

ИССЛЕДОВАНИЕ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ *IN VIVO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОПЛАСТОВ АРАБИДОПСИСА

В.И. Тарасенко, Т.А. Болотова, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский Институт Физиологии и Биохимии Растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, vslav@inbox.ru

Аннотация. Известно, что митохондрии, изолированные из различных растительных объектов, способны импортировать ДНК. Однако все исследования в области импорта ДНК проводились в системе *in organello*, и подтверждение существования феномена транслокации ДНК в митохондрии *in vivo* представляется чрезвычайно важной задачей. Нами разработан метод детекции импорта ДНК в митохондрии с использованием протопластов арабидопсиса. Показано, что находящаяся в цитоплазме растительной клетки ДНК активно поступает в митохондрии. Отмечена схожесть ряда характеристик импорта *in vivo* и *in organello*.

Ключевые слова: импорт ДНК, протопласты, порин, *Arabidopsis thaliana*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1385-1387

Известно, что митохондрии, изолированные из различных растительных объектов, способны импортировать двухцепочную линейную ДНК небольшого размера (<10 т.п.н.) путем активного, не зависящего от последовательности ДНК транспорта [Константинов и др., 2016]. Показано, что чужеродный генетический материал, импортируемый в органеллы в составе вектора, созданного на основе кукурузного плазмидного репликона, контролируемый митохондриальными регуляторными последовательностями, может экспрессироваться, а также служить матрицей для синтеза ДНК [Koulintchenko et al., 2003]. Получены доказательства интеграции чужеродной ДНК в митохондриальный геном картофеля, осуществляемой по механизму гомологичной рекомбинации [Mileshina et al., 2011]. В более поздних исследованиях обнаружено, что импорт ДНК-субстратов больших размеров зависит от наличия в их последовательности определенных элементов, а именно, инвертированных повторов на 5'- и 3'-концах молекулы: известно, что внутри органелл ИП вовлечены в связывание с белками, участвующими в репликации и стабилизации плазмиды [Ibrahim et al., 2011]. Наличие природного механизма переноса ДНК в митохондрии открывает принципиально новые возможности как для фундаментальных исследований, так и разработки методов трансформации митохондриального генома в биотехнологии сельскохозяйственных растений. Однако, все описанные выше исследования проводились с использованием изолированных митохондрий (*in organello*), и подтверждение существования импорта ДНК в митохондрии *in vivo* представляется чрезвычайно важной задачей.

В процессе разработки подходов к детекции импорта ДНК в митохондрии, происходящего *in vivo*, нами были использованы протопласты из листьев арабидопсиса. Для трансформации протопластов экзогенной ДНК был применен метод ПЭГ-опосредованной трансфекции [Yoo et al., 2007]. С помощью ПЦР в реальном времени показано, что существенное количество ДНК проникает в клетку и сохраняется там в течение как минимум 20 ч. Разработан подход к детекции импорта ДНК в митохондрии на уровне целых клеток. Данный подход включает: (а) трансформацию протопластов тем или иным ДНК-субстратом; (б) инкубацию клеток в течение 2-20 ч; (в) лизис протопластов и выделение митохондрий из протопластов микрометодом; (г) обработку изолированных митохондрий ДНКазой с целью избавления от возможного загрязнения фракцией ДНК, связавшейся с наружной мембраной митохондрий; (д) лизис

митохондрий и выделение митохондриальной ДНК; (е) оценку количества импортированной в митохондрии ДНК с помощью ПЦР в реальном времени. Преимуществом этого подхода является высокая чувствительность метода детекции и возможность дифференцировать ДНК, связавшуюся с наружной мембраной митохондрий, от ДНК, проникшей внутрь органелл.

С помощью данного метода было установлено, что находящаяся в цитоплазме растительной клетки ДНК активно поступает в митохондрии. Для трансформации протопластов был использован ряд ДНК-субстратов разной длины, аналогичных применявшимся в экспериментах по импорту *in organello*. После инкубации протопластов в течение 20 ч, выделения митохондрий и экстракции мтДНК, детекция с помощью ПЦР в реальном времени показала достаточно высокий уровень сигнала с праймеров, специфичных к последовательностям использованных субстратов. На следующем этапе работы было проведено сравнение интенсивности импорта ДНК-субстратов трех размеров – 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. Для трансфекции протопластов использовалось равное количество ДНК каждого из трех субстратов. Количество молекул ДНК, импортировавшихся в митохондрии в условиях *in vivo*, уменьшалось с увеличением размера импортируемого субстрата. Схожая зависимость была отмечена ранее для импорта ДНК разного размера в изолированные митохондрии, что свидетельствует в пользу того, что обнаруженные нами закономерности импорта ДНК *in organello* отражают процессы, протекающие *in vivo*.

Разработанный подход мы использовали далее для трансформации субстратом размером 2,7 т.п.н. протопластов, изолированных из листьев растений дикого типа (*Col-0*) и двух мутантных линий *vdac1* и *vdac3*, у которых инактивирована одна из изоформ митохондриального порина, VDAC1 или VDAC3.

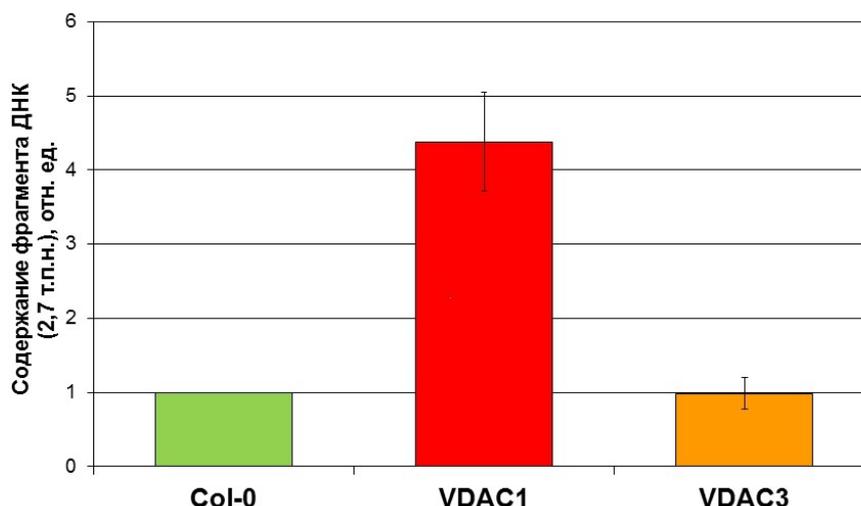


Рисунок. Анализ эффективности импорта ДНК в митохондрии протопластов (*in vivo*) арабидопсиса дикого типа (*Col-0*) и мутантов *vdac1* и *vdac3*. На рисунке показано относительное количество импортированной ДНК фрагмента размером 2,7 т.п.н., нормированное к содержанию фрагмента гена *nad4* (митохондриальная ДНК), выявленное при анализе проб после импорта в митохондрии протопластов (*in vivo*).

Как следует из представленной на рисунке диаграммы, интенсивность транслокации ДНК в митохондрии в протопластах мутанта *vdac1* была выше более чем в 4 раза по сравнению с уровнем митохондриального импорта в протопластах дикого типа. Импорт в митохондрии протопластов *vdac3* оставался на уровне, показанном для дикого типа. Эти данные согласуются с результатом, полученным нами в

экспериментах по импорту ДНК в изолированные митохондрии в системе *in organello*. В этих экспериментах мы наблюдали повышенную активность импорта ДНК в митохондрии, выделенные из мутантов по VDAC, сравнительно с растениями дикого типа. Следует отметить, что отличия в интенсивности импорта в митохондрии мутанта *vdac1* были заметно более выраженными по сравнению с митохондриями *vdac3*.

Таким образом, нами впервые разработана система, позволяющая детектировать транслокацию ДНК, происходящую на уровне живой растительной клетки. Отмечено, что ряд показанных с использованием этой системы закономерностей импорта сходен с таковыми, продемонстрированными ранее для импорта в изолированные митохондрии, что свидетельствует в пользу того, что оба подхода отражают процессы, происходящие в целом растении.

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

Литература

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, № 10. – С. 1307–1321.

Ibrahim N., Handa H., Cosset A., Koulintchenko M., Konstantinov Y., Lightowlers R.N., Dietrich A., Weber-Lotfi F. DNA delivery to mitochondria: sequence specificity and energy enhancement // Pharm. Res. – 2011. – V. 28. – 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. – P. 1245–1254.

Mileshina D., Koulintchenko M., Konstantinov Yu., Dietrich A. Transfection of plant mitochondria and *in organello* gene integration // Nucleic Acids Research. – 2011. – V. 39 (17). – e115.

Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis // Nature Protoc. – 2007. – V. 2 (7). – P. 1565–1572.

STUDY OF DNA IMPORT INTO MITOCHONDRIA IN VIVO USING ARABIDOPSIS PROTOPLASTS

V.I. Tarasenko, T.A. Bolotova, M.V. Koulintchenko, Y.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russia,
vslav@inbox.ru

Abstract. It is known that mitochondria isolated from different plants are able to import DNA. However, all studies in the field of DNA import have been conducted using *in organello* system, and the confirmation of the existence of DNA import into the mitochondria *in vivo* seems to be an extremely important task. We have developed a method for detecting DNA import into mitochondria using Arabidopsis protoplasts. It is shown that the DNA located in the cytoplasm of the plant cell actively enters the mitochondria. The similarity of a number of import characteristics *in vivo* and *in organello* was noted.

Keywords: DNA import, protoplasts, VDAC, *Arabidopsis thaliana*