

variability. Karyotyped derivative of these race were observed in polymorphic populations, such populations were defined as new races. **Conclusions.** Climatic changes in postglacial period caused the migration of the metacentric races thus leading to the spread of metacentrics across the area of the acrocentric race.  
*Key words:* *Sorex araneus*, chromosomal polymorphism.

УДК 576.315

КУЛИНЧЕНКО М.В.<sup>1</sup>, КЛИМЕНКО Е.С.<sup>1</sup>, ВЕБЕР-ЛОТФИ Ф.<sup>2</sup>, ДИЕТРИШ А.<sup>2</sup>,  
КОНСТАНТИНОВ Ю.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН НАН,  
Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии растений НЦНИ,  
Франция, F-67084, ул. г. Страсбург, ул. Генерала Циммера, 12, e-mail: andre.dietrich@ibmp-cnrs.unistra.fr

### ДНК КАК МОДУЛЯТОР ПРОТОННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ НА ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЕ МИТОХОНДРИЙ *SOLANUM TUBEROSUM*, ДЕЙСТВУЮЩИЙ НА УРОВНЕ ПЕРЕНОСЧИКА АДЕНИННУКЛЕОТИДОВ

Ранее нами установлено, что растительные митохондрии обладают природной способностью к поглощению чужеродной ДНК [1–3]. При этом в механизм трансмембранного переноса ДНК у растений и дрожжей вовлечены, по всей вероятности, такие компоненты поры митохондриальной мегапроницаемости как порин в составе наружной мембраны митохондрий и переносчик АДФ и АТФ (адениннуклеотидтранслоказа) в составе внутренней мембраны этих органелл [3, 4]. Как показано ранее с использованием митохондрий печени крыс, АДФ и пальмитиновая кислота способны изменять ионную проводимость митохондриальных мембран [5, 6]. Обнаружено также, что АДФ в достаточно низких концентрациях (10 мкМ) ингибирует импорт ДНК в растительные митохондрии [3]. В настоящее время остается, однако, неизученным вопрос, оказывает ли такая макромолекула как ДНК какое-либо влияние на ионную проницаемость мембран митохондрий растений. Нельзя исключить, что при определенных обстоятельствах в организме (бактериальные и вирусные инфекции и другие ситуации, при которых значительно повышается содержание ДНК в цитоплазме) не учитываемый ранее эффект ДНК как полианиона на мембранную проницаемость мембран митохондрий может иметь важные физиологические последствия как для функционирования органелл, так и судьбы клетки в целом. Целью настоящей работы было проведение с использованием системы *in organello* сравнительного исследования влияния ДНК, адениннуклеотидов (АДФ, АТФ),

пальмитиновой кислоты и пальмитоил-КоА, а также таких высокоспецифических ингибиторов адениннуклеотидтранслоказы как атрактилозид и карбоксиатрактилозид на проницаемость внутренней мембраны митохондрий картофеля для ионов водорода.

#### Материалы и методы

В экспериментах использовали изолированные митохондрии клубней картофеля (*Solanum tuberosum*), выделенные по методу [7]. В качестве ДНК использовали полинуклеотидную последовательность длиной 200 пн, получаемую с помощью ПЦР со специфическими праймерами к митохондриальной ДНК картофеля, используемой в качестве матрицы. Проницаемость митохондриальных мембран к ионам водорода оценивали путем регистрации набухания митохондрий в среде, содержащей 100 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 20 мМ трис-НСl (рН 7,4). Регистрацию набухания митохондрий производили путем измерения поглощения на волне 540 нм с помощью спектрофотометра LKB Ultrospec II UV-Visible. Все эксперименты по изучению влияния ДНК и других агентов на набухание митохондрий проведены в 7–9-кратной повторности.

#### Результаты и обсуждение

Путем регистрации набухания органелл в среде, содержащей 100 мМ NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), обнаружено, что ДНК в концентрации 1 мМ (рис. 1), подобно таким высокоспецифическим лигандам как карбоксиатрактилозид и атрактилозид (данные не приводятся), стимулирует набухание митохондрий, по-видимому, путем связывания с

адениннуклеотидтранслоказы. При этом эффект ДНК на набухание митохондрий не проявляет чувствительности к циклоспоруину А (данные не приводятся). АДФ в отличие от карбоксиатрактилозида и atraктилозида зависимым от используемой концентрации образом вызывал торможение набухания митохондрий (рис. 2). Установлено, что аденозиндифосфат (но не аденозинтрифосфат) эффективно устраняет стимулирующий эффект ДНК на набухание митохондрий (рис. 2), по-видимому, за счет более высокого сродства к сайтам связывания переносчика адениннуклеотидов. В то же время, как это видно из данных рис. 2, карбоксиатрактилозид и atraктилозид не устраняли, а напротив, усиливали эффект ДНК на скорость набухания митохондрий.

Обнаруженные отличия в действии ингибиторов адениннуклеотидтранслоказы и АДФ на набухание митохондрий можно объяснить, по-видимому, топологическими отличиями в их связывании с переносчиком адениннуклеотидов: известно, что карбоксиатрактилозид и atraктилозид связываются с переносчиком в его *c*-конформации, что приводит к увеличению протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий [5]. В то же время АДФ связывается с переносчиком

в его *m*-конформации [5], что приводит к снижению протонной проводимости мембраны, как это можно видеть в наших экспериментах по снижению скорости набухания митохондрий в присутствии аденозиндифосфата. Сравнение обнаруженного нами эффекта ДНК на набухание митохондрий с таковым atraктилозида, карбоксиатрактилозида и АДФ позволяет с высокой долей вероятности заключить, что стимулирующий эффект ДНК на набухание реализуется, по-видимому, через связывание нуклеиновой кислоты с адениннуклеотидтранслоказой. При этом ДНК взаимодействует с сайтами связывания адениннуклеотидтранслоказы в случае ее *c*-конформации, т.е. подобно действию таких классических ингибиторов этого переносчика как atraктилозид и карбоксиатрактилозид.

Для выяснения возможного механизма действия ДНК на протонную проводимость внутренней митохондриальной мембраны мы изучили действие низких концентрации пальмитиновой кислоты на набухание митохондрий картофеля в тех же условиях. Как видно из представленных на рис. 3 данных, пальмитиновая кислота вызывает значительную индукцию набухания митохондрий, которая может быть устранена путем добавления увеличивающихся концентраций АДФ.

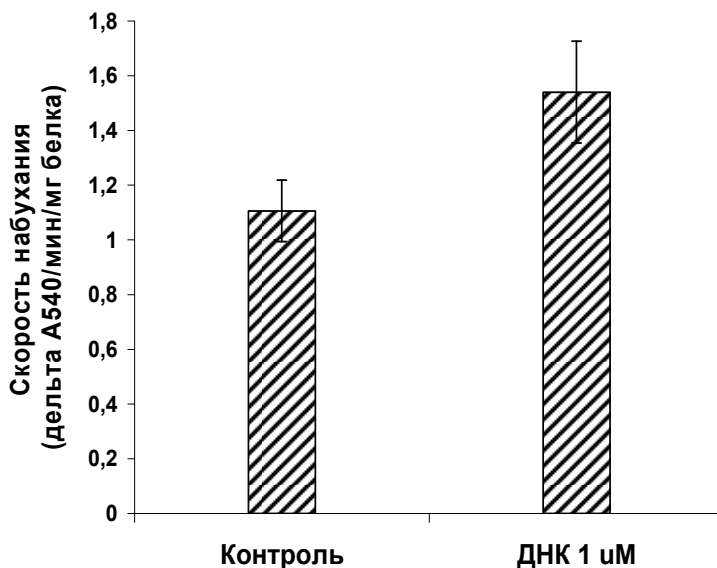


Рис. 1. Эффект ДНК на набухание митохондрий картофеля (*Solanum tuberosum*)

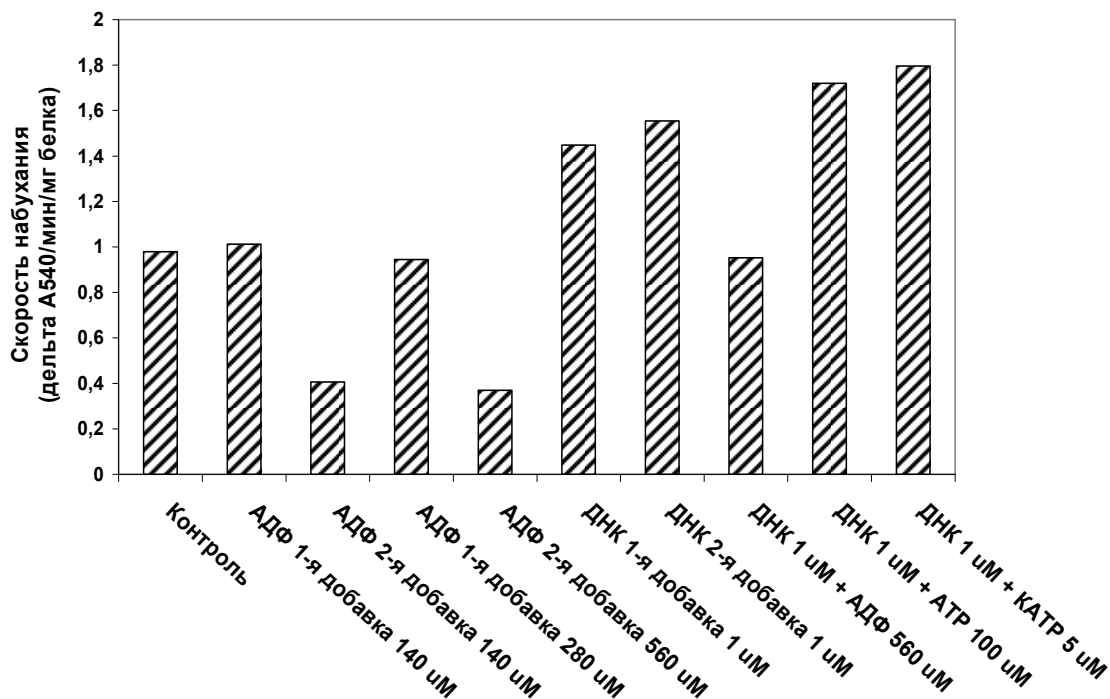


Рис. 2. Эффекты АДФ, аттрактилозида, карбоксиаттрактилозида и ДНК на набухание митохондрий картофеля (*Solanum tuberosum*). АТР – аттрактилозид, КАТР – карбоксиаттрактилозид

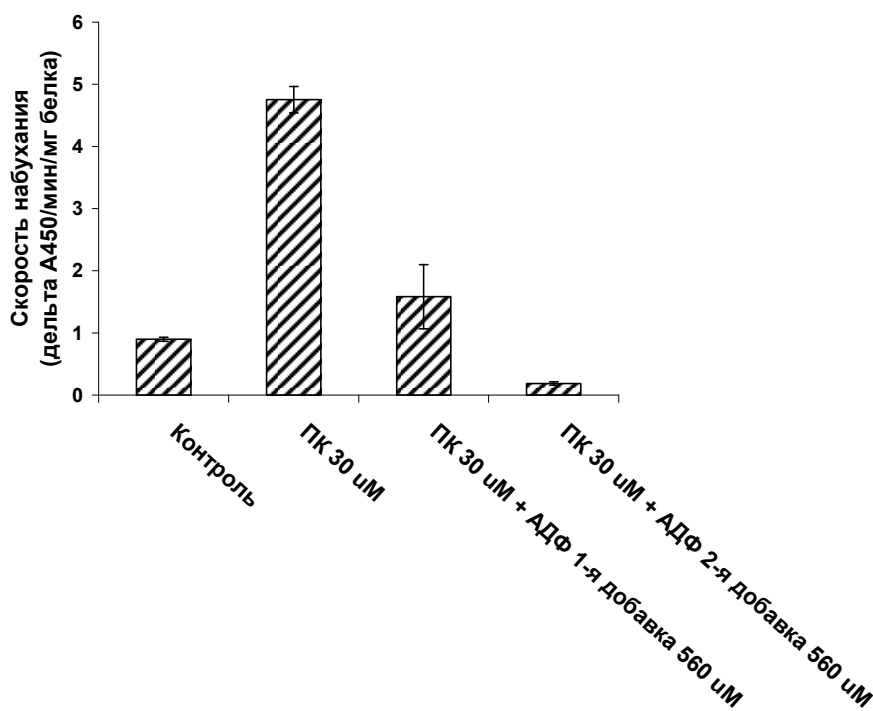


Рис. 3. Тормозящий эффект АДФ на индукцию набухания митохондрий под влиянием пальмитиновой кислоты. ПК – пальмитиновая кислота

Ранее с использованием митохондрий печени крыс [6] установлена способность пальмитиновой кислоты в тех же концентрациях

индуцировать открытие в митохондриях «неклассической» (нечувствительной к циклоспорино А) поры мегапроницаемости.

Установлено также, что низкие концентрации пальмитиновой кислоты (15  $\mu\text{M}$ ) способны повышать протонную проводимость внутренней мембраны митохондрий гороха путем взаимодействия с адениннуклеотидтранслоказой [8]. Мы предполагаем, что в наших экспериментах по набуханию митохондрий картофеля под влиянием использованных нами соединений также происходило открытие митохондриальной поры мегапроницаемости (permeability transition pore, mPTP). Из всех исследованных нами модуляторов набухательной способности митохондрий наибольшее влияние на проницаемость митохондрий к ионам водорода оказывала пальмитиновая кислота. ДНК в концентрации 1 мМ оказывала сходный, но менее выраженный эффект на набухание митохондрий. Отметим, что стимулирующий эффект на набухание как ДНК, так и пальмитиновой кислоты мог быть обращен добавлением АДФ. Данный факт дает основание предполагать, что ДНК оказывает свой эффект на набухание, по всей вероятности, путем связывания с адениннуклеотидтранслоказой, являющейся, как известно, одним из важных компонентов митохондриальной поры мегапроницаемости. В целом, полученные данные свидетельствуют в пользу важности исследований, направленных на выявление метаболических (несвязанных с информационной функцией этой макромолекулы) эффектов немитохондриальной ДНК на функции митохондрий в условиях *in vivo*.

## Выводы

ДНК (длиной 200 п.н.) в концентрации 1 мМ, подобно таким высокоспецифическим лигандам как карбоксиаатрактилозид и атрактилозид, стимулирует набухание изолированных митохондрий клубней картофеля (*Solanum tuberosum*), по всей вероятности, путем связывания с переносчиком АДФ и АТФ внутренней митохондриальной мембраны, что и приводит к увеличению ее проницаемости к ионам водорода. АДФ в физиологических концентрациях (560 мМ) способен обращать эффект ДНК на протонную проводимость митохондрий. На основе результатов сравнительного изучения влияния ДНК, длинноцепочечных жирных кислот, ацил-КоА и АДФ на набухание митохондрий предложена гипотеза о способности немитохондриальной ДНК выступать в качестве одного из факторов метаболической модуляции проницаемости мембран митохондрий подобно длинноцепочечным жирным кислотам и при определенных физиологических состояниях клетки увеличивать проницаемость внутренней митохондриальной мембраны путем изменения свойств митохондриальной поры мегапроницаемости (permeability transition pore). Мы полагаем, что в определенных критических ситуациях в клетке такой эффект ДНК на митохондрии может быть одним из факторов, запускающих апоптоз.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (12-04-01400) и Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН (проект № 59).*

## Литература

1. Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н. Синтез ДНК бактериальной векторной плазмиды pBR322 в изолированных митохондриях кукурузы // Докл. АН СССР. – 1988. – 298. – С. 502–504.
2. Константинов Ю.М., Подсосонный В.А., Луценко Г.Н., Ривкин М.И. Транслокация бактериальных векторных плазмид в митохондрии проростков кукурузы // Биохимия. – 1989. – 54. – С. 154–158.
3. Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – 22. – P. 1245–1254.
4. Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Boesch P., Cosste A., Konstantinov Y., Lightowers R., Dietrich A. Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – 1787. – P. 320–327.
5. Panov A., Filippova S., Lyakhovich V. Adenine nucleotide translocase as a site of regulation by ADP of the rat liver mitochondria permeability to  $\text{H}^+$  and  $\text{K}^+$  ions // Arch. Biochem. Biophys. – 1980. – 199. – P. 420–426.
6. Sultan A., Sokolove P.M. Palmitic acid opens a novel cyclosporine A-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – 386. – P. 37–51.
7. Neuburger M., Journet EP, Bligny R, Carde JP, Douce R. Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll // Arch Biochem Biophys. – 1982. – 217. – P. 312–323.
8. Vianello A., Petrusa E., Macri F. ATP/ADP antiporter is involved in uncoupling of plant mitochondria induced by low concentrations of palmitate // FEBS Lett. – 1994. – 349. – P. 407–410.

**KOULINTCHENKO M.V.**<sup>1</sup>, **KLIMENKO E.S.**<sup>1</sup>, **IBRAHIM N.**<sup>2</sup>, **WEBER-LOTFI F.**<sup>2</sup>,  
**DIETRICH A.**<sup>2</sup>, **KONSTANTINOYU.M.**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,  
Russian Federation, 664033, Irkutsk, Lermontov str., 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

<sup>2</sup> Institut de Biologie Moleculaire des Plantes CNRS,  
France, F-67084, Strasbourg, 12 rue du general Zimmer, e-mail: andre.dietrich@ibmp-cnrs.unistra.fr

## **DNA AS MODULATOR OF H<sup>+</sup>-IONS PERMEABILITY OF INNER MEMBRANE OF MITOCHONDRIA IN *SOLANUM TUBEROSUM* ACTING ON THE LEVEL OF ADENINE NUCLEOTIDE TRANSLOCATOR**

**Aims.** To study the potential metabolic consequences of DNA import into mitochondria we investigated the effect of 200 bp length DNA on the permeability of inner membrane of tuber mitochondria in *Solanum tuberosum* in comparison with such an effect of adenine nucleotides (ADP, ATP), palmitic acid, palmitoyl-CoA and highly specific inhibitors of adenine nucleotide translocator as atractyloside and carboxyatractyloside. **Methods.** Freshly-isolated highly purified mitochondria from potato tuber (*Solanum tuberosum*) were used in all experiments. To evaluate the permeability of the inner mitochondrial membrane to H<sup>+</sup>-ions the swelling of mitochondria in the medium containing 100 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 20 mM tris-HCl (pH 7.4) was measured using LKB Ultrospec II UV-Visible spectrophotometer. **Results.** We showed that DNA in concentration 1 mM is able to induce swelling of potato tuber mitochondria like such highly specific ligands of adenine nucleotide translocator as carboxyatractyloside and atractyloside. Therefore the increase in permeability of inner mitochondrial membrane to H<sup>+</sup>-ions is presumably explained by binding of DNA to active sites of ADP/ATP carrier. The stimulation of mitochondrial swelling by addition of DNA was removed by the addition of ADP in physiological concentrations. As for carboxyatractyloside and atractyloside, both these ligands increase DNA effect on mitochondrial swelling. **Conclusions.** We conclude that DNA is able to bind to specific binding sites of adenine nucleotide translocator in plant mitochondria and through conformational changes of this key membrane carrier to induce the increase of inner mitochondrial membrane permeability to H<sup>+</sup>-ions. We hypothesize that in some critical states of plant cell (bacterial and viral infections leading to increase of DNA concentration in cytoplasm) the DNA effect on ion membrane permeability observed in this study may serve as one from a set of signals inducing apoptosis.

**Key words:** mitochondria, *Solanum tuberosum*, DNA, mitochondrial swelling, adenine nucleotide translocator, inner membrane permeability to H<sup>+</sup>-ions.

УДК 575.22+575.222

**МИХАЙЛИК С.Ю., АНТОНІЮК М.З., ТЕРНОВСЬКА Т.К.**

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,  
Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: sermuraha@gmail.com

## **МОЖЛИВІ МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ МІНЛИВОСТІ ГЛІАДИНОВИХ ГЕНІВ В ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ**

Гени, що кодують гліадини пшениці, є однією з найзручніших моделей, яку можна використати для вивчення молекулярної природи тих процесів, які відзначаються сьогодні як генетична нестабільність геномів гібридного походження. Попереднє вивчення трьох наборів інтрогресивних ліній м'якої пшениці, які мають інтрогресії від трьох видів егілопсу [1], за електрофоретичними спектрами гліадинів виявило високий рівень мінливості між різними лініями та між рослинами однієї і тієї самої лінії. Гліадини кодуються двома серіями ортологічних генних кластерів, *Gli-1*

*Gli-2*, розташованих на коротких плечах хромосом 1-ої та 6-ої гомеологічних груп, відповідно. Вони складаються з мономерних протеїнів, які утворюють у електрофоретичному спектрі зони ω, γ, β та α. в напрямку збільшення електрофоретичної рухливості. Рекомбінація усередині генних кластерів відбувається вкрай рідко [2]. В гліадинових спектрах інтрогресивних ліній нові компоненти найчастіше зустрічалися у ω-зоні, рідше у γ- та β-зонах та зовсім рідко у α-зоні [3], що можна пояснити частково розмірами та роздільною здатністю електрофоретичних спектрів цих зон.