

УДК 577.29

ИМПОРТ ДНК В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ: КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ *in organello* И *in vivo**

© 2019 Т.А. Тарасенко[#], В.И. Тарасенко[#], М.В. Кулинченко**,
Е.С. Клименко, Ю.М. Константинов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033 Иркутск, Россия; электронная почта: mk100171@yahoo.com

Поступила в редакцию 06.03.2019

После доработки 02.04.2019

Принята к публикации 10.04.2019

Природная компетентность митохондрий к поглощению ДНК – феномен, известный на протяжении последних 20 лет. Все исследования этого процесса до настоящего времени проводили исключительно на уровне изолированных митохондрий, поскольку отсутствовала система, позволяющая изучать перенос ДНК в эти органеллы в целых клетках. Нами проведена работа по усовершенствованию и стандартизации существующих подходов к изучению импорта ДНК в митохондрии растений в системе *in organello*. Разработан метод детекции импорта флуоресцентно меченых субстратов ДНК. С учетом выявленных особенностей процесса импорта ДНК, предложен эффективный метод оценки его интенсивности с помощью количественной ПЦР. Нами разработана и детально охарактеризована также система *in vivo*, позволяющая исследовать процесс переноса молекул ДНК из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в протопластах *Arabidopsis thaliana*. Предлагаемый комплексный подход для изучения природной компетентности митохондрий растений к поглощению ДНК позволит установить, сохраняются ли *in vivo* закономерности митохондриального импорта ДНК, показанные *in organello*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: импорт ДНК, митохондрии растений, флуоресцентное мечение, трансформация протопластов, *Arabidopsis thaliana*.

DOI: 10.1134/S032097251907011X

Как известно, большинство митохондриальных белков кодируются ядерными генами и после биосинтеза в цитоплазме импортируются в митохондрию. Тем не менее митохондрии имеют собственную генетическую систему, которая обеспечивает органеллу набором белков, необходимых для формирования структуры комплексов окислительного фосфорилирования или их биогенеза. Компактно организованный геном митохондрий млекопитающих размером 16,5 т.п.н. кодирует 13 полипептидных компонентов электрон-транспортной цепи, 2 тРНК и 2 рРНК [1]. По сравнению с геномом млекопитающих, мт-геном растений обладает огромным размером, который может превышать 1500 т.п.н. [2, 3]. При этом мтДНК растений содержит только 60 генов, кодирующих 3 рРНК, 15–20 тРНК и 30–35 известных белков. Тем не менее для более чем половины последовательностей мт-генома растений функции не известны, и отсутствуют

какая-либо гомология с имеющимися в базах данных последовательностями [4].

Известно, что для митохондриального генома растений характерна удивительно высокая, в сравнении с другими геномами, частота событий горизонтального и внутриклеточного переносов [5]. Более 5% нуклеотидных последовательностей митохондриального генома имеют хлоропластное, ядерное или вирусное происхождение [4, 6]. Высока вероятность того, что на структуру и динамику митохондриального генома растений значительное влияние может оказывать наличие у митохондрий природной компетентности – способности поглощать ДНК из окружающей среды. Этот феномен был первоначально продемонстрирован для растений [7, 8], но в дальнейшем был описан также для митохондрий млекопитающих [9] и дрожжей [10]. Митохондрии также импортируют РНК, главным образом тРНК. Установлено, что митохондриальный порин (VDAC) является основным участником этого процесса, кроме того, показано, что компоненты аппарата импорта белков также вовлечены в процесс импорта РНК [11, 12].

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 19-066, 1.07.2019.

** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

В отличие от импорта белков и тРНК, биологическая роль и молекулярный механизм импорта ДНК в митохондрии до сих пор остаются недостаточно изученными. Накопленные данные свидетельствуют о том, что VDAC, как и в случае импорта РНК, является основным каналом импорта ДНК [7, 13, 10]. Недавние исследования выявили другие белки, которые могут быть вовлечены в этот процесс [14]. Одним из этих белков может быть предшественник β -субъединицы АТФ-синтазы, связанный с внешней мембраной, где он может взаимодействовать с VDAC в процессе связывания ДНК. Кроме того было показано, что CuVpp, субъединица комплекса I, действующая как рецептор в межмембранном пространстве, играет роль в импорте длинных фрагментов ДНК [14]. Перенос ДНК через внутреннюю мембрану в матрикс остается малоизученным и может происходить в растениях и у млекопитающих с участием различных механизмов: ингибиторы белка-переносчика внутренней мембраны адениннуклеотид-транслоказы блокируют импорт ДНК в растениях, но не в митохондриях млекопитающих [9].

Ранее при изучении процесса импорта ДНК в митохондрии использовали преимущественно радиоактивно меченые субстраты ДНК [7]. Анализ с помощью радиоавтографии позволяет визуализировать полноразмерные молекулы импортированной ДНК, оценить влияние тех или иных эффекторов на интенсивность переноса ДНК. Тем не менее, введение радиоактивной метки имеет ряд недостатков – радиоактивность может быть опасна для здоровья, требует для работы с ней специальных, лицензируемых условий, время полураспада ^{32}P составляет всего 14 суток.

Помимо радиоактивного метода при изучении процесса импорта были получены доказательства попадания ДНК в митохондриальный матрикс с помощью методов транскрипции [7] и гомологичной рекомбинации *in organello* [15]. Импорт генетических конструкций с последующим анализом их транскрипции с помощью ОТ-ПЦР или проведение гомологичной рекомбинации *in organello* оптимальны для изучения процессов, связанных с экспрессией экзогенной ДНК и ее сохранением в составе мт-генома. Однако эти методы не подходят для оценки интенсивности процесса импорта ДНК в митохондрии. Таким образом, все подходы, использованные ранее для изучения импорта, имеют ряд недостатков.

Важно отметить, что все исследования импорта ДНК в митохондрии животных и растений, проводившиеся до настоящего времени,

осуществлялись на уровне изолированных митохондрий. До настоящего момента остается неясным происходит ли импорт на уровне целых клеток и сохраняются ли *in vivo* закономерности этого процесса, продемонстрированные ранее *in organello*. Разработка системы, позволяющей изучать механизмы переноса молекул ДНК из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в целых клетках, помимо фундаментальной значимости, может послужить отправной точкой для осуществления трансформации мт-генома высших растений, чрезвычайно важной и, на настоящий момент, нерешенной задачи.

Таким образом, очевидна необходимость оптимизации и стандартизации условий и подходов в исследовании импорта ДНК *in organello* и, что особенно важно, создания системы, позволяющей изучать транспорт ДНК в митохондрии *in vivo*. В данной работе мы представляем комплексный подход для изучения импорта ДНК в митохондрии с использованием двух систем – *in organello* и *in vivo*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал и условия выращивания. Растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип *Columbia* (*Col-0*) после стратификации в течение 3 суток при 4 °С выращивали при 22 °С в ростовой камере KBW-720 («Binder», Германия), в горшках, наполненных смесью почвогрунта для комнатных растений/торфа/вермикулита (2 : 1 : 3) при освещенности 150 мкмоль \times м $^{-2}$ \times с $^{-1}$ и длине светового дня 16 ч. Этилированные проростки кукурузы *Zea mays* (сорт «Кубанский 250 МВ») выращивали при 29 °С в течение 4 суток в темноте. В работе были использованы также клубни картофеля *Solanum tuberosum* (сорт «Адретта») и корнеплоды репы *Brassica rapa* (сорт «Внучка»). Семена кукурузы приобретены в НПО «КОС-МАИС», Краснодар; картофель выращен на территории СИФИБР СО РАН, Иркутск; семена репы приобретены в торговой сети.

Получение субстратов импорта ДНК. Для амплификации ДНК использовали Taq-полимеразу («Thermo Scientific», США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для получения флуоресцентного ДНК-субстрата использовали олигонуклеотиды, содержащие на 5'-конце флуоресцирующую группу Cy3 («Евроген», Россия), и позволяющие получить фрагменты ДНК размером 269 п.н., 852 п.н. и 2,7 т.п.н. (табл. 1). Режим амплификации для фрагментов размером 269 п.н. и 852 п.н.: 94 °С – 3 мин (1 цикл); 94 °С – 30 с, 58 °С – 45 с, 72 °С – 45 с, (30 цик-

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для получения флуоресцентного ДНК-субстрата

Название праймера	5'-3' последовательность праймеров
269bp-F	Cy3-ATGAGTAAAGGAGAAGAАСТТТТCACT
269bp-R	Cy3-CGGGGCATGGCACTCTTGA
852bp-F	Cy3-CTGTTCCCTTGGCCACACT
852bp-R	Cy3-ACGCTCTGTAGGATTTGAACC
2.7kb-F	Cy3-CCAACCACCACATACCGAAA
2.7kb-R	Cy3-ACGCTCTGTAGGATTTGAACC

лов); 72 °С – 1 мин. Для фрагмента размером 2,7 т.п.н. использовали следующий режим амплификации: 94 °С – 3 мин (1 цикл); 94 °С – 30 с, 60 °С – 45 с, 72 °С – 180 с (30 циклов); 72 °С – 5 мин. ДНК очищали на колонках GeneJET™PCR Purification Kit («Thermo Scientific», США) согласно инструкции производителя. Качество ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически с использованием Gel Doc XR System («BioRad», США), количество ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 («IMPLEN», Германия). Генетическая конструкция рСК/GFP/PRmt [7], содержащая последовательность гена *GFP*, служила матрицей для амплификации.

Выделение митохондрий. Митохондрии получали согласно описанным ранее протоколам из *Arabidopsis thaliana* [16], этиолированных проростков *Zea mays* [17], клубней *Solanum tuberosum* и корнеплодов *Brassica rapa* [18]. Количество белка в суспензии митохондрий оценивали по методу Бредфорда [19]. Очищенную фракцию митохондрий исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе Leo 906E («Zeiss», Германия). [20].

Импорт ДНК в изолированные митохондрии. Импорт ДНК проводили в буфере импорта, содержащем 0,4 М сахарозы, 40 мМ фосфата калия, рН 7,0, при температуре 25 °С и постоянном покачивании (350 rpm) на термошейкере для микропробирок и ПЦР планшетов TS-100 («BioSan», Латвия) в течение 30 мин [7], объем реакции составлял 100–200 мкл. Обработку митохондрий ДНКазой проводили в буфере импорта (100 мкл) в присутствии ДНКазы I (500 мкг/мл) («Sigma», США) и 10 мМ MgCl₂ в течение 20 мин при 25 °С. Дальнейшую отмывку проводили как описано ранее [7]. Для получения митопластов внешнюю мембрану митохондрий разрушали с помощью осмотического шока: осадок митохондрий ресуспендировали в 1 мл 5 мМ фосфата калия, рН 7,5, инкубировали на льду 5 мин,

затем осаждали и промывали в буфере, содержащем 0,3 М сахарозу, 10 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, рН 7,2.

Определение дыхательного контроля и интактности митохондрий. Анализ функциональной активности изолированных митохондрий (100 мкг белка) проводили полярографическим методом с использованием платинового кислородного электрода и ячейки Oxytherm system («Hansatech», Великобритания). Коэффициент дыхательного контроля митохондрий определяли согласно описанному ранее протоколу [21]. Интактность внешней мембраны митохондрий рассчитывали, как описано ранее [22].

Получение протопластов и их трансфекция ДНК. Протопласты получали из листьев *A. thaliana* в возрасте 35 суток, согласно описанному ранее протоколу [23] с модификациями. Верхний слой эпидермиса удаляли с помощью липкой ленты. Куски липкой ленты с приклеившимся нижним эпидермисом и клетками мезофилла помещали на поверхность среды выделения протопластов (0,4 М маннитол, 10 мМ CaCl₂, 20 мМ KCl, 20 мМ MES, рН 5,7, 0,1% БСА), содержащей 1% целлюлазу и 0,25% пектолиазу («MP Biomedicals», США) и инкубировали при легком покачивании при 23 °С на свету в течение 2 ч. К отобранной суспензии протопластов добавляли 15 мл среды промывания (СП), содержащей 154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl₂, 5 мМ KCl, 5 мМ глюкозу, 2 мМ MES, рН 5,7 и центрифугировали в течение 3 мин при 100 g, используя Allegra 64R («Beckman Coulter», США), при 20 °С. Супернатант удаляли, осадок протопластов ресуспендировали в 15 мл среды СП и повторяли центрифугирование. Осадок ресуспендировали в среде, содержащей 0,4 М маннитол, 15 мМ MgCl₂, 4 мМ MES, рН 5,7 из расчета 300 мкл на один образец. К суспензии протопластов добавляли раствор ДНК-субстрата (5 мкг), после чего к пробам добавляли 300 мкл раствора, содержащего 20% (w/v) PEG (MW 2000), 0,2 М маннитол, 100 мМ CaCl₂, и инкубировали в течение 5 мин. Суспензию протопластов подвергали трем циклам центрифугирования в 1,5 мл СП в течение 1 мин при 100 g и 20 °С. Протопласты ресуспендировали в СП и инкубировали в 48-луночном планшете (200 мкл на лунку) при 22 °С и слабом освещении в течение 20 ч.

Выделение митохондрий из протопластов *A. thaliana*. Целостность протопластов оценивали методом световой микроскопии. Суспензию протопластов центрифугировали в течение 1 мин при 100 g и 20 °С. К осадку добавляли 400 мкл среды выделения митохондрий (СВ) (0,4 М сахароза, 50 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂, 0,2% БСА, 2 мМ DTT). Непосредственно перед

использованием в СВ добавляли ДНКазу I из расчета 1 ед. акт. фермента на 50 мкл СВ. Протопласты разрушали с помощью гомогенизатора Поттера. К каждому образцу добавляли СВ до объема 1 мл и подвергали двум циклам последовательных низко- и высокоскоростных центрифугирований: в течение 5 мин при 3000 g и 4 °С и в течение 7 мин при 15 000 g и 4 °С, используя Allegra 64R («Beckman Coulter», США). Осадок митохондрий ресуспендировали в 100 мкл среды обработки ДНКазой (0,4 М сахараза, 40 мМ KH_2PO_4 , pH 7,0), содержащей 0,2% БСА, 10 мМ MgCl_2 и ДНКазу I из расчета 1 ед. акт. фермента на 50 мкл среды и инкубировали 20 мин при 25 °С. После инкубации митохондрии подвергали двум циклам центрифугирования в среде промывания, содержащей 0,2% БСА, 10 мМ EDTA и 10 мМ EGTA в течение 7 мин при 15 000 g и 4 °С.

Экстракция нуклеиновых кислот. Экстракцию ДНК из осадка митохондрий проводили с использованием буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, 1% (w/v) SDS, pH 7,5, и равного объема фенола. Нуклеиновые кислоты, содержащиеся после центрифугирования в водной фазе, осаждали этанолом в присутствии 200 мМ NaCl. Элюцию ДНК из геля проводили с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Scientific», США). Для анализа эффективности импорта флуоресцентно меченого ДНК-субстрата пробы подвергали электрофоретическому разделению в 1 %-ном агарозном геле и сканировали при помощи Ettan™ DIGE Imager («GE Healthcare», Швеция).

Количественная ПЦР. кПЦР проводили с использованием набора SYBR Select Master Mix («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Список использованных праймеров приведен в табл. 2. Амплификацию

проводили на CFX96 («Bio-Rad», США) в следующем режиме: 50 °С – 2 мин, 95 °С – 3 мин, 1 цикл; 95 °С – 20 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с, 40 циклов. Данные анализировали при помощи программного обеспечения CFX Manager («Bio-Rad», США). Все процедуры проводили как минимум в трех независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Импорт ДНК в растительные митохондрии в системе *in organello*. Нами был разработан альтернативный способ анализа импорта ДНК в изолированные митохондрии растений с использованием флуоресцентно меченой ДНК. Мы предположили, что введение в молекулы ДНК нерадиоактивной флуоресцентной метки позволит преодолеть недостатки радиоактивного мечения, сохраняя при этом основные преимущества использования для импорта меченых субстратов ДНК – такие, как возможность тестирования после экстракции полноразмерных импортированных молекул, высокая чувствительность и специфичность.

Флуоресцентную метку в состав субстрата импорта вводили амплификацией молекул ДНК с помощью праймеров, несущих на 5'-концах цианин 3 (Cy3) (рис. 1, а). Пользуясь данным подходом, мы получили флуоресцентно меченые субстраты ДНК (рис. 1, б) и оценили возможность их использования в зависимости от времени хранения. Пробы не теряли своей способности к флуоресценции в течение месяца: количество детектируемой ДНК (не менее 0,5 нг) оставалось на одном уровне (рис. 1, в).

Мы провели анализ импорта флуоресцентно меченых субстратов ДНК разной длины в митохондрии, выделенные из разных растительных источников (*Z. mays*, *B. rapa* и *A. thaliana*) (рис. 2). Оценка функциональной активности полученных митохондриальных препаратов показала, что митохондрии всех тестируемых растений обладали высокой степенью сопряжения окисления и фосфорилирования (величина дыхательного контроля ~4 при окислении сукцината), а их интактность составляла 85–90%. Согласно данным электронной микроскопии, полученные фракции митохондрий характеризовались высокой степенью очистки (рис. 2, а и б).

Сканирование флуоресценции препаратов мтДНК, выделенной из всех трех тестируемых нами растений, позволило детектировать полноразмерные молекулы ДНК, импортированные в митохондриальный матрикс (рис. 2, в). Таким образом, очевидно, что флуоресцентно меченую ДНК можно использовать в исследова-

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных для оценки количества импортированных ДНК-субстратов

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
gfp-F	GATGTGGAAAACAAGACAGGGGTTT
gfp-R	TGGTGAACCGGGCGTACTATTT
nad4-F	GCAATTCAGTGGGTTGGTCTGGT
nad4-R	AGGGATTGGCACGCTTTCCGG
rbcL-F	TGCCGTAGCCAACCGAGT
rbcL-R	TCTTTCCATACTTCACAAGCAGCA
yls8-F	GAGGTGCTTGCGTCTGTTGCT
yls8-R	TGTCSTTGAGAGCCCAGTTGAT

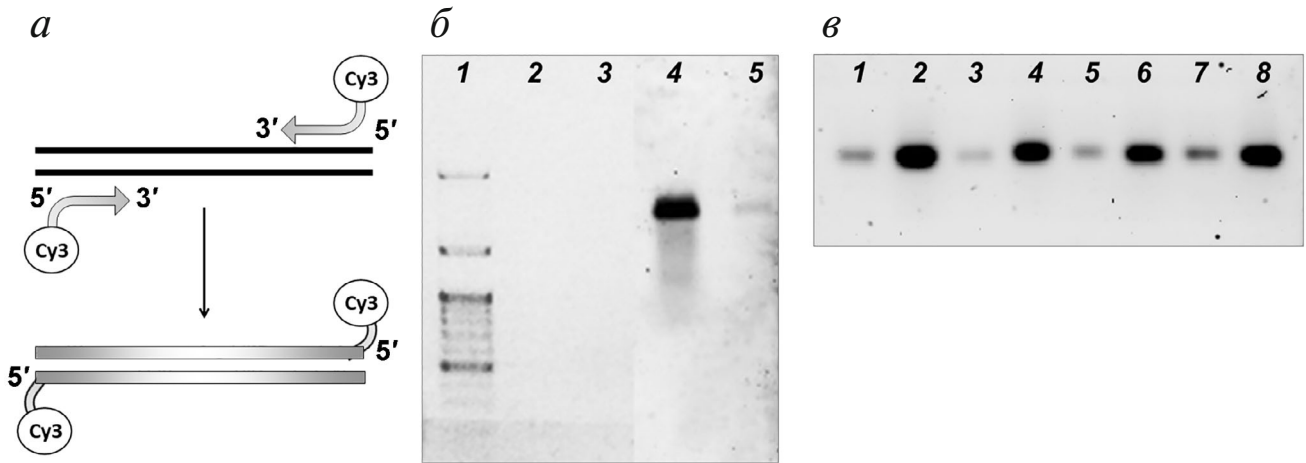


Рис. 1. Флуоресцентно меченые субстраты ДНК для импорта в митохондрии. *a* – Схема способа введения флуорофора Cy3 в молекулы ДНК; *б* и *в* – флуоресцентно меченые фрагменты ДНК 852 п.н. *б* – На гель нанесены 5 нг (2, 4) и 0,5 нг (3, 5) ДНК; (1–3) – визуализация ДНК после окрашивания бромистым этидием, (1) – маркер молекулярного веса ДНК; (4 и 5) – визуализация ДНК в сканере флуоресценции; *в* – визуализация флуоресцентно меченых проб ДНК; (1 и 2) – 4х-, (3 и 4) – 3х-, (5 и 6) – 2х-, (7 и 8) – 1-недельные пробы; (1, 3, 5 и 7) – 1 нг, (2, 4, 6 и 8) – 5 нг нанесенной на гель ДНК фрагмента 852 п.н

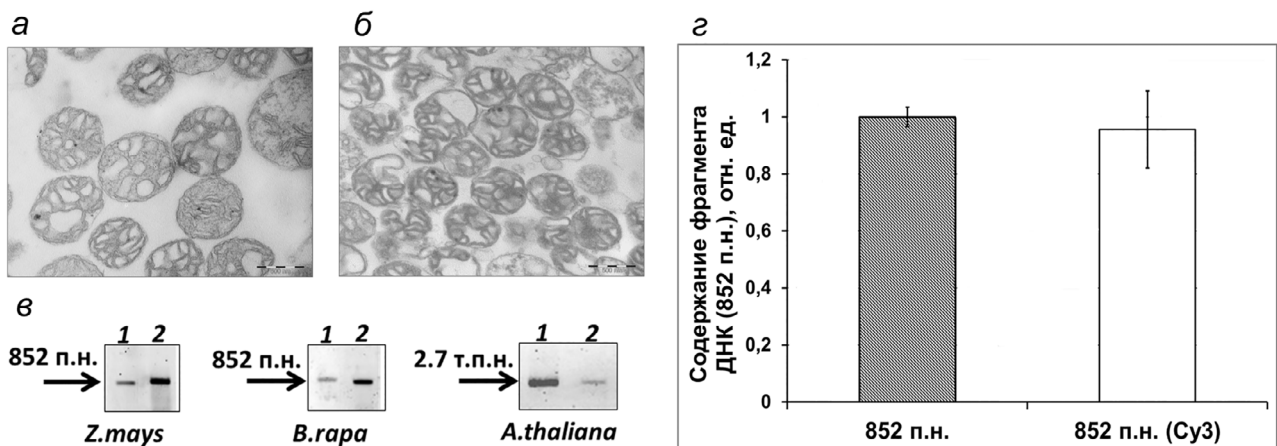


Рис. 2. Импорт меченой (Cy3) ДНК в растительные митохондрии. Митохондрии *B. rapa* (*a*) и *Z. mays* (*б*), изображения получены с помощью электронной микроскопии (масштаб 500 нм). *в* – Флуоресцентно меченая ДНК (0,5 мкг) размером 852 п.н. и 2,7 т.п.н. была импортирована в изолированные митохондрии *Z. mays*, *B. rapa* и *A. thaliana*. После инкубации с митохондриями мтДНК была экстрагирована и разделена электрофоретически в агарозном геле. Дорожки: 1 – флуоресцентно меченый ДНК-субстрат до импорта, 2 – экстрагированный после импорта в митохондрии. *г* – Влияние наличия Cy3 на 5'-концах фрагмента ДНК размером 852 п.н. на его импорт в митохондрии

ниях по изучению эффективности митохондриального импорта *in organello*.

Однако, анализ импорта ДНК в митохондрии с применением флуоресцентно меченых субстратов обладает недостаточной чувствительностью для решения ряда принципиальных задач, в частности, для изучения митохондриального импорта ДНК *in vivo*. Этого недостатка практически лишен метод анализа импорта ДНК с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (кПЦР), позволяя опре-

делять значительно меньшие количества импортируемой ДНК. Очевидным недостатком данного подхода является то, что в реакции кПЦР детектируются не полноразмерные молекулы ДНК, а лишь ее фрагменты.

Впервые анализ импорта немеченых субстратов ДНК *in organello* с помощью кПЦР с использованием TaqMan-зондов был применен в работе Клименко с соавт. [24]. В данном исследовании мы разработали стандартизованную систему анализа импорта ДНК в кПЦР с ис-

пользованием интеркалирующего красителя SYBR Green, которая отличается удобством применения и относительной быстротой. Для анализа количества импортированной ДНК проводили амплификацию нуклеотидной последовательности размером 185 п.н., являющейся фрагментом импортированного субстрата. Параллельно, в каждой экспериментальной пробе проводили анализ количества эндогенного митохондриального гена *nad4*, по которому затем нормировали количество импортированной ДНК.

Анализ активности импорта флуоресцентно меченого субстрата с помощью кПЦР подтвердил, что присутствие флуорофоров на концах молекул ДНК не препятствует ее переносу в митохондриальный матрикс: меченая Су3 и немеченая ДНК фрагмента 852 п.н. импортировалась в митохондрии *A. thaliana* с равной эффективностью (рис. 2, з).

Исходя из накопленных экспериментальных данных, следует отметить, что корректность результатов, полученных с помощью кПЦР, зависит от условий постановки реакции импорта ДНК в митохондрии. Используя на настоящий момент подходы при постановке реакции импорта имели существенные различия в отношении наличия или отсутствия стадии получения митопластов, объема реакции импорта, способа экстракции мтДНК [7, 9, 14, 24] и др. В данной работе мы провели определение объема реакции импорта, оптимального для эффективного поглощения ДНК митохондриями. Нами была проанализирована интенсивность импорта ДНК в серии образцов, различающихся объемом митохондриального белка (200 мкг) и добавленного ДНК-субстрата (500 нг) (рис. 3, а). Низкой эффективностью импорта ДНК отличались образцы, объем реакции которых составил 20 и 50 мкл. В небольших объемах реакции митохондрии, скорее всего, агрегируют, что может являться причиной блокирования транспортных каналов, необходимых для процесса переноса макромолекул. Объем реакции 100–300 мкл оказался наиболее оптимальным для транспорта ДНК в митохондрии (рис. 3, а).

Анализ флуоресцентно меченой ДНК, экстрагированной после импорта в митохондрии и подвергшейся электрофоретическому разделению в агарозном геле, выявил, помимо полноразмерного импортированного фрагмента размером 852 п.н., наличие «фона» низкомолекулярных фрагментов (рис. 3, б, дорожка 1). Появление этих низкомолекулярных фрагментов обусловлено, скорее всего тем, что после обработки ДНКазой и отмывок некоторая часть не импортированных и частично деградированных

молекул остается связанной с внешней мембраной митохондрий или в межмембранном пространстве и экстрагируется вместе с мтДНК. Присутствие этого «фона» может негативно влиять на количественную оценку импорта. Удаление внешней митохондриальной мембраны с помощью осмотического шока (этап получения митопластов), проведенное после импорта ДНК в митохондрии, позволяет существенно снизить содержание низкомолекулярных фрагментов (рис. 3, б, дорожка 2). Эта процедура приводит в то же время и к довольно значительному снижению количества импортированной в митохондрии ДНК, выявляемого в кПЦР (рис. 3, в). Для того чтобы выяснить, насколько существенна доля низкомолекулярных фрагментов в получаемом количественном результате импорта целевых фрагментов ДНК, мы провели электрофоретическое разделение ДНК, экстрагированной после импорта в митохондрии и получения митопластов. Элюированные из агарозного геля мтДНК и участок, соответствующий полноразмерному импортируемому фрагменту, проанализировали с помощью кПЦР (рис. 3, з). Как оказалось, эффективность импорта ДНК, как в случае использования в качестве матрицы экстрагированной ДНК непосредственно после импорта, так и при использовании элюата, содержащего полноразмерные импортированную и мтДНК, практически не различалась (рис. 3, з).

Полученные результаты позволяют заключить, что анализ при помощи кПЦР, несмотря на лежащую в основе подхода детекцию небольшого амплифицируемого фрагмента ДНК, при анализе препарата выделенной из митопластов ДНК дает результаты, совпадающие с результатами анализа препарата, содержащего только полноразмерный фрагмент импортированной ДНК.

Импорт ДНК в растительные митохондрии в системе *in vivo*. Исследования импорта ДНК в клетках животных и растений до настоящего времени оставались ограниченными системой изолированных митохондрий. Нами впервые разработан подход, позволяющий детектировать транспорт ДНК из цитоплазмы в митохондрии, происходящий в протопластах *A. thaliana*. Данный подход включает: (а) трансформацию протопластов ДНК-субстратом; (б) инкубацию клеток в оптимальных физиологических условиях (температура, освещенность) в течение 20 ч; (в) разрушение протопластов и выделение митохондрий из протопластов микрометодом; (г) обработку изолированных митохондрий ДНКазой с целью избавления от возможного загрязнения фракцией ДНК, связанной с наружной мембраной; (д) лизис митохондрий и выделение мтДНК; (е) оценку количества им-

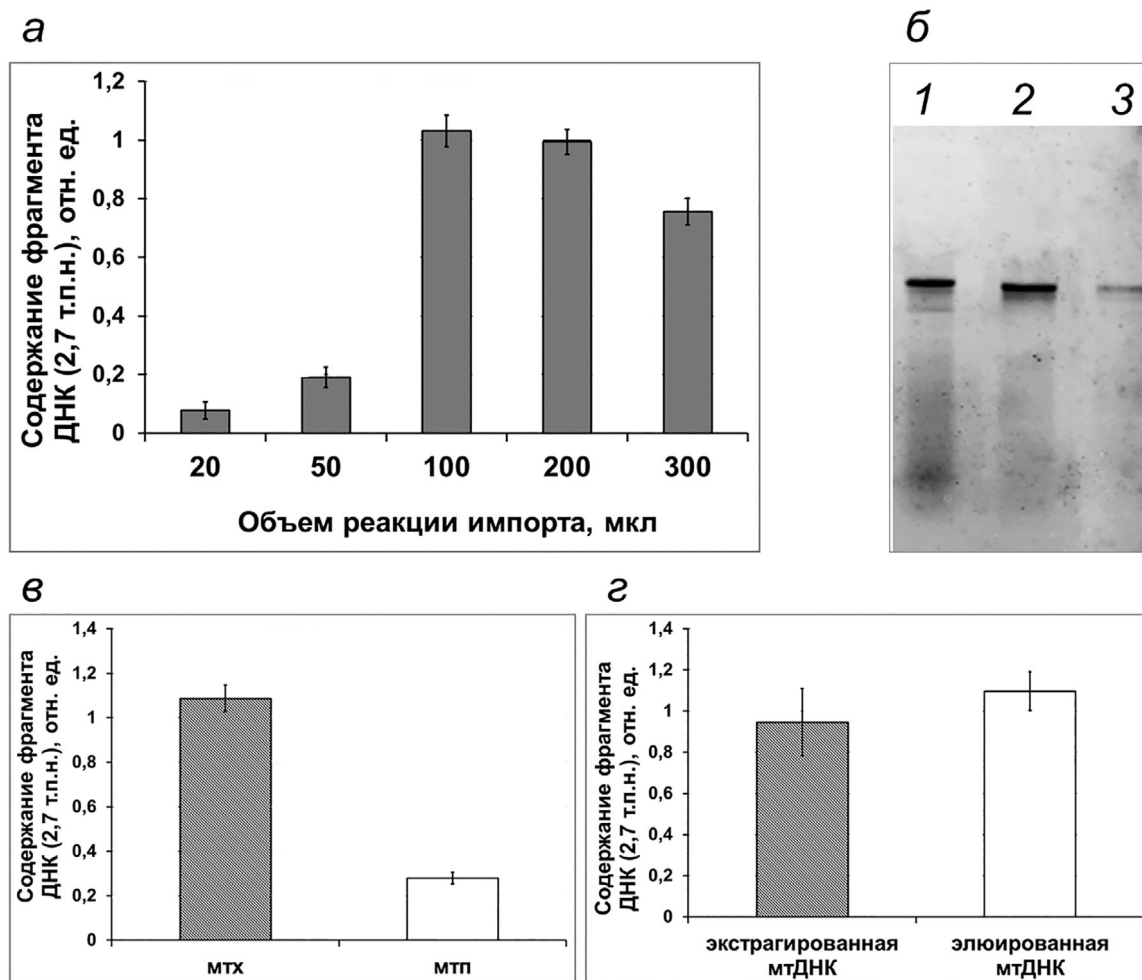


Рис. 3. Анализ параметров, влияющих на эффективность импорта ДНК в митохондрии. Импорт немеченого или флуоресцентно меченого фрагмента ДНК размером 2,7 т.п.н. проводили в митохондрии *S. tuberosum* (а), *A. thaliana* (б и в) и *B. rapa* (г). а – Относительное количество ДНК фрагмента размером 2,7 т.п.н., нормированное к содержанию фрагмента гена *nad4*, выявленное при анализе проб после импорта в изолированные митохондрии в условиях вариации объема реакции. б и в – анализ импорта ДНК после экстракции из митохондрий (дорожка 1, mtx) или митопластов (дорожка 2, mtp). г – кПЦР-анализ ДНК, экстрагированной после импорта в изолированные митохондрии (экстрагированная мтДНК) и подвергшейся элюции после разделения в агарозном геле (элюированная мтДНК)

портированной в митохондрии ДНК с помощью кПЦР. Использование флуоресцентного меченного ДНК-субстратов с помощью Су3-содержащих праймеров не позволило достичь эффективности включения, достаточной для выявления флуоресценции в препаратах ДНК митохондрий, выделенных из трансформированных протопластов (данные не приведены). Поэтому нами был выбран подход, включающий кПЦР-анализ, преимуществом которого является более высокая чувствительность.

Для получения протопластов из листьев *A. thaliana* и трансформации их ДНК был использован протокол, применявшийся ранее преимущественно в экспериментах, требующих временной экспрессии генетических конструк-

ций в цитоплазме [23]. Мы показали, что полученный препарат протопластов свободен от загрязнений, а протопласты сохраняют целостность в течение как минимум 20 ч после выделения и трансфекции их ДНК (рис. 4, а).

Митохондрии были выделены на основе метода, разработанного для получения органелл из протопластов суспензионной культуры *A. thaliana* [25], адаптированного нами для небольших количеств материала. С целью исключения возможности поглощения митохондриями фрагментов экзогенной ДНК в процессе выделения, в состав среды выделения митохондрий были включены $MgCl_2$ и ДНКаза I. Нами была произведена оценка степени загрязнения препарата ДНК, выделенного из протопластов митохондрий, последо-

вательностями ДНК немитохондриального происхождения. С этой целью был проведен кПЦР-анализ, в котором оценивалось содержание фрагментов хлоропластного гена *rbcL* и ядерного гена *yls8*. Установлено, что содержание как хлоропластной, так и ядерной ДНК в полученном препарате митохондрий снижено приблизительно в 500 раз по сравнению с ее содержанием в тотальной ДНК протопластов (рис. 4, б и в). Таким образом, митохондрии, выделенные примененным нами методом, имеют достаточно высокую степень очистки от чужеродных примесей.

В предварительных экспериментах протопласты были трансформированы ДНК-субстратом размером 2,7 т.п.н. После инкубации протопластов в течение 20 ч, выделения митохондрий и экстракции мтДНК, детекция с помощью кПЦР показала достаточно высокое содержание импортированного фрагмента ДНК.

Параллельно было проанализировано содержание того же ДНК-субстрата, импортированного в изолированные митохондрии *A. thaliana*. В результате показано, что содержание импортированного в митохондрии ДНК-субстрата было существенно выше в условиях импорта *in vivo* по сравнению с условиями *in organello* (рис. 4, г).

Для доказательства внутримитохондриальной локализации детектируемой ДНК митохондрии, выделенные из протопластов *A. thaliana*, были обработаны неионным детергентом Тритон X-100, нарушающим целостность митохондриальных мембран. Перед обработкой ДНКазой выделенные митохондрии инкубировали в среде, содержащей 0,5% (v/v) Тритон X-100, в течение 10 мин. Данная обработка приводила к практически полному отсутствию импортированного фрагмента ДНК (рис. 5, а), это служит важным аргументом в пользу того, что детектируемый

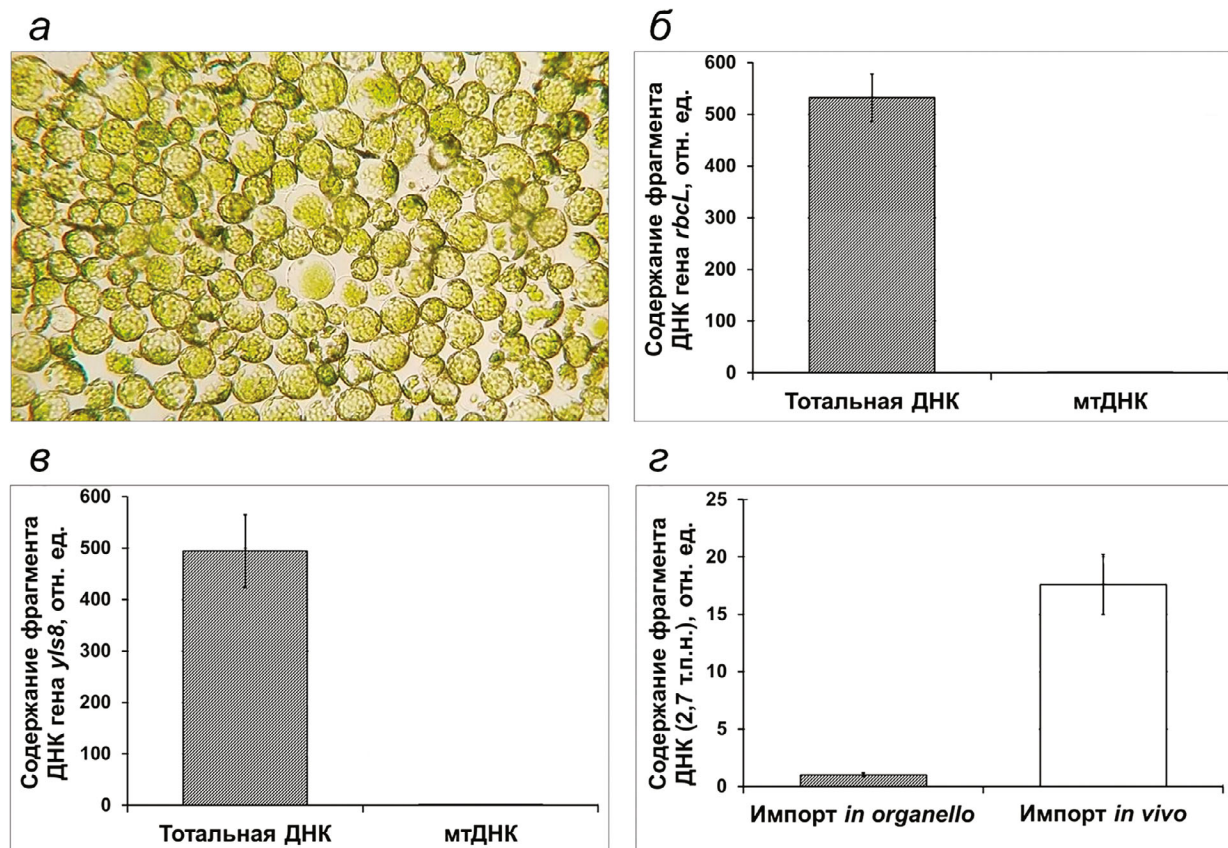


Рис. 4. Импорт ДНК в митохондрии протопластов *A. thaliana*. а – Внешний облик протопластов арабидопсиса после трансформации фрагментом ДНК и инкубации в течение 20 ч; б – анализ степени очистки митохондрий, выделенных из протопластов, от хлоропластного загрязнения; в – анализ степени очистки митохондрий, выделенных из протопластов, от загрязнения ядерной ДНК. Показано относительное количество фрагментов генов *rbcL* (хлДНК) и *yls8* (ядДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *nad4* (мтДНК), выявленное при анализе проб ДНК, выделенной из тотального экстракта протопластов и из препарата изолированных митохондрий; г – анализ импорта ДНК в изолированных органеллах (*in organello*) и в протопластах (*in vivo*) *A. thaliana*.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

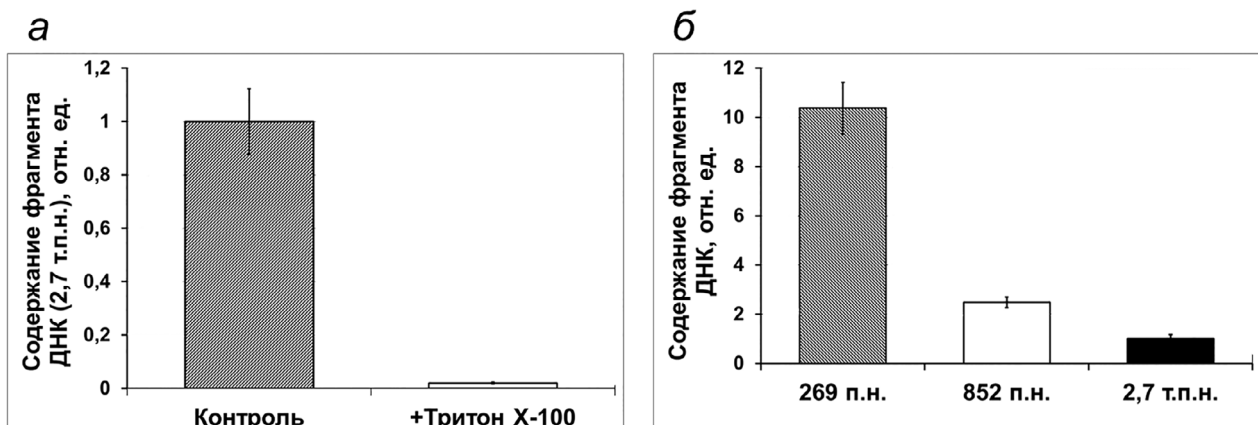


Рис. 5. Митохондриальный импорт ДНК, детектируемый (а) в условиях обработки митохондрий, выделенных из протопластов, детергентом Тритон X-100, и (б) в протопластах арабидопсиса с использованием ДНК различного размера. Показано относительное количество фрагмента гена *GFP* (содержащегося в импортированной ДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *nad4*

фрагмент локализован в матриксе митохондрий, а не ассоциирован с внешней мембраной.

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 (5 мкг). Из рис. 5, б видно, что количество молекул ДНК, импортировавшихся в митохондрии в условиях *in vivo*, уменьшается с увеличением размера импортируемого субстрата. Схожая зависимость была отмечена ранее для импорта фрагментов ДНК разного размера в изолированные митохондрии [7], это свидетельствует в пользу того, что обнаруженные нами закономерности импорта ДНК *in organello* отражают процессы, протекающие *in vivo*. Таким образом, нами впервые показано, что ДНК, находящаяся в цитоплазме целой растительной клетки, активно поступает в митохондрии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходя из особенностей структурной организации митохондриального генома растений, для которой характерны (i) большой размер в сравнении с мт-геномами других эукариотических организмов, (ii) наличие большого количества последовательностей чужеродного происхождения, (iii) наличие автономных репликонов, (iv) способность к рекомбинации, представляется весьма вероятным, что растительные митохондрии обладают выраженной способностью к захвату и интегрированию в геном чужеродных последовательностей. Действительно, с использованием подходов *in organello* и *in*

vivo нами показано существование феномена импорта ДНК в митохондрии высших растений. На настоящем этапе исследований сложно однозначно оценить значимость этого процесса для функций митохондрий в клетке. Не исключено, что это явление может быть следствием механизма, оставшегося от бактериального предка митохондрий: как известно, способность бактериальных клеток к захвату чужеродного генетического материала играет огромную роль в их эволюции [26, 27]. Наряду с этим, возможно участие митохондриальных транспортных каналов в поглощении молекул ДНК, имеющих вирусное происхождение, с целью запуска защитных механизмов клетки, связанных с митохондриями.

Достаточно хорошо известны пути транспорта ДНК в ядра растительных и животных клеток. Используя механизмы импорта клеточных белков ядерной адресации, через ядерную мембрану может транспортироваться ДНК вирусного происхождения [28]. Для двудольных растений характерен специфический перенос в ядро плазмидной ДНК при инфицировании агробактерией, опосредованный бактериальными белками VirD2 и VirE2. Кроме того, при использовании микроинъекции фрагментов ДНК в цитоплазму [29] и пермеабиллизации клеток дигитонином [30] показано существование неспецифического импорта фрагментов ДНК размером до нескольких т.п.н. в ядра клеток млекопитающих. На эволюционном уровне множество генов эубактериального происхождения мигрировали в ядро из клеточных органелл посредством внутриклеточного переноса генов [31]. В ядре растительных клеток присутствует практически полная копия хлоропластного генома [32, 33],

копии многих митохондриальных генов, кодирующих полипептиды [34] и тРНК [35]. Ядерные мобильные генетические элементы были приобретены во множестве случаев благодаря горизонтальному переносу генов [36]. Интересно, что события переноса генетического материала в геном хлоропластов чрезвычайно редки [37], при этом для хлоропластов, по-видимому, характерно отсутствие способности к активному поглощению ДНК [38]. Таким образом, наблюдается очевидная корреляция между способностью клеточной органеллы к транспорту ДНК и направлениями внутриклеточного переноса генетического материала в процессе эволюции. Мы предполагаем, что природная компетентность митохондрий к поглощению ДНК может являться одним из механизмов, посредством которых происходит миграция генетического материала внутри клетки. В данной работе представлены современные подходы к исследованию феномена импорта ДНК в растительные митохондрии.

Ранее в работах по изучению импорта ДНК в митохондрии использовали преимущественно радиоактивно меченые субстраты [7, 9, 10, 14]. Применение радиоактивно меченой ДНК имеет ряд существенных недостатков (табл. 3), поэтому для продолжения исследований этого явления необходимо было искать альтернативные подходы к детекции и анализу импортированной ДНК.

Нами был разработан способ детекции ДНК, импортированной в митохондрии растений, с помощью флуоресцентного мечения. Ранее единственное исследование импорта ДНК с использованием флуоресцентно меченых фрагментов [39] было проведено на изолированных митохондриях человека. Импортированную в митохондрии ДНК визуализировали с помощью конфо-

кальной микроскопии. Было показано, что меченая ДНК сохраняется после обработки ДНКазой, т.е. находится в матриксе органеллы. Однако данный метод не включал удаления внешней митохондриальной мембраны и не гарантировал избавления от ассоциированной с ней ДНК, а также не позволял различить флуоресценцию проникших в митохондрию полноразмерных фрагментов ДНК и продуктов их деградации.

Используя флуоресцентно меченые субстраты ДНК разной длины, мы изучили возможность их импорта в митохондрии трех видов растений (*A. thaliana*, *B. rapa* и *Z. mays*) и убедились, что наличие флуорофора не препятствует переносу полноразмерных молекул в митохондриальный матрикс. Однако, данный метод не дает количественную оценку импорта, которая необходима в экспериментах по изучению механизмов транспорта ДНК и его кинетических характеристик. Перечисленные недостатки могут быть устранены при использовании для анализа кПЦР. Мы оптимизировали этот подход, проведя подбор условий импорта в системе *in organello* и способа выделения ДНК для кПЦР-анализа. Наиболее оптимальными объемами для постановки реакции импорта являются 100–300 мкл. Использование элюированной после импорта ДНК в качестве матрицы при проведении кПЦР подтвердило, что амплификация стандартных для кПЦР ампликонов небольшого размера в составе импортированного субстрата позволяет получить надежный результат. Удаление внешней митохондриальной мембраны позволяет избавиться от связанной с ней ДНК, не проникшей в матрикс.

Оптимизированный нами подход *in organello* позволяет использовать интактные митохондрии для изучения механизмов импорта ДНК и роли белков-переносчиков митохондриальной

Таблица 3. Сопоставление преимуществ и недостатков методов анализа импорта ДНК

Критерий выбора метода	Метод анализа импорта		
	Радиоактивный метод анализа	Флуоресцентный метод анализа	кПЦР
Детекция полноразмерного фрагмента	+	+	–
Количественная оценка эффективности импорта	–	–	+
Сохранение качества ДНК-субстрата импорта при длительном хранении	–	+	+
Удобство и быстрота метода	–	+	+
Безопасность для здоровья	–	+	+
Применение в системе <i>in organello</i>	+	+	+
Применение в системе <i>in vivo</i>	–	–	+

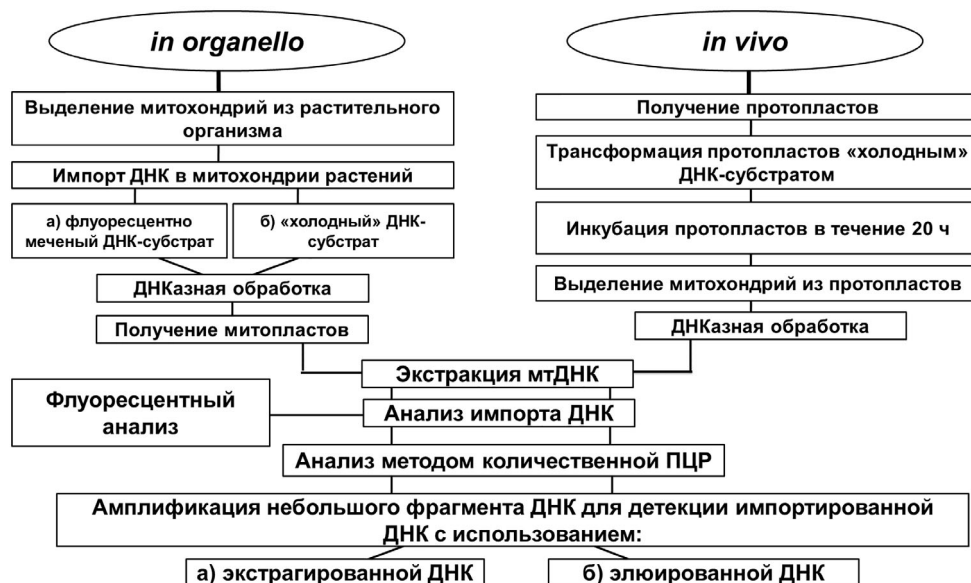


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая комплексный подход, основанный на использовании систем *in organello* и *in vivo*, для исследований импорта ДНК в растительные митохондрии

мембраны, однако, такая система не учитывает многочисленные клеточные факторы, способные влиять на процесс переноса.

Ранее природную компетентность митохондрий, как животных, так и растений, к поглощению ДНК не исследовали *in vivo*. При этом на протяжении многих лет не прекращался поиск методических подходов для осуществления трансформации митохондриального генома млекопитающих. Были предприняты попытки трансформации митохондрий посредством связывания ДНК с митохондриальным транзитным пептидом или с рекомбинантным митохондриальным белком TFAM, бактериальной конъюгации, доставки с помощью липофильных катионных соединений, переноса генов, опосредованного аденовирусами и других способов [40, 41]. Тем не менее, ни один из этих методов не позволил достичь стабильной трансформации. Отсутствуют также сообщения и об успешной трансформации митохондрий высших растений [12, 40]. Между тем, подобная работа представляет существенный интерес, поскольку, в частности, позволит получить трансгенные растения с контролируемым по материнской линии наследованием чужеродного генетического материала.

Трансформация протопластов широко применяется, в частности, для внедрения в клетку временно экспрессируемых конструкций с целью изучения внутриклеточной адресации белков [42], либо промоторной активности тех или иных регуляторных последовательностей

[43]. Также трансформация протопластов посредством электропорации была использована при попытке изучения *in vivo* импорта тРНК в митохондрии *S. tuberosum* [44]. Однако трансформация протопластов никогда ранее не применялась для изучения механизмов импорта ДНК.

На основе метода PEG-опосредованной трансформации протопластов *A. thaliana* [23] мы разработали подход к изучению импорта ДНК *in vivo*. В результате установлено, что фрагменты ДНК размером 270–2700 п.н., трансфицированные в протопласты, импортируются из цитоплазмы в митохондрии с достаточно высокой интенсивностью. Разработанный подход позволит в дальнейшем выявить, сохраняются ли закономерности импорта ДНК, показанные ранее с использованием изолированных митохондрий, такие как зависимость от размера и структурных особенностей молекулы ДНК, влияние на интенсивность импорта инактивации определенных белков митохондриальной мембраны, на уровне целой растительной клетки. Помимо изучения механизмов переноса ДНК *in vivo*, данный подход может быть использован при разработке системы трансформации митохондриального генома растений. Подобная система может включать трансфекцию протопластов конструкциями, содержащими последовательности, обеспечивающие встраивание в мт-геном [15] и транскрипцию целевых последовательностей [7], регенерацию клеточной стенки, селективный отбор трансформированных клеток и получение из них целых растений.

В заключение, нами был разработан комплексный подход для изучения импорта ДНК в растительные митохондрии, включающий анализ в системах *in organello* и *in vivo* (рис. 6). Применение этой системы позволит установить, сохраняются ли *in vivo* закономерности импорта ДНК, показанные *in organello*.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00603).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Клименкову Игорю Викторовичу за проведение микроскопии и Коротаевой Наталье Евгеньевне за помощь в проведении флуоресцентного анализа. В работе использовано оборудование ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН (г. Иркутск).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi C., Pesole, G., and Reyes, A. (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system, *Gene*, **238**, 195–209, doi: 10.1016/S0378-1119(99)00270-X.
- Alverson, A.J., Rice, D.W., Dickinson, S., Barry, K., and Palmer, J.D. (2011) Origins and recombination of the bacterial-sized multichromosomal mitochondrial genome of cucumber, *Plant Cell*, **23**, 2499–2513, doi: 10.1105/tpc.111.087189.
- Kubo, T., and Newton, K.J. (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations *Mitochondrion*, **8**, 5–14, doi: 10.1016/j.mito.2007.10.006.
- Unsel, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P., and Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides, *Nat. Genet.*, **15**, 57–61, doi: 10.1038/ng0197-57.
- Sanchez-Puerta, M.V. (2014) Involvement of plastid, mitochondrial and nuclear genomes in plant-to-plant horizontal gene transfer, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **83**, 317–323, doi: 10.5586/asbp.2014.041.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A., and Mikami, T. (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA^{Acys}(GCA), *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2571–2576, doi: 10.1093/nar/28.13.2571.
- Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., and Dietrich, A. (2003) Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex, *EMBO J.*, **22**, 1245–1254, doi: 10.1093/emboj/cdg128.
- Konstantinov, Y.M., Dietrich, A., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Klimenko, E.S., Tarasenko, V.I., Bolotova, T.A., and Koulintchenko, M.V. (2016) DNA import into mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1044–1056, doi: 10.1134/S0006297916100035.
- Koulintchenko, M., Temperley, R.J., Mason, P.A., Dietrich, A., and Lightowers, R.N. (2006) Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 143–154, doi: 10.1093/hmg/ddi435.
- Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Boesch P., Cosset, A., Konstantinov, Y., Lightowers, R.N., and Dietrich, A. (2009) Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 320–327, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.001.
- Campo, M.L., Peixoto, P.M., and Martinez-Caballero, S. (2017) Revisiting trends on mitochondrial mega-channels for the import of proteins and nucleic acids, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **49**, 75–99, doi: 10.1007/s10863-016-9662-z.
- Verechshagina, N.A., Konstantinov, Y.M., Kamenski, P.A., and Mazunin, I.O. (2018) Import of proteins and nucleic acids into mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 643–661, doi: 10.1134/S0006297918060032.
- Delage, L., Duchene, A. M., Zaepfel, M., and Marechal-Drouard, L. (2003) The anticodon and the D-domain sequences are essential determinants for plant cytosolic tRNA^{Val} import into mitochondria, *Plant J.*, **34**, 623–633, doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01752.x.
- Weber-Lotfi, F., Koulintchenko, M.V., Ibrahim, N., Hammann, P., Mileshina, D.V., Konstantinov, Y.M., and Dietrich, A. (2015) Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways, *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 3165–3181, doi: 10.1016/j.bbamer.2015.09.011.
- Mileshina, D., Koulintchenko, M., Konstantinov, Yu., and Dietrich, A. (2011) Transfection of plant mitochondria and in organello gene integration, *Nucleic Acids Res.*, **39**, e115, doi: 10.1093/nar/gkr517.
- Sweetlove, L.J., Taylor, N.L., and Leaver, C.J. (2007) Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*, *Methods Mol. Biol.*, **372**, 125–136, doi: 10.1007/978-1-59745-365-3_9.
- Newton, K.J., and Walbot, V. (1985) Maize mitochondria synthesize organ-specific polypeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6879–6883, doi: 10.1073/pnas.82.20.6879.
- Neuburger, M., Journet, E.P., Bigny, R., Carde J.-P., and Douce, R. (1982) Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll, *Arch. Biochem. Biophys.*, **217**, 312–323, doi: 10.1016/0003-9861(82)90507-0.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Layton, B.E., Sastry, A.M., Lastoskie, C.M., Philbert, M.A., Miller, T.J., Sullivan, K.A., Feldman, E.L., and Wang, C.-W. (2004) *In situ* imaging of mitochondrial outer membrane pores using atomic force microscopy, *Biotechniques*, **37**, 564–573, doi: 10.2144/04374BI01.
- Douce, R., and Neuburger, M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 371–414, doi: 10.1146/annurev.pp.40.060189.002103.
- Грабельных О.И., Кириченко К.А., Побежимова Т.П., Боровик О.А., Павловская Н.С., Любушкина И.В., Королева Н.А., Войников В.К. (2014) Влияние холодового шока на жирнокислотный состав и функциональное состояние митохондрий закаленных и незакаленных проростков озимой пшеницы, *Биологические мембраны*, **31**, 204–217, doi: 10.7868/S0233475514020029.

23. Wu, F.-H., Shen, S.-C., Lee L.-Y., Chan M.-T., and Lin, C.-S. (2009) Tape-Arabidopsis sandwich – a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method, *Plant Methods*, **5**, 1–10, doi: 10.1186/1746-4811-5-16.
24. Клименко Е.С., Милейко В.А., Морозкин Е.С., Лактионов П.П., Константинов Ю.М. (2011) Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР, *Биологические мембраны*, **28**, 199–205, doi: 10.1134/S1990747811030044.
25. Meyer, E.H., and Millar, A.H. (2008) Isolation of mitochondria from plant cell culture, *Methods Mol. Biol.*, **425**, 163–169, doi: 10.1007/978-1-60327-210-0_15.
26. Doolittle, W.F., Boucher, Y., Nesbo, C.L., Douady, C.J., Andersson, J.O., and Roger, A.J. (2003) How big is the iceberg of which organellar genes in nuclear genomes are but the tip? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **358**, 39–57, doi: 10.1098/rstb.2002.1185.
27. Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., and Gojobori, T. (2004) Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes, *Nat. Genet.*, **36**, 760–766, doi: 10.1038/ng1381.
28. Bai, H., Schiralli Lester, G.M., Petishnok, L.C., and Dean, D.A. (2017) Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA, *Biosci. Rep.*, **37**, BSR20160616, doi: 10.1042/BSR20160616.
29. Dowty, M.E., Williams, P., Zhang, G., Hagstrom, J.E., and Wolff, J.A. (1995) Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4572–4576, doi: 10.1073/pnas.92.10.4572.
30. Hagstrom, J. E., Ludtke, J.J., Bassik, M.C., Sebestyén, M.G., Adam, S.A. and Wolff, J.A. (1997) Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells, *J. Cell Sci.*, **110**, 2323–2331.
31. Johnston, I.G., and Williams, B.P. (2016) Evolutionary inference across eukaryotes identifies specific pressures favoring mitochondrial gene retention, *Cell Systems*, **2**, 101–111, doi: 10.1016/j.cels.2016.01.013.
32. Pichersky, E., Logsdon, J.M. Jr., McGrath, J.M., and Stasys, R.A. (1991) Fragments of plastid DNA in the nuclear genome of tomato: prevalence, chromosomal location, and possible mechanism of integration, *Mol. Gen. Genet.*, **225**, 453–458, doi: 10.1007/BF00261687.
33. Ayliffe, M.A., and Timmis, J.N. (1992) Plastid DNA sequence homologies in the tobacco nuclear genome, *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 105–112, doi: 10.1007/BF00279648.
34. Mower, J.P., Jain, K., and Hepburn, N.J. (2012) The role of horizontal transfer in shaping the plant mitochondrial genome, *Adv. Bot. Res.*, **63**, 41–69, doi: 10.1016/B978-0-12-394279-1.00003-X.
35. Marechal-Drouard, L., Small, I., Weil, J.H., and Dietrich, A. (1995) Transfer RNA import into plant mitochondria, *Methods Enzymol.*, **260**, 310–327, doi: 10.1016/0076-6879(95)60148-1.
36. Diao, X.M., Freeling, M., and Lisch, D. (2006) Horizontal transfer of a plant transposon, *PLoS Biol.*, **4**, e5, doi: 10.1371/journal.pbio.0040005.
37. Rice, D.W., and Palmer, J.D. (2006) An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters, *BMC Biol.*, **4**, doi: 10.1186/1741-7007-4-31.
38. Richardson, A.O., and Palmer, J.D. (2007) Horizontal gene transfer in plants, *J. Exp. Bot.*, **58**, 1–9, doi: 10.1093/jxb/erl148.
39. Jackson, C.B., Zbindena, C., Gallati, S., and Schaller, A. (2014) Heterologous expression from the human D-Loop in organello, *Mitochondrion*, **17**, 67–75, doi: 10.1016/j.mito.2014.05.011.
40. Remacle, C., Larosa, V., Salinas, T., Hamel, P., Subrahmanian, N., Bonnefoy, N., and Kempken, F. (2012) *In Genomics of chloroplasts and mitochondria, Advances in photosynthesis and respiration* (Bock, R., and Knoop V., eds), Springer Science, Belgium, pp. 443–458, doi: 10.1007/978-94-007-2920-9.
41. Niazi, A.K., Mileshina, D., Cosset, A., Val, R., Weber-Lotfi, F., and Dietrich, A. (2013) Targeting nucleic acids into mitochondria: progress and prospects, *Mitochondrion*, **13**, 548–558, doi: 10.1016/j.mito.2012.05.004.
42. Bhushan, S., Pavlov, P.F., Rudhe, C., and Glaser, E. (2007) *In vitro* and *in vivo* methods to study protein import into plant mitochondria, *Methods Mol. Biol.*, **390**, 131–150, doi: 10.1007/978-1-59745-466-7_9.
43. Wehner, N., Hartmann, L., Ehlert, A., Bottner, S., Onate-Sanchez, L., and Droge-Laser, W. (2011) High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of Arabidopsis transcription factor function, *Plant J.*, **68**, 560–569, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04704.x.
44. Wintz, H., and Dietrich, A. (1996) Electroporation of small RNAs into plant protoplasts: mitochondrial uptake of transfer RNAs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **223**, 204–210, doi: 10.1006/bbrc.1996.0870.

DNA IMPORT INTO PLANT MITOCHONDRIA: AN *in organello* AND *in vivo* COMPLEX APPROACH

T. A. Tarasenko, V. I. Tarasenko, M. V. Koulintchenko*, E. S. Klimenko, and Yu. M. Konstantinov

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
664033 Irkutsk, Russia; E-mail: mk100171@yahoo.com*

Received March 6, 2019

Revised April 2, 2019

Accepted April 10, 2019

Natural competence of mitochondria to uptake DNA is a phenomenon known for the last 20 years. To date, all studies of this process have been carried out with isolated mitochondria, because a system for studying DNA transport into mitochondria in whole cells was not available. We have contributed to the upgrade and standardization of the existing approaches to study DNA import into plant mitochondria in the *in organello* system. A method for detecting the import of fluorescently labeled DNA substrates involving an effective assessment of its intensity using quantitative PCR has been developed. We have also developed an *in vivo* system to investigate the translocation of DNA molecules from cytoplasm to mitochondrial matrix using *Arabidopsis thaliana* protoplasts. The proposed combined approach will be useful to determine whether the regularities of mitochondrial DNA import shown *in organello* remain *in vivo*.

Keywords: DNA import, plant mitochondria, fluorescent labeling, protoplasts transformation, *Arabidopsis thaliana*