in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* / R. Simbeni, F. Paltauf, G. Daum // *J Biol Chem*. – 1990. – V. 265. – P. 281-285.
156. 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. – e1001241.
157. Smirnov, A. Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 S ribosomal RNA import into human mitochondria / A. Smirnov, C. Comte, A.M. Mager-Heckel et al. // *J Biol Chem*. – 2010. – V. 285(40). – P. 30792-30803.
158. 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. – P. 617-623.
159. Smith, D.R. Gene conversion shapes linear mitochondrial genome architecture / D.R. Smith, P.J. Keeling // *Genome Biol. Evol*. – 2013. – V. 5. – P. 905-912.
160. Staudinger, M. Electroporation of isolated higher-plant mitochondria: transcripts of an introduced *cox2* gene, but not an *atp6* gene, are edited *in organello* / Staudinger M., Kempken F. // *Mol Genet Genomics*. – 2003. – V. 269. – P. 553-561.
161. Stupar, R.M. Complex mtDNA constitutes an approximate 620-kb insertion on *Arabidopsis thaliana* chromosome 2: implication of potential sequencing errors

- caused by large-unit repeats / R.M. Stupar, J.W. Lilly // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98. – P. 5099-5103.
162. Sugiyama, Y. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants / Y. Sugiyama, Y. Watase, M. Nagase et al. // Mol. Genet. Genom. – 2005. – V. 272. – P. 603-615.
163. Svab, Z. Stable transformation of plastids in higher plants / Z. Svab, P. Hajdukiewicz, P. Maliga // Proc Natl Acad Sci USA. – 1990. – V. 87. – P. 8526-8530.
164. Szabadkai, G. Mitochondria: the hub of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling / G. Szabadkai, M.R. Duchon // Physiology – 2008. – V. 23. – P. 84-94.
165. Szabo, I. Double-stranded DNA can be translocated across a planar membrane containing purified mitochondrial porin / I. Szabo, G. Bathori, F. Tombola et al. // FASEB J. – 1998. – V. 12. – P. 495-502.
166. Takahashi, Y. The function of voltage-dependent anion channels in plant / Takahashi Y., Tateda C. // Apoptosis. – 2013. – V. 18. – P. 917-924.
167. 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. – P. 457-465.
168. 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. – P. 9353-9370.
169. Thomas, R.R. Recombinant human mitochondrial transcription factor A stimulates mitochondrial biogenesis and ATP synthesis, improves motor function after MPTP, reduces oxidative stress and increases survival after endotoxin / R.R. Thomas, S.M. Khan, F.R. Portell et al. // Mitochondrion. – 2011. – V. 11. – P. 108-118.
170. Timothy, D.H. Plasmid-like mitochondrial DNAs in Diploperennial teosinte / D.H. Timothy, C.S. Levings, W.L. Hu et al. // Maydica. – V. 28. – P. 139-149.

171. Tonin, Y. Modeling of antigenomitherapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA / Y. Tonin, A.M. Heckel, M. Vysokikh et al. // J. Biol. Chem.–2014. – V. 289. – P. 13323-13334.
172. 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. – P. 24-38.
173. Turpen, T. Molecular cloning and physical characterization of a Brassica linear mitochondrial plasmid / T. Turpen, S.J. Garger, M.D. Marks // Mol. Gen. Genet. – 1987. – V. 209. – P. 227-233.
174. Ueda, M. Translocation of a 190-kb mitochondrial fragment into rice chromosome 12 followed by the integration of four retrotransposons / M. Ueda, N. Tsutsumi, K. Kadowaki // International Journal of Biological Sciences. – 2005. – V. 1. – P. 110-113.
175. Ueda, M. Gene content and gene transfer from mitochondria to the nucleus during evolution / M. Ueda, K. Kadowaki // Advances in Botanical Res. – 2012. – V. 63. – P. 22-35.
176. 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. – P. 57-61.
177. Val, R. Organelle trafficking of chimeric ribozymes and genetic manipulation of mitochondria / R. Val, E. Wyszko, C. Valentin et al. // Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39. – P. 9262-9274.
178. Vance, J.E. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria / J.E. Vance // J Biol Chem. – 1990. – V. 265. – P. 7248-7256.
179. 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 // Journal of Experimental Botany. – 2011. – V. 62. – P. 497-508.

180. Vestweber, D. DNA-protein conjugates can enter mitochondria *via* the protein import pathway / D. Vestweber, G.Schatz // Nature. – 1989. – V. 338. – P. 170-172.
181. Vianello, A. The mitochondrial permeability transition pore (PTP) — an example of multiple molecular exaptation? / A. Vianello, V. Casolo, E. Petrusa et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – V. 1817. – P. 2072-2086.
182. Wahleithner, J.A. Origin and direction of replication in mitochondrial plasmid DNAs of broad bean, *Vicia faba* / J.A. Wahleithner, D.R Wolstenholme // Curr. Genet. – 1988. – V. 14. – P. 163-170.
183. Wahleithner, J.A. Mitochondrial plasmid DNAs of broad bean: nucleotide sequences, complex secondary structures, and transcription / J.A. Wahleithner, Wolstenholme D.R. // Curr. Genet. – 1987. – V. 12. – P. 55-67.
184. Warren, J.M. Plasmids and the rate of sequence evolution in plant mitochondrial genome / J.M. Warren, M.P. Simmons, Z. Wu et al.// Genome Biol. Evol. – 2016. – V. 8(2). – P. 364-374.
185. 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. – P. 320-327.
186. 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. – P. 3165-3181.
187. Wiedemann, N. Connecting Organelles / N. Wiedemann, C. Meisinger, N. Pfanner // Science. – 2009. – V. 325. – P. 403-404.
188. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation / A.H. Wyllie // Nature. – 1980. – V. 284. – P. 555-556.
189. Yoon, Y.G. Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in *Escherichia coli* and transfer into transcriptionally active mitochondria / Y.G. Yoon, M.D. Koob // Nucleic Acids Res. – 2003. – V. 31. – P. 1407-1415.

190. 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. – P. 386-392.
191. Zaid, H. The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death / H. Zaid, S. Abu-Hamad, A. Israelson et al. // *Cell Death and Differentiation.* – 2005. – V. 12. – P. 751-760.
192. Zalk, R. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria / R. Zalk, A. Israelson, E.S. Garty et al. // *Biochem J.* – 2005. – V. 386. – P. 73-83.
193. Zamzami, N. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens / N. Zamzami, G. Kroemer // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2001. – V. 2 – P. 67-71.
194. Zhou, J. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Candida glabrata* after mitochondrial transformation / J. Zhou, L. Liu, J. Chen // *Eukaryot Cell.* – 2010. – V. 9. – P. 806-814.
195. 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. – P. 10-15.
196. Szabo, I. Double-stranded DNA can be translocated across a planar membran containing purified mitochondrial porin / I. Szabo, G. Bathori, F. Tombola et al. // *FASEB J.* – 1998. – V. 12. – P. 495-502.