

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ИМПОРТА ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

Ю.М. Константинов^{1,2}, М.В. Кулинченко¹, Е.С. Клименко¹,
Т.А. Болотова¹, В.И. Тарасенко¹, В.Н. Шмаков¹

¹ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск

Генетическую систему митохондрий высших растений отличает от других представителей эукариот высокая динамичность и чрезвычайно большие размеры митохондриальной хромосомы, а также наличие видоспецифических наборов кольцевых и линейных плазмид. Такие особенности митохондриального генома растений связывают с активно протекающими в этих органеллах процессами горизонтального переноса генов, которые происходят, по всей вероятности, с участием механизма импорта ДНК в митохондрии (Константинов и др., 1988, 1989; Koulintchenko et al., 2003; Клименко и др., 2011). Мы предположили, что набор участвующих в импорте ДНК белков не ограничивается, как показано ранее порином (VDAC) в наружной мембране и адениннуклеотид-транслоказой (АНТ) во внутренней мембране органелл (Koulintchenko et al., 2003), а перенос молекул ДНК разной длины может происходить с участием нескольких мембранных каналов. В данной работе предпринята попытка выявления и расшифровки альтернативных путей импорта ДНК разной длины и структуры в митохондрии растений. Основными используемыми подходами были: (1) ингибиторный анализ активности ряда мембранных переносчиков, предположительно вовлеченных наряду с транспортом метаболитов в процессы переноса ДНК в митохондрии; (2) использование мутантных линий арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) с инактивированными генами, кодирующими потенциальные белковые факторы импорта нуклеиновых кислот; (3) изучение импорта ДНК в митохондрии протопластов. Общеизвестно также, что важную роль в нормальном функционировании митохондрий играет постоянное взаимодействие этих органелл с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР) (Camara et al., 2010; Lebedzinska et al., 2009). В частности, межмембранные контакты митохондрий и ЭР необходимы для импорта синтезируемых в ЭР липидов в митохондрии (Flis, Daum., 2013). В связи с этим нами был изучен также митохондриальный импорт ДНК в реконструированной системе, включающей изолированные митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*) и микросомальную фракцию мембран ЭР нескольких видов растений. Для получения изолированных митохондрий использовали растительный материал *Solanum tuberosum*, *Brassica rapa*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*. Импорт ДНК в митохондрии проводили в системе *in organello* с использованием радиоактивно меченой ДНК (Koulintchenko et al., 2003) и/или методом ПЦР в реальном времени (Клименко и др., 2011). Для выявления и характеристики возможных альтернативных путей транспорта ДНК в митохондрии использовали набор ДНК-субстратов длиной от 100 п.н. до 12000 п.н., разбитый условно на группы субстратов малой (100–300 п.н.), средней (700–3000 п.н.) и большой (> 6000 п.н.) длины. Для изучения роли структурных особенностей ДНК-субстратов импорта использовали набор конструкций, различающихся наличием или отсутствием концевых инвертированных повторов (КИП) линейной плазмиды 11,6 т.п.н. митохондрий репы (*Brassica rapa*) или линейных S1, S2 плазмид кукурузы (*Zea mays*).

В ходе выполнения работы получены следующие результаты. Чтобы выяснить вопрос о возможном существовании независимых путей импорта ДНК разной длины в митохондрии, мы определили кинетические параметры поглощения ДНК-субстратов

малой и средней длины изолированными митохондриями *S. tuberosum*. В случае импорта ДНК малой длины (265 п.н.) обнаружено практически полное отсутствие насыщения транспорта по мере увеличения концентрации субстрата: количество поглощенной ДНК увеличивалось пропорционально содержанию ДНК, добавленной в среду инкубации митохондрий. В случае импорта фрагмента ДНК средней длины (2732 п.н.) выявилась другая зависимость эффективности поглощения субстрата от его содержания в среде инкубации: при содержании от 0,063 до 0,25 мкг наблюдается незначительное увеличение количества поглощенной ДНК; затем при концентрациях от 0,5 до 1,5 мкг происходит резкое увеличение активности поглощения, в 2 раза, и, далее, при содержании 2–4 мкг наблюдалось еще одно резкое увеличение уровня поглощения, в 2,5–3 раза. Полученные данные, позволяют заключить, что импорт ДНК малой и средней длины происходит, по всей видимости, с помощью различных механизмов, поскольку в случае импорта ДНК-субстрата 265 п.н. не происходило насыщения процесса в использованных условиях, тогда как для импорта ДНК-субстрата 2732 п.н. характерно ступенчатое насыщение процесса. Ступенчатый характер насыщения в последнем случае указывает на то, что транспорт молекул ДНК средней длины осуществляется не только с участием VDAC во внешней и АНТ во внутренней митохондриальной мембранах (Koulintchenko et al., 2003). Вероятно, при насыщении конкретного транспортного пути импорта ДНК в процесс последовательно включаются другие способы транспортировки ДНК через двойную мембрану митохондрий, основанные на работе альтернативных белков-переносчиков. Определение кинетики транспорта ДНК малой длины (265 п.н.) в митохондрии показало, что ДНК такого размера может переноситься в органеллы как с участием VDAC и АНТ, так и посредством других мембранных каналов без участия специфической рецепции белками внешней мембраны митохондрий. Изучение участия VDAC (порина) в механизме импорта ДНК с использованием инсерционных мутантов арабидопсиса с инактивированными генами At3g01280 и At5g15090, кодирующими изоформы митохондриального порина VDAC1 и VDAC3, соответственно, позволило установить, что митохондрии, выделенные из мутантов с отсутствием одной из этих изоформ порина (VDAC1 или VDAC3) транспортируют ДНК с большей эффективностью по сравнению с митохондриями растений дикого типа. При этом импорт ДНК малой и средней длины в большей степени активируется в митохондрии мутанта *vdac1* по сравнению с митохондриями мутанта *vdac3*.

Примечательно, что усиление активности митохондриального импорта у этих мутантов не было специфичным в отношении длины транспортируемой молекулы ДНК. В настоящее время пока трудно найти объяснение наблюдаемому нами явлению стимуляции митохондриального импорта ДНК в отсутствие изоформ VDAC. Можно предположить, что в случае этих мутаций нарушена барьерная («запирающая») функция порина в наружной митохондриальной мембране, в большей степени, выраженная в отношении транспорта молекул ДНК малой длины. В специальной серии экспериментов установлено, что микросомальная фракция клетки (мембраны ЭР) оказывает выраженное стимулирующее действие на транспорт ДНК в митохондрии. Активирующее влияние микросом на митохондриальный импорт ДНК имело выраженный видоспецифический характер. Активация импорта ДНК в митохондрии такого представителя двудольных растений как картофель (*S. tuberosum*) в присутствии микросом, полученных из двудольных растений, была значительно выше по сравнению с эффектом микросомальной фракции из проростков такого представителя однодольных как кукуруза (*Zea mays*). Полученные результаты служат указанием на важную роль взаимодействий митохондрий и эндоплазматического ретикула в импорте ДНК в митохондрии *in vivo*. Для получения более детальных представлений о возможной физиологической и генетической значимости импорта ДНК в митохондрии *in vivo* была разработана специальная система, основанная на получении изолированных протопластов *Arabidopsis thaliana*. С использованием протопластов установлено, что находящаяся в цитоплазме ДНК может активно поступать в митохондрии. Содержание импортированного в мито-

хондрии ДНК-субстрата при этом существенно выше в условиях импорта *in vivo* по сравнению с условиями *in organello*. Показано, что количество молекул ДНК, импортировавшихся в митохондрии в условиях *in vivo*, уменьшается с увеличением размера импортируемого субстрата. При трансформации ДНК протопластов, изолированных из листьев растений дикого типа (*Col-0*) и двух мутантных линий *vdac1* и *vdac3*, происходила активация транспорта ДНК в митохондрии в протопластах мутанта с инактивированной изоформой порина VDAC1 по сравнению с уровнем митохондриального импорта в протопластах дикого типа и *vdac3*. Сходные зависимости, полученные в экспериментах по изучению импорта ДНК в изолированных митохондриях и в протопластах, свидетельствуют в пользу того, что обнаруженные закономерности импорта ДНК *in organello* отражают процессы, протекающие *in vivo*. Совокупность полученных в данной работе фактов в пользу существования в митохондриях растений нескольких механизмов импорта ДНК наглядно, на наш взгляд, подтверждает необходимость активного продолжения исследований в этом направлении, поскольку выяснение детальных механизмов импорта ДНК позволит в будущем разработать эффективные методы манипуляций с митохондриальным геномом для решения фундаментальных и прикладных задач молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии и биомедицины.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 15-04-05046, 15-54-16010, 18-04-00603).

Литература

Клименко Е.С., Милейко В.А., Морозкин Е.С., 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.

Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н. Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды рBR322 в изолированных митохондриях кукурузы // Доклады АН СССР. – 1988. – Т. 298. – С. 502–504.

Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н., Ривкин М.И. Транслокация бактериальных векторных плазмид в митохондрии проростков кукурузы // Биохимия. – 1989. – Т. 54. – С. 154–158.

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 (Ferro-Novick S., Rapoport T.A. and Schekman R., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. – 2013. – P. 109–130.

Koulintchenko, M., Konstantinov, Y. and Dietrich, A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // The EMBO Journal. – 2003. – V. 22. – 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.