

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Инактивация компонентов комплекса TIM приводит к снижению уровня импорта ДНК в митохондриях арабидопсиса

Т.А. Тарасенко¹, К.Д. Елизова¹, В.И. Тарасенко¹✉, М.В. Кулинченко^{1,2}, Ю.М. Константинов¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия

✉ vslav@inbox.ru

Аннотация. Феномен импорта ДНК в митохондрии показан для всех основных групп эукариот. В растениях и животных импорт ДНК, по-видимому, происходит различными путями. Известно, что в растительные органеллы нуклеиновые кислоты попадают по альтернативным каналам в зависимости от размера импортируемых молекул. Импорт ДНК небольшого размера (до 300 п. н.) частично перекрывается с механизмом импорта тРНК, по крайней мере, на уровне внешней мембраны. Примечательно, что у растений в импорт тРНК вовлечены компоненты аппарата импорта белков, чья роль в транспорте ДНК до настоящего времени оставалась неизученной. В настоящей работе мы провели исследование роли отдельных компонентов транслоказы внутренней мембраны TIM в процессе импорта ДНК в изолированные митохондрии арабидопсиса и их возможной связи с порином VDAC1. С использованием нокаут-мутантов по генам, кодирующим изоформы белков Tim17 или Tim23, мы впервые показали участие этих белков в импорте фрагментов ДНК разной длины. Кроме того, ингибирование транспортных каналов специфическими антителами к VDAC1 приводило к снижению уровня импорта ДНК в митохондрии дикого типа, что позволило установить специфическое участие этой изоформы порина в импорте ДНК. В нокаут-мутанте *tim17-1* происходило дополнительное снижение эффективности импорта ДНК в присутствии антител к VDAC1 в сравнении с линией дикого типа. Полученные результаты указывают на участие белков Tim17-1 и Tim23-2 в аппарате импорта ДНК в растительные митохондрии. При этом Tim23-2 может быть частью канала, формируемого при участии VDAC1, в то время как Tim17-1, по-видимому, вовлечен в альтернативный, независимый от VDAC1, путь импорта ДНК. Выявление мембранных белков-переносчиков, участвующих в различных путях импорта ДНК, позволит использовать природную способность митохондрий к поглощению ДНК в качестве удобного биотехнологического инструмента для трансформации митохондриального генома. Ключевые слова: митохондрии; импорт ДНК; Tim17; Tim23; VDAC1; транспортный канал; нокаут-мутант; *Arabidopsis thaliana*.

Для цитирования: Тарасенко Т.А., Елизова К.Д., Тарасенко В.И., Кулинченко М.В., Константинов Ю.М. Инактивация компонентов комплекса TIM приводит к снижению уровня импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):971-979. DOI 10.18699/VJGB-23-112

Inactivation of the TIM complex components leads to a decrease in the level of DNA import into *Arabidopsis* mitochondria

T.A. Tarasenko¹, K.D. Elizova¹, V.I. Tarasenko¹✉, M.V. Koulintchenko^{1,2}, Yu.M. Konstantinov¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

✉ vslav@inbox.ru

Abstract. The phenomenon of DNA import into mitochondria has been shown for all major groups of eukaryotes. In plants and animals, DNA import seems to occur in different ways. It has been known that nucleic acids enter plant organelles through alternative channels, depending on the size of the imported molecules. Mitochondrial import of small DNA (up to 300 bp) partially overlaps with the mechanism of tRNA import, at least at the level of the outer membrane. It is noteworthy that, in plants, tRNA import involves components of the protein import apparatus, whose role in DNA transport has not yet been studied. In this work, we studied the role of individual components of the TIM inner membrane translocase in the process of DNA import into isolated *Arabidopsis* mitochondria and their possible association with the porin VDAC1. Using knockout mutants for the genes encoding Tim17 or Tim23 protein isoforms, we demonstrated for the first time the involvement of these proteins in the import of DNA fragments of different lengths. In addition, inhibition of transport channels with specific antibodies to VDAC1 led to a decrease in the level of DNA import into wild-type mitochondria, which made it possible to establish the specific involvement of this porin isoform in DNA import. In the *tim17-1* knockout mutant, there was an additional decrease in the efficiency of DNA import in the presence of antibodies to VDAC1 compared to the wild type line. The results obtained indicate the involvement of the Tim17-1 and Tim23-2 proteins in the mechanism of DNA import into plant mitochondria. At the same time, Tim23-2 may be part of the channel formed with the participation of VDAC1, while Tim17-1, apparently, is involved in an alterna-

tive DNA import pathway independent of VDAC1. The identification of membrane carrier proteins involved in various DNA import pathways will make it possible to use the natural ability of mitochondria to import DNA as a convenient biotechnological tool for transforming the mitochondrial genome.

Key words: mitochondria; DNA import; Tim17; Tim23; VDAC1; transport channel; knock-out mutant; *Arabidopsis thaliana*.

For citation: Tarasenko T.A., Elizova K.D., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Konstantinov Yu.M. Inactivation of the TIM complex components leads to a decrease in the level of DNA import into *Arabidopsis* mitochondria. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):971-979. DOI 10.18699/VJGB-23-112

Введение

Митохондрии – двумембранные органеллы аэробных эукариот, которые отвечают за энергетическое обеспечение клетки и обладают собственной генетической системой. Митохондриальная ДНК (мтДНК), представляющая собой наследие эндосимбиотического события (Martin et al., 2015), кодирует рРНК, тРНК, рибосомальные белки и белки окислительного фосфорилирования (Morley, Nielsen, 2017). Способность модифицировать митохондриальный геном может стать удобным инструментом для внесения направленных изменений в мтДНК с целью получения растений с ценными сельскохозяйственными характеристиками и решения вопросов генно-терапевтического лечения митохондриальных заболеваний человека.

Методология трансформации митохондрий экзогенной ДНК находится на начальных стадиях развития (Larosa, Remacle, 2013), поскольку пока не найдено эффективных способов манипуляции митохондриальным геномом с помощью направленной доставки молекул нуклеиновых кислот. Одним из перспективных подходов к трансформации митохондриального генома может стать манипуляция процессом импорта ДНК – природной способности митохондрий поглощать ДНК из внешней среды.

Феномен импорта ДНК первоначально был продемонстрирован для растений (Koulintchenko et al., 2003; Konstantinov et al., 2016), но в дальнейшем описан для митохондрий млекопитающих (Koulintchenko et al., 2006) и дрожжей (Weber-Lotfi et al., 2009). Следует отметить, что до настоящего момента нет полного понимания того, как осуществляется трансмембранный перенос ДНК в митохондриальный матрикс. По-видимому, в растениях и у млекопитающих импорт ДНК происходит различными путями (Koulintchenko et al., 2006). Более того, в растительных митохондриях перенос ДНК может совершаться посредством нескольких альтернативных механизмов при участии разнообразных белковых комплексов (Weber-Lotfi et al., 2015; Tarasenko et al., 2021).

На уровне внешней мембраны импорт ДНК в митохондрии растений происходит с участием порина (VDAC, от англ. *voltage-dependent anion channel*) (Koulintchenko et al., 2003). Роль VDAC показана также и в импорте тРНК (Salinas-Giegé et al., 2015) – клеточном процессе, обеспечивающем функционирование генетической системы этих органелл (Morley, Nielsen, 2017). В клетках растений присутствует несколько изоформ VDAC (Tateda et al., 2011), в частности у *Arabidopsis thaliana* существует четыре функциональные изоформы (Tateda et al., 2011), выполняющие различные роли. Так, белок VDAC1 более важен для роста растений и их устойчивости к болезням (Tateda et al., 2011), в то время как VDAC3, по-видимому, вовлечен в ответную реакцию на стресс (Nemono et al., 2020). На ос-

новании данных об интенсивности связывания отдельных изоформ VDAC с тРНК предполагают, что из четырех изоформ арабидопсиса именно VDAC4 вовлечена в импорт тРНК в митохондрии (Nemono et al., 2020).

Дифференциальное взаимодействие поринов митохондрий с тРНК свойственно и другим растениям. Так, у картофеля из двух мажорных изоформ, по-видимому, только VDAC34 участвует в импорте тРНК, поскольку именно для этой изоформы показано образование прочной связи с молекулой тРНК (Salinas et al., 2014). Изоформы VDAC арабидопсиса потенциально могут иметь специализацию также и в транспорте ДНК в зависимости от длины импортируемых молекул (Tarasenko et al., 2021). В линиях арабидопсиса, лишенных VDAC1, VDAC2 или VDAC4, происходило усиление импорта ДНК на фоне активации экспрессии VDAC3, что могло быть частью клеточного механизма, направленного на компенсацию отсутствия транспортного белка митохондриальной мембраны.

На уровне внутренней мембраны митохондрий импорт ДНК небольшого размера (до 300 п.н.) может происходить с участием переносчиков адениновых нуклеотидов (ADNT1), АТФ-Mg/Pi (APC) (Tarasenko et al., 2021) и/или переносчика фосфата MPT (Weber-Lotfi et al., 2015). В импорте ДНК среднего размера (400–7000 п.н.) участвует переносчик аденин-нуклеотидов AAC (англ. *ADP/ATP carrier*) (Koulintchenko et al., 2003). Участие CuBP, субъединицы дыхательного комплекса I, в переносе ДНК среднего и большого размера (Weber-Lotfi et al., 2015), по всей видимости, связано со стабилизацией канала, через который транспортируются более крупные молекулы.

Методом конкурентного ингибирования было показано вероятное пересечение путей импорта тРНК и ДНК небольшого размера (Weber-Lotfi et al., 2015), что неудивительно, учитывая участие VDAC в импорте как тРНК (Salinas et al., 2006), так и ДНК (Koulintchenko et al., 2003; Tarasenko et al., 2021). Примечательно, что у растений в процесс импорта тРНК вовлечены также и компоненты аппарата импорта белков (Verechshagina et al., 2018). Этот факт указывает на наличие мультифункциональных свойств у некоторых мембранных транспортеров растительных митохондрий. Исходя из этих данных, логично предположить, что компоненты белковых комплексов, участвующих в протекающих в митохондриях растений процессах транслокации тРНК и/или белков, могут быть вовлечены и в механизм импорта ДНК.

Наиболее очевидным кандидатом на роль мультифункционального транспортера представляется комплекс TIM, известный также как TIM17:23, отвечающий за перенос белков в митохондриальный матрикс. Этот мембранный комплекс непосредственно связан в единый канал с транслокацией белков внешней митохондриальной мембраны

ТОМ (от англ. *translocase of the outer membrane*), отдельные компоненты которой принимают участие в импорте тРНК у растений (Salinas et al., 2006).

Транслоказа внутренней мембраны TIM17:23, один из наиболее крупных белковых комплексов митохондрий, состоит из двух главных субъединиц – Tim17 и Tim23. Эти белки закреплены во внутренней мембране четырьмя трансмембранными спиралями, формирующими транслокационный канал (Ryan et al., 1998; Truscott et al., 2001). Известно, что субъединица Tim23 ответственна за образование поры, а Tim17 – за стабилизацию и регуляцию этой поры (Verechshagina et al., 2018). В растениях арабидопсиса для каждого из этих компонентов характерно наличие трех изоформ (Murcha et al., 2007), однако степень участия их в импорте белка, по-видимому, различна, что указывает на их потенциальную роль в других клеточных процессах.

Известно, что в комплексе TIM17:23 преобладает субъединица Tim23-2, для которой характерен наиболее высокий уровень экспрессии во всех тканях (Murcha et al., 2003). Учитывая высокую степень гомологии изоформ Tim23, указывающую на их потенциально взаимозаменяемые свойства, нельзя исключать наличие у преобладающей изоформы Tim23-2 мультифункциональной роли в клеточных процессах, подобно тому, как это было установлено для главных компонентов комплекса ТОМ (Salinas-Giegé et al., 2015). Субъединица Tim23-2 примечательна еще и тем, что присутствует, помимо TIM17:23, в дыхательном комплексе I (Murcha et al., 2005; Wang et al., 2012). Субъединица Tim23-3, напротив, обладает низким уровнем экспрессии, при этом в наибольшей степени отличаясь по последовательности от двух других изоформ (Murcha et al., 2007), что может указывать на выполнение этим белком дополнительных функций.

Наиболее распространенной изоформой белка Tim17 арабидопсиса является Tim17-2, для которой характерен стабильно высокий уровень экспрессии на протяжении всего развития. Довольно высокой (75 %) степенью сходства с Tim17-2 обладает изоформа Tim17-1 (Wang et al., 2014). Следует отметить, что к настоящему моменту не существует однозначного ответа на вопрос о роли Tim17-1 в растениях (Wang et al., 2014). В отличие от Tim17-2, изоформе Tim17-1 свойственны изменения уровня экспрессии в зависимости от стадии развития, с наиболее выраженным повышением на этапе развития семян, но постепенным снижением по мере развития (Wang et al., 2014). Очевидно, что во взрослом растении импорт белков обеспечивают преобладающие изоформы, в то время как минорный Tim17-1 потенциально может специализироваться на выполнении функций, не связанных с биогенезом митохондрий.

В нашей работе показано, что белки Tim23-2 и Tim17-1 принимают участие в трансмембранном переносе ДНК в митохондриальный матрикс, при этом Tim23-2, по-видимому, отвечает за импорт исключительно фрагментов малой длины. Кроме того, как оказалось, изоформа порина VDAC1 непосредственно вовлечена в процесс импорта ДНК и, вероятно, является частью канала, формируемого при участии белка Tim23-2. Полученные данные открывают перспективы для дальнейших исследований роли

компонентов транслоказы внутренней мембраны белков в импорте нуклеиновых кислот в митохондрии.

Материалы и методы

Растительный материал и условия выращивания.

В работе использованы растения арабидопсиса дикого типа *A. thaliana* (L.) Heynh. экотип Columbia (Col-0) и линии инсерционных мутантов GABI_689C11 (*tim23-2*, ген At1g72750), SALK_129386 (*tim23-3*, ген At3g04800) и SALK_092885 (*tim17-1*, ген At1g20350), семена которых были предоставлены М. Murcha (ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, Perth, Australia). Семена подвергали стратификации в течение трех суток при 4 °С и затем выращивали при 22 °С в ростовой камере KBW720 (Binder, Германия) в горшках, наполненных смесью компост/вермикулит в соотношении 2:1 при плотности потока фотосинтетических фотонов 150 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ и 16-часовом фотопериоде.

Получение субстратов импорта ДНК. Для амплификации ДНК использовали Taq-полимеразу (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. В качестве ПЦР-матрицы взяли генетическую конструкцию рСК/GFP/PRmt (Koulintchenko et al., 2003), содержащую последовательность гена *GFP*.

Амплификацию фрагментов ДНК длиной 2732 п. н. (Forward: 5'-CCAACCACCACATACCGAAA-3'; Reverse: 5'-ACGCTCTGTAGGATTTGAACC-3') и 265 п. н. (Forward: 5'-ATGAGTAAAGGAGAAGAАСТТТТCACT-3'; Reverse: 5'-CGGGGCATGGCACTCTTGA-3') проводили с применением специфических пар праймеров, захватывающих последовательность гена *GFP*, при температуре отжига 60 °С. ДНК очищали на колонках GeneJETTMPCR 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. Грубый митохондриальный экстракт получали из трехнедельных растений *A. thaliana* согласно описанному ранее протоколу (Sweetlove et al., 2007) методом дифференциального центрифугирования. Очищенную митохондриальную фракцию получали путем разделения грубой фракции митохондрий в ступенчатом градиенте плотности перколла (50–28–20 %) в течение 40 мин при 40000 g. Суспензию митохондрий отбирали на границе слоев с 50 и 28 % концентрацией перколла.

Импорт субстратов ДНК в митохондрии арабидопсиса *in organello*. Импорт ДНК проводили как описано ранее (Tarasenko et al., 2019). К 200 мкл буфера импорта (0.4 М сахарозы, 40 мМ фосфата калия, pH 7.0), содержащего 500 нг ДНК, добавляли 200 мкг очищенных митохондрий, затем инкубировали при 25 °С в течение 30 мин. Обработку митохондрий ДНКазой I (1 ед/мкл) (Thermo Scientific) выполняли в 100 мкл буфера импорта в присутствии 10 мМ MgCl₂ в течение 20 мин при 25 °С. Затем пробы подвергали отмывке в среде промывания, содержащей дополнительно 10 мМ ЭДТА и 10 мМ ЭГТА, и осуществляли экстракцию мтДНК для дальнейшего анализа эффективности импорта ДНК. В качестве контроля

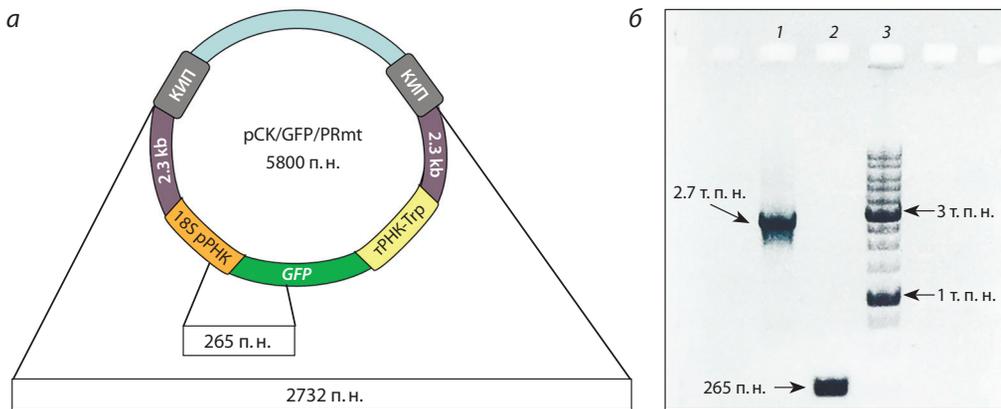


Рис. 1. ДНК-субстраты, использованные для импорта в митохондрии арабидопсиса.

a – схема генетической конструкции pCK/GFP/PRmt (Koulintchenko et al., 2003), которая служила матрицей для синтеза субстратов импорта ДНК. 2.3 kb – последовательность плазмиды 2.3 т. п. н. из митохондриального генома *Zea mays*; КИП – концевые инвертированные повторы плазмиды 11.6 т. п. н. из мт-генома *Brassica rapa*; *b* – электрофоретический анализ ДНК-субстратов импорта (200 нг каждого), полученных на основе pCK/GFP/PRmt. 1 – 2732 п. н.; 2 – 265 п. н., 3 – маркер молекулярного веса ДНК.

эффективности работы ДНКазы использовали пробу без добавления митохондрий. Уровень фонового сигнала, полученного с такой пробы, всегда был как минимум на два порядка ниже уровня сигнала с проб импорта.

Получение протопластов, трансфекция их ДНК и выделение митохондрий. Протопласты получали из листьев *A. thaliana* согласно описанному ранее протоколу (Wu et al., 2009) с модификациями (Tarasenko et al., 2019). В суспензию выделенных и очищенных протопластов вносили раствор ДНК-субстрата (5 мкг), после чего к пробам добавляли 300 мкл раствора, содержащего 20 % PEG-2000, 0.2 М маннитол, 100 мМ CaCl₂. Протопласты инкубировали в течение 5 мин, затем суспензию протопластов подвергали трем циклам центрифугирования в 1.5 мл среды промывания в течение 1 мин при 100 g и 20 °С. Дальнейшую инкубацию протопластов проводили в среде W5 (154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl₂, 5 мМ KCl, 5 мМ глюкозы, 2 мМ MES, pH 5.7) при 22 °С и слабом освещении в течение 20 ч. Суспензию протопластов центрифугировали в течение 1 мин при 100 g и 20 °С и выделяли митохондрии, как описано ранее (Tarasenko et al., 2019).

Анализ импорта ДНК. Количество импортированной в митохондрии ДНК определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Данные анализировали при помощи программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad). Были использованы пары праймеров, специфичные для последовательности гена *GFP* (Forward: 5'-GATGTGGA AAA CAAGACAGGGGTTT-3'; Reverse: 5'-TGGTGAACCG GCGTACTATT-3') и последовательности гена *NAD4* из митохондриального генома арабидопсиса (Forward: 5'-GCATTTTCAGTGGGTGGTCTGGT-3'; Reverse: 5'-AG GGATTGGCACGTTTCGG-3'). Соотношение содержания импортированной ДНК к мтДНК рассчитывали, основываясь на отношении абсолютных значений сигнала от импортированной ДНК и от гена *NAD4* с учетом разницы между размерами импортированных фрагментов (265 п. н. и 2.7 т. п. н.) и мт-генома (367 т. п. н.) с допущением,

что мт-геном представлен исключительно мастер-хромосомой.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили не менее чем в трех биологических повторностях. Построение диаграмм выполняли с помощью пакета программ Microsoft Excel. Степень достоверности различий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты

Известно, что импорт ДНК в митохондрии осуществляется посредством различных транспортных путей, эффективность которых зависит от размера импортируемых молекул (Weber-Lotfi et al., 2015; Tarasenko et al., 2021). Исходя из этого, для исследования роли отдельных белковых компонентов митохондриальной мембраны в импорте ДНК использовали фрагменты ДНК двух размерных классов – малой (265 п. н.) и средней (2732 п. н.) длин (рис. 1).

Полученные с помощью ПЦР (см. рис. 1, б) фрагменты ДНК размером 265 п. н. и 2.7 т. п. н. были импортированы в митохондрии, изолированные из растений арабидопсиса (*in organello*) дикого типа (Col-0) и нокаут-мутантов по белкам Tim23-2 (*tim23-2*), Tim23-3 (*tim23-3*) и Tim17-1 (*tim17-1*), представляющим собой изоформы ключевых белков комплекса TIM17:23. Для митохондрий мутанта *tim23-2* было показано значительное снижение уровня импорта фрагмента малой длины в сравнении с линией дикого типа (рис. 2, а), тогда как уровень импорта фрагмента среднего размера достоверно не отличался. В митохондриях мутанта *tim23-3* зависимости эффективности импорта ДНК этих двух размерных классов от отсутствия в мембране функционального Tim23-3 не обнаружено (см. рис. 2, б). Таким образом, очевидно, что изоформа белка Tim23-2 является частью аппарата импорта ДНК, выполняя при этом специфическую роль в переносе молекул ДНК преимущественно малой длины.

При исследовании импорта в митохондрии мутанта *tim17-1* наблюдалось снижение эффективности транспорта ДНК, приблизительно сходное для фрагментов как малой,

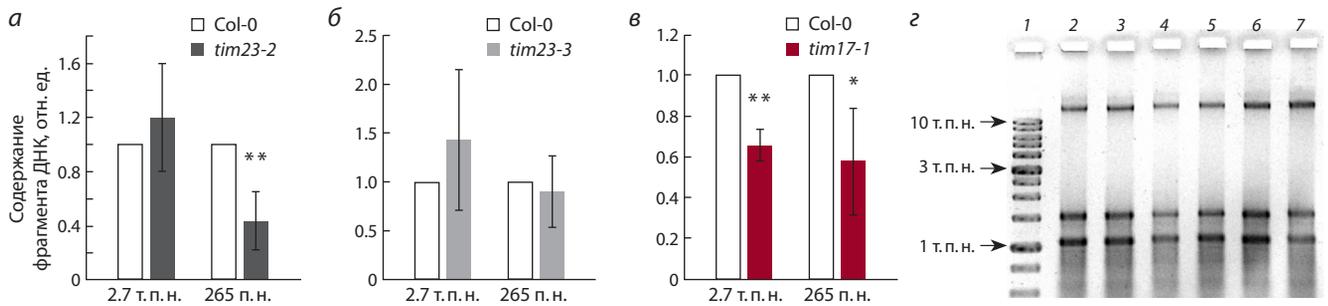


Рис. 2. Анализ импорта чужеродной ДНК в изолированные митохондрии арабидопсиса.

Фрагменты ДНК размером 265 п. н. и 2.7 т. п. н. были импортированы в митохондрии дикого типа и мутантных линий арабидопсиса: *tim23-2* (а), *tim23-3* (б) и *tim17-1* (в). Митохондриальная ДНК, экстрагированная из митохондрий после импорта (z), была использована для анализа при помощи ПЦР-РВ. Показано количество фрагмента гена *GFP* (импортированная ДНК), нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4* (мтДНК). Уровень импорта в Col-0 принят за относительную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартное отклонение. * и ** – статистически значимые различия при $p \leq 0.05$ и $p \leq 0.01$ соответственно. (z) – препарат нуклеиновых кислот митохондрий, использованный для анализа: 1 – маркер молекулярного веса ДНК, 2, 3 – мтДНК из *tim23-2*; 4, 5 – мтДНК из *tim23-3*; 6, 7 – мтДНК из *tim17-1*.

так и средней длины (см. рис. 2, в). Эти результаты позволяют предположить, что белок Tim17-1 также может быть важным участником аппарата транслокации ДНК в митохондрии.

С целью верификации данных по импорту фрагмента ДНК средней длины (2.7 т. п. н.) в митохондрии, изолированные из линий, мутантных по белкам Tim17 и Tim23 (см. рис. 2, а, в), мы провели эксперименты с использованием протопластов арабидопсиса, полученных из этих линий (*in vivo*) (рис. 3, а). Протопласты сохраняли свою структурную целостность на протяжении 20 ч (см. рис. 3, б). Обнаружено, что уровень импорта чужеродной ДНК из цитоплазмы протопластов в митохондрии нокаут-мутанта *tim17-1* действительно снижен, но в меньшей степени, чем это отмечено *in organello*. Из этих наблюдений следует, что недостаток митохондриального Tim17-1, по-видимому, частично компенсируется *in vivo* теми или иными клеточными факторами. В сравнении с *tim17-1* уровень импорта в митохондрии *tim23-2* не отличался от линии дикого типа аналогично тому, как это было показано в системе изолированных органелл (см. рис. 3, а). В совокупности результаты импорта ДНК, полученные *in organello* с использованием мутантных линий, лишенных транспортных белков Tim23-2 либо Tim17-1, отражают закономерности переноса ДНК *in vivo* в митохондрии протопластов этих линий.

Далее нами была поставлена задача – исследовать возможную взаимосвязь белка наружной мембраны митохондрий VDAC с Tim17-1 и Tim23-2 в импорте молекул ДНК малой длины. Использование антител к VDAC1 потенциально позволяет исключить изоформу этого белка из участия в формировании канала для переноса ДНК. Показано (Koulintchenko et al., 2003), что связывание антител, специфичных к определенному белку-переносчику внешней митохондриальной мембраны, должно ингибировать его транспортную активность. Мы применили этот методический подход для анализа эффективности импорта фрагментов ДНК размером 265 п. н. в изолированные митохондрии дикого типа и мутантных линий *tim17-1* или *tim23-2* (рис. 4).

На начальном этапе с целью исключения неспецифического ингибирования мы провели оценку влияния антител, специфично связывающих митохондриальный апоцитохром *b* (Cob). Этот белок внутренней мембраны представляет собой центральную каталитическую субъединицу убинол-цитохром *c* оксидоредуктазы (Islas-Osuna et al., 2006). Внешняя мембрана митохондрий непроницаема для антител, поэтому ингибирование транспортных процессов при использовании антител к Cob происходит не должно. Уровень импорта фрагмента 265 п. н. в митохондрии дикого типа после их обработки антителами к Cob не отличался от контрольной пробы (см. рис. 4, а). Исходя из этого, были проведены эксперименты, в которых фрагменты ДНК размером 265 п. н. импортировали в изолированные митохондрии мутантных линий *tim17-1* или *tim23-2*, предварительно

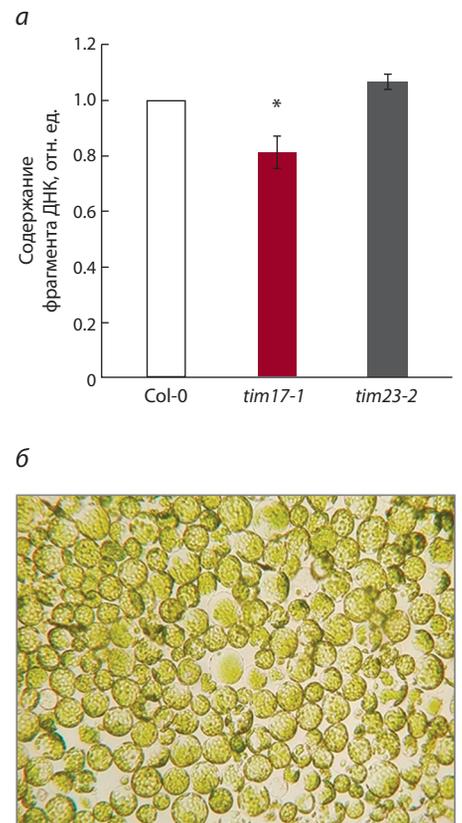


Рис. 3. Определение уровня импорта ДНК в митохондрии протопластов, полученных из листьев арабидопсиса, при помощи ПЦР-РВ.

а – фрагмент ДНК размером 2.7 т. п. н. импортирован в митохондрии протопластов дикого типа и мутантных линий арабидопсиса *tim17-1* и *tim23-2*. После трансфекции интактных протопластов проведено выделение митохондрий с последующей экстракцией мтДНК. Показано количество детектированного фрагмента гена *GFP*, нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. Уровень импорта в Col-0 принят за относительную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартное отклонение. * Статистически значимые различия при $p \leq 0.05$; б – световая микроскопия целостности протопластов после трансформации фрагментом ДНК и инкубации в течение 20 ч.

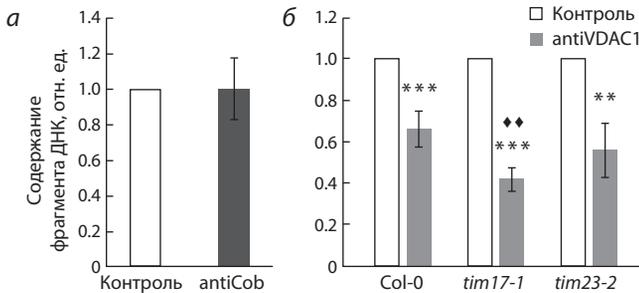


Рис. 4. Анализ эффективности импорта ДНК малой длины в изолированные митохондрии арабидопсиса в присутствии антител к мембранным белкам.

a – определение степени неспецифического ингибирования транспортных каналов, предположительно, вовлеченных в импорт ДНК, антителами к Cob; *b* – оценка эффективности импорта ДНК в митохондрии Col-0 и мутантных линий *tim17-1* и *tim23-2* в присутствии специфических антител к VDAC1 (antiVDAC1). Показано количество фрагмента гена *GFP*, нормированное к содержанию фрагмента гена *NAD4*. Уровень импорта фрагмента 265 п. н. в митохондрии арабидопсиса без предварительной обработки антителами (контроль) принят за относительную единицу. Допуски на диаграммах обозначают стандартные отклонения. ** (♦♦) и *** – статистически значимые различия при $p \leq 0.01$ и $p \leq 0.001$ соответственно; * – отличия от контроля; ♦ – отличия от уровня импорта в митохондрии Col-0, предварительно обработанные antiVDAC1 (*b*).

обработанные антителами к белку внешней мембраны VDAC1 (см. рис. 4, *b*).

Согласно полученным данным, уровень импорта ДНК малой длины в митохондрии дикого типа в присутствии антител к VDAC1 был достоверно снижен (см. рис. 4, *b*). Очевидно, что эта изоформа порина непосредственно вовлечена в транспорт ДНК данной длины в митохондрии арабидопсиса. Анализ импорта в митохондрии, в мембране которых отсутствует функциональный Tim23-2, показал, что в присутствии антител к VDAC1 эффективность этого процесса не отличалась от таковой в линии дикого типа в тех же условиях (см. рис. 4, *b*). Учитывая, что отсутствие Tim23-2 в мембране митохондрий приводит к снижению уровня импорта ДНК малой длины приблизительно в той же степени (см. рис. 2, *a*), что и при ингибировании VDAC1 в Col-0 или в нокаут-мутанте *tim23-2*, полученные результаты позволяют предположить, что VDAC1 образует с Tim23-2 один транспортный канал. Кроме того, степень снижения практически не меняется при одновременной инактивации этих двух белков-переносчиков, находящихся в разных митохондриальных мембранах (см. рис. 4, *b*). При этом в митохондриях линии *tim17-1*, обработанных антителами к VDAC1, мы отметили дополнительное снижение уровня импорта фрагмента 265 п. н. (см. рис. 4, *b*), что указывает на участие Tim17-1 в формировании канала импорта ДНК, не зависимо от VDAC1.

Из полученных данных следует, что VDAC1 является компаньоном Tim23-2, но не Tim17-1, в процессе транслокации фрагментов малой длины через двойную мембрану митохондрий. При этом белок Tim17-1, в отличие от Tim23-2, участвует в процессе импорта фрагментов как малой, так и средней длины, что служит дополнительным аргументом в пользу независимости Tim17-1 от канала, образуемого Tim23-2 и VDAC1.

С целью получения информации о фактической эффективности процесса импорта двух использованных фрагментов ДНК в митохондрии различных линий нами был произведен расчет содержания импортированной ДНК в митохондриях по отношению к содержанию митохондриальной ДНК (см. таблицу). В результате показано, что эффективность проникновения фрагмента малой длины чрезвычайно высока, составляя до 5 % от количества мтДНК. Импорт фрагмента 2.7 т. п. н. гораздо менее эффективен – количество проникшей в органеллы ДНК меньше количества импортированного фрагмента 265 п. н. примерно в 30 раз. Полученные результаты хорошо соотносятся с известными данными об эффективности импорта (Koulintchenko et al., 2003), а также являются дополнительным аргументом в пользу существования отдельных путей импорта для фрагментов малой и средней длины, отличающихся по интенсивности транспорта ДНК через мембрану.

Обсуждение

Роль субъединиц Tim23 и Tim17 в импорте белка в митохондрии хорошо изучена (Murtha et al., 2003, 2014; Lister et al., 2004), однако исследования потенциального вовлечения комплекса TIM17:23 или его отдельных субъединиц в процесс импорта ДНК в митохондрии до настоящего времени не проводили. Ранее показано, что разные изоформы белков Tim17 и Tim23 (Murtha et al., 2007) различаются своей способностью комплементировать нокаутные мутанты по ортологичным субъединицам у дрожжей, что предполагает некоторую функциональную специализацию разных изоформ (Murtha et al., 2003). Это исследование было сфокусировано на мажорной изоформе Tim23-2 и минорной Tim17-1, роль которой в митохондриях растений остается малоизученной. Для импорта фрагментов чужеродной ДНК разной длины мы использовали митохондрии, выделенные из линий арабидопсиса, мутантных по белкам Tim23-2 и Tim17-1.

В системе *in organello* нами показано, что оба белка принимают участие в импорте ДНК, при этом Tim23-2 более специфичен в отношении размера переносимой молекулы (см. рис. 2, *a*). Эти данные были подтверждены в системе импорта ДНК в митохондрии протопластов, полученных из линий арабидопсиса, мутантных по данным белкам

Содержание импортированных фрагментов ДНК в митохондриях относительно содержания мтДНК

Линия арабидопсиса	265 п. н., % от содержания мтДНК		2.7 т. п. н., % от содержания мтДНК
	-antiVDAC1	+antiVDAC1	
Col-0	5.76 ± 1.68	3.53 ± 0.75	0.176 ± 0.011
<i>tim17-1</i>	2.84 ± 0.56	1.44 ± 0.47	0.119 ± 0.044
<i>tim23-2</i>	2.31 ± 1.02	1.47 ± 0.64	0.173 ± 0.021

(Wu et al., 2009). Ранее нами разработан эффективный способ изучения импорта фрагментов ДНК в митохондрии после трансформации этими молекулами протопластов арабидопсиса, т. е. в условиях сохранения нативного клеточного окружения митохондрий (Tarasenko et al., 2019). В этой работе установлен ряд закономерностей, главная из которых – соответствие результатов, полученных на протопластах, данным исследований механизма импорта ДНК в митохондрии, изолированные из растений арабидопсиса.

Полученные с использованием протопластов результаты позволяют сделать вывод о том, что наблюдаемое снижение импорта ДНК в митохондрии, в мембране которых отсутствует Tim17-1, происходит *in vivo*. Таким же образом с использованием протопластов подтверждено, что Tim23-2 не играет роли в импорте ДНК средней длины. Этот белок, тем не менее, по данным экспериментов *in organello*, проявляет активность, специфичную в отношении переноса фрагментов ДНК малой длины. Это свойство Tim23-2 – еще один аргумент в пользу существования нескольких путей переноса ДНК через внутреннюю мембрану специфичных в определенной степени в отношении размера импортируемых молекул.

Другой исследованный в работе белок, представляющий минорную изоформу Tim17-1, напротив, оказался способен к импорту фрагментов ДНК как малой, так и средней длины. Для изоформы Tim17-1 характерен высокий уровень экспрессии во время прорастания семян, поэтому предполагается, что Tim17-1 может принимать участие в митохондриальном биогенезе на этой стадии развития (Wang et al., 2014). Неочевидна роль этой изоформы в импорте белка во взрослом растении арабидопсиса ввиду ее низкого уровня экспрессии, особенно на фоне постепенного повышения экспрессии двух других изоформ по мере роста и развития растения. Постепенное снижение уровня экспрессии субъединицы Tim17-1 после прорастания (Wang et al., 2014) может указывать на потенциальную специализацию этой изоформы в альтернативных и менее важных для биогенеза митохондрий процессах.

Помимо использования нокаут-мутантов, другой подход для изучения роли белков митохондриальной мембраны в транспортных процессах митохондрий – применение специфических антител к белкам митохондриальной мембраны (Koulintchenko et al., 2003; Murcha et al., 2005). Исследования роли VDAC в импорте ДНК в изолированные митохондрии картофеля и крысы ранее проводили с использованием антител, распознающих консервативный домен белков VDAC (Koulintchenko et al., 2003, 2006). Однако ни для одной из групп организмов до настоящего времени нет данных о роли в этом процессе конкретной изоформы митохондриального порина. Ранее нами была предпринята попытка изучения участия в импорте ДНК той или иной изоформы VDAC с помощью инсерционных мутантов по этим белкам, однако снижение уровня импорта не выявлено ни в одной из этих линий, очевидно, вследствие компенсации отсутствия белка другими изоформами/транспортными механизмами на протяжении развития растения (Tarasenko et al., 2021).

Известно, что четыре функциональные изоформы VDAC арабидопсиса, несмотря на высокую степень гомологии

(от 68 до 50 %), очевидно, обладают функциональной специализацией (Tateda et al., 2011; Nemono et al., 2020). При оценке уровня белка в митохондриях арабидопсиса обнаружено, что наиболее распространенная изоформа митохондриального порина – это VDAC1, у которой насчитывается примерно 44400 копий на митохондрию (Fuchs et al., 2020). В нашей работе мы использовали изоформно-специфичные антитела к VDAC1 арабидопсиса (AT3G01280), взаимодействующие с N-концом этого белка. Обнаружено, что ингибирование активности VDAC1 антителами приводит к снижению интенсивности импорта ДНК. Данный факт свидетельствует о том, что использование специфических антител для подавления работы порина оказалось более продуктивным подходом к изучению роли изоформ VDAC в импорте, чем применение нокаут-мутантов. Таким образом, нами впервые показано вовлечение конкретной изоформы порина, VDAC1, в перенос ДНК в митохондрии (рис. 5, а, б). В то время как в механизме импорта тРНК в митохондрии арабидопсиса предполагается специфическая функция изоформы VDAC4 (Nemono et al., 2020), в данной работе продемонстрировано участие изоформы VDAC1 в импорте ДНК. Исходя из этого, не исключена функциональная специализация различных изоформ VDAC в отношении типа нуклеиновых кислот (ДНК/РНК) и их размера.

Нами исследована также возможность взаимодействия VDAC1 с Tim17-1 или Tim23-2 в процессе транслокации ДНК. Ввиду того, что в импорт фрагмента малой длины 265 п.н. вовлечены, как оказалось, как Tim17-1, так и Tim23-2, мы использовали ДНК-субстрат именно этого размерного класса. В результате впервые установлено, что изоформа митохондриального порина 1, по-видимому, образует с Tim23-2 один транспортный канал: мы наблюдали равное снижение уровня импорта ДНК малой длины при ингибировании одного из этих компонентов и отсутствие дополнительного снижения при одновременной инактивации двух белков, локализующихся в разных мембранах (см. рис. 5, в, г).

Дополнительное снижение импорта ДНК, отмеченное в митохондриях мутантной линии *tim17-1* при ингибировании VDAC1 антителами, позволяет сделать вывод о том, что белки Tim17-1 и VDAC1, по-видимому, принадлежат к двум независимым транспортным каналам (см. рис. 5, д, е). Мы предполагаем, что белком-компаньоном внешней мембраны для Tim17-1 может быть одна из других изоформ порина (см. рис. 5, а, д). Отсутствие полного ингибирования импорта ДНК в митохондрии арабидопсиса в любом из исследованных случаев инактивации мембранных белков согласуется с гипотезой о наличии у этих органелл множественных путей, обеспечивающих механизм этого процесса (Weber-Lotfi et al., 2015; Tarasenko et al., 2021).

В какой степени участвуют в импорте ДНК другие изоформы VDAC и компоненты транслоказы белков внутренней мембраны Tim17:23 митохондрий арабидопсиса, существует ли для них специфичность в отношении размера переносимой молекулы, а также какие взаимоотношения между изоформами VDAC и белками Tim17-2, Tim17-3, Tim23-1, Tim23-3 – предстоит установить в дальнейших исследованиях.

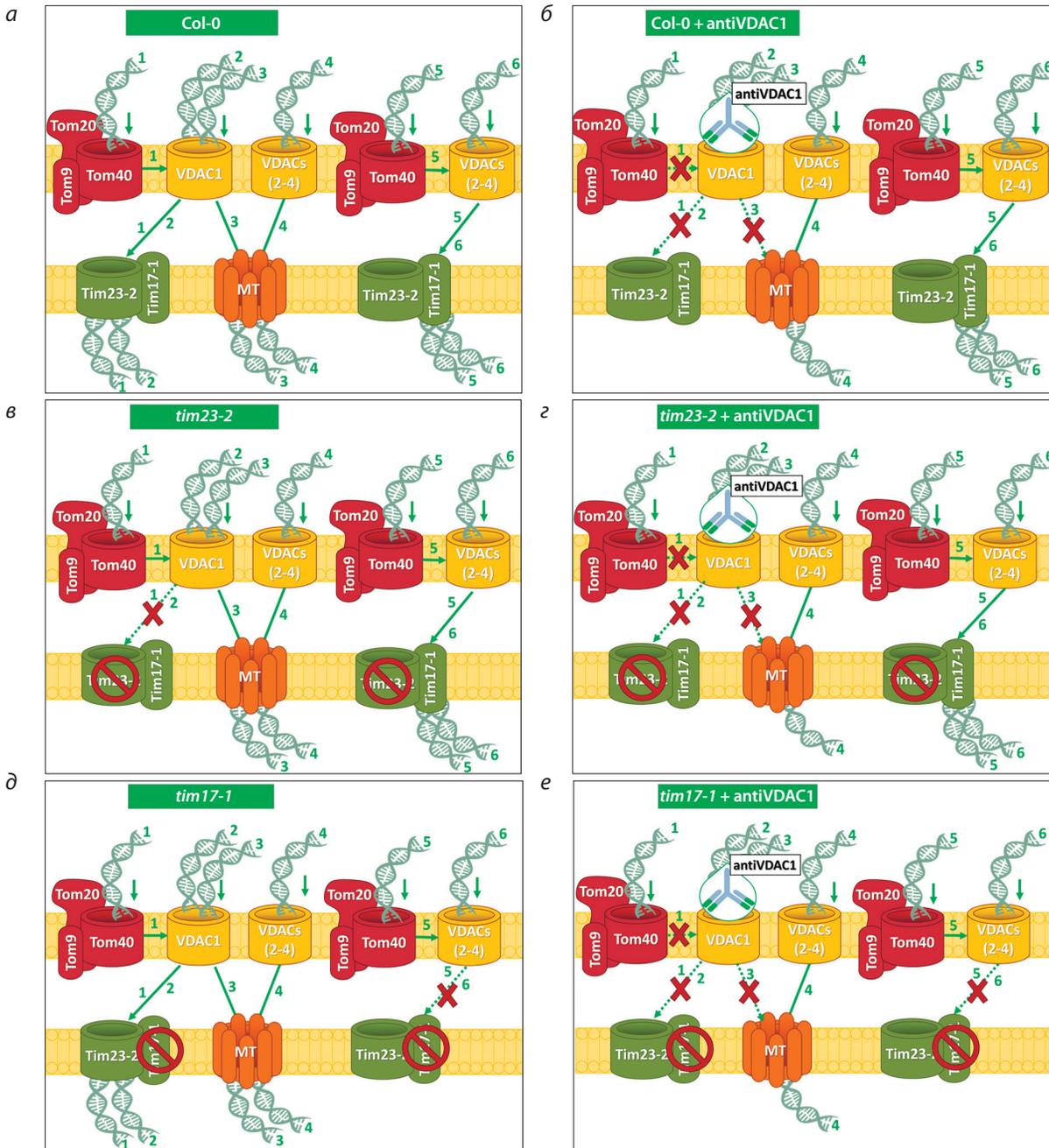


Рис. 5. Гипотетическая схема влияния инактивации белков митохондриальной мембраны на уровень импорта ДНК в митохондрии.

Инактивацию транспортного процесса обеспечивали (а, в, д) применением нокаут-мутантов арабидопсиса, в мембране митохондрий которых отсутствует функциональный белок Tim17-1 или Tim23-2, и/или (б, з, е) ингибированием белка VDAC1 внешней митохондриальной мембраны специфическими антителами. В случае одновременного исключения из транспортного процесса VDAC1 и Tim23-2 (з) происходило снижение уровня импорта, сопоставимое по интенсивности наблюдаемому в условиях инактивации только одного транспортера (б или в). При одновременном исключении из транспортного процесса VDAC1 и Tim17-1 (е) наблюдались дополнительное снижение эффективности в сравнении с инактивацией одного белка (б или д), указывающее на принадлежность этих белков к двум разным каналам. 1–6 – пути переноса молекул ДНК в матрикс; стрелки – направление переноса ДНК; прерывистые стрелки, перечеркнутые красным крестом, – блокирование транспортного пути; перечеркнутый круг – отсутствие в мембране митохондрий функционального белка в результате инсерционного мутагенеза. МТ – комплекс, формируемый с участием митохондриальных транспортеров.

Заключение

Исследование роли в механизме импорта ДНК отдельных белков комплекса TIM17:23 внутренней митохондриальной мембраны позволило установить их участие в этом процессе, а также определить потенциал их совместного функционирования с VDAC1. Учитывая, что специфич-

ность импорта ДНК в отношении размера переносимой молекулы, вероятно, определяется на уровне внутренней мембраны, полученные нами данные углубили понимание механизма импорта и расширили возможности для разработки системы трансформации митохондриального генома.

Список литературы / References

- Fuchs P., Rugen N., Carrie C., Elsasser M., Finkemeier I., Giese J., Hildebrandt T.M., Kuhn K., Maurino V.G., Ruberti C., Schallenberg-Rüdinger M., Steinbeck J., Braun H.P., Eubel H., Meyer E.H., Müller-Schüssele S.J., Schwarzländer M. Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics. *Plant J.* 2020;101(2):420-441. DOI 10.1111/tpj.14534
- Hemona M., Ubrig É., Azeredo K., Salinas-Giegé T., Drouard L., Duchêne A.-M. *Arabidopsis* voltage-dependent anion channels (VDACs): overlapping and specific functions in mitochondria. *Cells.* 2020;9(4):1023. DOI 10.3390/cells9041023
- Islas-Osuna M.A., Silva-Moreno B., Caceres-Carrizosa N., García-Robles J.M., Sotelo-Mundo R.R., Yepiz-Plascencia G.M. Editing of the grapevine mitochondrial cytochrome *b* mRNA and molecular modeling of the protein. *Biochimie.* 2006;88(5):431-435. DOI 10.1016/j.biochi.2005.10.003
- Konstantinov Y.M., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Bolotova T.A., Koulintchenko M.V. DNA import into mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)*. 2016;81(10):1044-1056. DOI 10.1134/S0006297916100035
- Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J.* 2003;22(6):1245-1254. DOI 10.1093/emboj/cdg128
- Koulintchenko M., Temperley R.J., Mason P.A., Dietrich A., Lightowers R.N. Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15(1):143-154. DOI 10.1093/hmg/ddi435
- Larosa V., Rémacle C. Transformation of the mitochondrial genome. *Int. J. Dev. Biol.* 2013;57(6-8):659-665. DOI 10.1387/ijdb.130230cr
- Lister R., Chew O., Lee M.N., Heazlewood J.L., Clifton R., Parker K.L., Millar A.H., Whelan J. A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction. *Plant Physiol.* 2004;134(2):777-789. DOI 10.1104/pp.103.033910
- Martin W.F., Garg S., Zimorski V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2015;370(1678):20140330. DOI 10.1098/rstb.2014.0330
- Morley S.A., Nielsen B.L. Plant mitochondrial DNA. *Front. Biosci.* 2017;22(6):1023-1032. DOI 10.2741/4531
- Murcha M.W., Lister R., Ho A.Y., Whelan J. Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2003;131(4):1737-1747. DOI 10.1104/pp.102.016808
- Murcha M.W., Elhafez D., Millar A.H., Whelan J. The C-terminal region of TIM17 links the outer and inner mitochondrial membranes in Arabidopsis and is essential for protein import. *J. Biol. Chem.* 2005;280(16):16476-16483. DOI 10.1074/jbc.M413299200
- Murcha M.W., Elhafez D., Lister R., Tonti-Filippini J., Baumgartner M., Philippart K., Carrie C., Mokranjac D., Soll J., Whelan J. Characterization of the *preprotein and amino acid transporter* gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2007;143(1):199-212. DOI 10.1104/pp.106.090688
- Murcha M.W., Wang Y., Narsai R., Whelan J. The plant mitochondrial protein import apparatus: the differences make it interesting. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1840(4):1233-1245. DOI 10.1016/j.bbagen.2013.09.026
- Ryan K.R., Leung R.S., Jensen R.E. Characterization of the mitochondrial inner membrane translocase complex: the Tim23p hydrophobic domain interacts with Tim17p but not with other Tim23p molecules. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18(1):178-187. DOI 10.1128/MCB.18.1.178
- Salinas T., Duchêne A.M., Delage L., Nilsson S., Glaser E., Zaepfel M., Maréchal-Drouard L. The voltage-dependent anion channel a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103:18362-18367. DOI 10.1073/pnas.0606449103
- Salinas T., El Farouk-Ameqrane S., Ubrig E., Sauter C., Duchêne A.M., Marechal-Drouard L. Molecular basis for the differential interaction of plant mitochondrial VDAC proteins with tRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(15):9937-9948. DOI 10.1093/nar/gku728
- Salinas-Giegé T., Giegé R., Giegé P. tRNA biology in mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(3):4518-4559. DOI 10.3390/ijms16034518
- Sweetlove L.J., Taylor N.L., Leaver C.J. Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*. In: Leister D., Herrmann J.M. (Eds.). *Mitochondria. Methods in Molecular Biology™*. Vol. 372. Humana Press, 2007;125-136. DOI 10.1007/978-1-59745-365-3_9
- Tarasenko T.A., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Klimenko E.S., Konstantinov Y.M. DNA import into plant mitochondria: complex approach for *in organello* and *in vivo* studies. *Biochemistry (Mosc.)*. 2019;84(7):817-828. DOI 10.1134/S0006297919070113
- Tarasenko T.A., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Konstantinov Y.M. Plant mitochondria import DNA via alternative membrane complexes involving various VDAC isoforms. *Mitochondrion.* 2021;60:43-58. DOI 10.1016/j.mito.2021.07.006
- Tateda C., Watanabe K., Kusano T., Takahashi Y. Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 2011;62(14):4773-4785. DOI 10.1093/jxb/err113
- Truscott K.N., Kovermann P., Geissler A., Merlin A., Meijer M., Driesen A.J., Rassow J., Pfanner N., Wagner R. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat. Struct. Biol.* 2001;8(12):1074-1082. DOI 10.1038/nsb726
- Verechshagina N.A., Konstantinov Y.M., Kamenski P.A., Mazunin I.O. Import of proteins and nucleic acids into mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018;83(6):643-661. DOI 10.1134/S0006297918060032
- Wang Y., Carrie C., Giraud E., Elhafez D., Narsai R., Duncan O., Whelan J., Murcha M.W. Dual location of the mitochondrial preprotein transporters B14.7 and Tim23-2 in complex I and the TIM17:23 complex in Arabidopsis links mitochondrial activity and biogenesis. *Plant Cell.* 2012;24(6):2675-2695. DOI 10.1105/tpc.112.098731
- Wang Y., Law S.R., Ivanova A., van Aken O., Kubiszewski-Jakubiak S., Uggalla V., van der Merwe M., Duncan O., Narsai R., Whelan J., Murcha M.W. The mitochondrial protein import component, TRANSLOCASE OF THE INNER MEMBRANE17-1, plays a role in defining the timing of germination in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2014;166(3):1420-1435. DOI 10.1104/pp.114.245928
- Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Boesch P., Cosset A., Konstantinov Y., Lightowers R.N., Dietrich A. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1787(5):320-327. DOI 10.1016/j.bbabi.2008.11.001
- Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Hammann P., Mileshina D.V., Konstantinov Y.M., Dietrich A. Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015;1853(12):3165-3181. DOI 10.1016/j.bbamer.2015.09.011
- Wu F.-H., Shen S.-C., Lee L.-Y., Chan M.-T., Lin C.-S. Tape-Arabidopsis sandwich – a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods.* 2009;5:16. DOI 10.1186/1746-4811-5-16

ORCID

T.A. Tarasenko orcid.org/0000-0002-2830-4175
V.I. Tarasenko orcid.org/0000-0001-8208-6941

M.V. Koulintchenko orcid.org/0000-0003-0931-2863
Yu.M. Konstantinov orcid.org/0000-0002-0601-2788

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00114 (<https://rscf.ru/project/22-74-00114/>). В работе использовано оборудование ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.07.2023. После доработки 14.09.2023. Принята к публикации 02.10.2023.