

На правах рукописи



КЛИМЕНКО Екатерина Сергеевна

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

03.01.05 физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2017

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель:

Константинов Юрий Михайлович
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Зоров Дмитрий Борисович
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского», заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий

Кирильчик Сергей Васильевич
кандидат биологических наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской Академии наук, руководитель группы эволюционной генетики

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук»

Защита диссертации состоится «20» апреля в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном Государственном бюджетном учреждении науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.

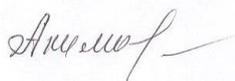
Факс (3952) 510-754; e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

Реферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 003.047.01,

кандидат биологических наук



Акимова Галина Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 митохондриях. 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 митохондриях 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 (≥ 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.

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 ПЦР в реальном времени, 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 (≤ 100 п.н.) и средней (≤ 1540 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования. В работе была использована модельная система *in organello*, позволяющая изучать механизм импорта ДНК в изолированные митохондрии растений (Koulintchenko et al., 2003).

Выделение митохондрий из клубней картофеля (*Solanum tuberosum*) осуществляли методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности перколла (Neuburger et al., 1982). Анализ функциональной активности изолированных митохондрий и определение дыхательного контроля проводили полярографическим методом с использованием платинового кислородного электрода и ячейки Oxytherm system («Hansatech»).

В качестве модельных субстратов импорта использовали амплифицированные с помощью ПЦР линейные двуцепочечные фрагменты ДНК различной длины (от 109 до 6000 п.н.). Для амплификации использовали генетические конструкции рСК/GFP/PRmt или рBsGFP. Все эти фрагменты содержали последовательности гена *GFP*.

Флуоресцентно меченые субстраты получали с помощью ПЦР, в качестве праймеров использовали два олигонуклеотида, содержащие на 5'-конце флуоресцирующую группу (Су3).

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 [α - 32 P]дЦТФ (3000 Ки/ммоль) как было описано ранее (Koulintchenko et al., 2003).

Импорт ДНК в митохондриях, изолированных из клубней картофеля, проводили согласно описанному ранее протоколу (Koulintchenko et al., 2003). Инкубацию митохондрий (200 мкг белка в одной пробе) с молекулами ДНК проводили в стандартных условиях (25°C при постоянном мягком покачивании) в течение 40 минут в 20 мкл буфера импорта, содержащего 0,4 М сахарозы, 40 мМ фосфата калия, pH 7,0. После инкубации митохондрии дважды отмывали от избытка ДНК в среде инкубации, затем ресуспендировали в исходном объеме буфера импорта и добавляли ДНКазу I (1 ед. акт./проба) (Thermo Scientific) и хлорид магния до конечной концентрации 10 мМ. ДНКазную обработку проводили в течение 20 минут при 25°C, затем дважды промывали и проводили экстракцию нуклеиновых кислот. Для выделения тотальной ДНК из митохондрий с целью последующего анализа эффективности импорта использовали метод фенольной экстракции или разработанный нами альтернативный метод термообработки изолированных митохондрий как описано в (Клименко и др., 2011).

Анализ эффективности импорта ДНК разных размерных классов проводился в основном с использованием метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для дизайна праймеров и TaqMan-зондов использовали программное обеспечение PrimerExpress (Applied Biosystems). Данные анализировали при помощи программного обеспечения CFX 96 или iQ5 (Bio-Rad). Параллельный анализ уровней амплификации *GFP* (GenBank: U73901.1) и митохондриального гена *COX2* (GenBank: DQ185064.1) позволял провести нормирование в каждом образце количества импортированной ДНК по отношению к экстрагированной мтДНК.

Все эксперименты были проведены не менее чем в трех биологических 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика особенностей импорта ДНК малой, средней и большой длины в изолированные митохондрии растений

В связи с тем, что в проводимых ранее исследованиях импорта ДНК в растительные митохондрии (Константинов и др, 1989; Koulintchenko et al., 2003) использовался ограниченный набор субстратов, в нашей работе предпринята попытка охарактеризовать импорт ДНК-субстратов 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.

В данном разделе работы представлены результаты изучения особенностей импорта ДНК малой, средней и большой длины (рис. 1).

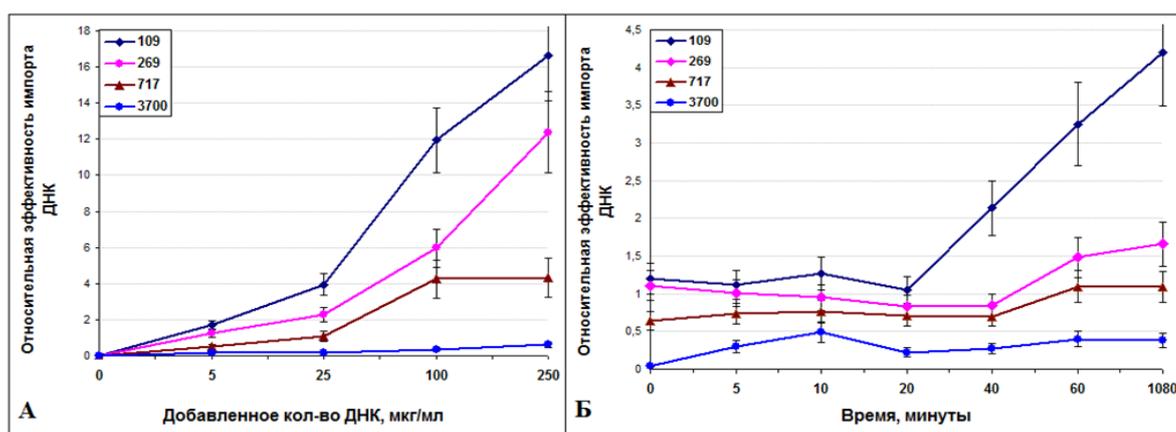


Рис. 1. Концентрационная (А) и кинетическая (Б) зависимость митохондриального импорта ДНК разной длины. (А) Зависимость эффективности импорта от концентрации ДНК в среде инкубации (в мкг/мл), время инкубации ДНК с митохондриями 40 минут; **(Б)** Зависимость эффективности импорта ДНК разной длины от времени инкубации. Концентрация ДНК в среде инкубации - 25 мкг/мл. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. На графиках указаны размеры импортируемых молекул ДНК. Данные не менее чем трех независимых экспериментов представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Исходя из полученных результатов (рис. 1 А), можно сделать вывод, что при использованных концентрациях ДНК (от 5 до 250 мкг/мл) для малых фрагментов длиной 109 – 269 п.н. насыщения процесса импорта в данных условиях не происходило. В то же время для молекул ДНК средней длины

(717 п.н.) насыщение процесса импорта было выявлено при концентрации ДНК в среде инкубации выше 100 мкг/мл ($\leq 0,22 \mu\text{M}$).

Анализ зависимости импорта ДНК от времени инкубации (рис. 1 Б) показал особенности процесса транспорта малых фрагментов ДНК. Так, для минимального по длине субстрата 109 п.н. с увеличением времени инкубации насыщения процесса импорта не происходило, однако, для фрагментов ДНК средней и большой длины (717 – 3700 п.н.) наблюдался выход на плато примерно после 60 минут, и дальнейшая инкубация не приводила к значительному повышению количества ДНК, импортированной в митохондрии.

Конкурентные взаимоотношения в импорте ДНК малой, средней и большой длины

Транспорт молекул в клетки и клеточные органеллы носит насыщаемый характер обычно в том случае, если он опосредован специфическими переносчиками, количество которых является лимитирующим фактором. Для изучения возможных конкурентных взаимоотношений в процессе импорта ДНК разных размерных классов в растительные митохондрии мы анализировали влияние потенциальных конкурентов, в качестве которых использовали фрагменты ДНК разных размерных классов (рис. 2). Помимо фрагментов, содержащих *GFP* (детектируемых с помощью ПЦР-анализа), в среду инкубации 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). В качестве конкурентной ДНК использовали фрагменты плазмиды pBluescript II KS (+), амплифицированные с помощью ПЦР. Параллельно в данных экспериментах также проводили анализ эффективности импорта ДНК в митопластах, полученных после импорта, что позволяло определить количество ДНК, импортированной в митохондриальный матрикс.

Были получены следующие основные 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 митопластах (рис. 2 А).
2. Наличие в среде инкубации конкурентной ДНК малой длины (25 – 250 мкг/мл) не приводило к снижению эффективности процесса импорта тестируемых фрагментов средней (1540 п.н.) и большой длины (6000 п.н.) в митохондриальный матрикс (митопласты) (рис. 2 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 митохондрии, так и в митопласты (рис. 2 Г).

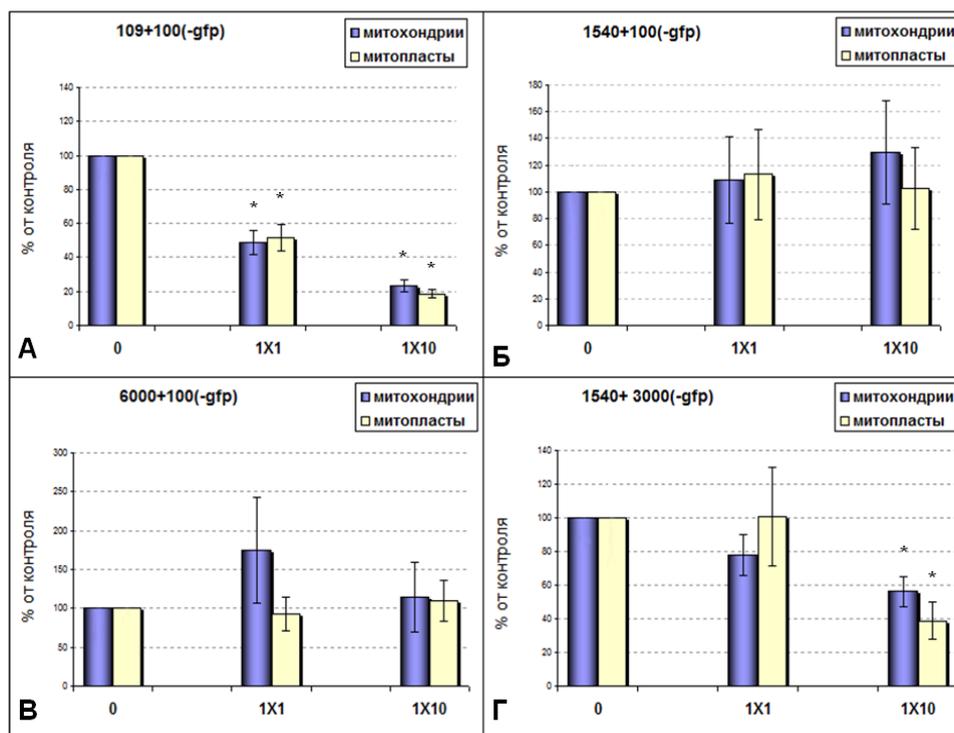


Рис. 2. Характеристика конкурентных взаимоотношений импорта ДНК малой, средней и большой длины в митохондриях *S. tuberosum*. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. Для импорта использовали субстраты ДНК, содержащие фрагмент гена *GFP*: 109 п.н. (А), 1540 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 мкг/мл); 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 (0) и исследуемым вариантом статистически значимы ($p < 0,05$).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ДНК малой, средней и большой 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.

Роль поверхностных белков митохондриальной мембраны в механизме импорта ДНК малой, средней и большой длины

Известно, что в процессе транспорта различных молекул через митохондриальные мембраны важную роль играют рецепторные белки. Ранее, согласно исследованиям Koulintchenko с соавт. (2003; 2006) 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.

Для инкубации с ДНК разной длины были использованы митохондрии, предобработанные протеиназой К (рис. 3).

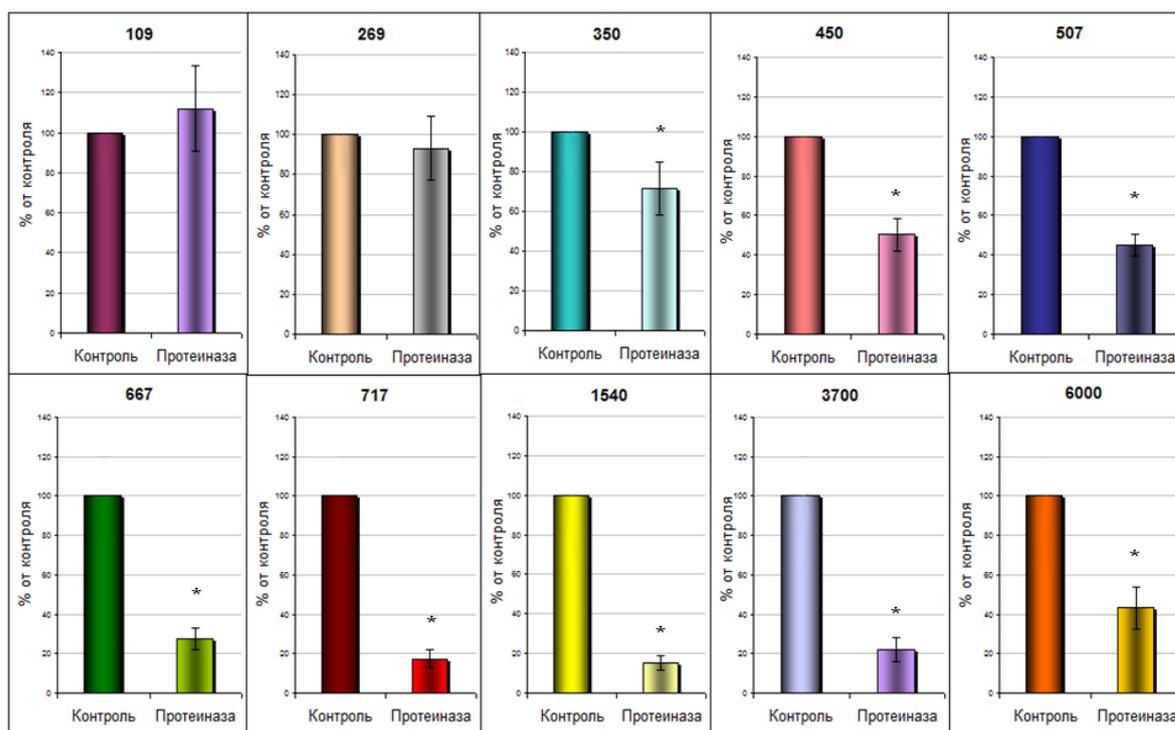


Рис. 3. Роль поверхностных белков наружной мембраны митохондрий в импорте ДНК разной длины. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum*, предобработанные протеиназой К (0,5 мкг/мкл). Эффективность импорта ДНК в митохондрии, необработанные протеиназой К (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 ($p < 0,05$).

Как видно из представленных на рисунке 3 данных, предобработка митохондрий протеиназой К практически не оказывала ингибирующего эффекта на транслокацию в митохондрии молекул ДНК малой длины (109 – 269 п.н.), но в то же время снижала импорт фрагментов ДНК от 717 до 6000 п.н. в 2 – 4 раза. Результаты, полученные в отношении субстратов средней и большой длины (717 – 3700 п.н.), импорт которых существенно ингибируется удалением поверхностных белков, соответствуют данным, показанным ранее в исследовании (Kouintchenko et al., 2003), в котором в качестве основного субстрата импорта использовали митохондриальную плазмиду размером 2,3 т.п.н. из кукурузы.

Участие в механизме импорта ДНК малой, средней и большой длины митохондриального порина (VDAC)

Ранее показано, что в транспорте ДНК определенного размера (2,3 т.п.н.) в изолированные митохондрии из различных источников (растения, млекопитающие, дрожжи) участвует зависимый от потенциала анионный канал VDAC (англ. voltage-dependent anion channel) или порин – белок, локализованный в наружной мембране (Kouintchenko et al., 2003, 2006; Weber-Lotfi et al., 2009). Известно, что VDAC способен формировать во внешней мембране митохондрий поры/каналы, сопоставимые с размером двуцепочечной ДНК (Weber-Lotfi et al., 2015; Szabo et al., 1998). Согласно

литературным данным, рутений красный 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; Israelson et al., 2008).

Для экспериментов по изучению роли VDAC в импорте ДНК разной длины использовали митохондрии картофеля, обработанные ингибитором порина рутением красным в концентрации 5 мкМ. В результате проведенных экспериментов установлено, что действие рутения красного вызывает стимуляцию импорта субстратов ДНК в пределах от 100 до 507 п.н. (примерно в 2 – 7 раз) (рис. 4).

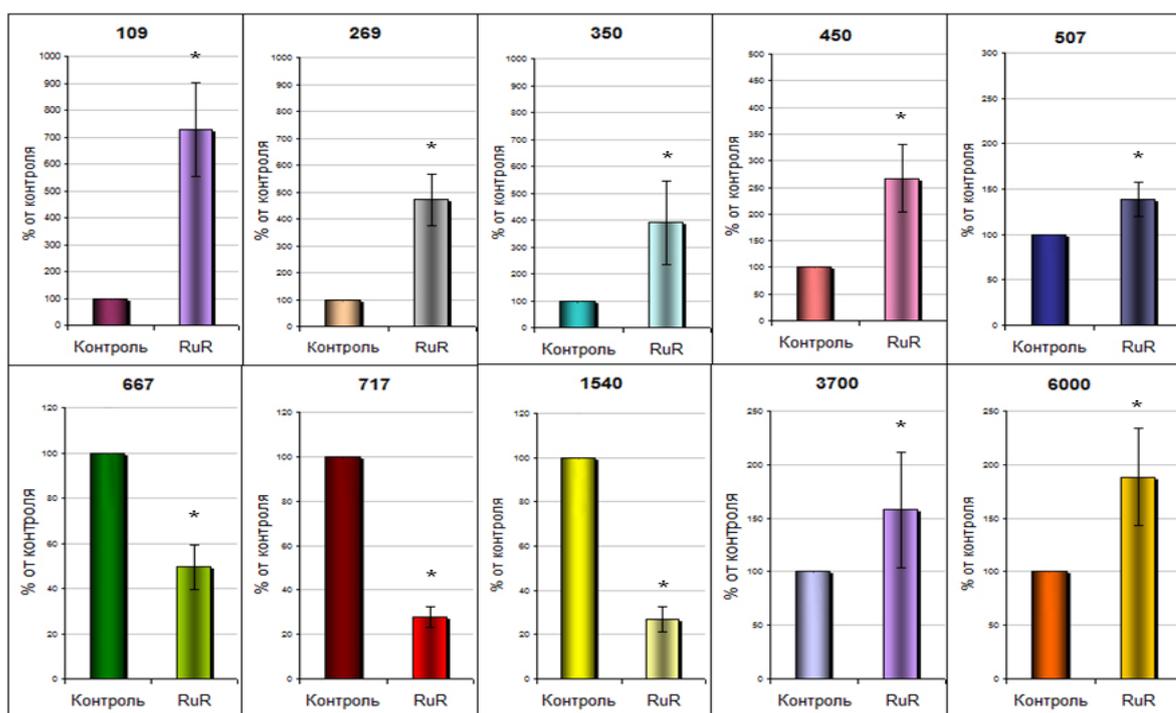


Рис. 4. Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* имеет различающуюся чувствительность к действию ингибитора митохондриальных мембранных переносчиков (VDAC). Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК разной длины в присутствии ингибитора VDAC – рутения красного (5 мкМ). 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 ($p < 0,05$).

При этом активирующее действие этого агента с увеличением длины импортируемой молекулы ДНК имеет тенденцию снижаться. Импорт фрагментов ДНК длиной 667 – 1540 п.н. в присутствии рутения красного снижался по сравнению с контролем в 2 – 3 раза, что согласуется с экспериментальными данными, полученными ранее с использованием плазмиды 2,3 т.п.н. кукурузы (Koulintchenko et al., 2003). Импорт молекул ДНК длиной от 3700 п.н. до 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). Важно отметить, что эффект стимуляции импорта ДНК под влиянием данного соединения был продемонстрирован впервые. Согласно литературным данным, рутений красный, в основном, оказывал ингибирующее действие на процесс импорта ДНК (Koulintchenko et al., 2003), а также тРНК в изолированные митохондрии растений, что указывает на участие порина в этом процессе (Salinas et al., 2006).

Для выявления специфичности действия ингибитора на импорт ДНК малой и большой длины были проведены эксперименты, в которых митохондрии после импорта ДНК и последующей обработки ДНКазой были подвергнуты (1) дополнительной обработке трипсином для удаления поверхностных мембранных белков, (2) гипотоническому шоку для получения митопластов. Эти обработки позволили проанализировать количество ДНК, импортировавшееся в митохондриальный матрикс (рис. 5).

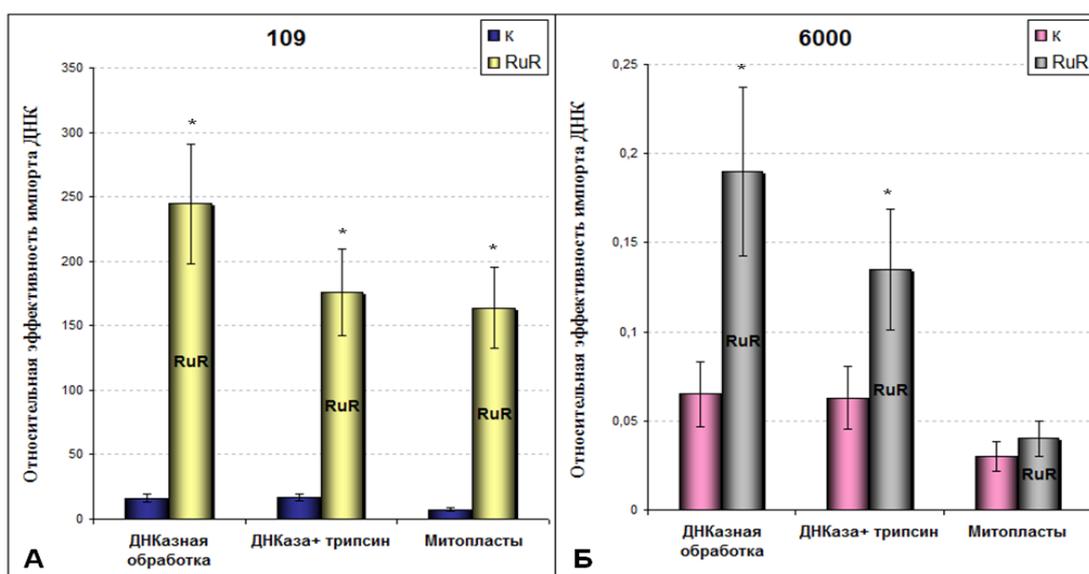


Рис. 5. Специфичность действия рутения красного, ингибитора митохондриального порина (VDAC) на импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum*. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. На графиках представлены результаты анализа активности импорта ДНК длиной 109 и 6000 п.н. в присутствии 5 мкМ рутения красного в митохондрии, 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 и исследуемым вариантом (RuR) статистически значимы ($p < 0,05$).

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, 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 значительной (рис. 5 А), в то время

как для субстрата длиной 6000 п.н. эффективность транспорта становится сопоставимой с эффективностью импорта в необработанные митохондрии (рис. 5 Б).

Таким образом, полученные в экспериментах данные позволяют предположить, что, вероятно, для данных субстратов импорта существуют альтернативные (помимо порина) пути транслокации на уровне внешней мембраны митохондрий, а процесс импорта ДНК может быть опосредован участием нескольких динамично формирующихся транспортных каналов / пор во внешней митохондриальной мембране.

Участие адениннуклеотидтранслоказы (АНТ) в механизме импорта ДНК малой, средней и большой длины

Транспорт ДНК разной длины через внутреннюю мембрану митохондрий до последнего времени является недостаточно изученным вопросом. Ранее (Koulintchenko et al., 2003) с использованием радиоактивно меченной митохондриальной плазмиды кукурузы длиной 2,3 т.п.н. было установлено участие АНТ в переносе ДНК в митохондриальный матрикс. Целью данного раздела работы было выяснение вопроса о том, участвует ли АНТ в импорте ДНК всех используемых в работе размерных классов: малой (≤ 500 п.н.), средней (700 – 3000 п.н.) и большой длины (≥ 3500 п.н.). Для проведения этих экспериментов перед импортом ДНК изолированные митохондрии картофеля обрабатывали атрактилозидом (англ. ATR – atractyloside) и карбоксиатрактилозидом (англ. CATR – carboxyatractyloside). Атрактилозид и карбоксиатрактилозид – гликозиды растительного происхождения, являющиеся высокоспецифичными ингибиторами АНТ и оказывающие свое действие со стороны межмембранного пространства (Palmieri et al., 2011; Klingenberg, 2008).

Обнаружено, что атрактилозид и карбоксиатрактилозид, модулирующие транспортную активность АНТ, вызывают существенное (в 2 – 4 раза) снижение активности импорта ДНК размером от 350 п.н. до 6000 п.н. в митохондрии картофеля (рис. 6 А, Б), что согласуется для этих модельных фрагментов 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.).

Анализируя все полученные в настоящее время экспериментальные данные, 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.

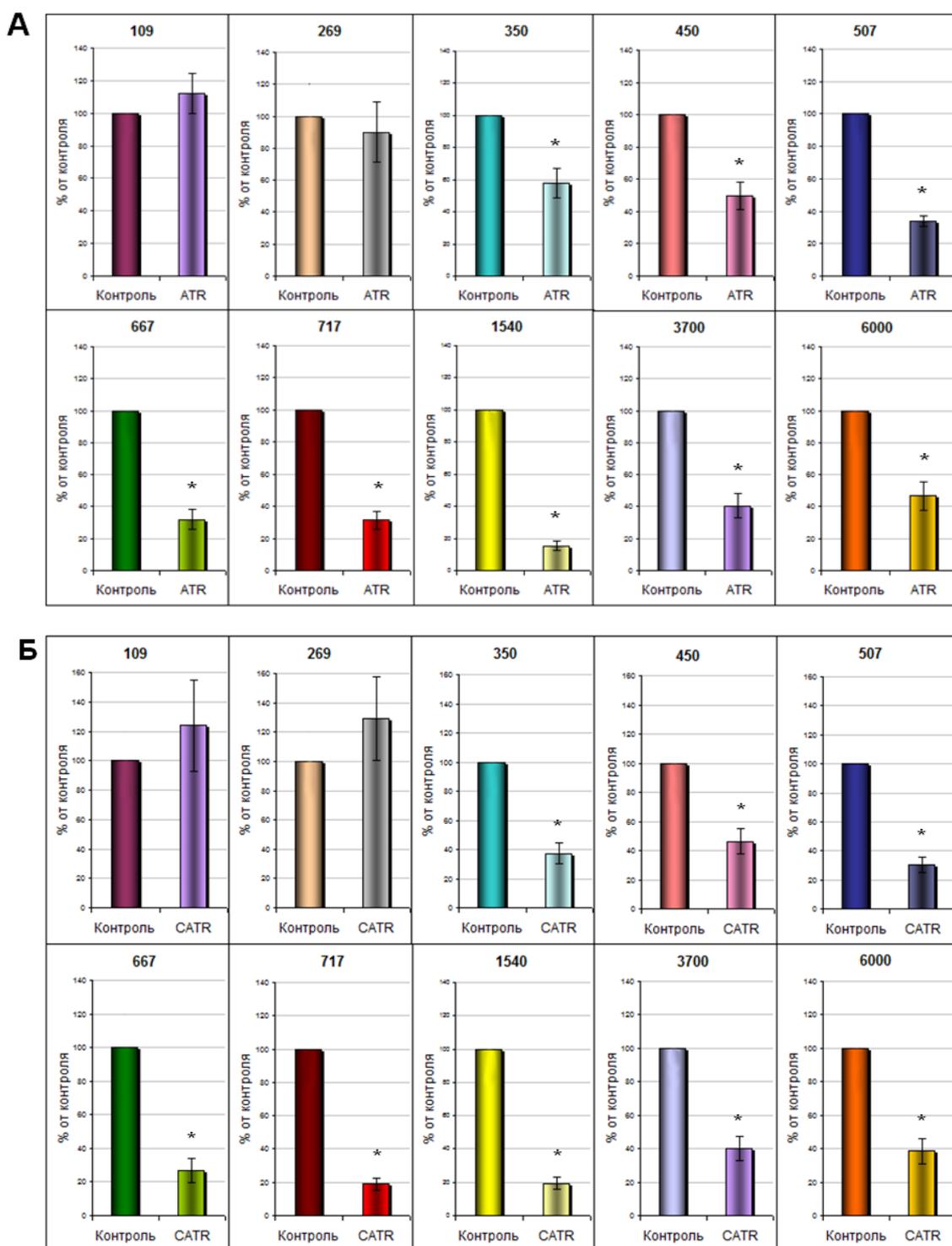


Рис. 6. Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* имеет различающуюся чувствительность к действию ингибиторов адениннуклеотидтранслоказы, атрактилозида (А) и карбоксиатрактилозида (Б). Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК разной длины в присутствии ингибитора АНТ - атрактилозида (100 мкМ) и карбоксиатрактилозида (10 мкМ). 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 (CATR, ATR) 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, как и в случае использования «холодной» ДНК (анализ с помощью ПЦР-РВ), оказывает стимулирующий эффект на импорт субстрата размером 269 п.н. в митохондрии картофеля (рис. 7). 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 также и на транспорт субстрата размером 2732 п.н. (рис. 7), что для субстрата данной длины согласуется с полученными ранее данными (Koulintchenko et al., 2003).

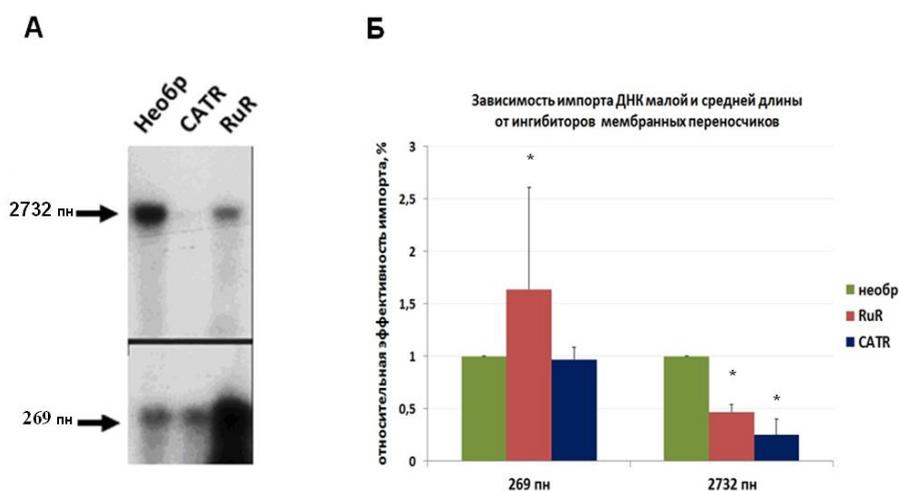


Рис. 7. Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* имеет различающуюся чувствительность к действию ингибиторов митохондриальных мембранных переносчиков (VDAC и АНТ). Анализ активности импорта проводили с использованием радиоактивно меченых субстратов размером 269 п.н. и 2732 п.н. 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 (CATR, RuR) статистически значимы ($p < 0,05$).

Таким образом, установленные различия в механизмах импорта ДНК разной длины в митохондрии растений могут быть связаны с вовлечением в импорт нескольких транспортных каналов, формируемых с участием белков как наружной, так и внутренней митохондриальных мембран растений.

Изучение участия в импорте ДНК разных размерных классов переносчика адениновых нуклеотидов ADNT1

Как следует из вышеизложенных экспериментальных данных, импорт малых фрагментов ДНК может осуществляться с участием альтернативных мембранных переносчиков. В поисках потенциальных кандидатов среди

известных митохондриальных транспортных белков внутренней мембраны, которые могли бы участвовать в импорте ДНК разной длины, мы исследовали влияние ингибиторов сравнительно недавно открытого представителя переносчиков адениннуклеотидов ADNT1, локализованного во внутренней мембране митохондрий (Palmieri et al., 2008).

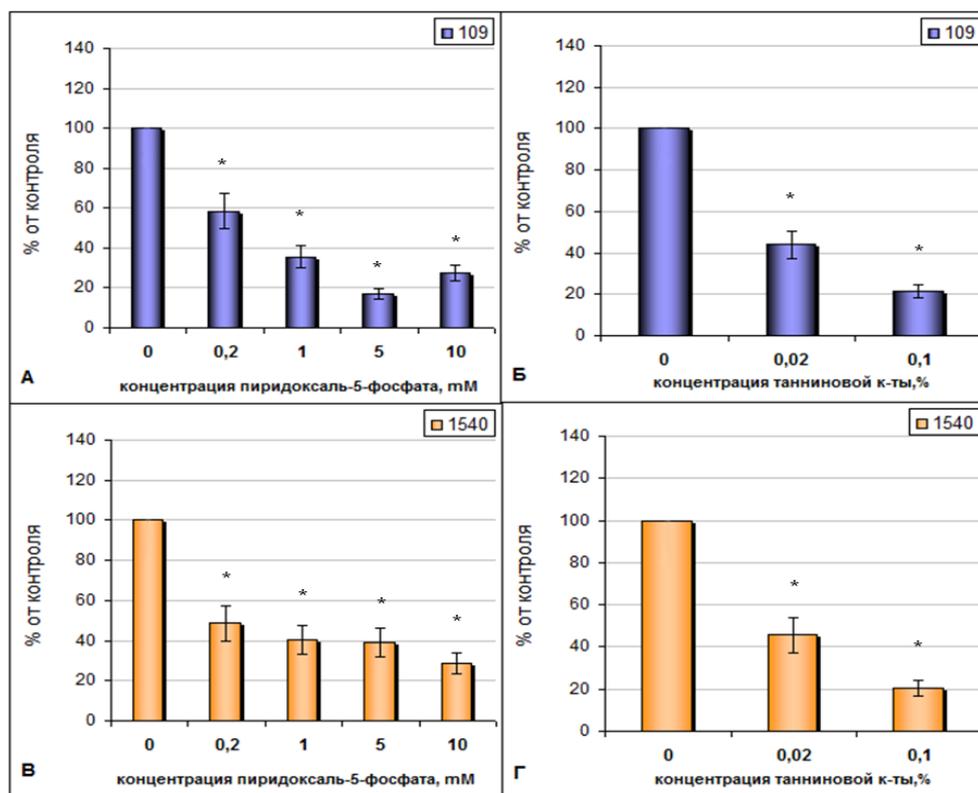


Рис. 8. Импорт ДНК разной длины в изолированные митохондрии *S. tuberosum* проявляет чувствительность к ингибиторам переносчика адениннуклеотидов ADNT1. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. На графиках представлены результаты анализа эффективности импорта ДНК длиной 109 и 1540 п.н. в присутствии ингибиторов ADNT1 – танниновой кислоты (Б, Г) и пиридоксаль-5-фосфата (А, В). 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 ($p < 0,05$).

Основываясь на данных Palmieri с соавт., (2008), мы провели изучение возможного участия ADNT1 в импорте ДНК с использованием изолированных из картофеля митохондрий, обработанных различными концентрациями танниновой кислоты (англ. – Tannic acid) или пиридоксаль-5-фосфата. Было установлено, что при концентрации танниновой кислоты 0,1% интенсивность импорта ДНК как малой, так и средней длины снижается примерно в 4 раза (рис. 8 Б, Г). Предобработка изолированных митохондрий картофеля пиридоксаль-5-фосфатом также приводила к снижению эффективности импорта ДНК малой и средней длины при всех используемых концентрациях (от 0,2 до 10 мМ) до 2 – 4 раз (рис. 8 А, В). 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. 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).

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. В данной работе впервые предпринята попытка реконструкции внутриклеточных взаимодействий митохондрий и эндоплазматического ретикулума с целью изучения влияния мембранных структур эндоплазматического ретикулума (ЭР) на импорт ДНК. Для этого импорт ДНК в системе *in organello* проводили в присутствии общей микросомальной фракции (мембраны 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 (*S. tuberosum*) использовали модельный фрагмент ДНК размером 717 п.н. (рис. 9 А). Микросомальную фракцию получали путем центрифугирования постмитохондриального супернатанта при 100000 g.

Импорт ДНК в митохондрии картофеля (для экспериментов использовали стандартное количество – 200 мкг митохондриального белка в каждой пробе) проводили в присутствии увеличивающегося количества микросомальной фракции (1,3; 2,5 и 5 мкг микросомальных белков).

В результате обнаружен значительный стимулирующий эффект микросомальной фракции на активность импорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля (рис. 9 А). Для контроля специфичности влияния микросомальной фракции на импорт ДНК использовали идентичное количество бычьего сывороточного альбумина (БСА), что 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 мембраны нативной микросомальной фракции оказывали на импорт ДНК намного более значительный стимулирующий эффект. 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.

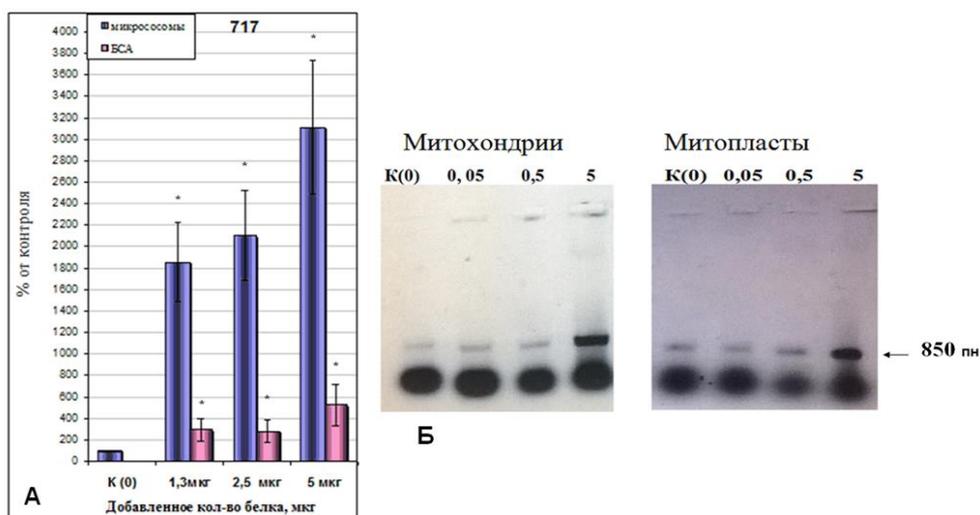


Рис. 9. Анализ импорта ДНК в митохондрии *S. tuberosum* в присутствии микросомальной фракции. А. На графике представлены результаты анализа эффективности импорта фрагмента ДНК длиной 717 п.н. в присутствии белков нативной микросомальной фракции (1,3; 2,5 и 5 мкг) и БСА. Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени. Б. 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). * – различия между контролем и исследуемым вариантом статистически значимы ($p < 0,05$).

Эксперименты по реконструкции внутриклеточных взаимодействий митохондрий и ЭР проводили также с использованием флуоресцентно меченых субстратов размером 850 п.н. (рис. 9 Б). Присутствие в реакции импорта нативной микросомальной фракции (использовали концентрации 0,05; 0,5; 5 мкг белка) вызывало повышение эффективности транспорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля по сравнению с контролем. Для оценки эффективности транспорта ДНК через внутреннюю мембрану, митохондрии после импорта подвергли осмотическому шоку 5 мМ фосфатом калия, полученные митопласты затем обрабатывали 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, указывая на то, что стимуляция импорта белками ЭР способствует проникновению ДНК через обе митохондриальные мембраны.

По данным предыдущих исследований было известно, что изолированные митохондрии растений обладают способностью импортировать молекулы ДНК без участия каких-либо кофакторов цитозольного происхождения. Как было показано в данной работе, импорт фрагментов ДНК длиной 717 – 850 п.н. происходит преимущественно с участием АНТ и порина, а также белков, выполняющих рецепторную функцию. Согласно литературным данным порин (VDAC), митофьюзины (англ. mitofusins) и белок IP_3R обеспечивают специфические взаимодействия между митохондриями и ЭР в клетках животных (de Brito, Scorrano, 2008; Merlwirth и Langer, 2008; Szabadkai,

Duchen, 2008). Несмотря на то, что в настоящее время практически отсутствует информация о составе белковых комплексов между митохондриями и мембранами ЭР у растений, имеющиеся к настоящему времени литературные данные и результаты проведенных нами экспериментов позволяют считать, что в условиях *in vivo* в зонах мембранного контакта постоянно происходят функциональные взаимодействия этих органелл. Эти контактирующие мембранные сайты митохондрий и ЭР обеспечивают, по всей видимости, не только обмен между органеллами ионов Ca^{2+} , белков и фосфолипидов, но также могут способствовать переносу ДНК в митохондрии.

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 (≥ 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* возможно 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 (таблица 1), что транспорт малых модельных фрагментов ДНК (≤ 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 (≤ 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 (таблица 1).

Таким образом, получены данные о существовании множественных путей переноса ДНК разной длины в митохондриях растений. ДНК малой (≤ 300 пн), средней (≤ 3000 пн) и большой длины (≥ 3000 пн) импортируется в митохондрии растений частично перекрывающимися, но не совпадающими полностью путями.

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 трансмитохондриальных растений является возможность жесткого контроля их распространения во внешней среде.

Таблица 1. Изучение 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
VDAC	RuR	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑
ANT	ATR	≈	≈	↓	↓	↓	↓	↓	↓	н.о.	↓	↓
	CATR	≈	≈	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ADNT1	PLP	↓	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	↓	н.о.	н.о.	н.о.
	TAN	↓	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	↓	н.о.	н.о.	н.о.
Белки-рецепторы	Протеиназа К	≈	≈	↓	↓	↓	↓	↓	↓	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 (≤ 100 п.н.) и средней (≤ 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 АНТ 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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Клименко Е.С., Милейко В.А, Лактионов П.П., Константинов Ю.М. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР. // Биологические мембраны. 2011. т.28, №3.С. 199-205.
2. Klimenko E.S., Zaporozhchenko I.A., Mileyko V.A., Morozkin E.S., Koulintchenko M.V., Laktionov P.P., Konstantinov Yu.M. Human cultured cells are capable to incorporate isolated plant mitochondria loaded with exogenous DNA. // Biopolymers and Cell. 2012. V. 28. P. 310-313.
3. Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Klimenko E.S., Konstantinov Yu.M., Weber-Lotfi F., Dietrich A. Specificity of DNA import into isolated mitochondria from plants and mammals. // Biopolymers and Cell. 2014. V. 30(1). P. 68-70.
4. Клименко Е.С., Кулинченко М.В., Гребнев П.А., Дитриш А., Константинов Ю.М. Изучение импорта ДНК разной длины и структуры в митохондрии растений. // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2014. № 4. С. 77–84.
5. Константинов Ю.М., Дитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. Импорт ДНК в митохондрии. // Биохимия. 2016. т.81, вып.10, с. 1307-1321.

Список условных сокращений

п.н. – пар нуклеотидов

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

м.п.н. – миллион пар нуклеотидов

тРНК – транспортная РНК

АНТ – адениннуклеотидтранслоказа

БСА – бычий сывороточный альбумин

VDAC – Voltage Dependent Anion Channel (митохондриальный порин)