



УДК 581.1

Различные типы протеинфосфатаз внутренней и наружной митохондриальных мембран высших растений как потенциальные участники редокс-сигналинга

И. Ю. Субота¹, А. Ш. Арзиев¹, Г. А. Невинский², Ю. М. Константинов¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E-mail.ru: subota@sifibr.irk.ru

Аннотация. В работе с использованием системы *in organello* исследовано фосфорилирование/дефосфорилирование митохондриальных белков кукурузы. Выявлены существенные различия в уровне фосфорилирования белков в интактных митохондриях и митопластах. Предположено, что обнаруженные различия обусловлены существованием различных типов протеинфосфатаз во внутренней и наружной мембранах митохондрий высших растений.

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

Введение

В соответствии с современными представлениями обратимое фосфорилирование клеточных белков рассматривается как важный биохимический механизм, связывающий внутриклеточные стимулы с внеклеточными событиями [8]. Так, трансдукция фотосинтетического редокс-сигнала в *Chlamydomonas* происходит с участием фосфорилирования хлоропластных белков. При высокой интенсивности освещения наблюдается увеличение степени восстановленности хлоропластных биотиолов, что приводит, в свою очередь, к изменению уровня транскрипции хлоропластных генов [9].

Ранее нами показано, что ингибиторы протеинкиназ и протеинфосфатаз значительно модифицируют эффекты редокс-агентов на активность синтеза белка в митохондриях злаков [1]. На основании этих данных предложена схема редокс-контроля экспрессии митохондриальных генов на уровне трансляции, основанная на участии в редокс-сигналинге протеинкиназ и протеинфосфатаз [1].

Предполагается, что в среднем в митохондриях растений содержится около 50–200 протеинкиназ, столько же или больше белков-мишеней и 10–30 протеинфосфатаз [5]. В настоящее время в митохондриях растений идентифицировано около 20 фосфобелков, участвующих в реализации митохондриальных функций: в регуляции цикла трикарбоновых кислот, в активации субъединиц II и III ком-

плексов дыхательной цепи, в реализации функций митохондриальных БТШ и др. [3].

Установлено также, что фосфорилирование белков в изолированных митохондриях кукурузы является редокс-чувствительным [2].

Несмотря на широкое распространение обратимого фосфорилирования белков в митохондриях высших организмов, в большинстве случаев физиологическое значение этого процесса остается малоизученным. Целью настоящей работы было изучение различных типов протеинфосфатаз внутренней и наружной митохондриальных мембран высших растений как потенциальных участников редокс-сигналинга.

Материалы и методы

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

Получение митохондрий. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности сахарозы [6].

Митопласты получали путем обработки митохондриальной суспензии дигитонином [4].

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 («ЛКВ», Швеция).

Определение белка. Концентрацию белка в изолированных митохондриях и митопластах определяли методом Лоури [7].

Результаты и обсуждения

Изучение фосфорилирования белков митопластов показало (рис.), что уровень фосфорилирования в митопластах значительно выше, чем в изолированных митохондриях. В пересчете на миллиграммы белка включение меченого фосфата в митохондрии составляло $7\,261 \pm 461$ имп/мин·мг белка, а в митопласты $106\,410 \pm 16\,509$ имп/мин·мг белка. Таким образом, наличие наружной митохондриальной мембраны приводит к значительному ингибированию фосфорилирования митохондриальных белков. Подобный эффект был ранее обнаружен при добавлении матриксной фракции митохондрий к фосфорилированным белкам внутренней мембраны [10].

Авторы показали, что добавление матриксной 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 F_0F_1 – АТРаза. Ингибирующий эффект матриксной фракции объяснялся именно дефосфорилированием белков, так как добавление вместе с матриксом NaF приводило к прекращению дефосфорилирования. В работе делается вывод, что субстратные протеинфосфатазы локализованы в матриксе, а не во внутренней мембране митохондрий [10]. 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 срав-

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

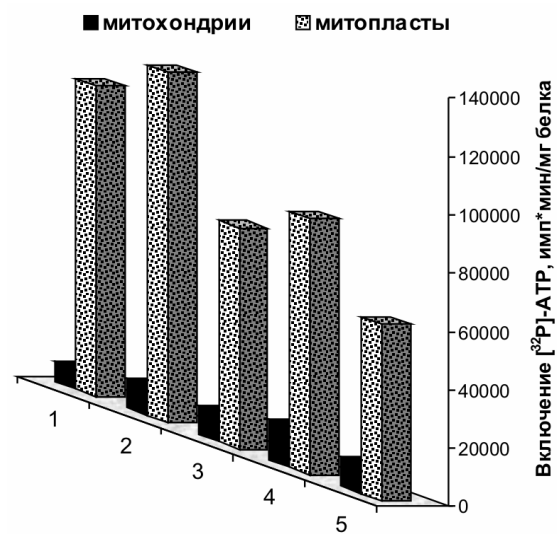


Рис. Определение тотальной активности фосфорилирования белков в митохондриях и митопластах кукурузы. 1 – контроль; 2 – стауроспорин; 3 – эндотол (1 мкМ); 4 – эндотол (50 мкМ); 5 – NaF (40 мкМ)

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 остается пока неясным.

Полученные в настоящей работе результаты позволяют вплотную подойти к обнаружению сенсора сигнала, который должен поступать к митохондриям от других компартментов растительной клетки. Первоначально предполагалось, что таким сенсором должна быть ре-

докс-чувствительная протеинкиназа. Однако, принимая во внимание полученные нами данные о значительных различиях в уровне фосфорилирования между митопластами и интактными митохондриями, которые, на наш взгляд, связаны с существованием различных типов протеинфосфатаз в разных митохондриальных субкомпартаментах, естественно предположить, что эту функцию может выполнять и редокс-чувствительная протеинфосфатаза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 07-04-01341-а, РФФИ 08-04-01426-а, Сибирского отделения Российской академии наук (междисциплинарные интеграционные проекты № 6, 98).

Литература

1. Субота И. Ю. Участие реакций фосфорилирования-дефосфорилирования белков в редокс-контроле трансляции в митохондриях злаков / И. Ю. Субота, А. Ш. Арзиев, Ю. М. Константинов // Физиология растений, 2004. – Т. 51. – С. 872–877.
2. Субота И. Ю. Ингибиторный анализ фосфорилирования/дефосфорилирования белков в митохондриях кукурузы в зависимости от редокс-условий / И. Ю. Субота [и др.] // Физиология растений, 2007. – Т. 54. – С. 389–396.
3. 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.
4. Christophe L. Mitochondrial DNA Polymerase from Wheat Embryos / L. Christophe, L. Torracol-Litvak [et al.] // Plant Sci. Lett. – 1981. – Vol. 21. – P. 181–192.
5. 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.
6. Konstantinov Yu. M. Inhibition of Adenine Nucleotide Translocation in Maize Seedling Mitochondria by Anionic Detergents / Yu. M. Konstantinov, G. N. Lutsenko, V. A. Podsonny // Physiol. Plant. – 1988. – Vol. 72. – P. 403–406.
7. Lowry O. H. Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
8. Pagliarini D. J. Mitochondrial Modulation: Reversible Phosphorylation Takes Center Stage? / D. J. Pagliarini, J. E. Dixon // Trends Biochem. Sci. – 2006. Vol. 31. – P. 26–34.
9. Pfannschmidt T. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes / T. Pfannschmidt // Trends Plant Sci. – 2003. – Vol. 8. – P. 33–41.
10. Struglics A. Protein Phosphorylation/Dephosphorylation in the Inner Membrane of Potato Tuber Mitochondria / A. Struglics [et al.] // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 475. – P. 213–217.

Different types of protein phosphatases in inner and outer membranes of mitochondria of higher plants as a presumable participants of redox signaling

I. Yu. Subota¹, A. Sh. Arziev¹, G. A. Nevinsky², Yu. M. Konstantinov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, Irkutsk

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch RAS, Novosibirsk

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: (395 2) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: molgene@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.

Константинов Юрий Михайлович
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317
доктор биологических наук, зав. лабораторией
лаборатории 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: (395 2) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru