

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 557.15.02;577.15.06

© Коллектив авторов

УБИКВИТИН ВЫЗЫВАЕТ СЕЛЕКТИВНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МАО К РАЗЛИЧНЫМ ПРОТЕИНАЗАМ

О.А. Бунеева^{1}, М.В. Медведева², А.Е. Медведев¹*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121, Москва,
Погодинская ул. д. 10; факс (495) 245-05-09; эл. почта: Olga.Buneeva@ibmc.msk.ru

²МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

Инкубация митохондрий мозга крысы с убиквитином и АТР и последующее осаждение митохондрий сопровождалось снижением содержания убиквитина в надосадке, которое было более выражено в присутствии АТР-регенерирующей системы (креатинфосфат/креатин фосфокиназа) в среде инкубации. Это включение убиквитина в митохондрии мозга, наблюдаемое в присутствии АТР в среде инкубации, приводило к увеличению чувствительности моноаминоксидаз (МАО) А и Б к протеолитической инактивации под действием трипсина и папаина соответственно. (При этом убиквитин не изменял чувствительность МАО Б к трипсину, а МАО А к папаину.) Полученные результаты свидетельствуют о том, что включение убиквитина в митохондрии мозга повышает доступность МАО к определенным экзогенным протеиназам. Однако остается не ясным, отражают ли эти изменения прямое конъюгирование молекул МАО с убиквитином или они обусловлены убиквитин-зависимыми изменениями мембранного окружения этих ферментов.

Ключевые слова: моноаминоксидаза, убиквитин, протеолитическая деградация, митохондрии мозга крысы, трипсин, папаин.

ВВЕДЕНИЕ. Убиквитин – белок, состоящий из 76 аминокислотных остатков, который встречается во всех эукариотических клетках [1]. Модификация убиквитином различных белков-мишеней определяет его роль во многих внутриклеточных процессах, включая регуляцию экспрессии генов, клеточного цикла и деления, ответ на стресс, элиминацию поврежденных белков, репарации ДНК, импорт белков в митохондрии, сборку рибосом, апоптоз и др. [2-4].

Модификацию белков убиквитином осуществляет убиквитин-конъюгирующая система в присутствии АТР. Сначала убиквитин-конъюгирующий фермент (E1) гидролизует АТР и образует тиоэфирную связь с убиквитином. Активированный убиквитин переносится далее на убиквитин-конъюгирующий фермент (E2), который, в свою очередь, переносит его на молекулу субстрата, специфически узнаваемого одной из убиквитин-лигаз (E3). Молекулы убиквитина присоединяются к субстрату в виде полиубиквитиновой цепи, которая и служит сигналом для протеолитической деградации в протеасомах [5].

Полиубиквитинирование белков для их дальнейшей протеасомной деградации – одна из основных функций убиквитина. Таким образом убиквитин-протеасомная система предохраняет эукариотическую клетку от накопления нерастворимых агрегатов дефектных белков [1, 6, 7]. Известно много цитозольных белков-мишеней убиквитина [7]. Роль убиквитина в обмене митохондриальных

* - адресат для переписки

белков млекопитающих практически неизвестна, хотя содержащие убиквитин белковые агрегаты обнаружены и в этих органеллах [8]. Установлено, что митохондрии мозга обладают собственной убиквитин-конъюгирующей системой, однако конкретные убиквитинированные белки до сих пор не идентифицированы [9, 10].

Предметом наших исследований является моноаминоксидаза (МАО; КФ 1.4.3.4), интегральный фермент внешней мембраны митохондрий, которому принадлежит ключевая роль в обмене важнейших медиаторных моноаминов в центральной нервной системе и периферических тканях [11, 12]. Известны две формы фермента: МАО А и МАО Б, которые кодируются различными генами и характеризуются разной субстратной специфичностью и чувствительностью к низким концентрациям ингибиторов хлоргиллина и (-)-депренила [11, 12].

Ранее группой McCauley было установлено, что *in vitro* новосинтезированные молекулы МАО А и Б встраиваются во внешнюю мембрану митохондрий убиквитин- и АТР-зависимым образом [13, 14]. В нашей лаборатории было показано, что патологические состояния, сопровождающиеся активацией окислительных процессов и увеличением образования убиквитиновых конъюгатов в митохондриях, вызывают окислительную модификацию МАО и увеличение чувствительности к трипсинолизу [15-17]. Кроме того, включение экзогенного убиквитина в митохондрии мозга крысы приводило к повышению чувствительности МАО А к инаktivации трипсином, однако активность МАО Б при этом практически не изменялась [18].

Мы предположили, что такая избирательность может отражать неодинаковую чувствительность МАО А и МАО Б к различным протеиназам. Вирусные и клеточные протеиназы семейства папаина участвуют в убиквитин-зависимых процессах [19-21], поэтому естественно предположить, что модифицированные МАО (А и Б) наиболее чувствительны к протеиназам именно этого семейства. Исследования папаиновых протеиназ показывают, что их активный центр обладает достаточно консервативной структурой [21-23].

В настоящей работе мы исследовали влияние убиквитина на чувствительность МАО А и МАО Б мозга крысы к протеолитической деградации под действием папаина. Для повышения включения убиквитина в митохондрии была использована АТР-регенерирующая система креатинфосфат-креатинфосфокиназа, с успехом применявшаяся ранее для изучения убиквитинирования других белков-мишеней [24-29].

МЕТОДИКА. В работе использовали [^{14}C]5-гидрокситриптамина креатинин сульфат и [^{14}C]2-фенилэтиламина гидрохлорид (“Amersham”, Англия). Остальные реактивы были приобретены у “Sigma-Aldrich” (Россия).

Митохондрии мозга крысы выделяли, как описано ранее [30], используя среду выделения следующего состава: 0,32 М сахараза, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5. Осадок митохондрий суспендировали в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5.

Инкубацию митохондрий (концентрация белка 2 мг/мл) с убиквитином проводили в объеме 0,6 мл в течение 30 мин при 37°C. Инкубационная смесь содержала 50 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 2 мМ MgCl_2 , 3 мМ дитиотреитол, 4 мМ АТР, АТР-регенерирующую систему (креатинфосфокиназу в концентрации 2 МЕ/мл и 10 мМ креатинфосфат), убиквитин (100 мкг). Контрольные пробы инкубировали без убиквитина. По окончании инкубации митохондрии осаждали, центрифугируя инкубационную смесь 30 мин при 16 000 g.

Осадок митохондрий ресуспендировали в 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4 (до концентрации белка 2-5 мг/мл) и инкубировали с трипсином (0,5 мг/мл) или папаином (4 мг/мл) при 37°C в течение 10 и 15 мин соответственно. Перед инкубацией с митохондриями папаин (8 мг/мл) преинкубировали 5 мин при 20°C с 4 мМ дитиотреитолом. В случае трипсинолиза в конце инкубации добавляли 10-кратный избыток ингибитора трипсина из соевых бобов [18]. Инкубацию

митохондрий с папаином останавливали, добавляя 20-кратный избыток холодного буфера. В обоих случаях митохондрии осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 30 мин.

Активность МАО А и МАО Б определяли радиометрическим методом, используя в качестве субстратов 0,1 мМ [^{14}C]5-гидрокситриптамиин и 0,005 мМ [^{14}C]2-фенилэтиламин, соответственно [30]. Удельная радиоактивность обоих субстратов составляла 10 Ки/моль.

О содержании убиквитина в супернатанте судили по электрофорезу белков надосадочной жидкости, который проводили в 10-15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [31]. Гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue R-250 и сканировали с помощью денситометра Ultrascan XL (LKB). Каждую дорожку сканировали дважды и определяли среднюю величину площади пика. Содержание в супернатанте примесей митохондриальных белков, близких по молекулярной массе к убиквитину, не превышало 15% [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В соответствии с предыдущими данными [18], инкубация митохондрий с убиквитином приводит к снижению содержания последнего в надосадочной жидкости (после осаждения митохондрий из неё) только в присутствии АТР (рисунок, столбцы 1 и 2). Добавление компонентов АТР-регенерирующей системы (креатинфосфокиназы 2 МЕ/мл и 10 мМ креатинфосфата) вызывало более выраженное снижение количества убиквитина в надосадке среды инкубации. С учетом этих данных дальнейшие эксперименты по исследованию чувствительности МАО к действию протеолитических ферментов проводили, используя данную АТР-регенерирующую систему.

Относительная
площадь пика, %

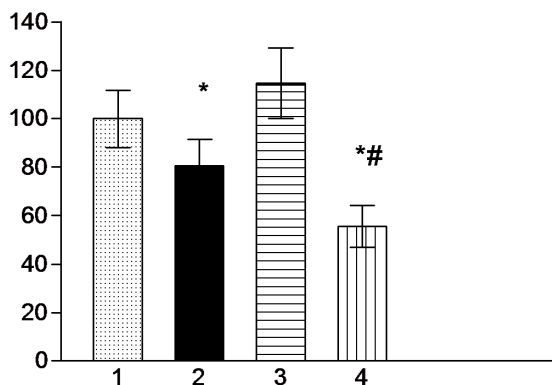


Рисунок.

Влияние АТР и АТР-регенерирующей системы на содержание убиквитина в супернатанте после инкубации митохондрий мозга крысы с убиквитином и их последующего осаждения. Результаты представлены в процентах по отношению к контролю. За 100% принято содержание убиквитина в супернатанте после осаждения митохондрий в случае их инкубации с убиквитином без АТР и АТР-регенерирующей системы ($587 \pm 11,0$ отн. ед.). Условия инкубации: 1,3 – в отсутствие АТР; 2,4 – в присутствии АТР; 1,2 – в отсутствие АТР-регенерирующей системы, 3,4 – в присутствии АТР-регенерирующей системы. Звездочка показывает значимость различий в содержании убиквитина в надосадочной жидкости в контрольных пробах, инкубированных без АТР (1,3), и в присутствии АТР (2,4): $p < 0,05$ – $p < 0,02$. Решетка (#) показывает значимость различий в содержании убиквитина при использовании полной инкубационной смеси с (4) и без (2) АТР-регенерирующей системы креатинкиназа-креатинфосфат ($p < 0,05$).

Представлены средние величины \pm ошибка средней из 4-6 независимых экспериментов.

ДЕЙСТВИЕ УБИКВИТИНА НА МАО-МИТОХОНДРИИ

МАО А митохондрий, преинкубированных с убиквитином в присутствии АТР, была более чувствительна к действию трипсина по сравнению с контролем (ср. $53,3 \pm 5,6$ и $43,5 \pm 3,1\%$; $p < 0,05$; табл. 1). При этом чувствительность МАО А контрольных митохондрий к папаину была более чем в два раза выше, чем к трипсину, однако инкубация с убиквитином к дальнейшему увеличению чувствительности к протеолитической инактивации не приводила.

Таблица 1. Влияние преинкубации с убиквитином на остаточную активность МАО А митохондрий мозга крысы после протеолиза с участием трипсина или папаина.

Митохондрии	Преинкубация	Трипсин	Папаин	
Контрольные	АТР	$53,3 \pm 5,6$	$21,3 \pm 4,2$	$p < 0,01$
Обработанные убиквитином	АТР+убиквитин	$43,5 \pm 3,1$	$29,5 \pm 8,6$	$p > 0,3$
		$p < 0,05$	$p > 0,4$	

Примечание. Здесь и в таблице 2 данные выражены в виде % остаточной активности МАО после инкубации с протеиназами. За 100% принимали активность МАО контрольных митохондрий мозга, которые инкубировали в отсутствие протеиназ. Представлены средние значения (\pm ошибка средней) 5-8 независимых экспериментов.

В отличие от МАО А, чувствительность к трипсинолизу МАО Б в контрольных и в преинкубированных с убиквитином митохондриях практически отсутствовала (табл. 2). В то же время фермент интактных митохондрий демонстрировал заметную чувствительность к папаину, которая повышалась более чем в два раза в случае инкубации с убиквитином (ср. $73,6 \pm 8,9$ и $30,6 \pm 7,5\%$; $p < 0,01$; табл. 2).

Таблица 2. Влияние преинкубации с убиквитином на остаточную активность МАО Б митохондрий мозга крысы после протеолиза с участием трипсина или папаина.

Митохондрии	Преинкубация	Трипсин	Папаин	
Контрольные	АТР	$97,2 \pm 8,1$	$73,6 \pm 8,9$	$p < 0,1$
Обработанные убиквитином	АТР+убиквитин	$94,7 \pm 2,9$	$30,6 \pm 7,5$	$p < 0,001$
		$p > 0,3$	$p < 0,01$	

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что АТР-зависимое включение убиквитина в митохондрии мозга крысы сопровождается селективным изменением чувствительности МАО А и Б к определенным протеазам. В случае МАО А – к трипсину, а в случае МАО Б – к папаину. Являются ли эти ферменты митохондрий объектом прямого убиквитинирования или изменения чувствительности МАО А и МАО Б

к протеолитической деградации отражают более сложные процессы, происходящие в мембране митохондрий при включении убиквитина в эти органеллы, пока не ясно. Это будет предметом дальнейших исследований.

Настоящие исследования осуществлены при финансовой поддержке РФФИ (проект 07-04-00803а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ciechanover A. (1994) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **375**, 565–581.
2. Hershko A. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**(9), 1191–1197.
3. Welchman R.L., Gordon C., Mayer R.J. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**(8), 599–609.
4. Varshavsky A. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30**(6), 283–286.
5. Бунеева О.А., Медведев А.Е. (2006) *Биохимия*, **71**(8), 851–860.
6. Ciechanover A., Orian A., Schwartz A.L. (2000) *Bioessays*, **22**, 442–451.
7. Sherman M.Y., Goldberg A.L. (2001) *Neuron*, **29**, 15–32.
8. Hu B.R., Martone M.E., Jones Y.Z., Liu C.L. (2000) *J. Neurosci.*, **20**, 3191–3199.
9. Adamo A.M., Pasquini L.A., Moreno M.B., Oteiza P.I., Soto E.F., Pasquini J.M. (1999) *J. Neurosci. Res.*, **55**, 523–531.
10. Mangani M., Serafini G., Antonelli A., Malatesta M., Gazzanelli G. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 21018–21024.
11. Abell C.W., Kwan S.W. (2001) *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **65**, 129–156.
12. Shih J.C., Chen K., Ridd M.J. (1999) *Annu. Rev. Neurosci.*, **22**, 197–217.
13. Zhuang Z., McCauley R. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 14594–14596.
14. Zhuang Z., Marks B., McCauley R. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 591–596.
15. Medvedev A.E., Gorkin V.Z. (1994) *Int. J. Devel. Neurosci.*, **12**, 151–155.
16. Medvedev A.E., Kinkel A., Kamyshanskaya N., Gorkin V. (1993) *Int. J. Biochem.*, **25**, 1791–1799.
17. Медведев А.Е., Тунтон К.Ф. (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 471–481.
18. Buneeva O.A., Medvedeva M.V., Medvedev A.E. (1999) *Neurobiology*, **7**, 257–261.
19. Barretto N., Jukneliene D., Ratia K., Chen Z., Mesecar A.D., Baker S.C. (2006) *Adv. Exper. Med. Biol.*, **581**, 37–41.
20. Sulea T., Linder H.A., Purisima E.O., Menard R. (2005) *J. Virol.*, **79**, 4550–4551.
21. Hu M., Li P., Li W., Yao T., Wu J.W., Gu W., Cohen R.E., Shi Y. (2002) *Cell*, **111**, 1041–1054.
22. Wiederanders B. (2003) *Acta Biochimica Polonica*, **50**, 690–713.
23. Dickinson D.P. (2002) *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **13**, 238–275.
24. Dahlmann B., Kuehn L., Reinauer H. (1995) *Biochem. J.*, **309** (Pt 1), 195–202.
25. Adachi K., Lakka V., Zhao Y., Surrey S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 41767–41774.
26. Gururaja T., Li W., Noble W.S., Payan D.G., Anderson D.C. (2003) *J. Proteome*, **2**, 394–404.
27. Yoshida A., Hirano K., Motoyashiki T., Morita T., Ueki H. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **406**, 253–260.
28. Døskeland A.P., Flatmark T. (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1561–1569.
29. Sakata N., Dixon J.L. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1437**, 71–79.
30. Medvedev A.E., Kinkel A.Z., Kamyshanskaya N.S., Axenova L.N., Moskvitina T.A., Gorkin V.Z., Andreeva N.I., Golovina S.M., Mashkovsky M.D. (1994) *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 303–308.
31. Laemmli U.K. (1970) *Nature (London)*, **227**, 680–685.

Поступила: 25. 06. 2007.

UBIQUITIN CAUSES SELECTIVE INCREASE IN THE SENSITIVITY OF RAT BRAIN
MITOCHONDRIAL MONOAMINE OXIDASES TO VARIOUS PROTEASES

O.A. Buneeva¹, M.V. Medvedeva², A.E. Medvedev¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10,
Moscow, 119121 Russia; fax: (495) 2450857; e-mail: Olga.Buneeva@ibmc.msk.ru

²School of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

Incubation of rat brain mitochondria with ubiquitin and ATP followed by subsequent mitochondria sedimentation was accompanied by reduction of ubiquitin content in the supernatant. This decrease was more pronounced in the presence of ATP-regenerating system in the incubation medium (creatine phosphate/creatine phosphokinase). This ubiquitin incorporation into brain mitochondria observed only in the presence of ATP in the incubation medium increased sensitivity of monoamine oxidases (MAO) A and B to proteolytic inactivation by trypsin and papain, respectively. (Ubiquitin did not influence sensitivity of MAO B to trypsin and MAO A to papain). The data obtained suggest that ubiquitin incorporation into rat brain mitochondria increases susceptibility of MAOs to certain exogenous proteases, however, it remains unclear whether these changes stem from direct MAO-ubiquitin conjugation or reflect alterations in the membrane environment of these enzymes.

Key words: monoamine oxidase, ubiquitin, proteolytic degradation, rat brain mitochondria, trypsin, papain.