

## ИЗУЧЕНИЕ ИМПОРТА ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И СТРУКТУРЫ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

Ю.М. Константинов<sup>1,3</sup>, Т.А. Болотова<sup>1</sup>, А. Dietrich<sup>2</sup>, F. Weber-Lotfi<sup>2</sup>,  
М.В. Кулинченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия, [yukon@sifibr.irk.ru](mailto:yukon@sifibr.irk.ru)

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology of Plants, CNRS, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия

**Аннотация.** Изучены кинетика митохондриального импорта ДНК-субстратов 265 п.н., 2732 п.н. и 9 т.п.н, а также их конкурентные взаимоотношения в процессе импорта в митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*). Фланкирование субстрата импорта 9 т.п.н. концевыми инвертированными повторами митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н. *Brassica napus* приводило к усилению импорта ДНК в митохондрии репы, картофеля и арабидопсиса. Сделано заключение о существовании нескольких путей импорта ДНК в митохондрии растений.

**Ключевые слова:** митохондрии, импорт ДНК, концевые инвертированные повторы, *Solanum tuberosum*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1276-1279

По современным представлениям природный механизм переноса нуклеиновых кислот в митохондрии высших организмов может стать основой для создания эффективных технологий направленной доставки генов в эти органеллы. Ранее нами установлен феномен природной компетентности митохондрий растений к поглощению (импорту) ДНК, участие в котором принимают порин (VDAC) и адениннуклеотидтранслоказы (АНТ), соответственно, в наружной и внутренней мембранах этих органелл [Koulintchenko et al., 2003]. Со временем стало очевидным, что набор факторов импорта ДНК не ограничивается этими белками, а сам процесс реализуется с участием нескольких нерасшифрованных пока механизмов [Weber-Lotfi et al., 2015]. Целью данной работы было выявление потенциальных альтернативных путей транспорта ДНК разной длины и структуры в митохондрии растений.

Концентрация субстрата является одним из основных факторов, определяющих скорость ферментативных реакций. Ранее Scherag (1973) показал, что работа АНТ может быть описана в рамках кинетики односубстратной ферментативной реакции. Мы предположили, что формирующие мембранную пору для транспорта ДНК переносчики (АНТ и другие), обладают разным сродством к ДНК. Это сродство, в свою очередь, может зависеть от длины молекулы ДНК, метаболического состояния митохондрий и других факторов. На рис. 1 представлены потенциальные варианты кинетики импорта, определяемые конкретным задействованным механизмом трансмембранного переноса ДНК. Определение кинетики импорта ДНК в митохондрии *S. tuberosum* для субстратов малой (265 п.н.) и средней (2732 п.н.) длины выявило существенные различия между кинетическими кривыми. Для ДНК-субстрата 265 п.н. кинетика импорта описывалась кривой, имеющей линейный характер (рис. 1, Г), тогда как кинетическая кривая импорта ДНК-субстрата 2732 п.н. имела сложный характер с несколькими выходами на плато (рис. 1, Д). Обнаруженные различия кинетических кривых импорта ДНК разной длины служат важным аргументом в пользу представлений о множественности путей митохондриального транспорта ДНК.

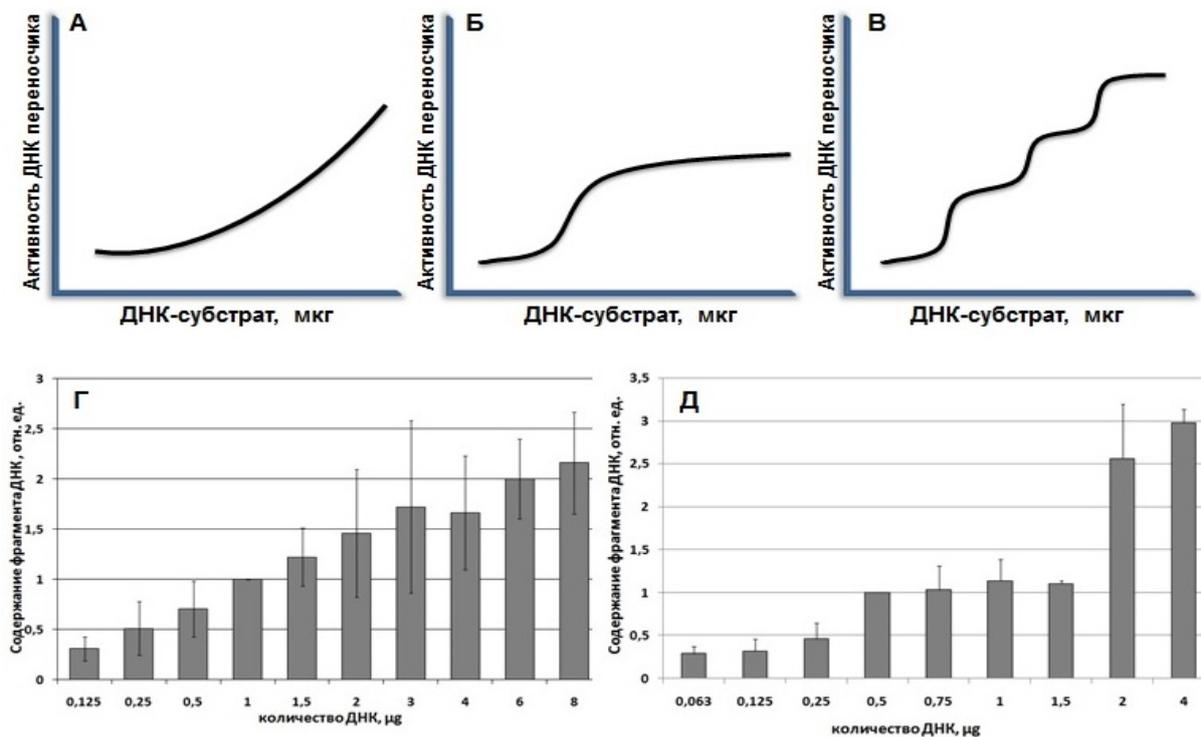


Рис. 1. А-В. Схемы вариантов кинетики импорта ДНК в митохондрии. А. Отсутствие насыщения процесса. Импорт ДНК не зависит от специфического белкового переносчика; Б. Насыщение процесса. Импорт ДНК реализуется с участием одного переносчика; В. Ступенчатое насыщение процесса. Импорт ДНК происходит при участии нескольких переносчиков. Г и Д. Определение кинетики импорта ДНК в митохондриях *S. tuberosum*. Инкубацию ДНК с митохондриями (100 мкг) проводили в течение 10 мин. Экстрагированную из митондрией ДНК анализировали методом количественной ПЦР. Представлено содержание фрагмента GFP в пробах ДНК после импорта фрагментов 265 п.н. (Г) и 2732 п.н. (Д), нормированное на содержание эндогенного гена *nad4*. Количество импортировавшегося субстрата в пробах «1 мкг» и «0,5 мкг» для фрагментов 265 п.н. и 2732 п.н., соответственно, принято за условную единицу.

Особенностью организации генома митондрией ряда высших растений является наличие видоспецифических наборов кольцевых и линейных плазмид. Особого внимания с точки зрения конструирования генетических векторов для манипуляций с митондриями заслуживают линейные плазмиды, содержащие на концах молекулы концевые инвертированные повторы (КИП). Одной из задач данной работы было выяснение роли КИП в импорте ДНК большой длины. Как показано ранее [Ibrahim et al., 2011], линейная плазида 11,6 т.п.н. митондрией *Brassica napus* может импортироваться в митондриии репы (*B. rapa*) лишь при наличии на концах инвертированных повторов (327 п.н.). Нами установлено, что фланкирование концевыми инвертированными повторами этой плазмиды фрагмента ДНК (длиной 9 т.п.н.) с нуклеотидной последовательностью, не имеющей отношения к плазмиде, приводит к усилению импорта ДНК такой длины не только в митондриии репы, но также картофеля и арабидопсиса (рис. 2).

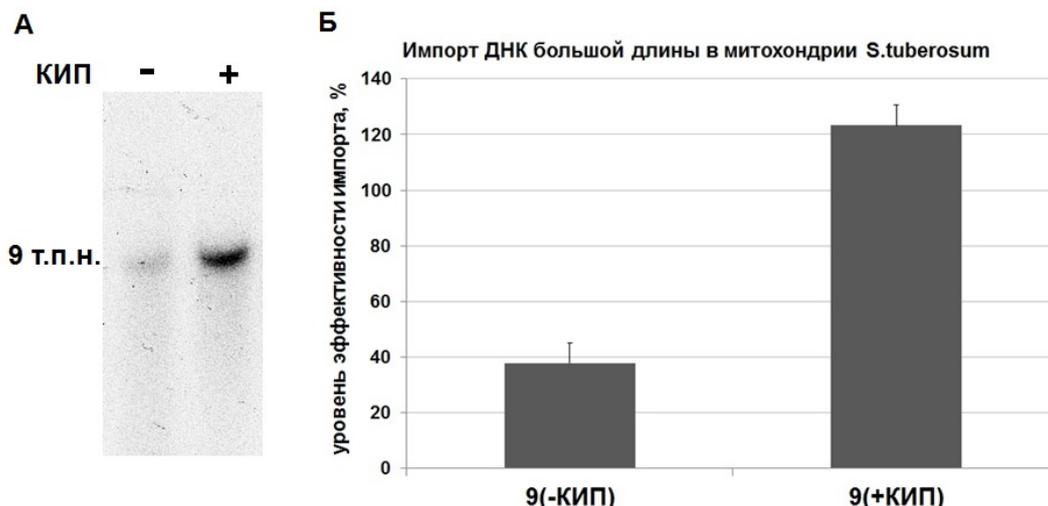


Рис. 2. Влияние КИП митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н. *Brassica rapa* на импорт ДНК-субстрата большой длины (9 т.п.н.) в митохондрии *S. tuberosum*. Митохондриальную ДНК после проведения импорта радиоактивно меченых ДНК-субстратов, 9 т.п.н. (-КИП) и 9,7 т.п.н. (+КИП) экстрагировали из органелл и разделяли электрофорезом в агарозном геле. (А) Авторадиограмма мембраны, на которую перенесена ДНК с геля. (Б) Диаграмма активности импорта в митохондриях ДНК-субстрата 9 т.п.н. с КИП (+) и без КИП (-).

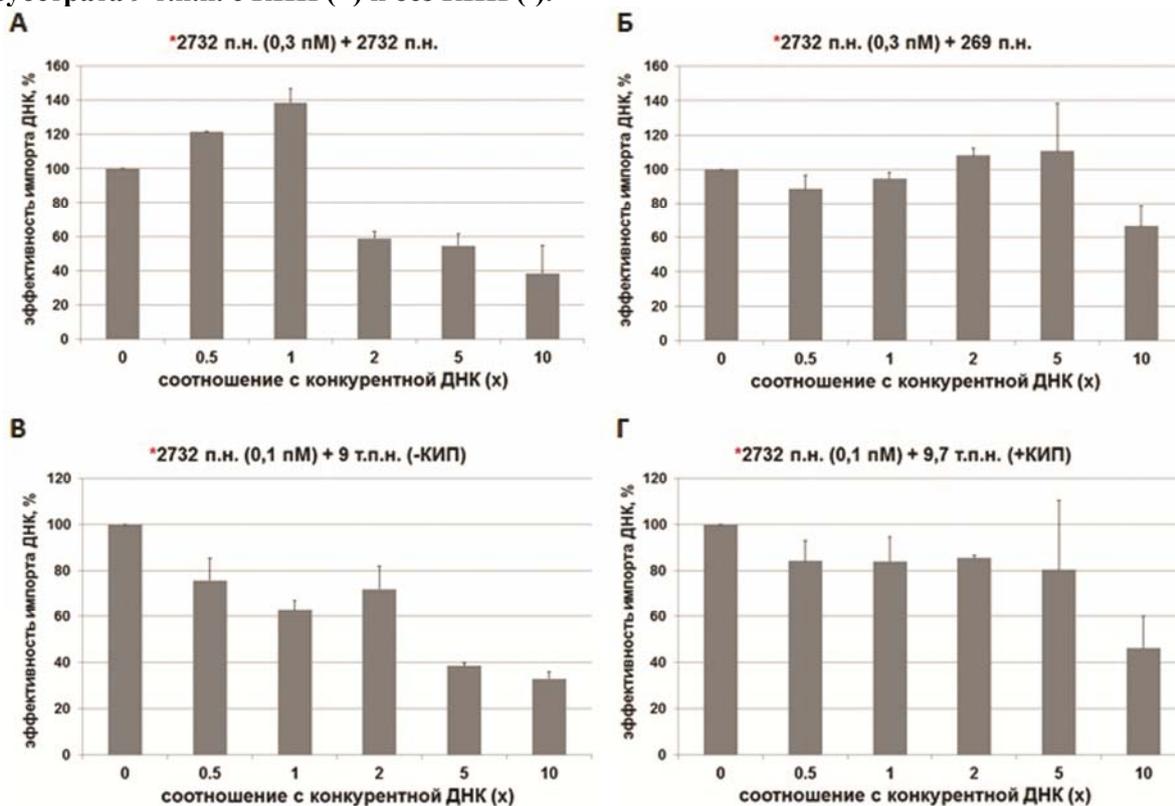


Рис. 3. Характеристика конкурентных взаимоотношений импорта ДНК средней длины в митохондрии *S. tuberosum*. Представлены диаграммы активности импорта радиоактивно меченого фрагмента 2732 п.н. (взятого в количестве 0,1 или 0,3 пМ) в митохондрии *S. tuberosum* в присутствии увеличивающегося количества немеченой ДНК (А) 2732 п.н., (Б) 269 п.н., (В) 9 т.п.н. (-КИП) и (Г) 9 т.п.н. (+КИП). Указано содержание конкурентной немеченой ДНК в каждой пробе, кратное взятому для импорта количеству меченой ДНК.

В данной работе мы исследовали также конкурентные взаимоотношения ДНК-субстратов разной длины в процессе их импорта. Для этого митохондрии инкубировали с радиоактивно меченым ДНК-субстратом (2732 п.н.) в присутствии кратно увеличивающегося количества немеченого субстрата (от 0,5 до 10 раз) той же или другой длины (рис. 3). Активность импорта ДНК длиной 2732 п.н. не изменялась в присутствии 2-5-кратного избытка ДНК малой (269 п.н.) или большой (9,7 т.п.н.) длины, содержащей КИП митохондриальной плазмиды 11,6 т.п.н. *Brassica napus*. Присутствие ДНК большой длины (9 т.п.н.) без КИП вызывало выраженное ингибирование импорта ДНК средней длины. Таким образом, импорт ДНК малой, средней и большой длины может происходить, по всей видимости, посредством альтернативных механизмов.

Из полученных результатов следует, что импорт в митохондрии ДНК разной длины и структуры осуществляется с помощью нескольких специфических механизмов. Выяснение природы специфичности митохондриального импорта в отношении различающихся ДНК-субстратов требует проведения дальнейших углубленных исследований с привлечением широкого комплекса методов молекулярной биологии, физиологии, биоинформатики и структурной биологии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-04-00603).*

#### Литература

Ibrahim N., Handa H., Cosset A., Koulintchenko M., Konstantinov Yu., Lightowlers R.N., Dietrich A., Weber-Lotfi F. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement // *Pharmaceutical Research*. – 2011. – V. 28, № 11. – P. 2871–2882.

Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // *EMBO J*. – 2003. – V. 22, № 6. – P. 1245–1254.

Scherer B., Grebe K., Riccio P., Klingenberg M. The new atractyloside type compound as a high affinity ligand to the adenine nucleotide carrier // *FEBS Letters*. – 1973. – V. 31(1). – P. 15–19.

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

#### STUDYING OF DIFFERENT LENGTH AND STRUCTURE DNA IMPORT INTO PLANT MITOCHONDRIA

Y.M. Konstantinov<sup>1,3</sup>, T.A. Bolotova<sup>1</sup>, A. Dietrich<sup>2</sup>, F. Weber-Lotfi<sup>2</sup>, M.V. Koulintchenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia, [yukon@sifibr.irk.ru](mailto:yukon@sifibr.irk.ru)

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology of Plants, CNRS, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

**Abstract.** The kinetics of mitochondrial import of DNA substrates 265 bp, 2732 bp, 9 kbp and their competitive interrelationships during import into potato tuber mitochondria (*Solanum tuberosum*) were studied. Flanking of the DNA substrate 9 kbp by terminal inverted repeats of mitochondrial plasmid 11.6 kbp of leads to increase DNA import into mitochondria of *Brassica napus*, *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. We concluded that there are few specific ways of DNA import into plant mitochondria.

**Keywords:** mitochondria, DNA import, terminal inverted repeats, *Solanum tuberosum*