



УДК 576.315

## Интеграция чужеродных последовательностей ДНК в митохондриальный геном растений

Д. В. Милешина (Непомнящих)<sup>1,2</sup>, А. Дитриш<sup>2</sup>, Ю. М. Константинов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии растений, Национальный центр научных исследований, Страсбург, Франция

E-mail: [dara@sifibr.irk.ru](mailto:dara@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** Ранее нами установлено, что изолированные митохондрии растений способны импортировать двуцепочечную линейную ДНК небольшого размера (<10 тпн) путем активного, не зависящего от последовательности ДНК транспорта. На основе этого явления разрабатывается система стабильной трансформации митохондриального генома. В данной работе представлены доказательства интеграции чужеродной ДНК в митохондриальный геном картофеля посредством гомологичной рекомбинации.

**Ключевые слова:** митохондрии растений, импорт ДНК, гомологичная рекомбинация.

### Введение

Изучение генома митохондрий сильно затруднено в связи с отсутствием системы генетической трансформации этих органелл. Несмотря на большой фундаментальный и биотехнологический интерес, в настоящее время остается недостижимой целью экспрессия чужеродных белков в митохондриях. В связи с необходимостью решения данной проблемы нами разрабатывается система генетической трансформации растительных митохондрий, основанная на физиологических механизмах переноса нуклеиновых кислот между клеточными компартментами.

Как показано ранее, изолированные растительные митохондрии способны импортировать двуцепочечную линейную ДНК небольшого размера (<10 т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов) путем активного, не зависящего от последовательности ДНК транспорта [1; 2]. Очевидно, что это явление может эффективно использоваться как в фундаментальных исследованиях структуры и функций генома органелл, так и в биотехнологических работах по генетической трансформации митохондрий. До последнего времени, однако, остается невыясненным вопрос о возможности встраивания чужеродных последовательностей ДНК в митохондриальную хромосому. Целью работы было исследование возможности интеграции чужеродных последовательностей ДНК в митохондриальный геном растений.

### Материалы и методы

**Получение конструкций.** Для получения конструкции *nad2-St/gfp*, фрагмент гена *nad2* (X93575) амплифицировали и клонировали в рKS плазмидном векторе. Затем *SphI*-рестрикционный фрагмент заменили на фрагмент гена *gfp* соответствующего размера, получив плазмиду *pBnad2-St/gfp*. Для получения конструкции *DR-Zm/gfp* фрагмент прямого митохондриального повтора кукурузы размером 5,3 тпн (AY506529) амплифицировали и клонировали в полилинкер рKS вектора. *HindIII*-фрагмент промежуточной конструкции заменили на фрагмент гена *gfp*, получив плазмиду *pBDR-Zm/gfp*. В качестве ДНК субстрата для импорта использовали радиоактивно меченные ПЦР-продукты, полученные с использованием праймеров, специфичных для митохондриальных последовательностей.

**Эксперименты in organello.** В экспериментах использовали изолированные митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*). Митохондрии выделяли согласно [3]. Реакцию импорта ДНК проводили, как описано в [2].

**Гель электрофорез.** Для анализа нуклеиновых кислот использовали электрофорез в агарозном геле в ТАЕ. Для анализа ДНК в денатурирующих условиях использовали щелочной агарозный гель [4].

**Рестрикционный анализ.** Нуклеиновые кислоты разделяли в агарозном геле с последующей элюцией высокомолекулярной фракции

мтДНК. Полученную ДНК переваривали эндонуклеазами рестрикции *ScaI* и *BamHI*. Рестрикционные фрагменты разделяли электрофоретически в агарозном геле, переносили на нейлоновую мембрану и экспонировали с рентгеновской пленкой.

**Инвертированная ПЦР.** МтДНК переваривали эндонуклеазой рестрикции *MseI*. 100 нг фрагментированной ДНК, лигировали T4 ДНК лигазой при концентрации 5'-концов 5 рМ. Лигазную смесь добавляли в ПЦР с праймерами CTAGTTGAACGCTTCCATCTTC и AGCAAGCTTGCCTAGCAGAGACGTGG. Полученные продукты амплификации клонировали и секвенировали.

### Результаты и обсуждение

**Подготовка ДНК субстратов.** Для изучения возможности интеграции чужеродной импортируемой ДНК в митохондриальный геном были разработаны конструкции на основе последовательностей мтДНК двух видов высших растений (*Zea mays* и *Solanum tuberosum*). Обе конструкции содержат фрагмент гена GFP (Green Fluorescent Protein), фланкированный последовательностями митохондриальной ДНК, размер которых составлял от 0,8 до 1,5 тпн. (рис. 1). Одна из них, *nad2St/gfp*, в качестве фланкирующих *gfp* ген содержала фрагменты митохондриального гена *nad2* картофеля с размерами 0,8 и 0,9 тпн. Вторая конструкция, *DR-Zm/gfp*, включала два участка прямого повтора (*DR*, от англ. Direct Repeat) митохондриального генома кукурузы, размеры которых составляли 1 и 1,5 тпн.

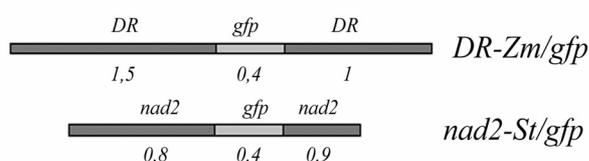


Рис. 1. Схематическое изображение конструкций, используемых для изучения возможности интеграции чужеродной импортируемой ДНК в митохондриальный геном растений. *DR1*, *DR2* – фрагменты прямого повтора митохондриального генома кукурузы; *nad2* – фрагменты митохондриального гена *nad2* картофеля (*Solanum tuberosum*); *gfp* – фрагмент гена GFP (*green fluorescent protein*) из медузы *Aequoria victoria*, цифрами обозначен размер фрагментов, тпн

Влияние последовательности ДНК на взаимодействие импортированной и эндогенной ДНК. В экспериментах с митохондриями клуб-

ней картофеля использовали обе подготовленные конструкции. При импорте радиоактивно меченой ДНК в митохондрии картофеля показано, что поведение импортированной ДНК зависит от последовательности (рис. 2, А). Так, при импорте конструкции *nad2St/gfp* кроме пятна засветки, соответствующего импортированному фрагменту, присутствует дополнительная полоса, соответствующая высокомолекулярной фракции мтДНК. В то же время при импорте *DR-Zm/gfp* наблюдается только одно пятно засветки, которое соответствует импортированному фрагменту.

Для выяснения количества сайтов взаимодействия мтДНК и импортированной конструкции *nad2St/gfp* был проведен рестрикционный анализ высокомолекулярной фракции мтДНК. Для этого в стандартном эксперименте после первичного разделения экстрагированных нуклеиновых кислот высокомолекулярную фракцию элюировали из геля и переваривали эндонуклеазами рестрикции *BamHI* и *ScaI*. Полученную смесь рестрикционных фрагментов разделяли в агарозном геле и подвергали автордиографии (рис. 2, Б). Кроме полосы, соответствующей собственно импортированной ДНК, обнаруживалась лишь одна дополнительная полоса около 7 тпн, что соответствует предсказанному размеру продукта (6,8 тпн).

**Стабильность взаимодействия импортированной и эндогенной ДНК.** При использовании конструкции *nad2St/gfp* для импорта в митохондрии картофеля значительная часть экзогенной ДНК оказывалась связанной с высокомолекулярной фракцией нуклеиновых кислот (рис. 3, А), которая соответствует хромосоме митохондрий. Это могло быть связано как с интеграцией импортированной ДНК в геном, так и с комплементарным взаимодействием гомологичных последовательностей без образования ковалентных связей. В дальнейшем, чтобы проверить характер взаимодействия между молекулами ДНК, часть выделенных нуклеиновых кислот подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях (рис. 3, Б). На рисунке видно, что и в денатурирующих условиях сигнал связан с мтДНК, что служит указанием в пользу интеграции импортированной в органеллы ДНК в геном.

**Интеграция репортерной (*gfp*) последовательности в митохондриальный геном.** Для подтверждения интеграции экзогенной ДНК в митохондриальный геном использовали инвертированную ПЦР (рис. 4). Митохондриальную ДНК обрабатывали экзонуклеазой рестрикции

*Mse I*, сайты узнавания которой присутствуют в репортерном гене и в геномной ДНК за пределами конструкции. Таким образом, в случае интеграции репортерной последовательности в геном, образуется рестрикционный фрагмент, состоящий из трех сегментов: фрагмента митохондриальной ДНК на 5'-конце, участка гомологии *nad2-R* и фрагмента гена *gfp* на 3'-конце. Переваренную рестриктазой *Mse I* ДНК лигировали для получения миникольцевых ДНК и использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции. Праймеры подобраны таким образом, чтобы продукт ПЦР образовывался только в случае интеграции репортерного

гена в геном органелл. В проведенных экспериментах был получен предполагаемый ПЦР-продукт (рис. 4), а также фрагменты большего размера. ПЦР-продукты были клонированы и секвенированы. Анализ последовательностей показал, что ПЦР-продукт размером 500 пн. соответствует предполагаемому, а фрагменты большего размера представляют собой дополнительные продукты лигирования, содержащие кроме фрагментов репортерного гена и экстрапоследовательности также небольшие (50–300 пн.) фрагменты мтДНК. Дополнительные последовательности всегда фланкированы сайтами узнавания экзонуклеазы рестрикции *Mse I*.

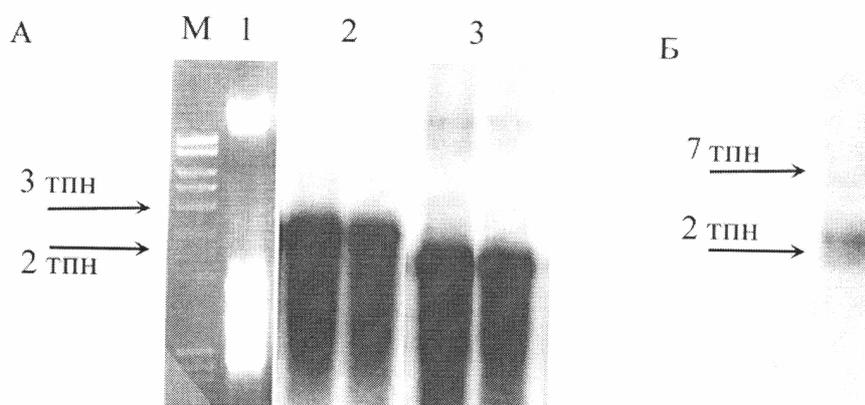


Рис. 2. Анализ специфичности рекомбинативного встраивания импортированной ДНК в митохондриальный геном картофеля:

А – автордиограмма ДНК после импорта; М – молекулярный маркер длины двухцепочечной ДНК, стрелками обозначены длины некоторых фрагментов; 1 – митохондриальная ДНК, окрашенная бромистым этидием; 2–3 – автордиограмма: 2 – ДНК после импорта *nad2St/gfp* в митохондрии; 3 – ДНК после импорта *DRZm/gfp*; стрелками обозначен размер фрагментов в тпн; Б – автордиограмма рестрикционных фрагментов высокомолекулярной фракции мтДНК

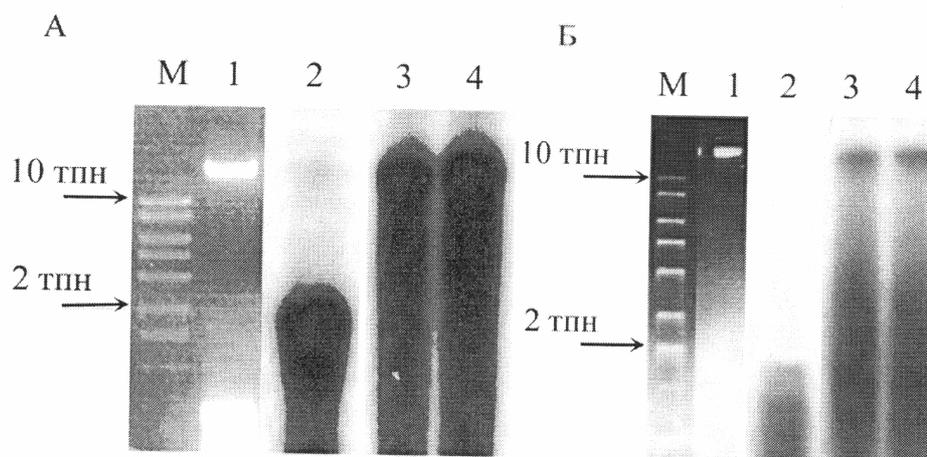


Рис. 3. Выявление событий интеграции импортированной ДНК конструкции *nad2-St/gfp* в митохондриальный геном картофеля:

А – электрофорез в обычных условиях, Б – электрофорез в денатурирующих условиях; М – молекулярный маркер длины фрагментов ДНК, стрелками указаны размеры некоторых фрагментов; 1 – образец мтДНК, окрашенный бромистым этидием; 2–4 – автордиограмма: 2 – образец ДНК после импорта; 3 – образец ДНК после импорта и постинкубации в течение 1 часа; 4 – образец ДНК после импорта и постинкубации в течение 2 часов

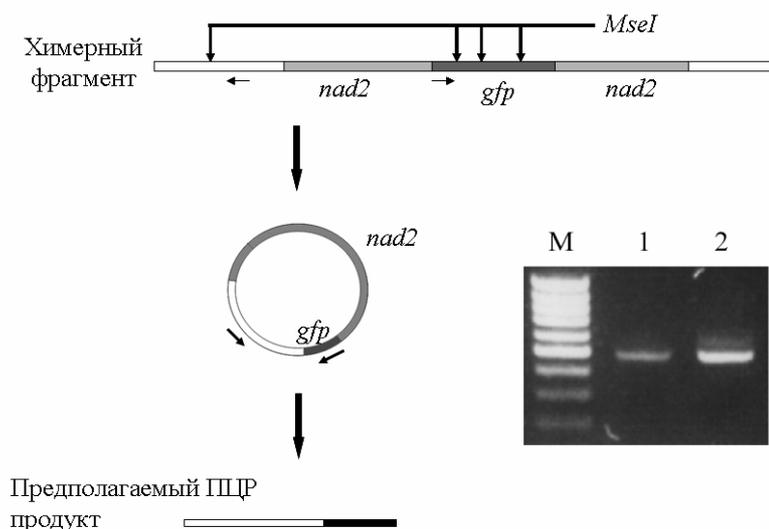


Рис. 4. Доказательство интеграции чужеродной ДНК в митохондриальный геном с помощью инвертированной ПЦР. М – молекулярный маркер длины фрагментов ДНК, 1 – образец ДНК после импорта; 2 – образец ДНК после импорта и постинкубации в течение 1 часа

Таким образом, нами получено подтверждение интеграции чужеродной импортируемой ДНК в митохондриальный геном картофеля посредством гомологичной рекомбинации.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 05-04-49137, 05-04-22004-НЦНИ и интеграционного комплексного проекта СО РАН № 5.1.

#### Литература

1. Константинов Ю. М. Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды pBR322 в изолированных митохондриях кукурузы / Ю. М. Константинов,

В. А. Подсосонный, Г. Н. Луценко // Докл. АН СССР. – 1988. – № 298. – С. 502–504.

2. Koulintchenko M. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex / M. Koulintchenko, Y. Konstantinov, A. Dietrich // EMBO J. – 2003. – Vol. 22(6). – P. 1245–1254.

3. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll / M. Neuburger [et al.] // Arch Biochem Biophys. – 1982. – Vol. 217(1). – P. 312–323.

4. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

## Integration of foreign DNA into the plant mitochondrial genome

D. V. Mileshina (Nepomnyashikh)<sup>1,2</sup>, A. Dietrich<sup>2</sup>, Yu. M. Konstantinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, RAS,

<sup>2</sup>Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, CNRS/ULP.

**Abstract.** We previously demonstrated that isolated plant mitochondria can actively import and retain double-stranded small (<10 kb) size DNA through sequence unspecific DNA uptake. On the base of this phenomenon we develop the system to stably transform plant mitochondrial genome. Here we present the evidence for the integration of foreign imported DNA into the potato mitochondrial genome through homologous recombination.

**Key words:** plant mitochondria, DNA import, homologous recombination.

Милешина Дарья Владимировна  
Сибирский институт физиологии и биохимии  
растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317  
младший научный сотрудник лаборатории  
генетической инженерии растений  
тел. (395 2) 42-49-03, факс (395 2) 51-07-54  
E-mail: dara@sifibr.irk.ru

Mileshina (Nepomnyashikh) Dariya Vladimirovna  
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry  
SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
research scientist  
Laboratory of Plant Genetic Engineering  
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54  
E-mail: dara@sifibr.irk.ru

*Дитриш Андре*  
*Институт молекулярной биологии растений*  
*Национального центра научных исследований*  
*Франция, Страсбург*

*Dietrich Andre*  
*Institut de Biologie Moléculaire des Plantes*  
*Centre national de la recherche scientifique (CNRS), 12*  
*rue de general Zimmer, s-67084, Strasbourg, France.*

*Константинов Юрий Михайлович*  
*Сибирский институт физиологии и биохимии*  
*растений СО РАН*  
*664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317*  
*доктор биологических наук*  
*заведующий лабораторией генетической*  
*инженерии растений*  
*тел. (395 2) 42-49-03, факс (395 2) 51-07-54*  
*E-mail: yukon@sifibr.irk.ru*

*Konstantinov Yuri Mikhailovitch*  
*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry*  
*SB RAS*  
*664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.*  
*D. Sc. in Biology, Head of Laboratory of Plant Genetic*  
*Engineering*  
*phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54*  
*E-mail: yukon@sifibr.irk.ru*