

УДК 557.15.02;577.15.06

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ УБИКВИТИН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МОНОАМИНОКСИДАЗ К ПРОТЕОЛИЗУ И СПЕЦИФИЧЕСКОМУ ИНГИБИТОРУ ПАРГИЛИНУ

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 (499) 245-05-09; эл. почта: olga.buneeva@ibmc.msk.ru

²МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

Включение экзогенного убиквитина в митохондрии мозга крысы в присутствии в среде инкубации АТР и АТР-регенерирующей системы (креатинфосфат-креатинфосфокиназа) вызывает повышение чувствительности моноаминоксидаз А и Б к механизм-активированному ингибитору паргилину и увеличение включения [³H]паргилина в митохондрии, которое было особенно заметно во фракции, полученной в результате иммунопреципитации митохондриальных белков антисывороткой к убиквитину и протеин А-сефарозой. Это свидетельствует о том, что МАО являются потенциальным субстратом для убиквитинирования. Однако содержание тритиевой метки в данной фракции в контроле составляло менее 0,1%, а после инкубации с АТР и убиквитином не более 0,25% от общего количества связанного с митохондриями [³H]паргилина. Включение убиквитина в митохондрии не оказывало влияния на величины молекулярных масс меченных [³H]паргилином белков. Эти результаты свидетельствуют о том, что прямое убиквитинирование моноаминоксидаз интактных митохондрий вряд ли играет решающую роль в выраженных изменениях чувствительности МАО А и МАО Б к протеолизу и специфическому ингибированию, обнаруженным в данных экспериментальных условиях. По-видимому, эти эффекты опосредованы более сложными процессами, происходящими в митохондриальной мембране в ходе АТР-зависимого включения убиквитина в эти органеллы.

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

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что в протеолизе цитозольных белков ключевая роль принадлежит убиквитин-протеасомной системе. Протеасомы - сложные надмолекулярные комплексы, осуществляющие энергозависимый протеолиз, - обнаружены в цитоплазме, перинуклеарном пространстве и ядре всех эукариотических клеток [1, 2]. Убиквитин – один из основных компонентов протеасомной системы – представляет собой белок с молекулярной массой 8 кДа, с помощью которого осуществляется мечение подвергающихся деградации белков путем ковалентного присоединения полиубиквитиновой цепи [3].

Наиболее изученная функция убиквитина – полиубиквитинирование белков для их дальнейшей деградации в протеасоме. Модифицируя различные белки-мишени, убиквитин принимает участие также во многих других внутриклеточных процессах: в регуляции экспрессии генов, клеточного цикла и деления, ответе на стресс, элиминации поврежденных белков, репарации ДНК, импорте белков в митохондрии, сборке рибосом, апоптозе и др. (в этом случае происходит моноубиквитинирование) [4-6]. Процесс убиквитинирования протекает

* - адресат для переписки

в несколько этапов с участием различных ферментов: убиквитин-активирующего, убиквитин-конъюгирующего и убиквитин-лигазы [3]. В отличие от белков цитозоля, роль убиквитина в обмене митохондриальных белков изучена недостаточно и конкретные убиквитинированные белки митохондрий до сих пор не идентифицированы [7-9], хотя существование убиквитин-конъюгирующей системы в митохондриях млекопитающих было показано в ряде работ [2, 8-9]. Ранее мы продемонстрировали, что включение экзогенного убиквитина в митохондрии мозга крыс *in vitro* сопровождается повышением чувствительности моноаминоксидазы к протеолитической инактивации [10, 11].

Моноаминоксидаза (МАО; КФ 1.4.3.4) – интегральный фермент внешней мембраны митохондрий - осуществляет окислительное дезаминирование важнейших медиаторных моноаминов в центральной нервной системе и периферических тканях [12, 13]. Известны две формы фермента: МАО А и МАО Б, – аминокислотные последовательности которых совпадают приблизительно на 70%. МАО А и МАО Б кодируются различными генами и характеризуются разной субстратной специфичностью и чувствительностью к низким концентрациям ингибиторов хлоргелина и (-)-депренила [12, 13].

Ранее группой McCauley было установлено, что *in vitro* новосинтезированные молекулы МАО А и Б встраиваются во внешнюю мембрану митохондрий убиквитин- и АТР-зависимым образом [14, 15]. 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 [16-18].

Мы показали также, что АТР-зависимое включение экзогенного убиквитина в митохондрии мозга крысы, во-первых, повышается в присутствии АТР-регенерирующей системы креатинфосфат-креатинфосфокиназа и, во-вторых, приводит к селективному изменению чувствительности МАО А и МАО Б к определенным протеиназам [11]. В результате включения убиквитина в митохондрии чувствительность МАО А мозга крысы к протеолитической деградации под действием трипсина увеличивалась на 20%, а чувствительность МАО Б к протеолизу под действием папаина – более чем в два раза [11]. Вопрос, обусловлены ли эти изменения прямым убиквитинированием моноаминоксидаз или они опосредованы более сложными процессами, происходящими в мембране митохондрий при включении убиквитина, оставался открытым.

В настоящей работе для анализа эффекта убиквитина на МАО митохондрий при включении его в эти органеллы мы использовали мечение моноаминоксидаз необратимым ингибитором [³H]паргилином [19] и последующий анализ молекулярных масс меченых белковых конъюгатов методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

МЕТОДИКА. В работе использовали [¹⁴C]5-гидрокситриптамина креатинин сульфат, [¹⁴C]2-фенилэтиламина гидрохлорид, [³H]N-метил-N-бензил-пропаргиламина гидрохлорид (паргилин) (“Amersham”, Англия). Остальные реактивы были приобретены у “Sigma-Aldrich” (Россия).

Митохондрии мозга крысы выделяли, как описано ранее [20], 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 трис-НСl, рН 7,5, 2 мМ MgCl₂, 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, pH 7,4 (до концентрации белка 1 мг/мл) и инкубировали с паргилином при 37°C в течение 30 мин в присутствии ингибиторов протеаз, бацитрацина (0,001%) и фенилметансульфонил-фторида (0,1 мМ). Инкубацию останавливали, добавляя 20-кратный избыток холодного буфера. Митохондрии осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 30 мин.

Мечение моноаминоксидаз [³H]паргилином (удельная активность 25 Ки/ммоль) осуществляли в 0,05 М фосфатном буфере, содержащем бацитрацин (0,001%) и фенилметилсульфонилфторид (0,1 мМ). После инкубации с 2 мкМ [³H]паргилином в течение 2-х или 18-ти часов при 37°C [19] митохондрии мозга осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 30 мин. Для удаления несвязавшегося [³H]паргилина митохондрии промывали тем же буфером. Иммунопроципитацию белков митохондрий, подвергнутых преинкубации с убиквитином-АТР и затем с [³H]паргилином, осуществляли при помощи антисыворотки к убиквитину и протеин А-сепарозы, следуя протоколу производителя ("Sigma").

Меченные [³H]паргилином митохондрии анализировали методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Гель, растворимый в перйодате натрия, готовили с использованием специальной сшивки – диаллилтартардиамида (ДАТД) [20]. Электрофорез проводили в системе Вебера-Осборна [21], так как использование фосфатного буфера вместо трис-буфера улучшает характеристики геля с этой сшивкой [22]. Окрашенный 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 [23] гель нарезали на полосы шириной 1-2 мм (в диапазоне выявленных белков с молекулярной массой 45-110 кДа) и после растворения в перйодате натрия определяли радиоактивность геля с использованием сцинтилляционной смеси, приготовленной, как описано в [24]. Строили количественную зависимость измеренной радиоактивности (импульсы/мин) от молекулярной массы и определяли процентное соотношение между различными формами моноаминоксидазы по площади полученных пиков.

Активность МАО А и МАО Б определяли радиометрически с использованием 0,1 мМ [¹⁴C]5-гидрокситриптамина и 0,05 мМ [¹⁴C]2-фенилэтиламина, соответственно [25]. Удельная радиоактивность обоих субстратов составляла 10 Ки/моль.

Влияние протеиназ на активность МАО А и МАО Б митохондрий мозга крыс, преинкубированных с убиквитином, определяли, как описано ранее [11].

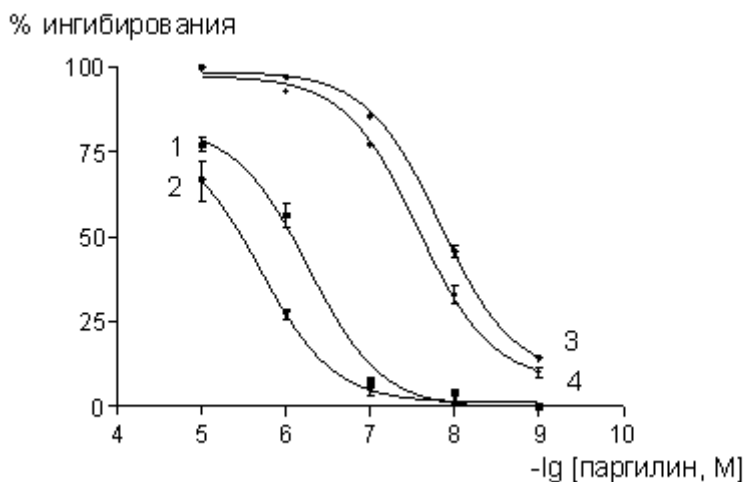
Результаты обрабатывали статистически, используя критерий Стьюдента для парных выборок, различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В соответствии с предыдущими данными [11], инкубация митохондрий с убиквитином приводила к снижению содержания последнего в надосадочной жидкости (после осаждения митохондрий из нее) только в присутствии АТР и АТР-регенерирующей системы (данные не приведены). Включение убиквитина в митохондрии сопровождалось увеличением чувствительности МАО А к трипсину, а МАО Б – к папаину (табл. 1).

Таблица 1. Влияние преинкубации с убиквитином на остаточную активность МАО А и Б митохондрий мозга крысы, подвергнутых последующей обработке трипсином или папаином.

МАО	Протеиназа	Преинкубация с АТР	Преинкубация АТР+убиквитин	p
А	Трипсин	70,3±2,9	44,2±3,1	<0,001
А	Папаин	21,7±6,1	21,3±5,8	>0,8
Б	Трипсин	98,7±2,6	93,2±2,4	>0,5
Б	Папаин	81,0±6,5	24,8±6,1	<0,001

Примечание. Условия преинкубации митохондрий с убиквитином описаны в разделе "Методика". За 100% принимали активность МАО в контрольных митохондриях мозга, которые инкубировали в отсутствие протеиназ. Представлены средние значения (± ошибка средней) 3-6 независимых экспериментов.

**Рисунок.**

Влияние преинкубации митохондрий мозга крысы с АТР и АТР-регенерирующей системой в присутствии (кривые 1,3) и в отсутствие (кривые 2,4) убиквитина на чувствительность к паргилину МАО А (1,2) и МАО В (3,4).

Инкубация препаратов митохондрий мозга крысы 2 мкМ паргиллином в течение 2-х часов при 37°C приводила к уменьшению активности как МАО А (рисунок, кривая 1), так и МАО В (рисунок, кривая 3). Предварительная обработка митохондрий убиквитином в присутствии АТР и АТР-регенерирующей системы вызывала заметное снижение величины IC₅₀ (концентрации ингибитора, необходимой для 50%-ного ингибирования ферментативной активности) для МАО А (с $4,17 \pm 0,12$ до $0,72 \pm 0,23$ мкМ, $p < 0,001$) и для МАО В (с $26,3 \pm 1,1$ до $13,2 \pm 1,0$ мкМ, $p < 0,001$) (ср. кривые 1,2 и кривые 3,4, соответственно).

Убиквитин-зависимое увеличение чувствительности МАО к паргиллину сопровождалось значительным увеличением включения [³H]паргиллина в митохондрии мозга крысы (с $57,0 \pm 7,0$ до $84,4 \pm 9,2$ фмоль/мг белка; $+48 \pm 11\%$, $p < 0,01$). При этом было отмечено 5-кратное увеличение включения [³H]паргиллина во фракцию митохондрий мозга крысы, осаждаемую путем последовательной обработки митохондриальных препаратов антисывороткой к убиквитину и протеин А-сефарозой (с $0,04 \pm 0,02$ до $0,19 \pm 0,03$ фмоль/мг белка, $n=2$).

Последующий анализ молекулярных масс [³H]паргиллин-меченых белков показал, что в митохондриях выявляются три фракции белков, содержащих тритиевую метку. Их количественное соотношение было примерно одинаковым (табл. 2). Молекулярные массы белков II и III фракций, обнаруженных в контрольных (инкубированных без убиквитина) митохондриях ($64,2 \pm 2,0$ кДа и $47,0 \pm 2,0$ кДа), соответствовали молекулярным массам моноаминоксидаз А и В [26]. Кроме того, была выявлена еще одна фракция (I) с молекулярной массой $84,0 \pm 3,0$ кДа, на долю которой приходилось около 33% прочно связанной с митохондриальной фракцией тритиевой метки. Поскольку на сегодняшний день паргиллин-связывающие белки ассоциируются только с МАО (А или В), данная фракция может представлять собой димер, по-видимому, МАО-В, устойчивый к действию додецилсульфата. (Существование димеров, стабильных в присутствии додецилсульфата, хорошо описано в литературе, в том числе для мозга и др. тканей крысы [27, 28]). Это и другие возможные предположения (например, прочное связывание меченого паргиллина другими белками) требуют отдельного изучения.

Таблица 2. Влияние убиквитина на относительное распределение [³H]изатин-связывающих белков мозга крысы.

Белковые фракции	Контроль		Инкубация с убиквитином	
	Молекулярная масса, кДа	Количество, % от общего	Молекулярная масса, кДа	Количество, % от общего
I	84,0±3,0	33,0±4,0	81,0±2,0	27,0±6,0
II	64,2±2,0	44,0±4,7	69,0±3,0	34,6±5,0
III	47,0±2,0	37,0±6,0	45,0±1,0	51,0±9,0

Примечание. Условия преинкубации митохондрий с убиквитином и последующего мечения белков [³H]паргилином описаны в разделе "Методика". За 100% принято 57,0±7,0 (контроль) и 84,4±9,2 (инкубация с убиквитином и АТР) фмоль связанного [³H]паргилина на 1 мг белка. Представлены средние значения 6-10 независимых экспериментов.

Как видно из данных таблицы 2, инкубация митохондрий с убиквитином в присутствии АТР и АТР-регенерирующей системы не приводила к значимому изменению молекулярных масс меченых белков. Не было отмечено и увеличения значений молекулярных масс меченых белков или изменения соотношения белков (увеличения доли высокомолекулярных форм) и при более длительной (до 18 часов) инкубации митохондрий с [³H]паргилином (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты данного исследования показывают, что включение убиквитина в митохондрии приводит к увеличению чувствительности МАО А и МАО Б к протеолитической инактивации определёнными (но не всеми) протеиназами (трипсином и папаином, соответственно), а также к специфическому ингибитору паргилину. Убиквитин-зависимое увеличение чувствительности к паргилину сопровождалось статистически значимым увеличением включения [³H]паргилина в митохондрии. Последнее было особенно заметно при иммунопреципитации митохондриальных белков, в результате последовательной обработки препаратов митохондрий антисывороткой к убиквитину и протеин А-сефарозой.

Поскольку на сегодняшний день меченные [³H]паргилином белки ассоциируются только с моноаминоксидазами, приведенные выше данные свидетельствуют в пользу потенциального убиквитинирования митохондриальных МАО. Однако следует подчеркнуть, что фракция, полученная в результате иммунопреципитации митохондриальных белков антисывороткой к убиквитину и протеин А-сефарозой, содержит всего 0,07% тритиевой метки в контрольных митохондриях и 0,23% тритиевой метки в обработанных убиквитином и АТР митохондриях. Другими словами, митохондриальные МАО являются "плохим" субстратом убиквитинирования *in vitro*. Поскольку ошибка эксперимента в опытах по определению молекулярной массы меченных [³H]паргилином белков была значительно выше (табл. 2), очевидно, что убиквитин-зависимые изменения молекулярной массы митохондриальных белков не могут быть выявлены в использованной нами системе.

С другой стороны, изменение чувствительности МАО к протеиназам и паргилину, наблюдаемое в условиях включения экзогенного убиквитина в митохондрии мозга крысы, не может быть объяснено прямым убиквитинированием очень маленькой фракции МАО. Вероятно, эти эффекты обусловлены опосредованным изменением свойств этих мембранных ферментов в ходе убиквитинирования других компонентов митохондрий. Например, недавно

показано, что новая митохондриальная убиквитинлигаза MITOL, локализованная (как и MAO) во внешней мембране митохондрий, в клетках HeLa может подвергаться аутоубиквитинированию [29]. Это влияет на динамические характеристики данных органелл и, очевидно, на свойства их мембраносвязанных белков.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Ciechanover A., Orian A., Schwartz A.L. (2000) Bioassays, **22**, 442-451.
2. Бунеева О.А., Медведев А.Е. (2006) Биохимия, **71**, 851-860.
3. Ciechanover A. (1994) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **375**, 565-581.
4. Hershko A. (2005) Cell Death Differ., **12**(9), 1191-1197.
5. Welchman R.L., Gordon C., Mayer R.J. (2005) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **6**(8), 599-609.
6. Varshavsky A. (2005) Trends Biochem. Sci., **30**(6), 283-286.
7. Sherman M.Y., Goldberg A.L. (2001) Neuron, **29**, 15-32.
8. 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.
9. Mangani M., Serafini G., Antonelli A., Malatesta M., Gazzanelli G. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 21018-21024.
10. Buneeva O.A., Medvedeva M.V., Medvedev A.E. (1999) Neurobiology, **7**, 257.
11. Бунеева О.А., Медведева М.В., Медведев А.Е. (2007) Биомед. химия, **53**, 603-608.
12. Abell, C.W., Kwan, S.W. (2001) Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **65**, 129-156.
13. Shih J.C., Chen K., Ridd M.J. (1999) Annu. Rev. Neurosci., **22**, 197-217.
14. Zhuang Z., McCauley R. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 14594-14596.
15. Zhuang Z., Marks B., McCauley R. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 591-596.
16. Medvedev A.E., Gorkin V.Z. (1994) Int. J. Devel. Neurosci., **12**, 151-155.
17. Medvedev A.E., Kinkel A., Kamyshanskaya N., Gorkin V. (1993) Int. J. Biochem., **25**, 1791-1799.
18. Медведев А.Е., Тунтон К.Ф. (1997) Вопросы мед. химии, **43**, 471-481.
19. Anderson M.C., Tipton K.F. (1994) J. Neural. Transm. Suppl., **41**, 47-53.
20. Anker H.S. (1970) FEBS Lett., **7**, 293.
21. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., **244**, 4406-4412.
22. Spath P.J., Koblet H. (1979) Anal. Biochem., **93**, 275-285.
23. Spector T. (1978) Anal. Biochem., **86**, 142-146.
24. Anderson L.E., McClure W.O. (1973) Anal. Biochem., **51**, 173-179.
25. 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.
26. Callingham B.A., Parkinson D., In Singer T.P., Von Korff R.W., Murphy D.L. (Eds.) (1979) Academic Press, New York, pp. 81-86.
27. Nyborg A.C., Kornilova A.Y., Jansen K., Ladd Th.B, Wolfe M.S., Golde T.E. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 15153-15160.
28. Grohmann U., Orabona C., Bianchi R., Belladonna M.L., Fioretti M.C., Puccetti P. (2000) Cytokine, **12**, 401-404.
29. Yonashiro R., Ishido S., Kyo S., Fukuda T., Goto E., Matsuki Y., Ohmura-Hoshino M., Sada K., Hotta H., Yamamura H., Inatome R., Yanagi S. (2006) EMBO J., **25**, 3618-3626.

Поступила 28.06. 2008.

ANALYSIS OF UBIQUITIN-DEPENDENT INCREASE IN MONOAMINE OXIDASE
SENSITIVITY TO PROTEOLYSIS AND SPECIFIC INHIBITION

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: (499) 2450857; e-mail: olga.buneeva@ibmc.msk.ru

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

Insertion of exogenous ubiquitin into rat brain mitochondria in the presence of ATP and the ATP-regenerating system (creatine phosphate/creatine phosphokinase) is accompanied by the increase in: i) sensitivity of mitochondrial monoamine oxidases A and B to proteolytic inactivation (by trypsin and papain, respectively); ii) inhibition by mechanism based inhibitor, pargyline; iii) in [³H]-pargyline insertion into mitochondria ($+48 \pm 11\%$, $p < 0.01$). There was almost fivefold increase in [³H]-pargyline incorporation into the fraction obtained by immunoprecipitation of mitochondrial proteins with anti-ubiquitin antiserum and protein A Sepharose. This suggests that MAO is a potential substrate for ubiquitination *in vitro*. However, the content of the tritium label in this fraction was less than 0.1% and not more than 0.25% of total radioactivity of [³H]pargyline bound to control and ATP-ubiquitin treated mitochondria, respectively. Insertion of ubiquitin into mitochondria did not influence molecular masses of [³H]-pargyline labeled proteins (MAO A and B). These results suggest that direct ubiquitination of MAO insignificantly contributes to marked changes in sensitivity of MAO A and MAO B to proteolysis and specific inhibition found under these experimental conditions. It is possible that more complex processes are involved into realization of these effects during ATP-dependent ubiquitin incorporation into mitochondria.

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