Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 615-622.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.112
©Коллектив авторов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО УБИКВИТИНА ДЛЯ БИОСЕНСОРНОГО АНАЛИЗА УБИКВИТИНОВОГО СУБИНТЕРАКТОМА МИТОХОНДРИЙ

О.А. Бунеева[1], О.В. Гнеденко[1], М.В. Медведева[2], А.С. Иванов[1], А.Е. Медведев[1]*

[1]Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
Погодинская ул., 10, 119121 Москва; факс (499)245-0857;
эл. почта: professor57@yandex.ru
[2]МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет

Убиквитинирование белков является важным механизмом, который не только обеспечивает специфическое мечение для последующей деградации, но и во многом определяет локализацию белков в клетке и регуляцию белок-белковых взаимодействий. В контексте белок-белковых взаимодействий решающую роль играет присоединение (моно/поли)убиквитиновых молекул к белкам, содержащим специфические убиквитин-связывающие домены. Формирование убиквитинового интерактома показано для цитозоля. Вовлечение в такого рода взаимодействия митохондрий и ассоциированных с ними экстрамитохондриальных белков изучено значительно хуже. В настоящем исследовании с использованием оптического биосенсора показано связывание белков лизата митохондриальной фракции мозга мышей с иммобилизованным мономерным убиквитином. Модельные очищенные белки (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, креатинкиназа), ассоциированные с внешним компартментом митохондрий, взаимодействовали как с иммобилизованным убиквитином, так и между собой. Это свидетельствует в пользу того, что (поли)убиквитиновые цепи могут участвовать в белок-белковых взаимодействиях между убиквитинированными и неубиквитинированными белками и вносить определенный вклад в формирование (митохондриального) убиквитинового субинтерактома.

Ключевые слова: убиквитинирование, митохондрии, белок-белковые взаимодействия, субинтерактом, биосенсорный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Биологические процессы в живых системах, как правило, осуществляются при помощи различных белков, которые взаимодействуют друг с другом, формируя стабильные или временные белковые комплексы, анализом которых занимается относительно молодая наука интерактомика [1]. Термин интерактом определяет всю совокупность белок-белковых взаимодействий (сетей), существующих в конкретном объекте в данный конкретный момент времени. Картирование индивидуальных компонентов белковых комплексов, осуществляющих непрямые взаимосвязи между белками, включает выделение этих комплексов при помощи различных вариантов аффинной хроматографии с последующей масс-спектрометрической идентификацией [2-5].

Поскольку белок-белковые взаимодействия в клетке постоянно изменяются, становится всё более очевидным, что развитие болезней неминуемо сопровождается нарушением функционирования различных белок-белковых сетей (интерактомов) [4].

Убиквитин – белок с молекулярной массой 8 кДа – состоит из 76 аминокислотных остатков и встречается во всех эукариотических клетках. Помимо широко известной функции убиквитина – специфического мечения белков-мишеней для их последующей деградации в протеасомах, – этот белок участвует во многих других внутриклеточных

* - адресат для переписки

процессах: регуляции экспрессии генов, клеточного цикла и деления, ответе на стресс, элиминации поврежденных белков, репарации ДНК, импорте белков в митохондрии, сборке рибосом, апоптозе и других [6-9]. Таким образом, убиквитинирование является модификацией, которая может определять локализацию белков в клетке, функцию белков, а также регулировать белок-белковые взаимодействия [10]. При этом решающую роль здесь играет присоединение единичных убиквитиновых молекул либо полиубиквитиновых цепей к белку-мишени, а также наличие специфических убиквитин-связывающих доменов, определяющих нековалентное присоединение убиквитиновых цепей к поверхности белков. Наличие нескольких различных таких доменов является важным фактором в механизмах межмолекулярной регуляции [11, 12].

Формирование убиквитинового интерактома показано для цитозоля [13]. Известно, что митохондрии мозга обладают собственной убиквитин-конъюгирующей системой [14, 15], однако роль убиквитина в судьбе митохондриальных и ассоциированных с ними экстрамитохондриальных белков млекопитающих вообще, а белков мозга в особенности, изучена значительно хуже [16, 17].

Недавно, используя систему инкубации митохондрий мозга с биотинилированным убиквитином *in vitro*, мы впервые идентифицировали около 50 убиквитин-связывающих белков, ассоциированных с митохондриальной фракцией мозга [18]. При этом наличие так называемой “убиквитиновой сигнатуры”, свидетельствующей о прямом убиквитинировании, было обнаружено всего у 12% белков. Последнее свидетельствует о том, что остальные белки, по-видимому, образуют комплексы либо с самим убиквитином, либо с другими экстра- и интрамитохондриальными компонентами, внося определенный вклад в формирование убиквитинового субинтерактома митохондрий [18].

Многое в данном контексте может прояснить изучение взаимодействий иммобилизованного убиквитина как с компонентами митохондрий, так и с индивидуальными белками.

В настоящей работе с помощью оптического биосенсора Biacore T200 мы исследовали взаимодействие белков лизата митохондриальной фракции мозга мышей, а также очищенных белков (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) и креатинкиназы) с мономерным убиквитином. Ранее глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и креатинкиназа были нами обнаружены в числе не содержащих “убиквитиновой сигнатуры” убиквитин-связывающих белков суммарной митохондриальной фракции мозга мыши [18].

МЕТОДИКА

Реактивы и оборудование

HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергента P20, 10 мМ HEPES (pH 7,4)); 10 мМ ацетатный буфер (pH 4,5); 10 мМ ацетатный буфер (pH 5,5); набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), 1 М этаноламин-HCl (pH 8,5)) были получены от “GE Healthcare” (США). Креатинкиназа из мышц кролика, убиквитин из эритроцитов быка, Sephadex G-50 fine, АТР, фосфокреатин, МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин гидрохлорид), изатин, реактивы для определения активности и чистоты глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы были получены от “Sigma-Aldrich” (США).

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу выделяли из мышц кролика, как описано в [19], хранили в суспензии в сульфате аммония (насыщение 0,9) при 4°C. Чистоту препарата контролировали электрофоретически. Непосредственно перед экспериментом фермент обессоливали на колонках SigmaPrep Spin и переводили в 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4) с помощью гель-фильтрации при центрифугировании, как описано в инструкции, используя в качестве носителя Sephadex G-50 fine. Активность ГАФД измеряли спектрофотометрически при 340 нм по скорости образования NADH. Реакционная смесь содержала 50 мМ глициновый буфер (pH 10,0), 50 мМ фосфат калия, 5 мМ ЭДТА, 1 мМ глицеральдегид-3-фосфат и 1 мМ NAD^+. Реакцию начинали добавлением фермента. Активность фермента составляла 120 мкмоль/мин на 1 мг белка.

Концентрацию белка определяли при помощи метода Бредфорд [20] на спектрофотометре Cary 50 (“Varian”, Австралия).

Получение лизатов митохондрий мозга мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом.

В работе использовали стандартное моделирование МФТП-индуцированного паркинсонизма у мышей [21, 22]. Введение

эндогенного нейропротектора изатина (100 мг/кг) осуществляли за 30 минут до введения МФТП. Митохондрии мозга мыши выделяли, как описано ранее [23]; осадок митохондрий суспендировали в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4). Лизаты митохондрий получали при инкубации препаратов в присутствии 3% Тритона X-100 (4°C, 60 мин, концентрация белка 6 мг/мл).

Анализ белок-белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора.

Эксперименты по исследованию белок-белковых взаимодействий выполняли на оптическом SPR-биосенсоре Biacore T200 (“GE Healthcare”). Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 (“GE Healthcare”), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана.

Иммобилизация убиквитина.

Карбоксильные группы декстрана активировали путём пропускания смеси 0,2 M EDC/0,05 M NHS в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин с последующей промывкой HBS-буфером в течение 3 мин при той же скорости. Далее осуществляли иммобилизацию убиквитина путём пропускания его раствора (50 мкг/мл) в иммобилизационном 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Не прореагировавшие с белком активированные карбоксильные группы декстрана блокировали 1 М раствором этаноламина (pH 8,5) в течение 3 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

Иммобилизация ГАФД.

Карбоксильные группы декстрана активировали путём пропускания смеси 0,2 M EDC/0,05 M NHS в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин с последующей промывкой HBS-буфером в течение 3 мин при той же скорости. Далее осуществляли иммобилизацию ГАФД путём пропускания раствора фермента (50 мкг/мл) в иммобилизационном 10 мМ ацетатном буфере (pH 5,5) в течение 7 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Не прореагировавшие с белком активированные карбоксильные группы декстрана блокировали 1 М раствором этаноламина (pH 8,5) в течение 2 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

Взаимодействие ГАФД с иммобилизованным убиквитином и взаимодействие креатинкиназы с иммобилизованными ГАФД и убиквитином исследовали в диапазонах концентраций от 3 мкМ до 20 мкМ и от 5 мкМ до 47 мкМ, соответственно. В качестве рабочего буфера использовали 50 мМ калий фосфатный буфер (pH 7,4). После пропускания каждого образца белков в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин поверхность чипа регенерировали буфером, содержащим 1 М NaCl, 50 мМ калий фосфатный буфер (pH 7,4) в течение 0,5 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Канал без иммобилизованного белка использовали в качестве контрольного.

Расчёт равновесных констант диссоциации (K_d) белковых комплексов выполняли с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 (“GE Healthcare”).

Взаимодействие с иммобилизованным убиквитином лизатов митохондрий мозга мыши исследовали при концентрации белка 1 мг/мл. Все остальные параметры биосенсорного анализа были аналогичны используемым при исследовании взаимодействия с убиквитином ГАФД и креатинкиназы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Связывание компонентов лизата митохондрий контрольных мышей на поверхности чипа оптического биосенсора с иммобилизованным мономерным убиквитином приводило к появлению характерного сигнала, свидетельствующего о взаимодействии компонентов лизата с иммобилизованным белком (рис. 1). При добавлении того же количества лизата митохондрий мозга мышей с МФТП индуцированным паркинсонизмом сигнал биосенсора был заметно выше (рис. 1). Это согласуется с ранее полученными нами данными, что при введении МФТП происходит увеличение числа белков, специфически связывающихся с иммуноаффинным сорбентом с иммобилизованными на протеин А-сефарозе антителами к убиквитину [22]. Введение нейропротекторного соединения изатина контрольным мышам и мышам с МФТП-индуцированным паркинсонизмом снижало сигнал биосенсора ниже контрольных значений (рис. 1). Это свидетельствует в пользу того, что развитие экспериментального паркинсонизма у мышей и введение нейропротекторной дозы изатина влияют на убиквитиновый субинтерактом митохондрий мозга.

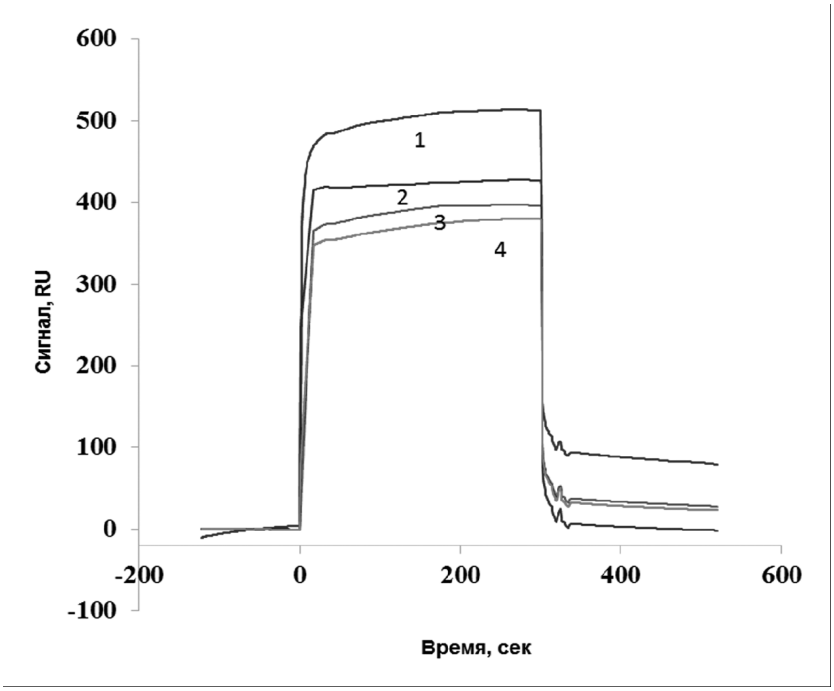

Рисунок 1. Взаимодействие лизатов митохондрий мозга мыши с иммобилизованным убиквитином. Концентрация белка 1 мг/мл. 1 - МФТП, 2 - контроль, 3 - изатин + МФТП, 4 - изатин.

Связывание ГАФД или креатинкиназы на поверхности чипа с иммобилизованным мономерным убиквитином приводило к концентрационно-зависимому увеличению сигнала биосенсора (рис. 2 и 3). Расчётные величины K_d составили 19,5 мкМ и 3,9 мкМ, соответственно. В присутствии субстратов (1 мМ фосфокреатина, 5 мМ АТР) и кофактора (2 мМ Mg^{2+}) связывание креатинкиназы с иммобилизованным убиквитином увеличивалось. Креатинкиназа столь же эффективно взаимодействовала и с ГАФД (K_d=5,05 мкМ), иммобилизованной на поверхности чипа оптического биосенсора (рис. 4).

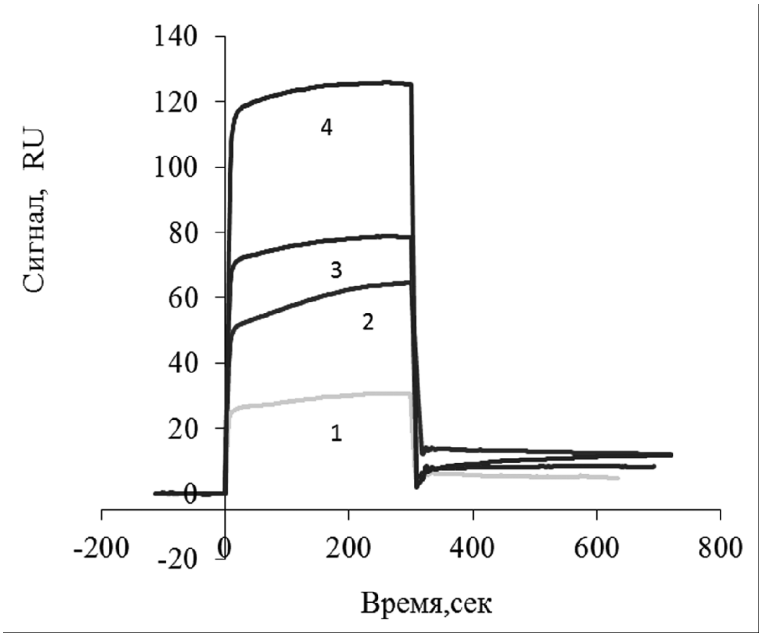

Рисунок 2. Взаимодействие глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназы с иммобилизованным убиквитином. Концентрация ГАФД: 1 - 3 мкМ, 2 - 6 мкМ, 3 - 10 мкМ, 4 - 20 мкМ.

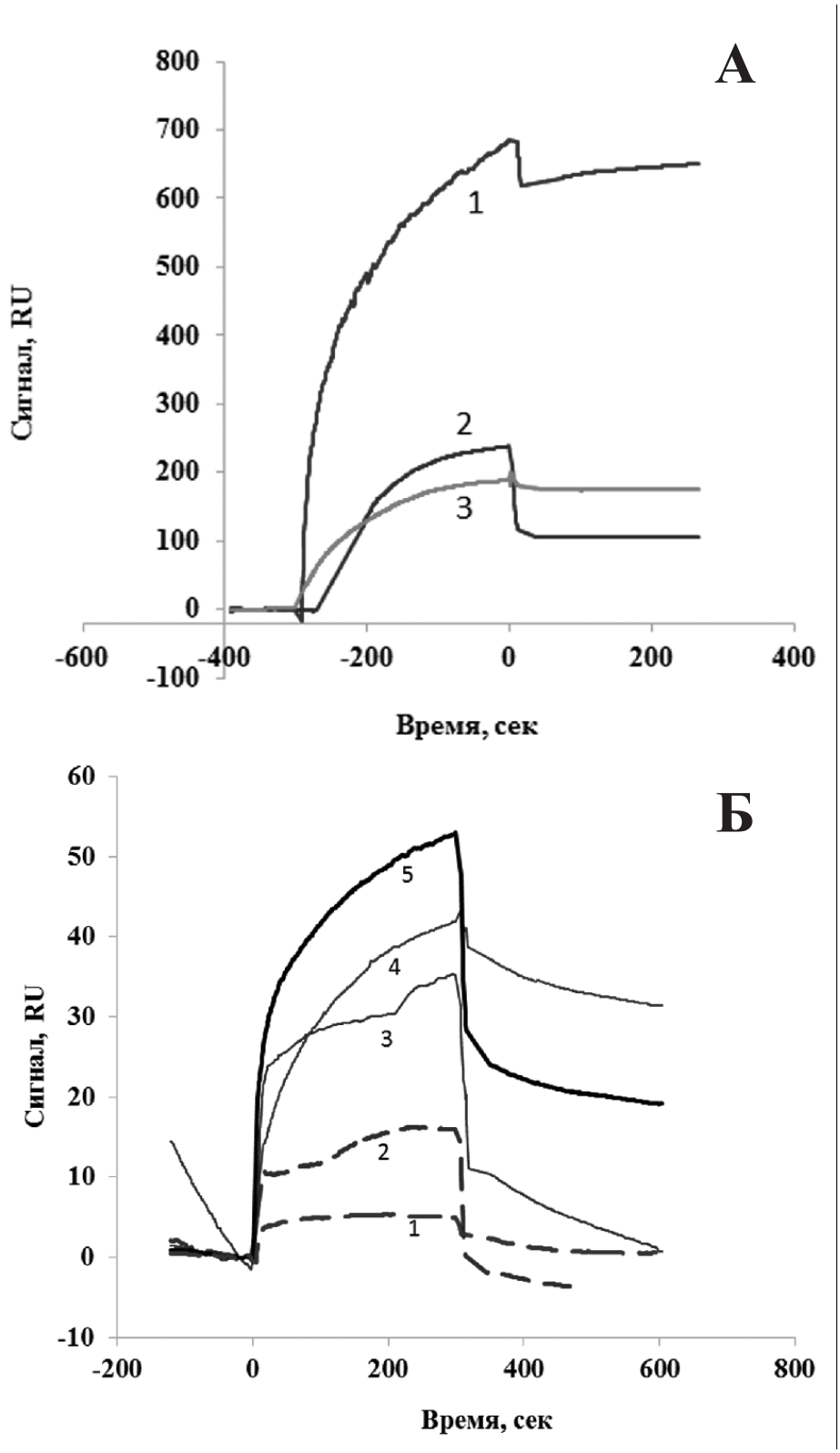

Рисунок 3. Взаимодействие креатинкиназы с иммобилизованным убиквитином (а) и влияние её субстратов на это взаимодействие (б).
(А) Концентрация креатинкиназы: 1 - 5,9 мкМ, 2 - 25 мкМ, 3 - 47 мкМ.
(Б) концентрации креатинкиназы и других добавок: 1 - 1 мМ фосфокреатин, 2 - 5 мМ АТР, 3 - 1 мкМ креатинкиназа +1 мМ фосфокреатин, 4 - 1 мкМ креатинкиназа +5 мМ АТР, 5 - 1 мкМ креатинкиназа + 5 мМ АТР+ 1 мМ фосфокреатин + 2 мМ Mg^{2+}.

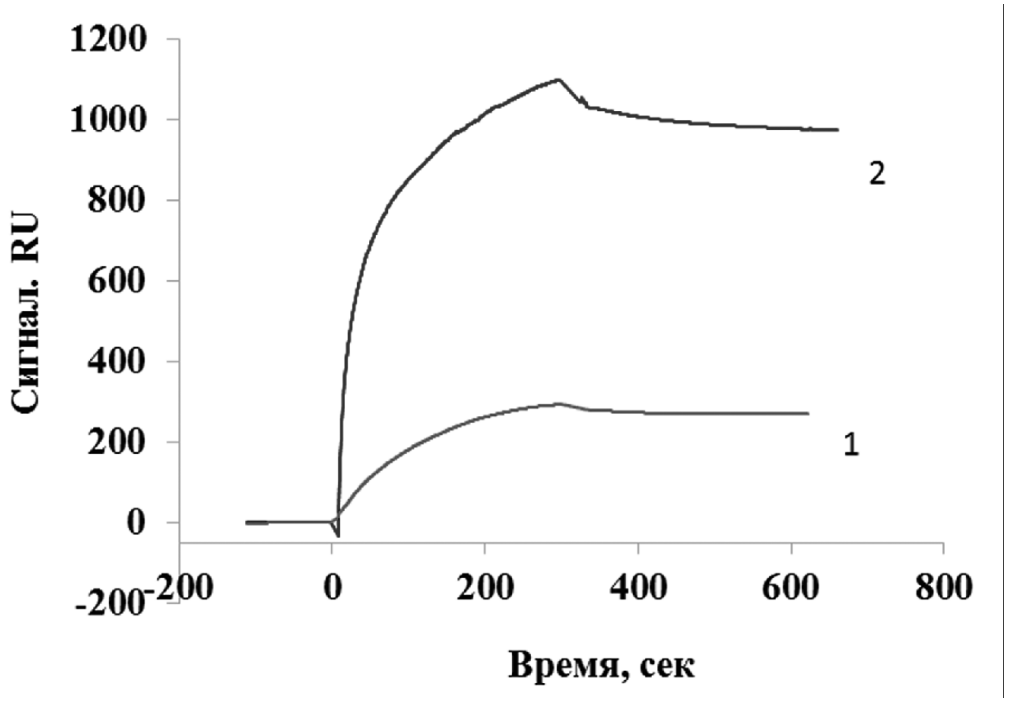

Рисунок 4. Взаимодействие креатинкиназы с иммобилизованной глицеральдегид-6-фосфатдегидрогеназой. Концентрация креатинкиназы: 1 - 5,9 мкМ, 2 - 47 мкМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Иммобилизованный на поверхности чипа оптического биосенсора мономерный убиквитин можно рассматривать как присоединенный к белку-мишени и взаимодействующий с окружающими компонентами (рис. 5). Важным условием для специфического нековалентного взаимодействия является наличие у потенциальных белков-партнеров убиквитин-связывающего домена [24]. Этот домен обнаружен у многих белков, включая ГАФД [13]. Хотя мы не нашли данных о существовании такого домена у мышечной креатинкиназы, известно, что этот фермент специфически взаимодействует с MuRF1 белком, который действует в качестве убиквитинлигазы в убиквитинировании этого фермента для последующей протеасомной деградации [25]. Мы полагаем, что с учётом этих данных обнаруженные в данном исследовании нековалентные взаимодействия с убиквитином не только ГАФД, но и креатинкиназы являются биологически значимыми. При этом важно отметить, что выраженность такого рода взаимодействий у креатинкиназы – фермента, не имеющего убиквитин-связывающего домена, – регулируется физиологическими концентрациями субстратов и кофакторов (фосфокреатином, АТР и ионами магния).

Хотя в настоящее время трудно определить, какие компоненты лизата митохондрий мозга ответственны за взаимодействие с иммобилизованным мономерным убиквитином, важность этих взаимодействий иллюстрирует тот факт, что они отличаются у контрольных мышей, животных с МФТП-индуцированным паркинсонизмом и при введении изатина. Очевидно, что развитие экспериментального МФТП-индуцированного паркинсонизма, характеризующееся нарушением энергетических функций митохондрий [26] и изменением процессов убиквитинирования [16, 26], сопровождается изменением убиквитинового субинтерактома митохондрий. Изатин – эндогенный нейропротектор [27]; препятствует развитию симптомов паркинсонизма в ряде экспериментальных моделей [28]. Поэтому уменьшение связывания компонентов митохондриальных лизатов с иммобилизованным убиквитином, наблюдающееся в случае введения изатина животным с МФТП-индуцированным паркинсонизмом, очевидно, свидетельствует в пользу нормализации белок-белковых взаимодействий в митохондриальном компартменте клеток мозга.

Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что иммобилизованный убиквитин может быть использован для биосенсорного анализа убиквитинового субинтерактома митохондрий и белок-белковых взамодействий его отдельных компонентов в очищенных системах.

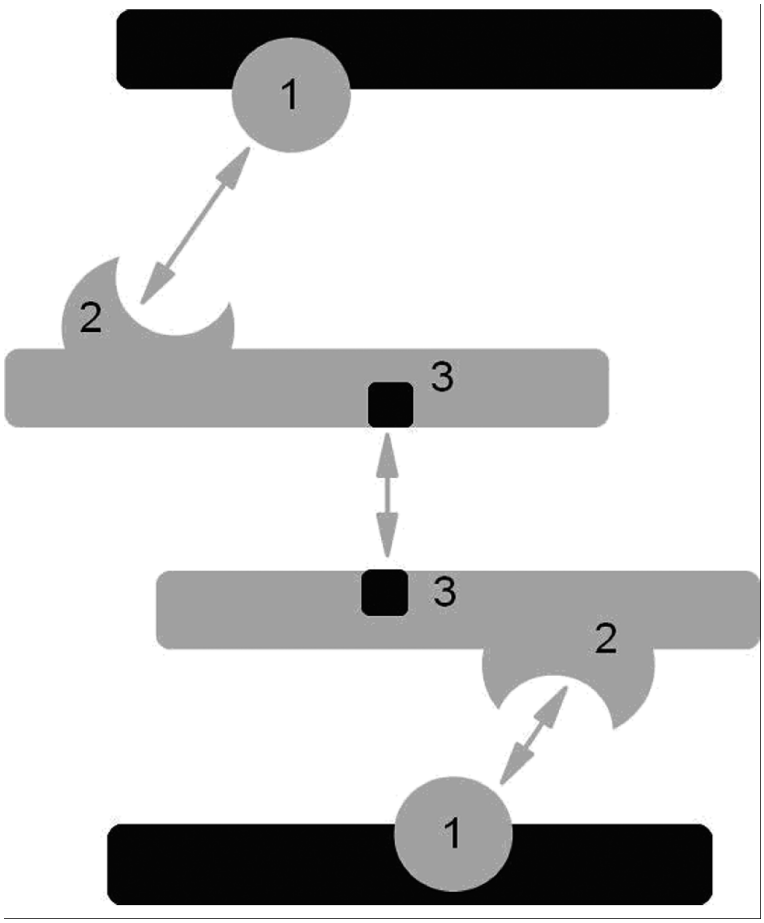

Рисунок 5. Один из возможных путей формирования убиквитинового интерактома (модифицировано из [11]): 1 - убиквитин, 2 - убиквитин-связывающий домен, 3 - домены олигомеризации.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект 13-04-00161а) и частично выполнена в рамках государственного задания по программе фундаментальных исследований Государственных премий..

ЛИТЕРАТУРА

1. *Иванов А.С., Згода В.Г., Арчаков А.И.* (2011) Биоорг. химия, **37**, 8-21.
2. *Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M., Séraphin B.* (1999) Nat. Biotechnol., **17**,1030-1032.
3. *Charbonnier S., Gallego O., Gavin A.C.* (2008) Biotechnol. Annu. Rev., **14**,1-28.
4. *Vidal M., Cusick M.E., Barabási A.L.* (2011) Cell, **144**, 986–998.
5. *Medvedev A., Kopylov A., Buneeva O., Zgoda V., Archakov A.* (2012) Proteomics, **12**, 621-637.
6. *Hershko A.* (2005) Cell Death Differ., **12**, 1191-1197.
7. *Wang H., Matsuzawa A., Brown S.A., Zhou J., Guy C.S., Tseng P.H., Forbes K., Nicholson T.P., Sheppard P.W., Häcker H., Karin M., Vignali D.A.* (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 20197-20202.
8. *Paul S.* (2008) Bioessays, **30**, 1172-1184.
9. *Cook C., Petrucelli L.* (2009) Biochim. Biophys. Acta, **1792**, 664-675.
10. *Schnell J.D., Hicke L.* (2003) J. Biol. Chem., **278**, 35857-35860.
11. *Dikic I., Wakatsuki S., Walters K.J.* (2009) Nature Reviews, Mol. Cell Biol., **10**, 659-671.
12. *Husnjak K., Dikic I.* (2012) Ann. Rev. Biochem., **81**, 291-322.
13. *Butterfield D.A., Hardas S.S., Bader Lange M.L.* (2010) J. Alzheimers Dis., **20**, 369-393.
14. *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.
15. *Mangani M., Serafini G., Antonelli A., Malatesta M., Gazzanelli G.* (1991) J. Biol. Chem., **266**, 21018-21024.
16. *Бунеева О.А., Медведев А.Е.* (2006) Биохимия, **71**, 1050-1061.
17. *Бунеева О.А., Медведев А.Е.* (2011) Биомед. химия, **57**, 246-281.
18. *Buneeva O.A., Medvedeva M.V., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Medvedev A.E.* (2012) Int. J. Mol. Sci., **13**, 11593-11609.
19. *Scopes R.K., Stoter A.* (1982) Methods Enzymol., **90**, 479-490.

20. *Spector T.* (1978) Anal. Biochem., **86**, 142-146.
21. *Lau Y.S., Trobougo K.L., Crampton J.M., Wilson J.A.* (1990) Gen. Pharmacol., **21**,181-187.
22. *Бунеева О.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Неробкова Л.Н., Капица И.Г., Непоклонов А.В., Медведев А.Е.* (2011) Тезисы докладов V Российского симпозиума "Белки и пептиды", Петрозаводск, Карельский научный центр РАН (ISBN 978-5-9274-0475-9).
23. *Medvedev A.E., Gorkin V.Z.* (1994) Int. J. Dev. Neurosci., **12**, 151-155.
24. *Hurley J.H., Lee S., Prag G.* (2006) Biochem. J., **399**, 361-372.
25. *Koyama S., Hata S., Witt C.C., Ono Y., Lerche S., Ojima K., Chiba T., Doi N., Kitamura F., Tanaka K., Abe K., Witt S.H., Rybin V., Gasch A., Franz T., Labeit S., Sorimachi H.* (2008) J. Mol. Biol., **376**, 1224-1236.
26. *Benskey M., Lee K.Y., Parikh K., Lookingland K.J., Goudreau J.L.* (2013) NeuroToxicology, **37**, 144–153.
27. *Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I.* (1983) Science, **219**, 979-980.
28. *Medvedev A.E., Buneeva O.A., Glover V.* (2007) Biologics, **1**, 151-162.

Поступила 14 .11. 2013.

THE USE OF IMMOBILIZED UBIQUITIN FOR BIOSENSOR ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL SUBINTERACTOME

O.A. Buneeva[1], O.V. Gnedenko[1], M.V. Medvedeva[2], A.S. Ivanov[1], A.E. Medvedev[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10, Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; fax: (499)245-0857; e-mail: professor57@yandex.ru
[2]School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Protein ubiquitination is considered as an important mechanism that is responsible not only for specific labeling of proteins for their subsequent degradation but also for localization of proteins in the cell and regulation of protein-protein interactions. In the context of protein-protein interactions binding of (mono/poly)ubiquitinated molecules to proteins containing specific ubiquitin binding domains appear to play the decisive role. Although formation of the ubiquitin interactome has been demonstrated for cytosol, involvement of mitochondria and associated extramitochondrial proteins into such interactions still requires detailed investigation. In this study using an optical biosensor we have demonstrated binding of proteins of mouse brain mitochondrial lysates to immobilized monomeric ubiquitin. Model purified proteins, which are known to be associated with the outer mitochondrial compartment (glyceraldehyde-3-phosphate dehydorgenase, creatine phosphokinase), interacted with immobilized ubiquitin as well as with each other. This suggests that (poly)ubiquitinated chains may be involved in protein-protein interactions between ubiquitinated and non-ubiquitinated proteins and thus may contribute to formation of (mitochondrial) ubiquitin subinteractome.

Key words: ubiquitination, mitochondrial protein-protein interactions, subinteractome, biosensor analysis.