



## ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ГЕНИСТЕИНА НА ПРОЦЕСС ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПО ОСТАТКАМ ТИРОЗИНА В МИТОХОНДРИЯХ КУКУРУЗЫ

© 2019 г. И. Ю. Субота\*, #, А. Ш. Арзиев\*, Ю. М. Константинов\*

\*ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений,  
Россия, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Поступила в редакцию 27.04.2018 г.

После доработки 25.05.2018 г.

Принята к печати 09.06.2018 г.

Активность специфических тирозиновых протеинкиназ, как известно, связана с активацией и продукцией онкогенов. Специфические ингибиторы для тирозиновых протеинкиназ могут быть эффективными не только в качестве противоопухолевых агентов, но и действенным средством для изучения физиологической роли тирозинового фосфорилирования. Среди подобных ингибиторов, как было показано, наиболее специфическое действие оказывал флавоноид генистеин. Этот агент практически полностью ингибировал фосфорилирование по остаткам тирозина, в то время как активность сериновых и треониновых протеинкиназ подавлялась слабо. При этом другой флавоноид кверцетин одинаково эффективно ингибировал и тирозинкиназную активность и активность других протеинкиназ. Целью работы было исследование действия генистеина на фосфорилирование белков по остаткам тирозина в митохондриях кукурузы для исследования сигнальных каскадов, связанных с тирозиновыми протеинкиназами. Было впервые обнаружено, что в митохондриях кукурузы фосфорилированию по тирозиновым остаткам подвергаются белок теплового шока 60 (HSP60) и белок с мол. массой около 90 кДа. Фосфорилирование белка 90 кДа наблюдается только при обработке изолированных митохондрий генистеином. Изучение активности V дыхательного комплекса митохондрий показало значительное снижение активности митохондриальной АТФ-азы при действии генистеина. Активирующее действие данного агента на митохондриальные протеинкиназы можно объяснить изменением редокс-состояния митохондрий за счет ингибирования генистеином митохондриальной АТФ-азы.

*Ключевые слова:* генистеин, митохондрии, тирозиновое фосфорилирование белков, АТФ-аза

DOI: 10.1134/S0132342319010184

### ВВЕДЕНИЕ

Активность специфических тирозиновых протеинкиназ, как известно, связана с продукцией онкогенов семейства *src* ретровирусов [1]. Эта киназная активность значительно коррелирует со способностью ретровирусов к трансформации клетки, при этом мутанты со сниженной активностью тирозиновых протеинкиназ имеют низкую способность к трансформации, а мутанты с отсутствием этой активности полностью лишены такого свойства [2]. Кроме того, фосфорилирование остатков тирозина, возможно, контролирует пролиферацию клеток, а также клеточную сигнализацию и метаболизм, необходимый для быстрой сборки мультибелковых сигнальных комплексов в таких фундаментальных метаболиче-

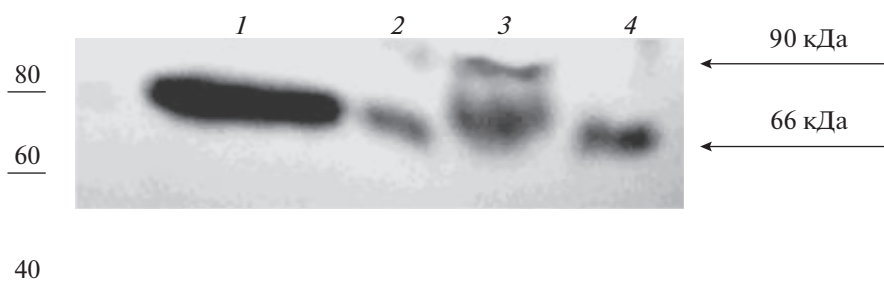
ских путях, как например, окислительное фосфорилирование, передача сигнала о митохондриальном редокс-статусе к другим компартментам клетки и др. [3].

Фосфорилирование белков растений по остаткам тирозина мало изучено. Предполагали, что этот тип фосфорилирования в растениях осуществляется митоген-активируемыми протеинкиназами, широко представленными в растениях [4]. Установлено, что в геноме арабидопсиса имеется 57 генов, кодирующих различные протеинкиназы, имеющие тирозинкиназные мотивы [4].

Несмотря на то что тирозиновые киназы и фосфатазы главным образом представлены в цитозоле или ядре, некоторые из них локализованы в митохондриях. В частности, было показано, что протеинкиназы Lyn, Fyn, Csk и Fgk семейства Src-киназ обнаруживаются в межмембранном пространстве митохондрий. Подобная локализация тирозиновых протеинкиназ может указывать на

Сокращения: HSP – белки теплового шока.

# Автор для связи: (тел. +7 (904) 118-99-39; эл. почта: subota@sifibi.irk.ru).



**Рис. 1.** Исследование с помощью иммуноблоттинга влияния генистеина на фосфорилирование белков по тирозиновым остаткам в препаратах экстрактов митохондрий кукурузы. Линии 1 и 2 в отсутствие генистеина, линии 3 и 4 в присутствии 2.5 мкМ генистеина: 1, 3 – интактные митохондрии, полученные из проростков кукурузы; 2, 4 – митопласты, полученные из митохондрий проростков кукурузы.

участие этих протеинкиназ в регуляции окислительного фосфорилирования [5]. Исходя из этих данных и предположений, специфический ингибитор для тирозиновых протеинкиназ может быть эффективным не только в качестве противоопухолевого агента, но и как действенное средство для изучения физиологической роли тирозинового фосфорилирования. Среди подобных ингибиторов, как было показано, наиболее специфичным оказался флавоноид генистеин. Этот агент практически полностью ингибировал фосфорилирование по тирозиновым остаткам, в то время как активность сериновых и треониновых протеинкиназ подавлял слабо; при этом другой флавоноид кверцетин одинаково эффективно снижал и тирозинкиназную активность, и активность других протеинкиназ [6].

Целью работы было исследование влияния генистеина на фосфорилирование белков по остаткам тирозина в митохондриях кукурузы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали иммунохимические методы анализа для определения специфических сайтов фосфорилирования по остаткам тирозина. Как видно из представленных на рис. 1 данных, специфическому фосфорилированию подвергаются остатки тирозина митохондриальных белков 66 и 90 кДа. Следует отметить, что белок с молекулярной массой около 90 кДа выявляется только при обработке изолированных митохондрий ингибитором тирозиновых протеинкиназ генистеином.

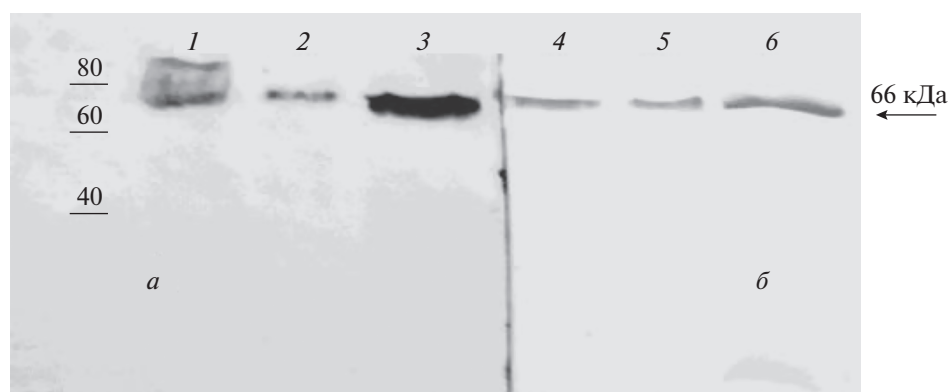
Далее мы попытались идентифицировать белок с молекулярной массой около 66 кДа (рис. 2) иммунохимически. С помощью иммунодетекции с антителами против HSP60 удалось установить, что фосфобелок с молекулярной массой около 66 кДа является белком HSP60. Как было показано нами ранее [16], уровень фосфорилирования белков в митопластах и в наружной мембране митохондрий кукурузы был значительно выше, чем

в интактных митохондриях. Одно из возможных объяснений этого феномена – наличие так называемых “субстратных фосфатаз” в митохондриальной наружной мембране, которые в первую очередь дефосфорилируют белки внутренней мембраны митохондрий [16]. Поэтому, чтобы избежать действия этих протеинфосфатаз, мы использовали митопласты. Предполагалось, что в митопластах уровень фосфорилирования будет выше. В митопластах, получаемых путем удаления наружной мембраны митохондрий, наблюдается фосфорилирование только белка HSP60 по остатку тирозина (рис. 2). Следует отметить, что кажущийся размер в геле HSP60 в наших исследованиях несколько отличается от предсказанных размеров этого белка на основании анализа нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих этот белок у кукурузы. Эти результаты коррелируют с другими исследованиями митохондриальных белков кукурузы [7].

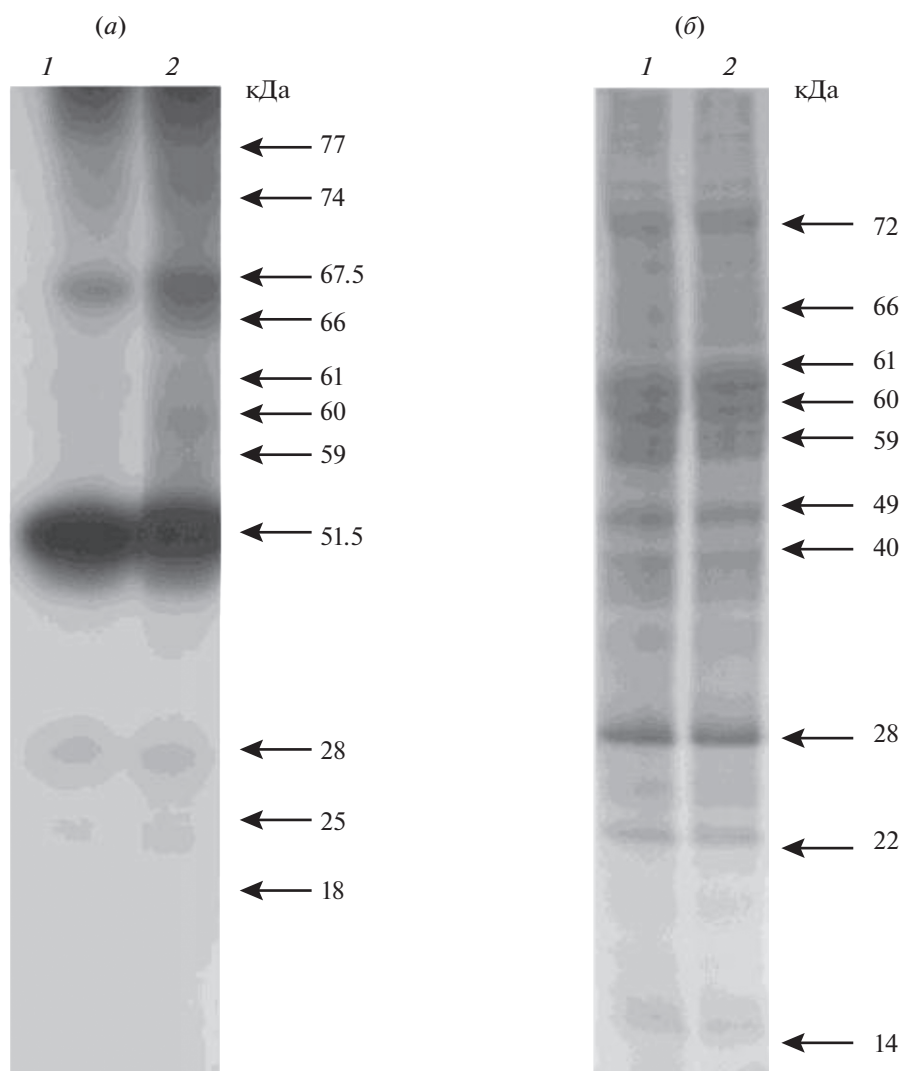
Таким образом, показано, что локализованный в митохондриях и митопластах кукурузы HSP60 может фосфорилироваться по остаткам тирозина.

При исследовании фосфорилирования митохондриальных белков с помощью включения радиоактивно меченного фосфата было обнаружено дополнительное фосфорилирование белков с мол. массой 66, 60 и 59 кДа, и такое фосфорилирование наблюдалось при обработке генистеином (2.5 мкМ) в отличие от контроля, в котором оно отсутствовало (рис. 3а). Как видно из рисунка, происходило именно изменение уровня фосфорилирования белков, т.к. общее количество митохондриального белка было идентичным (рис. 3б).

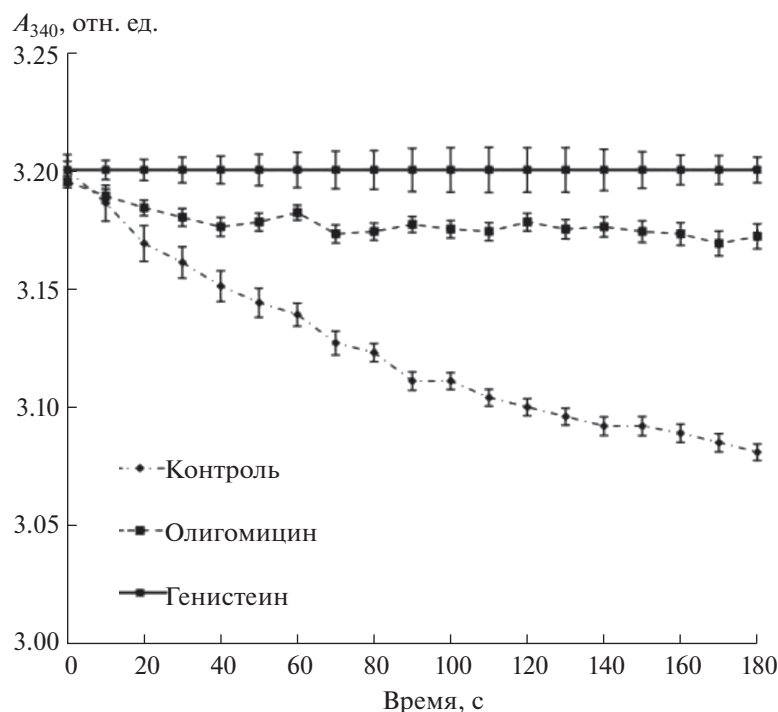
В процессе выполнения работы возник вопрос, почему ингибитор тирозиновых протеинкиназ генистеин не снижал фосфорилирование белков, а, напротив, стимулировал этот процесс. Возможно несколько объяснений данного феномена. Одним из объяснений может быть нечувствительность митохондриальных растительных тирозинкиназ к этому ингибитору. Более того,



**Рис. 2.** Анализ наличия фосфорилированных белков митохондрий и идентификация среди них белка HSP60 как фосфорилируемого. Иммуноблотинг с помощью антител против фосфотирозина (а) и антител против HSP60 (б). Линия 1 – митохондрии + генистеин (2.5 мкМ); 2 – митопласты; 3 – митохондрии; 4 – митохондрии + генистеин (2.5 мкМ); 5 – митопласты; 6 – митохондрии.



**Рис. 3.** Электрофоретическое разделение и анализ фосфорилирования митохондриальных белков кукурузы: (а) радиоавтография; (б) окрашивание Кумасси R-250. Дорожки 1 – препарат белков митохондрий; дорожки 2 – препарат белков митохондрий с добавлением 2.5 мкМ генистеина.



**Рис. 4.** Влияние генистеина на активность митохондриальной АТР-азы митохондрий кукурузы. О повышении активности фермента судили по падению оптической плотности.

увеличение количества идентифицируемых фосфорилированных белков при обработке генистеином, может указывать на возможное участие митохондриальных протеинкиназ в регуляции активности протеинфосфатаз, так как известно, что ряд фосфатаз активируется только путем фосфорилирования специфической аминокислотной группы протеинкиназами [8].

Изучение активности V дыхательного комплекса митохондрий показало значительное снижение гидролизной активности митохондриальной АТР-азы при действии генистеина (рис. 4). Действие генистеина было сходно с действием специфического ингибитора мембранно-связанной митохондриальной АТР-азы олигомицина.

Как известно, генистеин является изофлавоноидом растительного происхождения. Как и многие изофлавоноиды, генистеин обладает мощным антиоксидантным действием. Ингибирование активности АТР-азы генистеином сходно с действием такого сильного антиоксиданта как ресвератрол [9]. Как показано, мощный эффект ресвератрола, как и генистеина связан, прежде всего, с ингибированием активности митохондриальной АТР-азы [10]. Генистеин подобно ресвератролу ингибирует как активность АТР-азы, так и АТР-синтазную активность. Мишень ресвератрола для ингибирования  $F_0F_1$ -АТР-азы — это  $F_1$  компонент, в то время как генистеин действует на  $F_0$  компонент [11].

По-видимому, снижение активности митохондриальной АТР-азы генистеином, может приводить к изменению редокс-состояния митохондрий [11]. Поскольку многие протеинкиназы и протеинфосфатазы митохондрий редокс-чувствительны [12] можно предположить, что именно сдвиг в редокс-статусе приводит к увеличению количества фосфорилированных белков при обработке изолированных митохондрий генистеином.

Таким образом, можно заключить, что в митохондриях кукурузы фосфорилированию по остаткам тирозинов подвергаются HSP60 и неидентифицированный белок с молекулярной массой около 90 кДа. Фосфорилирование белка 90 кДа наблюдалось только при обработке изолированных митохондрий генистеином. Активирующее действие данного агента на митохондриальные тирозиновые протеинкиназы можно объяснить изменением редокс-состояния митохондрий при ингибировании генистеином митохондриальной АТР-азы.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирмы "Sigma", США. TBS — буферный раствор, содержащий 50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 7.6. Для иммуоблоттинга использовали поликлональные антитела кролика против растительных белков и

вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой фирмы “Agrisera”, США.

**Получение митохондрий и митопластов.** Митохондрии выделяли из 4-дневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L., гибрид ВИР 42МВ) методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте концентрации сахарозы [13]; митопласты получали согласно методике [14].

**Фосфорилирование белков *in vitro*** проводили, как описано в работе [15].

Осадок митохондрий ресуспендировали в 50 мкл буфера, содержащего 0.3 М сахарозу, 50 mM Hepes (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> и 0.2 mM (0.4–1.0 Ки/ммоль) [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР (ФГУП “ИРМ”, Россия). Инкубацию проводили в течение 15–20 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением буфера для подготовки образца к электрофорезу, содержащего 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8% SDS, 10% глицерин, 5%  $\beta$ -меркаптоэтанол и 0.001% бромфеноловый синий [16]. Смесь прогревали при температуре 95°C в течение 2 мин. Полученные пробы хранили при температуре –20°C.

**Полипептидный состав фосфорилированных белков.** Белки митохондриальные (150–200 мкг) анализировали электрофорезом 12.5% ПААГе в присутствии SDS [16]. В качестве маркеров молекулярных масс использовали стандарты фирмы “СибЭнзим” (Россия), содержащие 12 белков с молекулярными массами от 10 до 250 кДа.

**Вестерн-блот** осуществляли согласно методике Тиммонса и Дунбара [17]. Митохондриальные белки после разделения в SDS-ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для заполнения свободных мест на мембране ее инкубировали в буфер TBS с добавлением 5% обезжиренного молока и 0.05% Tween-20, в течение ночи. Затем мембраны инкубировали в растворе первичных антител против фосфотирозина и HSP60 (Agrisera, США) в разведении (1 : 1000). Мембрану промывали буфером TBS с добавлением 0.05% Tween-20 не менее 3 раз и добавляли раствор конъюгата антикролик-щелочная фосфатаза (“Agrisera”, США).

**Активность АТР-азы** определяли спектрофотометрически при 340 нм [9]. Метод основан на сопряжении пируваткиназной и лактатдегидрогеназной реакции. Реакционная смесь содержала: 100 mM Tris (pH 8.0), 4 mM MgATP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.23 mM NADH, 1 mM фосфоенолпируват, 1.4 ед. акт. пируваткиназы, 1.4 ед. акт. лактатдегидрогеназы и 25–50 мкг митохондриального белка. Измерение оптического поглощения проводили в течение 3 мин. Специфичность F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>АТР-азной активности определяли

с помощью специфического ингибитора этого комплекса олигомицина [18]. Как известно, олигомицин ингибирует митохондриальную АТР-азу до 90%, причем действует на конформационные взаимодействия между F<sub>0</sub> и F<sub>1</sub> на мембране митохондрий [18].

## БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) СО РАН при президиуме ИНЦ СО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hunter T., Cooper J.A. // Annu. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 897–930.
2. Bishop J.M. // Annu. Rev. Biochem. 1983. V. 52. P. 301–354.
3. Horbinski C., Chu C.T. // Free Radic. Biol. Med. 2005. V. 28. P. 2–11.
4. Rudrabhatla P., Reddy M.M., Rajasekharan R. // Plant Mol. Biol. 2002. V. 129. P. 239–319.
5. Huttemann M., Lee I., Samavati L., Yu H., Doan J.W. // BBA. 2007. V. 12. P. 1701–1720.
6. Akiyama T., Tshida J., Nakagawa S., Ogowara H., Watanabe S., Iton N., Shibuya M., Fukami Y. // Journal of Biological Chemistry. 1987. V. 262. P. 5592–5595.
7. Lund A.A., Blum P.H., Bhatramakki D., Elthon T.E. // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 1097–1110.
8. Eto M.J. // Biol. Chem. 2009. V. 284(51). P. 35273–35277.
9. Zheng J., Ramires V.D. // Eur. J. of Pharmacol. 1993. V. 368. P. 92–102.
10. Zheng J., Ramires V.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 261. P. 499–503.
11. Schmidt F., Knobbe C.B., Frank B., Wolburg H., Weller I. // Oncology Reports. 2008. V. 19. P. 1061–1066.
12. Субота И.Ю., Арзиев А.Ш., Сенженко Л.П., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 3. С. 389–396.
13. Konstantinov Yu.M., Lutsenko G.N., Podsonny V.A. // Physiol. Plant. 1988. V. 72. P. 403–406.
14. Christophe L., Tarrago-Litvak L., Castroviejo M., Litvak S. // Plant Science Letters. 1981. V. 21. P. 181–192.
15. Субота И.Ю., Арзиев А.Ш., Константинов Ю.М. // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 4. С. 518–522.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 174–182.
17. Timmons T.M., Dunbar B.S. // Methods in Enzymology. 1990. V. 182. P. 679–701.
18. Penefsky H.S. // Proc Natl Sci USA. 1985. V. 82. P. 1589–1593.

## The Study of Particular Effects of Genistein on the Tyrosine Phosphorylation of Proteins in the Mitochondria of Maize

I. Yu. Subota\*., #, A. Sh. Arziev\*, and Yu. M. Konstantinov\*

#E-mail: subota@sifibr.ru

\*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Lermontova, 132, Irkutsk, 664049 Russia

The activity of specific tyrosine protein kinases is known to be associated with the production of oncogenes. Specific inhibitor for tyrosine protein kinases can be effective not only as an antitumor agent, but also as effective means to study the physiological role of tyrosine phosphorylation. Among similar inhibitors, flavonoid genistein was shown to have the most specific effect. This agent almost completely inhibited phosphorylation of tyrosine residues, while the activity of serine and threonine protein kinases was slightly suppressed, while another flavonoid quercetin inhibited equally effectively the tyrosine kinase activity and the activity of other protein kinases. The aim of the work was to study the effect of genistein on phosphorylation of proteins on tyrosine residues in maize mitochondria for the study of signal cascades associated with tyrosine protein kinases. It was first discovered that the corn mitochondrial tyrosine phosphorylation of protein exposed HSP60 and protein 90 kDa. Phosphorylation of 90 kDa protein is observed only by the treatment of isolated mitochondria genistein. The study of the mitochondria respiratory complex V activity a significant decrease in hydrolysis activity of the mitochondrial ATP-ase by action of genistein. The activating effect of this agent on mitochondria protein kinases can be explained by changes in the redox state of mitochondria due to inhibition of mitochondrial ATP-ase by genistein.

*Keywords: genistein, mitochondria, tyrosine phosphorylation of protein, ATPase*