

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.29

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНА  
В МИТОХОНДРИЯХ АРАБИДОПСИСА В СИСТЕМЕ *in organello*

© 2023 г. В. И. Тарасенко<sup>а, 1</sup>, Т. А. Тарасенко<sup>а, 1, \*</sup>, И. В. Горбенко<sup>а</sup>,  
Ю. М. Константинов<sup>а</sup>, М. В. Кулинченко<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук,  
Иркутск, 664033 Россия

<sup>б</sup>Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук,  
Казань, 420111 Россия

\*e-mail: bolotova\_t.a@mail.ru

Поступила в редакцию 04.08.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 30.09.2022 г.

Генетическая трансформация митохондрий высших эукариот *in vivo* – одна из нерешенных и практически важных задач. Для эффективной экспрессии чужеродного генетического материала в митохондриях необходим подбор регуляторных элементов, обеспечивающих высокий уровень транскрипции и стабильность образующихся транскриптов. С использованием явления природной компетентности митохондрий растений нами изучена эффективность регуляторных элементов митохондриальных генов, фланкирующих экзогенную ДНК. С этой целью в изолированные митохондрии арабидопсиса импортировали генетические конструкции, несущие ген *GFP* под контролем промоторных областей генов *RRN26* или *COX1* и одной из двух 3'-нетранслируемых областей (3'-НТО) митохондриальных генов, с последующей транскрипцией *in organello*. Показано, что уровень экспрессии *GFP* под контролем промоторов генов *RRN26* или *COX1 in organello* коррелирует с уровнем транскрипции этих генов, наблюдаемым *in vivo*. При этом присутствие последовательности, кодирующей тРНК<sup>Trp</sup>, в 3'-НТО приводит к более высокому уровню транскрипта *GFP*, чем сайта связывания белка MTSF1 из 3'-НТО гена *NAD4*. Полученные результаты открывают перспективы для создания системы эффективной трансформации митохондриального генома.

**Ключевые слова:** регуляция экспрессии генов, импорт ДНК, *GFP*, промоторная область, нетранслируемая область, RPO<sup>Trp</sup>, митохондрии, *Arabidopsis thaliana*, *in organello*

DOI: 10.31857/S002689842303014X, EDN: CHUECL

ВВЕДЕНИЕ

Генетическая трансформация митохондрий растений и животных *in vivo* – одна из нерешенных и практически важных задач [1]. Доставку ДНК в митохондрии затрудняет не только малый размер этих органелл и динамичная природа митохондриального генома растений [2], но и необходимость создания генетических конструкций, содержащих весь набор регуляторных элементов митохондриальных генов, способных обеспечить эффективную экспрессию целевого гена в органеллах *in vivo*.

Известно, что интенсивность транскрипции с той или иной промоторной области митохондриальных генов в системе *in vitro* часто не совпадает с интенсивностью, наблюдаемой *in vivo* [3], что затрудняет подбор оптимальных регуляторных элементов для генетической конструкции. Как

показано ранее, изолированные митохондрии растений, как и митохондрии животных, способны импортировать ДНК [4–6]. Использование этой способности митохондрий представляется перспективным подходом, позволяющим провести предварительное тестирование элементов генетических конструкций, предназначенных для трансформации митохондриального генома *in vivo*, в условиях *in organello*.

Транскрипция митохондриальных генов растений контролируется рядом промоторов, имеющих различную эффективность и распознаваемых разными РНК-полимеразами [7]. Ранее было показано, что транскрипция гена *COX1* в митохондриях арабидопсиса осуществляется преимущественно РНК-полимеразой двойной локализации RPO<sup>Trp</sup>, в то время как ген *RRN26* транскрибируется основной митохондриальной РНК-полимеразой RPO<sup>M</sup> [8]. Методом run-on показано, что интенсивность транскрипции гена *RRN26*

<sup>1</sup> Эти авторы внесли равный вклад в выполнение исследования.

арабидопсиса существенно выше, чем гена *COX1* [8]. Учитывая эти особенности, мы выбрали для исследования уровня транскриптов гена *GFP in organello* промоторные области генов *RRN26* и *COX1*: дифференциальный характер экспрессии с разных промоторных областей позволил бы судить о корректном функционировании данных регуляторных элементов.

Известно, что в регуляции экспрессии генов в митохондриях растений ключевую роль играет посттранскрипционный уровень [3, 9]. Вторичные структуры и сайты связывания белков, присутствующие в 3'-нетранслируемых областях (3'-НТО) митохондриальных транскриптов, обеспечивают их защиту от деградации митохондриальными экзорибонуклеазами, в первую очередь полинуклеотидфосфорилазой, расщепляющей любые незащищенные транскрипты в митохондриальном матриксе [10, 11], тем самым внося решающий вклад в контроль уровня РНК в органеллах [12, 13]. В митохондриях растений тРНК-подобные элементы (а иногда и последовательности функциональных тРНК) нередко играют важную роль в стабилизации 3'-концов мРНК-транскриптов. Подобные структуры обнаружены в генах *сстС* и *nad6* арабидопсиса, а гены *atp6-1* и *atp6-2* содержат последовательности, кодирующие тРНК<sup>Сер</sup>, непосредственно вслед за кодирующей последовательностью [14]. В созревании 3'-концов транскриптов этих генов участвует РНКаза Р, обеспечивающая процессинг тРНК [15]. В связи с этим при создании генетических конструкций логично использовать в качестве 3'-НТО последовательность гена тРНК.

Однако тРНК-подобные элементы и другие вторичные структуры [16, 17] присутствуют на 3'-концах лишь некоторых митохондриальных транскриптов растений. Предполагается, что наиболее распространенным механизмом стабилизации 3'-концов мРНК могут служить сайты, взаимодействующие со специфическими РНК-связывающими белками. Действительно, на 3'-конце зрелого транскрипта гена *NAD4* арабидопсиса обнаружен сайт связывания PPR-белка, названного MTSF1 [12]. Позднее идентифицировали еще два подобных белка, стабилизирующих 3'-концы зрелого транскрипта *NAD2* и одного из экзонов предшественника транскрипта *NAD1* [18, 19]. Мы использовали 30-нуклеотидную последовательность 3'-НТО гена *NAD4* арабидопсиса в качестве альтернативного варианта области, потенциально способной обеспечивать стабильность транскрипта целевого гена.

В результате проделанной работы установлено, что уровни транскриптов, синтезированные *in organello* с разных генетических конструкций, импортированных в митохондрии, зависят от промоторной области (*COX1* или *RRN26*), регули-

рующей транскрипцию *GFP*. Кроме того, показано, что последовательность тРНК<sup>Трп</sup> на 3'-конце образующегося транскрипта стабилизирует его более эффективно, чем 3'-НТО гена *NAD4*. Представленные в работе данные открывают перспективы использования разработанной нами системы импорта и транскрипции рекомбинантной ДНК *in organello* для изучения регуляторных последовательностей митохондриального генома растений и эффективного подбора элементов генетических конструкций для трансформации митохондриального генома *in vivo*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Растительный материал и условия выращивания.** Семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia (Col-0) подвергали стратификации в течение 3 сут при 4°C, а затем выращивали при 22°C в ростовой камере KBW720 ("Binder", Германия) в горшках, наполненных смесью компост/вермикулит в соотношении 2 : 1, при плотности потока фотосинтетических фотонов 150 мкмоль · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> и 16-часовом фотопериоде.

**Получение генетических конструкций, содержащих регуляторные последовательности митохондриальных генов, для проведения импорта в системе *in organello*.** Генетические конструкции включали в себя: (а) 5'-область, содержащую промоторные элементы митохондриальных генов арабидопсиса *RRN26* (ATMG00020 согласно базе данных TAIR) или *COX1* (ATMG01360); (б) последовательность гена *GFP* медузы *Aequoria victoria*; (в) 3'-область, представляющую собой ген тРНК<sup>Трп</sup> из линейной митохондриальной плазмиды 2.3 т.п.н. кукурузы (*Zea mays*) [20], либо принадлежащая гену *NAD4* (ATMG00580) *A. thaliana*. Все генетические конструкции получены на основе плазмиды рСК/GFP/PRmt [20]. Входивший в состав плазмиды промотор гена 18S рРНК из картофеля был замещен на промоторную область гена *RRN26* (*Prrn26*) или *COX1* (*Pcox1*) арабидопсиса, в результате чего получили генетические конструкции рСК-*Prrn26*-tRNA и рСК-*Pcox1*-tRNA. Для амплификации фрагментов *Prrn26*-tRNA и *Pcox1*-tRNA, содержащих указанные регуляторные элементы, использованы специфические праймеры, последовательности которых представлены в табл. 1.

Для получения на основе рСК-*Prrn26*-tRNA генетической конструкции, несущей альтернативную 3'-НТО, проведена амплификация фрагмента, содержащего промоторную область гена *RRN26* и ген *GFP* без последовательности тРНК на 3'-конце, с последующим клонированием в рJET1.2 согласно инструкции производителя ("Thermo Scientific", США). Для этого использовали прямой праймер к последовательности линейной плазмиды 2.3 т.п.н. в паре с обратным

**Таблица 1.** Праймеры, использованные при создании генетических конструкций

Синтезируемый фрагмент ДНК	Пары праймеров	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Фрагмент, п.н. (матрица)
<i>Prrn26*</i>	<i>rnn26-For</i> <i>rnn26-Rev</i>	<u>GAATTCAGGCGTTATTGCTGTGCTTCC</u> <u>CCATGGTCAGGGTACACTGAACACCAC</u>	449 (мтДНК)
<i>Pcox1*</i>	<i>cox1-For</i> <i>cox1-Rev</i>	<u>GAATTCGAGTTTGACCACCTGTTTCTCT</u> <u>CCATGGAAATTTGAGATTCTTCGTTATTACC</u>	525 (мтДНК)
<i>Prrn26-GFP-3'UTR_NAD4**</i>	2.3(257)- <i>For</i> nad4-3'UTR- <i>Rev</i>	CCAACCACCACATACCGAAA <u>ACCCGTTTTCTTTCTTTGCTGATCCCTTATTGTATAGTTCATCCATGCCA</u>	2752 (рСК- <i>Prrn26</i> -tRNA)

\*При клонировании в состав конструкции рСК/GFP/PRmt промоторная область гена *RRN26* или *COX1* из митохондриального генома арабидопсиса встраивается непосредственно перед геном *GFP* по сайтам EcoRI (подчеркнут) и NcoI (выделен курсивом), фрагмент промоторной области (Y08501.2) выделен **жирным шрифтом**.

\*\*Прямой праймер подобран к последовательности линейной плазмиды кукурузы 2.3 т.п.н., находящейся в конструкции рСК-*Prrn26*-tRNA перед последовательностями промотора и гена *GFP*, обратный праймер включает последовательность “3-НТО” митохондриального гена *NAD4* (Y08501.2) арабидопсиса (выделена **жирным шрифтом**) и фрагмент гена *GFP*.

**Таблица 2.** Праймеры для синтеза ДНК-субстратов импорта

Пары праймеров	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Фрагмент, п.н. (матрица)
2,3(257)- <i>For</i> 2,3(2989)- <i>Rev</i>	CCAACCACCACATACCGAAA ACGCTCTGTAGGATTTGAACC	2893 (рСК- <i>Prrn26</i> -tRNA или рСК- <i>Pcox1</i> -tRNA)
2,3(257)- <i>For</i> pJET(930)- <i>Rev</i>	CCAACCACCACATACCGAAA GCAGCTGGCACGACAGGTTTC	3260 (pJET- <i>Prrn26</i> -NAD4)

праймером, содержащим 3'-НТО гена *NAD4* из митохондриального генома арабидопсиса (табл. 1). В результате получена генетическая конструкция pJET-*Prrn26*-NAD4, которая служила матрицей для амплификации ДНК-субстрата импорта *Prrn26*-NAD4.

**Получение субстратов для импорта ДНК.** ДНК амплифицировали с использованием Taq-полимеразы (“Thermo Scientific”, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Генетические конструкции получали с помощью специфических пар праймеров, используя один и тот же “прямой” праймер и разные “обратные” праймеры в зависимости от ДНК-матрицы (табл. 2).

Режим амплификации: 94°C – 3 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 60°C – 45 с, 72°C – 180 с (30 циклов); 72°C – 5 мин. ДНК очищали на колонках GeneJET™ PCR Purification Kit (“Thermo Scientific”) согласно инструкции производителя. Качество ПЦР-продуктов оценивали электрофоретически с использованием Gel Doc XR System (“Bio-Rad”, США), количество ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (“IMPLEN”, Германия).

**Выделение митохондрий.** Митохондрии получали из трехнедельных растений *A. thaliana* согласно описанному ранее протоколу [21]. Гомогенизацию растительного материала проводили в среде выделения (25 мМ пиродифосфат натрия, 10 мМ K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ сахароза, 2 мМ EDTA, 0.5% (в/о) бычьего сывороточного альбумина (БСА), 1% (в/о) поливинилпирролидона-40, 5 мМ цистеин, 20 мМ ас-

корбиновая кислота, рН 7.6). Соотношение веса растительного материала к объему среды – 1 : 12. Для получения грубой митохондриальной фракции проведено два цикла дифференциального центрифугирования при 2500 g (5 мин) и 17400 g (20 мин) в среде промывания (1 мМ EGTA, 50 мМ MOPS, 300 мМ сахароза, 0.2% (в/о) БСА, рН 7.2). Очищенную митохондриальную фракцию получали путем разделения грубой фракции митохондрий в ступенчатом градиенте плотности перколлы (50–28–20%) в течение 40 мин при 40000 g. Суспензию митохондрий отбирали на границе слоев с 50 и 28% перколлы. Количество белка в суспензии митохондрий оценивали по методу Брэдфорда [22].

**Определение дыхательного контроля и интактности митохондрий.** Коэффициент дыхательного контроля митохондрий (100–150 мкг белка/мл) определяли как отношение скорости поглощения кислорода митохондриями в присутствии ADP (100–200 мкМ) и в отсутствие ADP с использованием в качестве субстратов дыхания сукцината натрия (10 мМ) и глутамата натрия (5 мМ), в среде, содержащей 0.3 М сахарозу, 10 мМ K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1% БСА (рН 7.2) [23], с применением платинового кислородного электрода и ячейки Oxytherm system (“Hansatech”, Великобритания). Целостность внешней мембраны митохондрий рассчитывали по разнице скорости аскорбатзависимого стимулированного цитохромом с KCN-чувствительного поглощения кислорода в отсутствие и в присутствии 0.04% Тритона X-100 [24].

**Таблица 3.** Праймеры, использованные в количественном ПЦР-анализе

Пары праймеров	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	ДНК-матрица для ПЦР-РВ, фрагмент, п.н.
NAD4-L NAD4-R	GCATTTTCAGTGGGTTGGTCTGGT AGGGATTGGCACGCTTTCGG	мтДНК (146)
GFP-L GFP-R	GATGTGGAAAACAAGACAGGGGTTT TGGTGAACCGGGCGTACTATTT	Prrn26-tRNA/-NAD4, Pcox1-tRNA (185)

**Импорт рекомбинантных ДНК в митохондрии арабидопсиса и транскрипция *in organello*.** ДНК импортировали согласно [25]. К 200 мкл буфера импорта (0.4 М сахара, 40 мМ фосфат калия, рН 7.0), содержащего 500 мкг ДНК, добавляли 200 мкг очищенных митохондрий, затем инкубировали при 25°C в течение 30 мин. Обработку митохондрий ДНКазой I (1 ед./мкл) (“Thermo Scientific”) проводили в 100 мкл буфера импорта в присутствии 10 мМ MgCl<sub>2</sub> в течение 20 мин при 25°C. Затем отбирали 1/4 пробы, подвергали отмывке в среде промывания, содержащей дополнительно 10 мМ EDTA и 10 мМ EGTA, и экстрагировали мтДНК с целью дальнейшего анализа эффективности импорта ДНК. Оставшуюся часть пробы отмывали в буфере импорта, после чего митохондрии ресуспендировали в 200 мкл буфера транскрипции (330 мМ сахара, 90 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 12 мМ трицин, 5 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 мМ EGTA, 1 мМ GTP, 2 мМ ДТТ, 2 мМ ADP, 10 мМ сукцинат натрия, 0.15 мМ СТР, 0.15 мМ УТР, рН 7.2) [26] и инкубировали в течение 2–20 ч при легком помешивании (300 об/мин) и температуре 25°C. мтДНК экстрагировали с использованием фенола и буфера экстракции (10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, 1% (в/о) SDS, рН 7.5) в соотношении 1 : 1, как описано ранее [25]. Митохондриальную РНК выделяли после окончания реакции транскрипции при помощи TRIzol reagent (“Ambion”, США) согласно инструкции производителя.

**Анализ импорта ДНК.** Количество импортированной в митохондрии ДНК определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) [25] с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили на CFX96 (“Bio-Rad”) в следующем режиме: 95°C – 5 мин, 1 цикл; 95°C – 20 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с, 35 циклов. Данные анализировали при помощи программного обеспечения CFX Manager (“Bio-Rad”). Использовали пары праймеров, специфичные к последовательностям гена *GFP* и гена *NAD4* из митохондриального генома арабидопсиса (табл. 3).

**Анализ экспрессии гена *GFP* в изолированных митохондриях.** Уровень транскрипта гена *GFP* оценивали с помощью обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ (ОТ-ПЦР-РВ). На первом этапе синтезировали кДНК с использованием в качестве матрицы РНК, экстрагированной из ми-

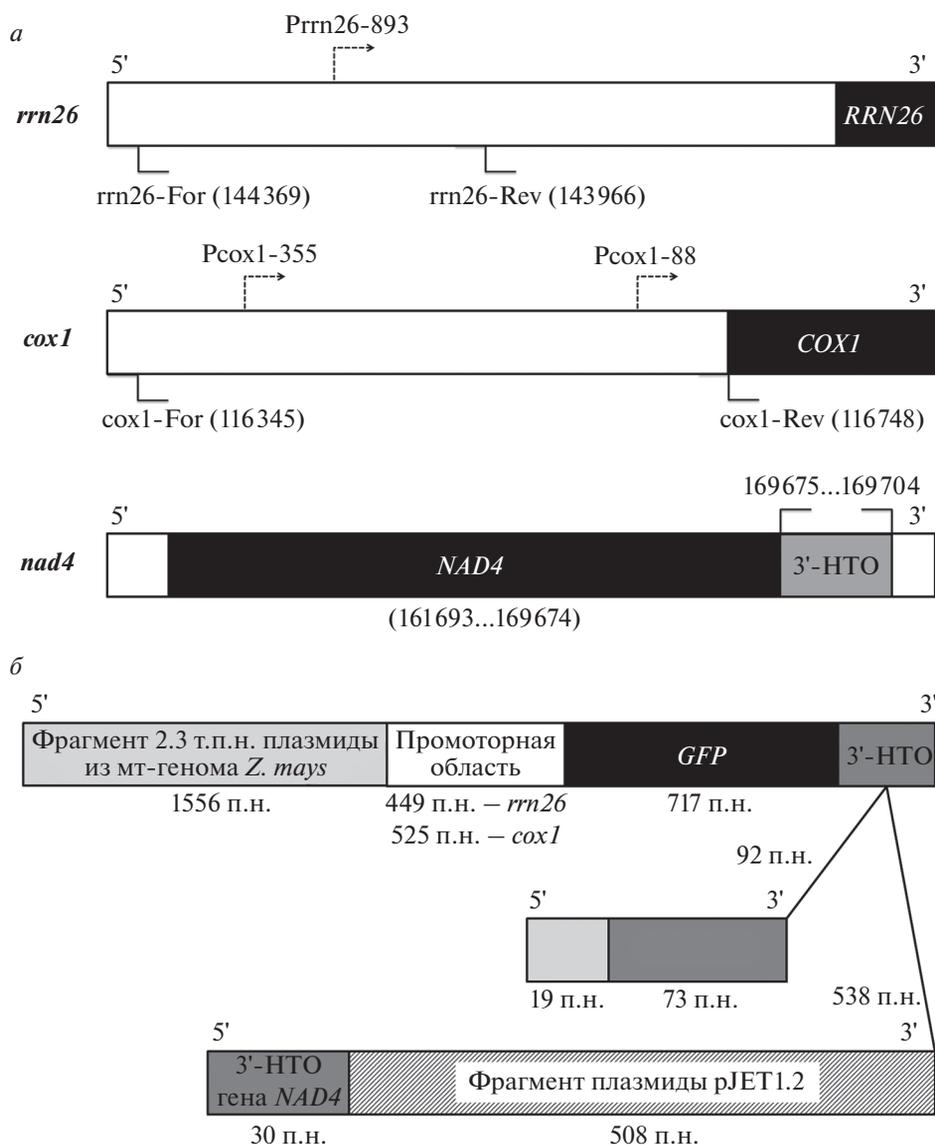
тохондрий после транскрипции, как описано ранее [27]. Содержание транскрипта определяли с помощью ПЦР-РВ по протоколу, приведенному выше.

**Статистическая обработка результатов.** Эксперименты проводили не менее чем в трех биологических повторностях. Построение диаграмм выполняли с помощью пакета программ Microsoft Excel. Степень статистической значимости различий оценивали по критерию Стьюдента при уровне значимости ( $P$ )  $\leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для тестирования возможности экспрессии *GFP* в митохондриях клонировали (см. раздел “Экспериментальная часть”) промоторные области митохондриальных генов *RRN26* и *COX1* арабидопсиса (рис. 1а). Области для амплификации были выбраны с учетом данных о позиции промоторов, согласно которым сайт инициации транскрипции гена *RRN26* находится в положении (–893) от начала зрелого транскрипта, а промоторная область гена *COX1* содержит два сайта инициации транскрипции (–355) и (–88) [7, 28]. В полученных генетических конструкциях ген *GFP* в 3'-направлении фланкирован последовательностью гена тРНК<sup>Trp</sup>, входящей в состав митохондриальной ДНК-плазмиды 2.3 т.п.н. кукурузы (рис. 1б). Создана также альтернативная генетическая конструкция, в которой последовательность гена тРНК замещена 3'-НТО гена *NAD4* арабидопсиса (рис. 1а, 1б).

ДНК-субстраты, полученные на основе описанных генетических конструкций, использовали для импорта в митохондрии, выделенные из растений арабидопсиса. Использование нами высокоэнергизованных митохондрий подтверждено величиной дыхательного контроля и результатами оценки интактности наружной митохондриальной мембраны (данные не приведены). Прежде всего, было необходимо убедиться, что используемые субстраты ДНК импортируются в изолированные митохондрии с равной эффективностью вне зависимости от их последовательности. Контролем служил фрагмент ДНК, в котором отсутствовали регуляторные последовательности, контролирующей экспрессию *GFP* (рис. 2). В первой серии экспериментов (рис. 2а) в митохондрии арабидопсиса импортировали фрагменты ДНК, в кото-

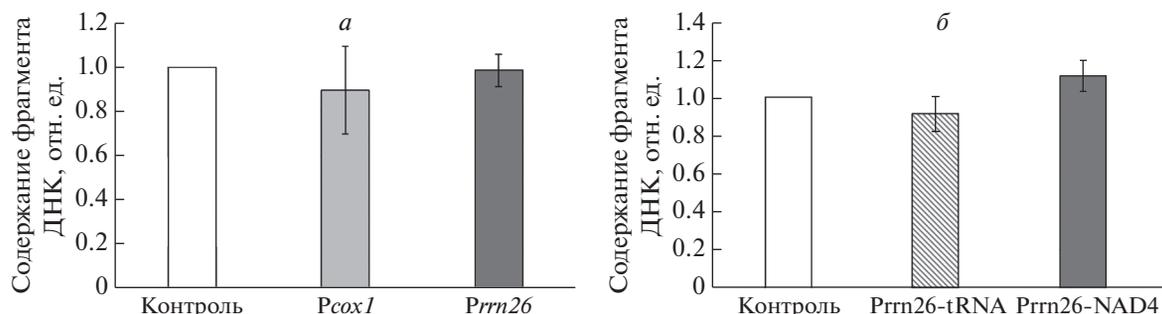


**Рис. 1.** Регуляторные элементы генетических конструкций, полученных на основе рСК/GFP/PRmt. *а* — Позиции праймеров в митохондриальном геноме арабидопсиса (Y08501.2) для амплификации фрагментов, содержащих промоторную область генов *RRN26* или *COX1* (сплошная линия), включившую промоторы с сайтами инициации (прерывистая линия); альтернативная 3'-НТО из митохондриального генома арабидопсиса (Y08501.2), принадлежащая гену *NAD4*; *б* — генетические конструкции *Prmn26*-GFP или *Pcox1*-GFP, включающие промоторную область генов *RRN26* или *COX1* соответственно, чужеродный ген *GFP* и один из двух вариантов 3'-НТО: последовательности тРНК линейной плазмиды 2.3 т.п.н. из митохондриального генома *Z. mays* (20) или 3'-НТО гена *NAD4* из митохондриального генома арабидопсиса (Y08501.2) с дополнительной последовательностью плазмидного вектора pJET1.2 на 3'-конце. На 5'-концах конструкций *Prmn26*-GFP и *Pcox1*-GFP находится фрагмент линейной митохондриальной плазмиды 2.3 т.п.н. (1556 п.н.), являющийся частью исходной конструкции рСК/GFP/PRmt [20].

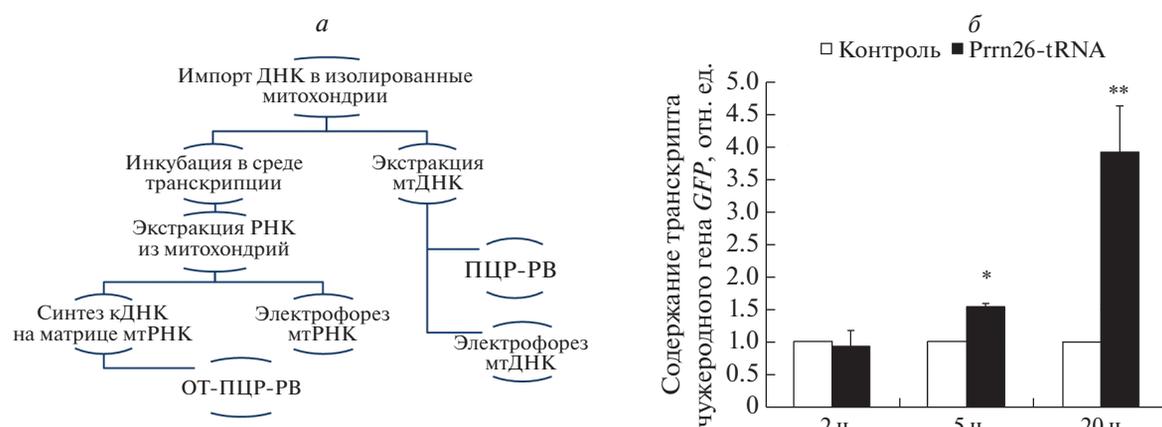
рых *GFP* был фланкирован в 5'-направлении промоторной областью *Prmn26* или *Pcox1*, а в 3'-направлении — последовательностью тРНК<sup>Trp</sup>. Показан приблизительно равный уровень импорта ДНК всех генетических конструкций. Сходный результат получен при анализе импорта ДНК, содержащей один и тот же промотор *Prmn26*, но разные 3'-НТО (последовательности тРНК<sup>Trp</sup> или 3'-НТО гена *NAD4*) (рис. 2б). Равный

уровень импорта полученных нами конструкций свидетельствовал об адекватности использования данной системы для изучения экспрессии импортированной ДНК в митохондриях арабидопсиса.

Эффективность экспрессии чужеродной ДНК в изолированных митохондриях арабидопсиса изучали в несколько этапов (рис. 3а). Для определения оптимальной продолжительности синтеза целевого транскрипта *GFP in organello* после им-



**Рис. 2.** Анализ эффективности импорта генетических конструкций в изолированные митохондрии арабидопсиса с использованием ПЦР-РВ: импорт ДНК, содержащей промоторы *Prnr26* или *Pcox1* и 3'-НТО из митохондриального генома *Z. mays* (последовательности тРНК) (а); импорт ДНК, включающих в свой состав промотор *Prnr26* и один из двух вариантов 3'-НТО (последовательности тРНК или 3'-НТО гена *NAD4*) (б). Уровень импорта ДНК без регуляторных элементов митохондриального генома (контроль) принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают ошибки среднего.

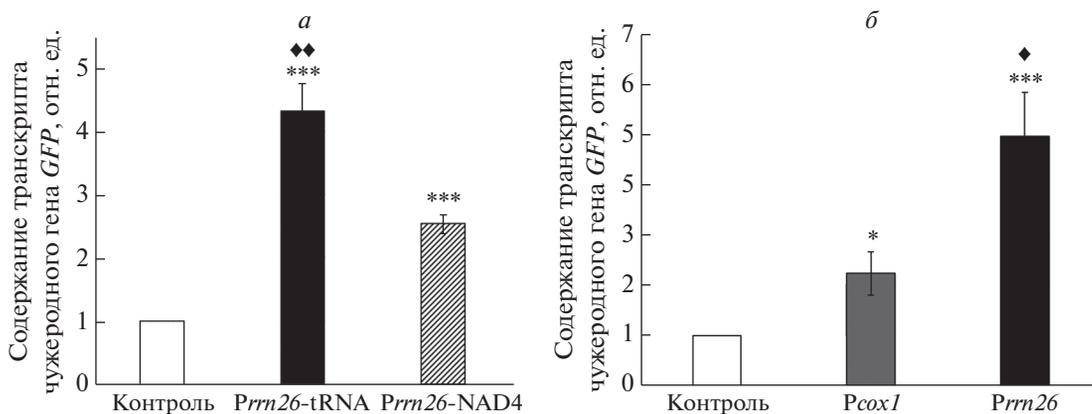


**Рис. 3.** Исследование уровня транскрипта гена *GFP* под контролем регуляторных элементов митохондриальных генов *in organello*. Схема стандартного эксперимента (а). Зависимость уровня транскрипта гена *GFP* под контролем промотора *Prnr26* от времени (б). Уровень неспецифической транскрипции с ДНК-матрицы без регуляторных элементов (контроль) принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают ошибки среднего; \* и \*\* обозначают статистически значимые различия при  $P \leq 0.02$  и  $P \leq 0.01$  соответственно.

порта генетической конструкции *Prnr26-tRNA* в изолированные митохондрии арабидопсиса инкубацию митохондрий проводили в течение 2, 5 или 20 ч (рис. 3б). Показано, что содержание транскрипта *GFP* зависело от времени инкубации митохондрий: транскрипт детектировался во всех трех временных точках, при этом уровень сигнала возрастал с увеличением времени инкубации. В качестве контроля использовали фрагмент ДНК сопоставимой длины (около 3 т.п.н.), в составе которого отсутствовали промотор и 3'-НТО. Уровень сигнала, детектируемого в ОТ-ПЦР после транскрипции *in organello* с этой конструкции, мы расценивали как уровень неспецифической транскрипции. Подобная транскрипция, инициируемая без участия каких-либо промоторных последовательностей, типична для митохондрий растений, детектируется в системах *in vitro* [28, 29] и, возможно, происходит *in vivo* [10]. Исходя из полученных данных, в последующих экспери-

ментах мы использовали наиболее длительный период инкубации (20 ч), так как в этом случае нарабатывается наибольшее количество транскрипта, уровень которого существенно превышает уровень транскрипта, синтезируемого с контрольной конструкции (рис. 3).

В следующей серии экспериментов для импорта в митохондрии использовали две генетические конструкции, содержащие промоторную область гена *RRN26*, но различающиеся входящей в их состав 3'-НТО (рис. 4а). НТО играют важную роль в контроле экспрессии генов в митохондриях растений, отвечая за стабильность транскрипта, поэтому тестирование вариантов генетической конструкции, содержащих последовательности различных 3'-НТО, было необходимым этапом исследования. Используемые конструкции содержали два варианта последовательности 3'-НТО: (1) участок митохондриальной плазмидоподобной ДНК кукурузы, кодирующий тРНК<sup>Trp</sup> или



**Рис. 4.** Уровень транскрипта *GFP*, синтезирующегося *in organello* в митохондриях арабидопсиса, при использовании разных генетических конструкций: включающих в свой состав *Prnr26* и один из двух вариантов 3'-НТО (последовательности тРНК<sup>Trp</sup> или 3'-НТО гена *NAD4*) (а); содержащих *Pcox1* или *Prnr26* и 3'-НТО из митохондриального генома *Z. mays* (последовательности тРНК) (б). Уровень неспецифической транскрипции с ДНК-матрицы без регуляторных элементов (контроль) принят за условную единицу. Допуски на диаграммах обозначают ошибки среднего; \* (♦), \*\* (♦♦) и \*\*\* обозначают статистически значимые различия при  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  и  $P \leq 0.001$  соответственно. \* обозначает отличия от контроля, ♦ обозначает отличия от *Prnr26-NAD4* (а) / *Pcox1* (б).

(2) 30-нуклеотидную последовательность на 3'-конце транскрипта гена *NAD4* арабидопсиса, служащую сайтом связывания белка MTSF1, играющего ключевую роль в стабилизации этого транскрипта [12].

Установлено, что содержание транскриптов, образующихся с ДНК-субстрата, несущего тРНК<sup>Trp</sup> в 3'-НТО, выше, чем при использовании ДНК-субстрата, содержащего последовательность 3'-НТО гена *NAD4* (рис. 4а). Эти результаты позволяют судить о более эффективной стабилизации транскрипта, синтезируемого в системе *in organello*, в случае присутствия на его 3'-конце вторичных структур, содержащихся в молекуле тРНК.

Следующий этап работы – тестирование уровня транскрипции с различных промоторных последовательностей в митохондриях арабидопсиса – проведен с использованием генетических конструкций, содержащих последовательность тРНК<sup>Trp</sup> в 3'-НТО (рис. 4б). Уровень транскрипции при использовании субстрата импорта, в котором *GFP* находился под контролем промоторной области *Prnr26*, был более высоким, чем в случае субстрата, в котором экспрессия гена контролировалась промоторной областью *Pcox1* (рис. 4б). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о дифференциальной экспрессии митохондриальных генов арабидопсиса, находящихся под контролем различных промоторов [8].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе работы нами показано, что ДНК-субстраты, содержащие либо разные промоторные области, либо разные 3'-НТО, импортировались в митохондриальный матрикс с та-

кой же эффективностью, как и фрагмент ДНК без регуляторных элементов. Эти результаты согласуются с данными о том, что процесс импорта ДНК не зависит от нуклеотидной последовательности [20].

Анализ содержания транскрипта чужеродного гена, наработанного в митохондриальном матриксе, после нескольких часов инкубации митохондрий выявил достаточно высокий уровень неспецифической транскрипции в условиях *in organello*. Об этом свидетельствовало обнаружение транскрипции гена *GFP* с субстрата импорта ДНК, не содержавшего регуляторных элементов (рис. 3). Неспецифические сайты инициации транскрипции – общая ситуация в случае транскрипции с митохондриальных промоторов в условиях *in vitro*, инициируемой обеими митохондриальными РНК-полимеразами, особенно РРОТ<sub>mp</sub> [28]. Этой РНК-полимеразе свойственна высокая транскрипционная активность *in vitro* даже при отсутствии в ДНК-субстрате промоторных последовательностей [28]. Исходя из этого, было необходимо определить продолжительность инкубации митохондрий после импорта ДНК, при которой содержание транскрипта, синтезированного с митохондриальных промоторов, будет существенно превышать уровень неспецифической транскрипции. Оптимальный результат получен после 20 ч инкубации, по истечении которой уровень целевого транскрипта в существенной степени превышал фоновый (рис. 3).

На следующем этапе работы мы проанализировали эффективность двух вариантов 3'-концевых последовательностей, обладающих потенциальной способностью стабилизировать синтезируемый транскрипт – шпилькоподобной структуры,

образуемой тРНК<sup>Trp</sup>, и сайта связывания белка MTSF1, специфичного для гена *NAD4* арабидопсиса. Нами проведен анализ уровня нарабатываемого транскрипта *GFP* под контролем промоторной области гена *RRN26* и каждого из двух вариантов 3'-НТО. В результате оказалось, что последовательность тРНК<sup>Trp</sup> на 3'-конце образующегося транскрипта более эффективно обеспечивает его стабильность, чем 3'-НТО гена *NAD4* арабидопсиса (рис. 4а). Такой результат выглядит достаточно неожиданным, особенно учитывая видовую специфичность последовательности 3'-НТО гена *NAD4*. MTSF1 – РНК-связывающий белок, относящийся к семейству PPR-белков, которое включает свыше 450 представителей, участвующих во всех этапах метаболизма РНК в органеллах арабидопсиса [30]. Показано, что 20-нуклеотидной последовательности, локализованной непосредственно на 3'-конце зрелого транскрипта *NAD4*, достаточно для связывания белка MTSF1 *in vitro*. Предполагается, что сразу после синтеза транскрипта-предшественника в митохондриях MTSF1 связывается с этой последовательностью и препятствует продвижению полинуклеотидфосфорилазы и других экзонуклеаз, расщепляющих РНК в направлении 3' → 5', в результате чего происходит стабилизация транскрипта и формирование его 3'-конца [12]. Тем не менее, нельзя исключить, что дополнительные последовательности могут играть роль в распознавании транскрипта *NAD4* белковым аппаратом экспрессии *in vivo*. Известно, что метаболизм РНК в митохондриях растений – сложный и не до конца изученный процесс, включающий в себя ряд взаимосвязанных этапов [3, 19]. Можно предположить, что образующийся в нашей системе чужеродный транскрипт не распознается в полной мере белковым аппаратом, ответственным за созревание и стабилизацию специфических митохондриальных РНК. Альтернативным объяснением полученного результата может быть отсутствие свободного белка MTSF1 в митохондриях, использованных в наших экспериментах.

С другой стороны, шпилькоподобные структуры, образуемые последовательностью тРНК<sup>Trp</sup> митохондрий кукурузы, оказались достаточно эффективными для защиты транскрипта от деградации экзонуклеазами. Можно предположить, что этот механизм менее специфичен и зависит от меньшего числа факторов, что сделало его более эффективным в отношении стабилизации чужеродного транскрипта *in organello*. Ранее в изолированных митохондриях крысы была выявлена различная стабильность транскриптов, экспрессируемых с импортированных в митохондрии генетических конструкций, несущих репортерные гены с различными 3'-концевыми последовательностями [5]. В том случае, когда вслед за последовательностью репортерного гена в конструкции

располагалась последовательность, кодирующая тРНК, целевой транскрипт оказывался существенно более стабильным, чем когда в 3'-области находилась поли(А)-последовательность. Таким образом, несмотря на существенные различия в организации и экспрессии митохондриального генома растений и животных, в обоих случаях наличие последовательности тРНК в 3'-области оказывается эффективным механизмом стабилизации транскрипта в системе *in organello*.

Далее мы провели сравнительный анализ содержания транскриптов *GFP*, находящихся под контролем промоторных областей двух митохондриальных генов – *RRN26* и *COX1*. Эффективность функционирования промоторов митохондриальных генов арабидопсиса и других растений ранее изучали в условиях *in vitro* с использованием митохондриального экстракта [29, 31] либо рекомбинантных РНК-полимераз [28], однако в системе изолированных митохондрий подобная работа проведена впервые. Нами показано, что уровень транскрипта *GFP* под контролем *Prrn26* выше, чем под контролем *Pcox1* (см. рис. 4б), из чего следует, что интенсивность транскрипции чужеродного гена в митохондриях растений *in organello* зависит от эффективности промотора митохондриального гена, входящего в состав импортируемой генетической конструкции.

Выявленные *in organello* различия в уровне экспрессии гена *GFP* под контролем разных промоторных последовательностей согласуются с данными о закономерностях экспрессии генов *RRN26* и *COX1 in vivo* [8]. Как показано с помощью метода *gus-on* транскрипции, интенсивность транскрипции гена *RRN26* в листьях арабидопсиса примерно в 2 раза превышает интенсивность транскрипции гена *COX1*, что отлично коррелирует с нашими данными [8]. *RRN26* представляет собой ген, наиболее активно транскрибируемый в митохондриях арабидопсиса [8]. В то же время, в экспериментах *in vitro* с использованием рекомбинантной РНК-полимеразы RPO<sub>Tm</sub> показано, что уровень транскрипции, инициируемой с единственного промотора гена *RRN26*, многократно ниже интенсивности транскрипции с промотора *Patp6-1-200* гена *atp6*, транскрибирующегося *in vivo* на относительно невысоком уровне [28]. Из этого следует, что данные, полученные нами в системе *in organello*, корректно отражают эффективность митохондриальных промоторных областей, наблюдаемую в растениях арабидопсиса *in vivo*, в отличие от результатов, полученных в системе *in vitro*.

Ранее различия в уровне экспрессии репортерных генов, контролируемых двумя основными промоторными областями митохондриального генома млекопитающих – HSP и LSP – наблюдали в изолированных митохондриях крысы [5]. Уровень транскрипта, инициируемого с промотора

HSP, был в несколько раз выше, чем транскрипта, находившегося под контролем промотора LSP. Интересно отметить, что и в этом случае относительная интенсивность транскрипции была близка к показанной ранее *in vivo* [32], но не в системе *in vitro*, что служит указанием на отсутствие в последнем случае дополнительных факторов, необходимых для корректного протекания транскрипции [5, 33].

Вопрос о существовании дополнительных транскрипционных факторов в митохондриях растений остается открытым до настоящего времени. В то время как в митохондриях животных обнаружено несколько транскрипционных факторов [34], только косвенные данные свидетельствуют в пользу существования таких белков в митохондриях растений [35–37]. Наши данные, указывающие на существенные различия в относительной интенсивности транскрипции, инициируемой с промоторной области гена *RRN26 in organello* и *in vitro*, свидетельствуют в пользу существования дополнительных факторов транскрипции. Ранее было показано, что 9-нуклеотидный мотив САТААГАГА – центральный элемент промоторной области гена *RRN26* и ряда других митохондриальных промоторов [7], слабо распознается рекомбинантными RPO<sup>Tm</sup> и RPO<sup>Tpr</sup>, находясь в составе промотора *Prmn26*, и не распознается вообще в составе остальных проверенных промоторов (*Patp6*-1-156, *Patp9*-239 и *Patp8*-157) [28]. По нашему мнению, высокая эффективность этого промотора *in organello*, показанная нами, говорит в пользу участия в распознавании этой последовательности пока не идентифицированных белковых факторов митохондриальной локализации.

Следует отметить, что для инициации специфической транскрипции с митохондриальных промоторов арабидопсиса рекомбинантными РНК-полимеразами *in vitro* строго необходим ДНК-субстрат с суперспирализованной структурой [28]. Импорт суперспирализованных молекул ДНК невозможно обеспечить в условиях *in organello* в силу специфичности процесса переноса ДНК в митохондрии в отношении линейной ДНК [20], однако использование нами линейных субстратов позволило, тем не менее, выявить специфическую транскрипцию чужеродного гена, находящегося под контролем митохондриальных промоторов. Сходным образом линейная ДНК оказывается подходящим субстратом для инициации транскрипции с митохондриальных промоторов при использовании в системе *in vitro* грубого экстракта митохондрий, содержащего все митохондриальные белки [29, 38]. Эти данные в совокупности указывают на то, что в митохондриях растений присутствуют белковые факторы, модулирующие изменение конформации ДНК таким образом, чтобы сделать ее доступной для синтеза РНК.

Таким образом, нами впервые показана возможность детекции транскриптов чужеродного гена *GFP*, находящегося под контролем промоторных областей митохондриальных генов *COX1* или *RRN26*, после импорта рекомбинантных ДНК-матриц в изолированные митохондрии арабидопсиса. Обнаруженные ранее различия в уровне транскрипции митохондриальных генов *in vivo*, инициируемой с промоторных областей *Pcox1* или *Prmn26*, подтверждаются в разработанной нами системе изучения экспрессии чужеродных генов *in organello*. При этом установлено, что уровень транскрипта гена *GFP*, синтезированного *in organello*, выше при использовании в качестве 3'-НТО последовательности тРНК<sup>Trp</sup>, чем в присутствии 3'-НТО гена *NAD4* арабидопсиса. Полученные результаты создают возможность использования разработанной нами системы импорта ДНК *in organello* для изучения особенностей экспрессии митохондриальных генов растений, а также для подбора митохондриальных генетических регуляторных элементов, наиболее эффективных для обеспечения экспрессии чужеродного гена при трансформации митохондрий *in vivo*.

В работе использовано оборудование ЦКП “Биоаналитика” СИФИБР СО РАН (Иркутск).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00114, <https://rscf.ru/project/22-74-00114/>.

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larosa V., Remacle C. (2013) Transformation of the mitochondrial genome. *Int. J. Dev. Biol.* **57**, 659–665. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130230cr>
2. Remacle C., Larosa V., Salinas T., Hamel P., Subrahmanian N., Bonnefoy N., Kempken F. (2012) Transformation and nucleic acid delivery to mitochondria. In: *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria. Advances in Photosynthesis and Respiration*. **35**. Eds Bock R., Knoop V. Dordrecht: Springer, [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2920-9\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2920-9_19)
3. Hammani K., Giegé P. (2014) RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends Plant Sci.* **19**, 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.008>
4. Константинов Ю.М., Дитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарасенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. (2016) Импорт ДНК в митохондрии. *Биохимия*. **81**, 1307–1321.
5. Koulintchenko M., Temperley R.J., Mason P.A., Dietrich A., Lightowers R.N. (2006) Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. *Hum.*

- Mol. Genet.* **15**, 143–154.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi435>
6. Tarasenko T.A., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Konstantinov Y.M. (2021) Plant mitochondria import DNA via alternative membrane complexes involving various VDAC isoforms. *Mitochondrion*. **60**, 43–58.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.07.006>
  7. Kühn K., Weihe A., Börner T. (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucl. Acids Res.* **33**, 337–346.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gki179>
  8. Kühn K., Richter U., Meyer E., Delannoy E., de Longevialle A.F., O'Toole N., Börner T., Millar A., Small I., Whelan J. (2009) Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. **21**, 2762–2779.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.068536>
  9. Moller I.M., Rasmusson A.G., Van Aken O. (2021) Plant mitochondria – past, present and future. *Plant J*. **108**, 912–959.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.15495>
  10. Holec S., Lange H., Kuhn K., Alioua M., Borner T., Gagliardi D. (2006) Relaxed transcription in *Arabidopsis* mitochondria is counterbalanced by RNA stability control mediated by polyadenylation and polynucleotide phosphorylase. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2869–2876.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2869-2876.2006>
  11. Perrin R., Meyer E.H., Zaepfel M., Kim Y.J., Mache R., Grienenberger J.M., Gualberto J.M., Gagliardi D. (2004) Two exoribonucleases act sequentially to process mature 3'-ends of atp9 mRNAs in *Arabidopsis* mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 25440–25446.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M401182200>
  12. Haili N., Amal N., Quadrado M., Amiar S., Tcherkez G., Dahan J., Briozzo P., Colas des Francs-Small C., Vrielynck N., Mireau H. (2013) The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the nad4 mRNA in *Arabidopsis* mitochondria. *Nucl. Acids Res.* **41**, 6650–6663.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt337>
  13. Ruwe H., Wang G., Gusewski S., Schmitz-Linneweber C. (2016) Systematic analysis of plant mitochondrial and chloroplast small RNAs suggests organelle-specific mRNA stabilization mechanisms. *Nucl. Acids Res.* **44**, 7406–7417.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw466>
  14. Forner J., Weber B., Thuss S., Wildum S., Binder S. (2007) Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: T-elements contribute to 5' and 3'-end formation. *Nucl. Acids Res.* **35**, 3676–3692.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm270>
  15. MacIntosh G.C., Castandet B. (2020) Organellar and secretory ribonucleases: major players in plant RNA homeostasis. *Plant Physiol.* **183**, 1438–1452.  
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00076>
  16. Dombrowski S., Brennicke A., Binder S. (1997) 3'-Inverted repeats in plant mitochondrial mRNAs are processing signals rather than transcription terminators. *EMBO J.* **16**, 5069–5076.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.5069>
  17. Kuhn J., Tengler U., Binder S. (2001) Transcript life-time is balanced between stabilizing stem-loop structures and degradation promoting polyadenylation in plant mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 731–742.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.731-742.2001>
  18. Wang C., Aubé F., Planchard N., Quadrado M., Dargel-Graffin C., Nogué F., Mireau H. (2017) The pentatricopeptide repeat protein MTSF2 stabilizes a nad1 precursor transcript and defines the 3' end of its 5'-half intron. *Nucl. Acids Res.* **45**, 6119–6134.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx162>
  19. Wang C., Blondel L., Quadrado M., Dargel-Graffin C., Mireau H. (2022) Pentatricopeptide repeat protein MITOCHONDRIAL STABILITY FACTOR 3 ensures mitochondrial RNA stability and embryogenesis. *Plant Physiol.* **190**, 669–681.  
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiac309>
  20. Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. (2003) Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J.* **22**, 1245–1254.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg128>
  21. Sweetlove L.J., Taylor N.L., Leaver C.J. (2007) Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Meth. Mol. Biol.* **372**, 125–136.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_9)
  22. 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.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
  23. Douce R., Neuburger M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 371–414.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002103>
  24. Tarasenko T.A., Subota I.Yu., Tarasenko V. I., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M.V. (2020) Plant mitochondrial subfractions have different ability to import DNA. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **32**, 5–18.  
<https://doi.org/10.1007/s40626-020-00167-w>
  25. Тарасенко Т.А., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Клименко Е.С., Константинов Ю.М. (2019) Импорт ДНК в митохондрии растений: комплексный подход для изучения *in organello* и *in vivo*. *Биохимия*. **84**, 1036–1048.  
<https://doi.org/10.1134/S032097251907011X>
  26. Farré J.C., Araya A. (2001) Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription, splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles. *Nucl. Acids Res.* **29**, 2484–2491.  
<https://doi.org/10.1093/nar/29.12.2484>
  27. Tarasenko V.I., Katyshev A.I., Yakovleva T.V., Garnik E.Y., Chernikova V.V., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M.V. (2016) RPOTmp, an *Arabidopsis* RNA polymerase with dual targeting, plays an important role in mitochondria, but not in chloroplasts. *J. Exp. Botany.* **67**, 5657–5669.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw327>
  28. Kühn K., Bohne A.V., Liere K., Weihe A., Börner T. (2007) *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate *in vitro* transcription of organellar genes. *Plant Cell*. **19**, 959–971.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.046839>

29. Binder S., Hatzack F., Brennicke A. (1995) A novel pea mitochondrial *in vitro* transcription system recognizes homologous and heterologous mRNA and tRNA promoters. *J. Biol. Chem.* **270**, 22182–2218. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22182>
30. Rovira A.G., Smith A.G. (2019) PPR proteins – orchestrators of organelle RNA metabolism. *Physiol. Plant.* **166**, 451–459. <https://doi.org/10.1111/pp1.12950>
31. Hanic-Joyce P.J., Gray M.W. (1991) Accurate transcription of a plant mitochondrial gene *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* **11**, 2035–2039. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.4.2035-2039.1991>
32. Attardi G., Chomyn A., King M.P., Kruse B., Polosa P.L., Murdter N.N. (1990) Regulation of mitochondrial gene expression in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 509–513. <https://doi.org/10.1042/bst0180509>
33. Micol V., Fernández-Silva P., Attardi G. (1997) Functional analysis of *in vivo* and *in organello* footprinting of HeLa cell mitochondrial DNA in relationship to ATP and ethidium bromide effects on transcription. *J. Biol. Chem.* **272**, 18896–18904. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18896>
34. Kotrys A.V., Szczesny R.J. (2019) Mitochondrial gene expression and beyond—novel aspects of cellular physiology. *Cells.* **9**, 17. <https://doi.org/10.3390/cells9010017>
35. Newton K.J., Winberg B., Yamato K., Lupold S., Stern D.B. (1995) Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the *cox2* gene of perennial teosintes. *EMBO J.* **14**, 585–593. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07034.x>
36. Xiao S., Zang J., Pei Y., Liu J., Liu J., Song W., Shi Z., Su A., Zhao J., Chen H. (2020) Activation of mitochondrial *orf355* gene expression by a nuclear-encoded DREB transcription factor causes cytoplasmic male sterility in maize. *Mol. Plant.* **13**, 1270–1283. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.07.002>
37. Тарасенко В.И., Субота И.Ю., Кобзев В.Ф., Константинов Ю.М. (2005) Выделение митохондриальных белков, специфично связывающихся с промоторной областью гена *cox1* кукурузы. *Мол. биология.* **39**(3), 394–402.
38. Rapp W.D., Stern D.B. (1992) A conserved 11 nucleotide sequence contains an essential promoter element of the maize mitochondrial *atp1* gene. *EMBO J.* **11**, 1065–1073. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05145.x>

## Differential Expression of a Foreign Gene in Arabidopsis Mitochondria *in organello*

V. I. Tarasenko<sup>1</sup>, T. A. Tarasenko<sup>1</sup>, \*, I. V. Gorbenko<sup>1</sup>,  
Yu. M. Konstantinov<sup>1</sup>, and M. V. Koulintchenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

<sup>2</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

\*e-mail: bolotova\_t.a@mail.ru

Genetic transformation of higher eukaryotes mitochondria *in vivo* is one of the unresolved and important problems. For efficient expression of foreign genetic material in mitochondria, it is necessary to select regulatory elements that ensure a high level of transcription and transcript stability. This work is aimed at studying the effectiveness of regulatory elements of mitochondrial genes flanking exogenous DNA using the phenomenon of natural competence of plant mitochondria. For this purpose, genetic constructs carrying the *GFP* gene under the control of the promoter regions of the *RRN26* or *COX1* genes and one of the two 3'-untranslated regions (3'-UTR) of mitochondrial genes were imported into isolated *Arabidopsis* mitochondria, followed by transcription *in organello*. It was shown that the level of *GFP* expression under the control of promoters of the *RRN26* or *COX1* genes *in organello* correlates with the level of transcription of these genes observed *in vivo*. At the same time, the presence of the tRNA<sup>Trp</sup> sequence in the 3'-UTR leads to a higher level of the *GFP* transcript than the presence in this region of the 3'-UTR of the *NAD4* gene containing the binding site of the MTSF1 protein. The results obtained open up prospects for creating a system for efficient transformation of the mitochondrial genome.

**Keywords:** regulation of gene expression, DNA import, *GFP*, promoter region, untranslated region, RPOTmp, *Arabidopsis thaliana* mitochondria, *in organello*