

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ/ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ КАК ОДИН ИЗ ВЕДУЩИХ МЕХАНИЗМОВ ТОНКОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ

И.Ю. Субота, М.В. Кулинченко, Ю.М. Константинов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, *isubota@mail.ru*

Аннотация. Обратимая ковалентная модификация белков, такая как фосфорилирование/дефосфорилирование и тиол-дисульфидный обмен, имеет ведущее значение в тонкой метаболической регуляции ферментов. Модификации ферментов очень чувствительны к сигналам, в митохондриях важную сигнальную роль играют ионы Ca^{2+} . Проведено исследование уровня фосфорилирования митохондриальных белков в присутствии Ca^{2+} , вызывающих открытие CsA-чувствительной mPTP-поры, и митохондриальных дыхательных комплексов с помощью разделения белковых субъединиц методом 2DBN/SDS-PAGE электрофореза.

Ключевые слова: митохондрии, фосфорилирование/дефосфорилирование белков, ионы кальция

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-993-997

Регуляция ферментов за счет обратимых ковалентных модификаций имеет ведущее значение в так называемом тонком метаболическом контроле. Очевидно, фосфорилирование/дефосфорилирование и тиол-дисульфидный обмен – наиболее распространенные виды обратимых ковалентных модификаций белков у высших эукариот, включая растения. По крайней мере, 7 митохондриальных ферментов, связанных с дыханием растений, контролируются, хотя бы частично, с помощью фосфорилирования. В настоящее время в митохондриях арабидопсиса и гороха идентифицировано более 10 протеинкиназ и одна протеинфосфатаза. Согласно анализу *in silico*, в среднем, в митохондриях растений содержится около 50–200 протеинкиназ, столько же или больше белков-мишеней и 10–30 протеинфосфатаз [Juszczuk et al., 2007].

Обратимые ковалентные модификации ферментов очень чувствительны к сигналам. Среди внутриклеточных мессенджеров, участвующих в передаче сигнала в митохондриях, центральное место, очевидно, занимают ионы Ca^{2+} . Общеизвестно, что свободный кальций играет жизненно важную роль в клеточном развитии и вовлечен во многие физиологические функции, в частности, в развитие апоптоза. В митохондриях как в любом другом компартменте клетки, уровень Ca^{2+} постоянно изменяется в широких пределах. Ряд исследований продемонстрировали, что мембранный потенциал митохондрий и увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий вовлечены в гомеостаз Ca^{2+} в растительных клетках. Показано, что ионы Ca^{2+} в концентрации 1–2.5 мМ запускают в митохондриях злаков события, связанные с начальными стадиями апоптоза (в частности, высокоамплитудное набухание митохондрий) [Virolainen et al., 2005]. Высокоамплитудное набухание митохондрий связано с открытием неселективной поры, сопровождаемое падением мембранного потенциала митохондрий. Ранее нами было показано, что митохондриальные протеинкиназы/протеинфосфатазы редокс-чувствительны [Субота и др., 2007]. Таким образом, при высокоамплитудном набухании митохондрий может происходить изменение уровня фосфорилирования/дефосфорилирования митохондриальных белков, что, возможно, является одним из этапов ответа на стресс, вызванный высокими концентрациями ионов Ca^{2+} .

В задачи работы входило исследование фосфорилирования/дефосфорилирования митохондриальных белков в присутствии ионов кальция в концентрации, вызывающей открытие CsA-чувствительной mPTP-поры. Кроме того, была проведена оценка активности фосфорилирования митохондриальных дыхательных комплексов с помощью разделения митохондрий на отдельные белковые субъединицы с помощью двумерного электрофореза в ПААГ (2DBN/SDS-PAGE) с последующей окраской флуоресцентным красителем Pro-Q Diamond, который позволяет непосредственно оценивать фосфорилирование белков и детектировать очень небольшие количества фосфопротеинов.

В экспериментах использовали свежевыделенные митохондрии, полученные из колеоптелей 3-х дневных этиолированных проростков кукурузы гибрида ВИР 46 МВ по методу [Konstantinov et al., 1988]. Анализ фосфорилирования белков в изолированных митохондриях проводили согласно методу [Субота и др., 2010] с использованием радиоактивно меченой [γ - 32 P]АТР (ФГУП “ИРМ”, Россия). Полипептидный состав фосфорилированных белков анализировали в системе Лэммли [Laemmli, 1970] с последующим экспонированием гелей с рентгеновской пленкой. Иммунодетекцию проводили согласно методике [Timmons, Dunbar, 1990].

Как известно, об открытии поры свидетельствует так называемое высокоамплитудное набухание митохондрий. Набухание выделенных митохондрий измеряли спектрофотометрически при длине волны 540 нм в течение 30-40 мин сразу после выделения митохондрий. О набухании судили по падению оптической плотности митохондриальной суспензии. В качестве индукторов высокоамплитудного набухания применяли ионы Ca^{2+} в составе CaCl_2 (0.5 и 2 мМ). Обнаружено, что падение оптической плотности в данный промежуток времени отмечается в митохондриях, обработанных 2 мМ CaCl_2 , но не 0.5 мМ CaCl_2 . При совместном действии ионов Ca^{2+} и CsA (ингибитора mPTP- поры) набухания митохондрий не наблюдалось (рис. 1).

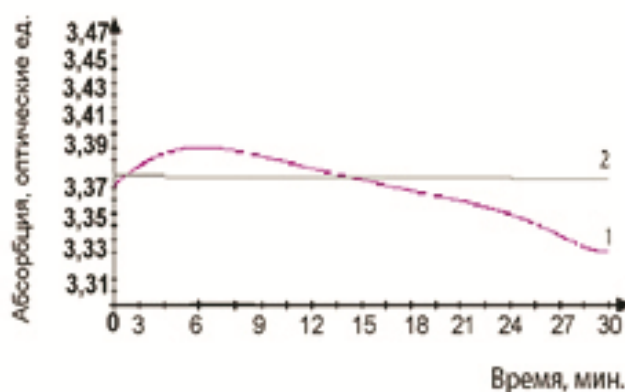


Рис. 1. Действие циклоспорина А на Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий, полученных из этиолированных проростков кукурузы. 1 - обработка CaCl_2 (2 мМ); 2 - обработка CaCl_2 (2 мМ)+циклоспирин А.

В наших экспериментах митохондрии находились в набухом состоянии с открытой порой около 15 мин, что приводило к выходу из межмембранного пространства цитохрома *c*. Совместное использование CaCl_2 и CsA предотвращало выход цитохрома *c*, что указывает на вовлеченность феномена неселективной митохондриальной проницаемости. Таким образом, при обработке изолированных митохондрий ионами кальция в концентрации 2 мМ моделировались события, связанные с начальными стадиями апоптоза, т.е. открытием неселективной поры и выходом цитохрома *c* из митохондрий.

Следующим этапом работы было исследование последствий открытия неселективной поры в отношении фосфорилирования/дефосфорилирования митохондриальных белков. С помощью метода фосфорилирования белков *in organello* показано, что обработка CaCl_2 (2 мМ) вызывала увеличение уровня фосфорилирования белков с мол. м. около 74, 61, 60 и 33 кДа. Однако, фосфорилирование белков с мол. м. около 51.5 кДа и 37 кДа в этих условиях было снижено по сравнению с контролем. В присутствии ионов Ca^{2+} в изолированных митохондриях дополнительно фосфорилировались полипептиды с мол. м. 66 кДа (определенный нами ранее как БТШ60) и 57 кДа (α -субъединица F_1 -комплекса АТРазы). Данный факт указывает на то, что в митохондриях кукурузы есть, по крайней мере, одна Ca^{2+} -зависимая протеинкиназа. Обнаружено, что при действии ионов кальция изменяется уровень фосфорилирования субъединиц F_1 -АТРазы, но не изменяется их синтез. Последнее касается как белков, кодируемых ядром (субъединица бета F_1 -АТРазы), так и митохондриями (альфа субъединица F_1 -АТРазы). Полученные нами данные об увеличении уровня фосфорилирования отдельных митохондриальных белков кукурузы под влиянием ионов кальция в концентрации, вызывающей открытие неселективной поры и выход цитохрома *c*, свидетельствуют о наличии тонкой регуляции ответа растительных митохондрий на абиотический стресс.

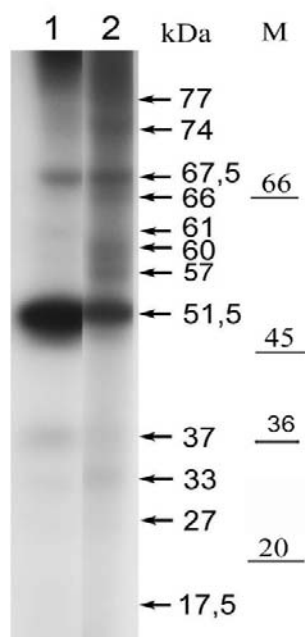


Рис. 2. Эффект ионов Ca^{2+} на уровень фосфорилирования митохондриальных белков кукурузы в системе *in organello*. 1 – контроль; 2 – обработка CaCl_2 (2 мМ). Авторадиограмма фосфорилирования митохондриальных белков.

В настоящее время получено большое количество результатов, свидетельствующих в пользу того, что фосфорилирование и автофосфорилирование комплексов окислительного фосфорилирования может играть значительную роль в регуляции активности этих мультифункциональных структур.

Относительно низкое содержание митохондриальных протеинкиназ в дыхательных комплексах митохондрий значительно ограничивает использование в их исследовании очень информативного подхода – разделения белков с помощью SDS-электрофореза в ПААГ с последующей их идентификацией масс-спектрометрией. В этом аспекте методика скрининга активных митохондриальных протеинкиназ с

помощью окраски фосфобелков специфическим флуоресцентным красителем в сочетании с blue-native электрофорезом (BN-PAGE) дает гораздо более информативные и корректные результаты.

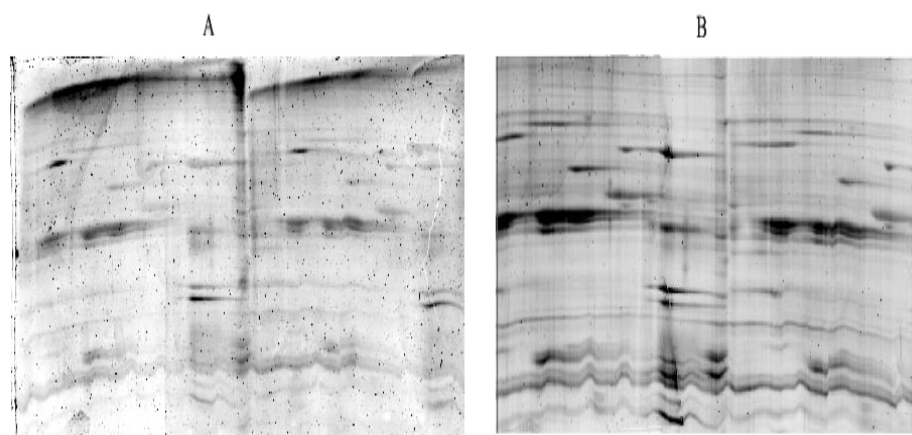


Рис. 3. А – фосфобелки митохондриальных дыхательных комплексов после 2D BN/SDS-PAGE, визуализированные с помощью Pro-Q Diamond; В – митохондриальные белки, окрашенные Sypro Ruby.

Для оценки активности фосфорилирования митохондриальных дыхательных комплексов митохондрии разделяли на отдельные белковые субъединицы с помощью двумерного электрофореза в ПААГ (2DBN/SDS-PAGE). Далее, для оценки эффективности фосфорилирования дыхательных комплексов гель экспонировали с красителем Pro-Q Diamond, анализ наличия фосфобелков и глубину их фосфорилирования проводили с помощью флуоресцентного сканера. Как видно на рис. 3, в митохондриальных мембранных комплексах фосфобелков гораздо меньше, чем белков, не подвергающихся данной посттрансляционной модификации.

Выражаем благодарность и искреннюю признательность к.б.н., н.с. Н.Е. Коротаевой за помощь в работе с флуоресцентным сканером.

Литература

- Субота И.Ю., Арзиев А.Ш., Сенженко Л.П., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. Ингибиторный анализ фосфорилирования/дефосфорилирования белков в митохондриях кукурузы в зависимости от редокс-условий // Физиология растений. – 2007. – V. 54. – P. 389–396.
- Субота И.Ю., Арзиев А.Ш., Сенженко Л.П., Тарасенко В.И., Невинский Г.А., Константинов Ю.М. Влияние ионов Ca^{2+} и цАМФ на редокс-зависимое фосфорилирование в митохондриях высших растений // Физиология растений. – 2010. – Т. 57, № 1. – С. 42–49.
- Juszczuk I.M., Bykova N.V., Moller I. M. Protein phosphorylation in plant mitochondria // *Physiol. Plant.* – 2007. – V. 129. – P. 90–103.
- Konstantinov Yu.M., Lutsenko G.N., Podsozny V.A. Inhibition of adenine nucleotide translocation in maize seedling mitochondria by anionic detergents // *Physiol. Plant.* – 1988. – V. 72. – P. 403–406.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 174–182.
- Timmons T.M., Dunbar B.S. Protein blotting and immunodetection // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 182. – P. 679–701.

Virolainen E., Blokhina O., Fagerstedt K. Ca^{2+} -induced high amplitude swelling and cytochrome *c* release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress // Annals of Botany. – 2005. – V. 90. – P. 509–516.

PHOSPHORYLATION/DEPHOSPHORYLATION OF PROTEINS AS ONE OF THE MAIN MECHANISMS OF FINE REGULATION OF METABOLIC FUNCTIONS OF MITOCHONDRIA

I.Y. Subota, M.V. Kulinchenko, Yu.M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, isubota@mail.ru

Abstract. Reversible covalent modification of proteins, such as phosphorylation/dephosphorylation and thiol-disulfide exchange, has an essential role in the fine metabolic regulation of enzymes. Modification of enzymes is very sensitive to signals, in mitochondria Ca^{2+} ions play an important signaling role. The level of phosphorylation of mitochondrial proteins in the presence of Ca^{2+} , causing the opening of the CSA-sensitive mPTP-pore, and of mitochondrial respiratory complexes by separation of protein subunits in 2D BN/SDS-PAGE electrophoresis was studied.

Keywords: mitochondria, phosphorylation/dephosphorylation of protein, Ca^{2+} ions