

# 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](mailto: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

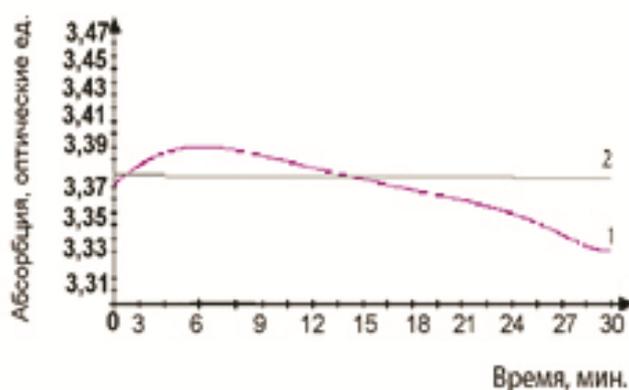
Регуляция ферментов за счет обратимых ковалентных модификаций имеет ведущее значение в так называемом тонком метаболическом контроле. Очевидно, фосфорилирование/дефосфорилирование и тиол-дисульфидный обмен – наиболее распространенные виды обратимых ковалентных модификаций белков у высших эукариот, включая 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 свежely выделенные 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 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ (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].

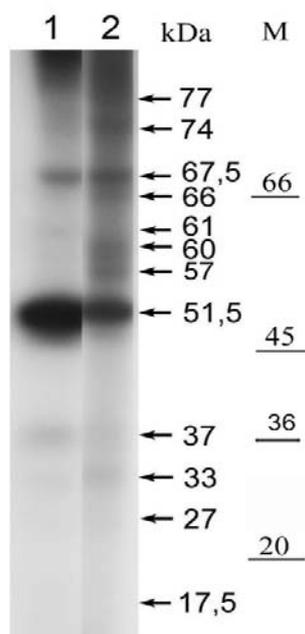
Как известно, об открытии поры свидетельствует так называемое высокоамплитудное набухание митохондрий. Набухание выделенных митохондрий измеряли спектрофотометрически при длине волны 540 нм в течение 30-40 мин сразу после выделения митохондрий. О набухании судили по падению оптической плотности митохондриальной 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)+циклоспорин 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  $\text{CaCl}_2$  (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  $\text{Ca}^{2+}$  в изолированных митохондриях дополнительно фосфорилировались полипептиды с мол. м. 66 кДа (определенный нами ранее как БТШ60) и 57 кДа ( $\alpha$ -субъединица  $F_1$ -комплекса АТФазы). Данный факт указывает на то, что в митохондриях кукурузы есть, по крайней мере, одна  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая протеинкиназа. Обнаружено, что при действии ионов кальция изменяется уровень фосфорилирования субъединиц  $F_1$ -АТФазы, но не изменяется их синтез. Последнее касается как белков, кодируемых ядром (субъединица бета  $F_1$ -АТФазы), так и митохондриями (альфа субъединица  $F_1$ -АТФазы). 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.

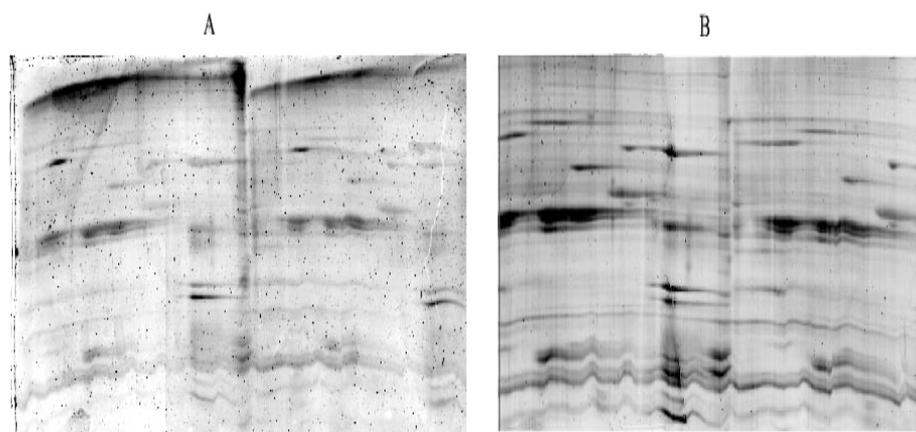


**Рис. 2. Эффект ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на уровень фосфорилирования митохондриальных белков кукурузы в системе *in organello*. 1 – контроль; 2 – обработка  $\text{CaCl}_2$  (2 мМ). Авторадиограмма фосфорилирования митохондриальных белков.**

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. Коротяевой 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. – T. 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<sup>2+</sup>-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](mailto: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<sup>2+</sup> ions play an important signaling role. The level of phosphorylation of mitochondrial proteins in the presence of Ca<sup>2+</sup>, 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<sup>2+</sup> ions