



УДК 581.1

## Различные типы протеинфосфатаз внутренней и наружной митохондриальных мембран высших растений

И. Ю. Субота, А. Ш. Арзиев, Ю. М. Константинов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск  
E-mail: [subota@sifibr.irk.ru](mailto:subota@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** В работе исследовано фосфорилирование/дефосфорилирование митохондриальных белков кукурузы в системе *in organello*. Обнаружены значительные различия в уровне фосфорилирования белков в интактных митохондриях и митопластах. Вероятно, такие различия обусловлены существованием различных типов протеинфосфатаз во внутренней и наружной мембранах митохондрий высших растений.

**Ключевые слова:** митохондрии, митопласты, протеинкиназы, протеинфосфатазы, *Zea mays*.

В настоящее время с помощью методов *in silico* показано, что ядерные геномы риса и арабидопсиса кодируют 1100–1700 протеинкиназ [4], т. е. в 10 раз больше, чем геном дрожжей (119 протеинкиназ) и в 2–3 раза больше, чем геном человека (518 протеинкиназ) [9]. Это свидетельствует о том, что в клетках растений около 1000–2000 различных белков могут регулироваться с помощью фосфорилирования/дефосфорилирования. Предполагается, что в среднем в митохондриях растений содержится около 50–200 протеинкиназ, столько же или больше белков-мишеней и 10–30 протеинфосфатаз [4]. В настоящее время в митохондриях растений идентифицировано около 20 фосфо-белков, участвующих в реализации митохондриальных функций: в регуляции цикла трикарбоновых кислот, в активации субъединиц II и III комплексов дыхательной цепи, в реализации функций митохондриальных БТШ и др. [2]. Считается, что фосфорилирование БТШ22 кукурузы по остатку Ser59 влияет на его олигомеризацию. Именно в таком структурном состоянии этот белок может действовать как шаперон [7]. Фосфорилирование БТШ60, БТШ70, БТШ90 может иметь такое же значение. В изолированных митохондриях кукурузы фосфобелок с мол. массой около 66 кДа был иммунохимически идентифицирован как БТШ60 [1].

Как известно, электрон-транспортная цепь митохондрий – один из основных источников АФК в клетке. Фосфорилирование супероксиддисмутазы, одного из ферментов, вовлеченных в детоксикацию свободных радикалов, может

указывать на то, что митохондриальный обмен АФК регулируется [4].

Таким образом, обратимое фосфорилирование белков широко распространено в митохондриях высших организмов, вместе с тем в большинстве случаев физиологическое значение этого процесса остается малоизученным. Целью настоящей работы было сравнение протеинкиназной и протеинфосфатазной активности, как в изолированных митохондриях кукурузы, так и в органеллах с удаленной наружной мембранной.

### Материал и методы

В работе использовали 4-дневные этиолированные проростки кукурузы (*Zea mays* L., гибрид ВИР 42МВ).

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности сахарозы [5].

Митопласты получали путем обработки митохондриальной суспензии дигитонином [3].

Проводилась количественная оценка включения меченого фосфата в полипептиды. Пробы, содержащие фосфорилированные белки, размораживали. Затем отбирали аликвоты объемом 15 мкл, наносили на диски из хроматографической бумаги Whatman 3ММ. Фильтры отмывали 10 % ТХУ, многократно промывали этанолом до нейтральных значений pH, высушивали и помещали во флаконы с 2 мл сцинтилляционного раствора. Определение радиоактивности образцов проводили с помощью жидкостного счетчика Wallac-8100 («LKB»,

Швеция). Концентрацию белка в изолированных митохондриях и митопластах определяли методом Лоури [6].

**Результаты и обсуждение**

Использование митопластов показало (рис.), что уровень фосфорилирования в митопластах выше, чем в изолированных митохондриях. В пересчете на миллиграммы белка включение меченого фосфата в митохондрии составляло  $7261 \pm 461$  имп/мин·мг белка, а в митопласты  $106\,410 \pm 16\,509$  имп/мин·мг белка. Таким образом, наличие наружной мембраны приводит к значительному ингибированию фосфорилирования митохондриальных белков. Подобный эффект был обнаружен при добавлении матричной фракции митохондрий к фосфорилированным белкам внутренней мембраны [8].

Авторы показали, что добавление матричной фракции митохондрий картофеля к фракции внутренней мембраны, содержащей меченые  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  белки внутренней мембраны, вызывает дефосфорилирование всех фосфопептидов на внутренней мембране, включая субъединицы 22 и 28 кДа F0F1 – АТРазы. Ингибирующий эффект матричной фракции объяснялся именно дефосфорилированием белков, так как добавление вместе с матриксом NaF приводило к прекращению дефосфорилирования. По мнению авторов, это доказывает, что субстратные протеинфосфатазы локализованы в матриксе, а не во внутренней мембране митохондрий. При этом должна быть какая-то другая фосфатаза, которая локализована во внутренней мембране и ингибирование которой приводит к значительному снижению активности фосфорилирования белков. Протеинфосфатазы в матриксе митохондрий способны дефосфорилировать фосфобелки внутренней мембраны. Принимая во внимание данные результаты, можно предположить, что в наружной мембране митохондрий, подобно матриксу, содержится больше протеинфосфатаз, чем во внутренней мембране. Согласно нашим данным, обработка интактных органелл ингибиторами протеинфосфатаз NaF и эндотолом увеличивает тотальный уровень фосфорилирования по сравнению с контролем, при этом такая же обработка митопластов приводит к значительному снижению активности фосфорилирования полипептидов (рис.). Это можно объяснить существованием в митохондриях растений двух типов протеинфосфатаз. Первый тип – это так называемые «субстратные» фосфатазы, которые дефосфорилируют большинство фосфобелков. Второй – фосфатазы протеинкиназ, которые дефосфори-

лируют только киназы. Причем протеинкиназная активность этих ферментов проявляется только тогда, когда они находятся в дефосфорилированном состоянии.

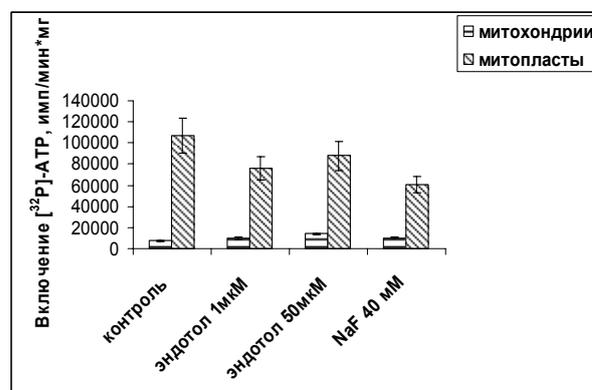


Рис. Тотальная активность фосфорилирования белков в митохондриях и митопластах кукурузы

В целом на основании полученных данных сделан вывод о том, что в наружной мембране митохондрий значительно более представлены по сравнению с другими субмитохондриальными фракциями (внутренняя мембрана и матрикс) протеинфосфатазы «субстратного» типа. Подобно протеинфосфатазам матрикса протеинфосфатазы наружной мембраны способны дефосфорилировать фосфобелки внутренней мембраны. Физиологическое значение обнаруженных различий протеинфосфатаз субмитохондриальных фракций пока неизвестно.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 07–04–01341–а, РФФИ 08–04–01426–а, Сибирского отделения Российской академии наук (междисциплинарный интеграционный проект № 6).

**Литература**

1. Субота И. Ю. Ингибиторный анализ фосфорилирования / дефосфорилирования белков в митохондриях кукурузы в зависимости от редокс-условий / И. Ю. Субота, А. Ш. Арзиев, Л. П. Сенженко и др. // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 389–396.
2. Bykova N. V. Identification of 14 New Phosphoproteins Involved in Important Plant Mitochondrial Processes / N. V. Bykova, H. Egsgaard, I. M. Moller // FEBS Lett. – 2003. – Vol. 540. – P. 141–146.
3. Christophe L. Mitochondrial DNA Polymerase from Wheat Embryos / L. Christophe, L. Torraco-Litvak, M. Castoroviejo, S. Litvak // Plant Sci. Lett. – 1981. – Vol. 21. – P. 181–192.
4. Juszczuk I. M. Protein Phosphorylation in Plant Mitochondria / I. M. Juszczuk, N. V. Bykova, I. M. Moller // Physiol. Plant. – 2007. – Vol. 129. – P. 90–103.

5. Konstantinov Yu. M. Inhibition of Adenine Nucleotide Translocation in Maize Seedling Mitochondria by Anionic Detergents / Yu. M. Konstantinov, G. N. Lutsenko, V. A. Podsoznyy // *Physiol. Plant.* – 1988. – Vol. 72. – P. 403–406.

6. Lowry O. H. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr et al. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

7. Lund A. A. In vivo Modifications of the Maize Mitochondrial Small Heat Stress Protein, HSP22 /

A. A. Lund, D. M. Rhoads, A. L. Lund et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 924–929.

8. Struglics A. Protein Phosphorylation/Dephosphorylation in the Inner Membrane of Potato Tuber Mitochondria / A. Struglics, K.M. Fredlund, Yu.M. Konstantinov et al. // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 475. – P. 213–217.

9. Wang D. Systematic Trans-Genomic Comparison of Protein Kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae* / D. Wang, J. F. Harper, M. Gribskov // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 132. – P. 2152–2165.

## Different types of protein phosphatases in inner and outer mitochondrial membranes of higher plants

I. Yu. Subota, A. Sh. Arziev, Yu. M. Konstantinov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

**Abstract.** The protein phosphorylation/dephosphorylation of maize mitochondrial proteins in organello was investigated. There were found considerable differences in the level of protein phosphorylation between intact mitochondria and mitoplasts. These results could be explained by the presence of different types of protein phosphatases in inner and outer membranes of mitochondria of higher plants.

**Key words:** mitochondria, mitoplasts, protein kinases, protein phosphatases, *Zea mays*

Субота Ирина Юрьевна  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова 132, а/я 317  
кандидат биологических наук, научный сотрудник  
лаборатории генетической инженерии растений  
тел. (395 2) 42–49–03, факс: (395 2) 51–07–54  
E-mail: subota@sifibr.ru

Subota Irina Yurievna  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
Ph.D. in Biology, research scientist,  
Laboratory of Plant Genetic Engineering  
phone: (3952) 42–49–03, fax: (3952) 51–07–54  
E-mail: subota@sifibr.ru

Арзиев Анатолий Шамуратович  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова 132, а/я 317  
ведущий инженер лаборатории  
генетической инженерии растений  
тел. (395 2) 42–49–03, факс: (395 2) 51–07–54  
E-mail: molgene@sifibr.irk.ru

Arziev Anatoly Shamuradovitch  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
leading engineer, Laboratory of Plant  
Genetic Engineering  
phone: (3952) 42–49–03, fax: (3952) 51–07–54  
E-mail: molgene@sifibr.irk.ru

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

Невинский Георгий Александрович  
Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8  
доктор химических наук, профессор,  
зав. лабораторией ферментов репарации  
тел. (383) 335–62–26 факс: (383) 333–36–77  
E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru.

Nevinsky Georgi Aleksandrovitch  
Institute of Chemical Biology  
and Fundamental Medicine SB RAS  
630090, Novosibirsk, 8, Lavrentiev Ave.  
D.Sc. in Chemistry, Prof., Head of Laboratory  
of Repair Enzymes  
Phone: (383) 335–62–26, fax: (383) 333–36–77  
E-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru.