

ИЗУЧЕНИЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ РЕКОНСТРУКЦИИ

Е.С. Клименко, В.Н. Шмаков, Т.А. Болотова, И.Ю. Субота, В.И. Тарасенко,
М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *katia.klimenko@gmail.com*

Аннотация. Изолированные митохондрии растений обладают способностью импортировать молекулы ДНК. В данной работе импорт ДНК проводили в реконструированной системе, включающей изолированные митохондрии клубней картофеля и микросомальную фракцию (фрагментированные мембраны ЭР). Обнаружен стимулирующий эффект микросомальных мембран на активность импорта ДНК в митохондрии. Мы предполагаем, что, помимо митохондриальных белков, в импорте ДНК в условиях *in vivo* могут принимать участие и белки ЭР.

Ключевые слова: митохондрии, импорт ДНК, эндоплазматический ретикулум (ЭР), микросомальная фракция, *Mitochondria-associated ER Membranes (MAMs)*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1272-1275

В настоящее время известно, что важную роль в нормальном функционировании митохондрий играет постоянное взаимодействие этих органелл с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) [Samaga et al., 2010; Lebedzinska et al., 2009]. Структурные взаимодействия митохондрий и ЭР достигаются за счет формирования белковых комплексов, что оказывает значительное влияние на морфологию митохондрий, процессы их слияния и деления, репликацию мтДНК, передачу различного рода сигналов и ионов (в особенности ионов кальция), а также импорт белков в митохондрии [Kornmann et al., 2009, 2010; Wiedemann et al., 2009]. Межмембранные контакты митохондрий и ЭР необходимы также для импорта в митохондрии синтезируемых в ЭР липидов [Flis, Daum, 2013].

Ранее нами было показано, что изолированные митохондрии растений обладают способностью импортировать молекулы ДНК [Koulintchenko et al., 2003]. Мы предполагаем, что набор участвующих в импорте ДНК белков не ограничивается порином (VDAC) в наружной мембране и адениннуклеотидтранслоказой (АНТ) во внутренней мембране органелл [Koulintchenko et al., 2003]. Импорт молекул ДНК в митохондрии растений может происходить с участием дополнительных белковых факторов. Нельзя исключить, что структурно-функциональные комплексы в зонах мембранных контактов, участвующие в процессах обмена различных метаболитов между ЭР и митохондриями, могут оказывать свое влияние также и на транспорт ДНК в митохондрии. В данной работе впервые была предпринята попытка осуществить реконструкцию внутриклеточных взаимодействий митохондрий картофеля (*Solanum tuberosum*) 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) нескольких видов растений. Ранее подобный способ реконструкции внутриклеточных взаимодействий между митохондриями и ЭР был использован для изучения транспорта липидов в изолированные митохондрии дрожжей и млекопитающих [Vance, 1990; Achleitner et al., 1999].

В результате проведенного исследования обнаружен значительный стимулирующий эффект микросомальных мембран на активность импорта ДНК в

изолированные митохондрии картофеля. Присутствие 5 мкг микросомальной фракции усиливало импорт фрагмента ДНК размером 717 п.н. примерно в 30 раз (рисунок, А). Для контроля специфичности влияния микросомальной фракции на импорт ДНК использовали сопоставимые количества БСА (бычьего сывороточного альбумина) и мембранную фракцию тонопласта свеклы (*Beta vulgaris L.*). 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. В то же время добавление в среду инкубации фракции тонопласта свеклы не оказывала влияние на импорт ДНК в митохондрии (рисунок, А).

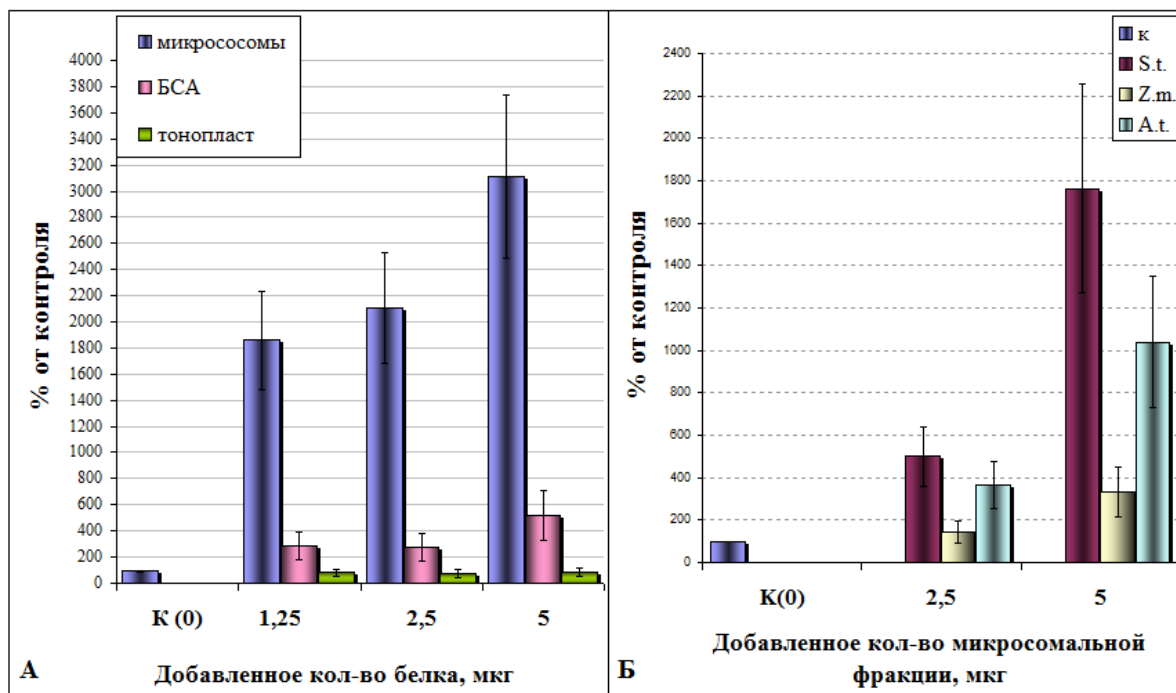


Рисунок. Импорт ДНК в изолированные митохондрии *S. tuberosum* в присутствии микросомальной фракции. Анализ эффективности импорта фрагментов ДНК длиной 717 п.н. (А). К(0) - импорт ДНК в изолированные митохондрии (контроль без фракций), (1,3; 2,5 и 5 мкг) - в присутствии белков нативной микросомальной фракции, БСА или мембранной фракции тонопласта *B. vulgaris L.* (Б) Импорт фрагмента ДНК длиной 717 п.н. в присутствии микросомальной фракции, выделенной из клубней картофеля (S.t), этиолированных проростков кукурузы (Z.m.) или 3-недельных проростков арабидопсиса (A.t.). Анализ активности импорта проводили с использованием метода ПЦР в реальном времени.

Установлено, что активирующее влияние микросомальной фракции имеет выраженный видоспецифический характер. Активация транспорта ДНК в митохондрии такого представителя двудольных растений как картофель в присутствии микросом, полученных из двудольных растений (*Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*), была значительно выше по сравнению с эффектом микросомальной фракции кукурузы (*Zea mays*), представителя однодольных (рисунок, Б).

С целью выявления специфичности влияния мембранной фракции ЭР нами протестировано проявление эффекта микросом на импорт ДНК в митохондрии и митопласты (митохондрии, у которых была удалена внешняя мембрана). Добавление в среду инкубации 5 мкг микросомальной фракции стимулировало импорт ДНК в

изолированные митохондрии картофеля, в среднем в 20-29 раз, а в митопласты – в 4-6 раз. Таким образом, для активации импорта ДНК необходимо взаимодействие микросомальной фракции либо с внешней мембраной митохондрий, либо с контактными сайтами обеих митохондриальных мембран. Очевидно, что именно белки внешней мембраны митохондрий играют ключевую роль в формировании структурно-функциональных комплексов между митохондриями и мембранными структурами ЭР.

Несмотря на то, что в настоящее время состав этих белковых комплексов в растениях остается практически не изучен, на основании полученных данных мы предполагаем, что, помимо митохондриальных белков, в формировании определенных каналов/пор, способствующих импорту ДНК в митохондрии в условиях *in vivo*, очевидно, могут принимать участие и белки ЭР.

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

Литература

Achleitner G., Gaigg B., Krasser A., Kainersdorfer E., Kohlwein S.D., Perktold A., Zellnig G., Daum G. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact // *Eur J Biochem.* – 1999. – V. 264 (2). – P. 545–553.

Camara A.K.S., Lesnevsky E.J., Stowe D.F. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria // *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010. – V. 13 (3). – P. 279–347.

Flis V.V. and Daum G. Lipid transport between the endoplasmic reticulum and mitochondria // in: *The Endoplasmic Reticulum. A Subject Collection from Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (eds. Ferro-Novick S., Rapoport T.A. and Schekman R.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 2013. – P. 109–130.

Kornmann B., Currie E., Collins S.R., Schuldiner M., Nunnari J., Weissman J.S., Walter P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen // *Science.* – 2009. – V. 325. – P.477–481.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // *EMBO J.* – 2003. – V. 22 (6) – P. 1245–1254.

Lebedzinska M., Szabadkai G., Jones A.W.E., Duczynski J., Wieckowski M.R. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membranes and other subcellular organelles // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2009. – V. 41. – P. 1805–1816.

Vance J.E. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria // *J. Biol. Chem.* –1990. –V. 265 (13). – P. 7248–7256.

Wiedemann N., Meisinger C., Pfanner N. Connecting organelles // *Science.* – 2009. – V. 325. – P.403–404.

STUDY OF DNA IMPORT INTO PLANT MITOCHONDRIA USING THE RECONSTRUCTION METHOD

E.S. Klimenko, V.N. Shmakov, N.A. Bolotova, Subota I.Yu., V.I. Tarasenko,
M.V. Koulintchenko, Yu.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian
Academy of Sciences, Russia, *katia.klimenko@gmail.com*

Abstract. Isolated plant mitochondria have the ability to import DNA molecules. In this study, the import of DNA was carried out in a reconstituted system consisting of isolated mitochondria of potato tubers and microsomal fraction (fragmented membrane of endoplasmic reticulum). It was shown that microsomal fraction stimulates the DNA transport into isolated plant mitochondria. We assume that, in addition to mitochondrial proteins, ER proteins can participate in DNA import *in vivo*.

Keywords: *mitochondria, DNA import, microsomal fraction, endoplasmic reticulum (ER), Mitochondria-associated ER Membranes (MAMs)*