

НОВЫЙ КОФИЛИН-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ БИОГЕНЕЗА И ДЕГРАДАЦИИ МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

DOI: 10.17691/stm2020.12.1.01

УДК 576.311:577.12:577.15/.24

Поступила 30.03.2019 г.



Т.Ф. Ковалева, к.б.н., старший научный сотрудник

отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины¹;

Н.С. Максимова, аспирант, младший научный сотрудник

отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины¹;

П.В. Пчелин, лаборант отдела молекулярно-клеточных технологий

Института фундаментальной медицины¹;

В.И. Першин, лаборант отдела молекулярно-клеточных технологий

Института фундаментальной медицины¹;

Н.М. Ткаченко, младший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий

Института фундаментальной медицины¹;

М.Р. Гайнуллин, к.м.н., старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий

Института фундаментальной медицины¹; научный сотрудник^{2, 3};

И.В. Мухина, д.б.н., профессор, директор Института фундаментальной медицины¹;

зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹; профессор кафедры нейротехнологий

Института биологии и биомедицины⁴

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

²Norwegian PSC Research Center, Department of Transplantation Medicine, Division of Surgery, Inflammatory Diseases and Transplantation, Oslo University Hospital Rikshospitalet, P.O. Box 4950, Nydalen, Oslo, 0424, Norway;

³Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Oslo, P.O. Box 1171, Blindern, Oslo, 0318, Norway;

⁴Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950

Цель исследования — изучение роли посттрансляционных модификаций кофилина в регуляции дыхания и аутофагии митохондрий головного мозга мышей.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на мышах линии C57BL/6. Для получения цитоплазматической и митохондриальной фракций мозга использовали метод дифференциального центрифугирования. Анализ уровня экспрессии кофилина, фосфокофилина, K48- и K63-ассоциированных цепей убиквитина, маркера аутофагии LC3B выполняли с помощью методов электрофореза, иммунопреципитации и вестерн-блота. Для исследования процессов убиквитилирования использовали ингибитор деубиквитирующих ферментов PR619. Активность дыхания митохондрий головного мозга оценивали с помощью метода высоко-разрешающей флуороспирометрии.

Результаты. Показана модификация кофилина неканоническими K63-мультиубиквитиновыми цепями в цитоплазме и митохондриях головного мозга. Выявлен разный уровень экспрессии фосфокофилина, кофилина и его убиквитилированных протеоформ. Ингибитор деубиквитирующих ферментов PR619 влияет на уровень фосфорилированных и убиквитилированных форм кофилина в митохондриях и цитоплазме, при этом установлено изменение активности тканевого дыхания и аутофагии.

Для контактов: Ковалева Татьяна Федоровна, e-mail: tatiana.f.sergeeva@gmail.com

Заключение. Чувствительность кофилина к ингибитору деубиквитирующих ферментов свидетельствует о существовании в клетках нового некатаболического механизма регуляции данного белка, который может быть вовлечен в регуляцию функций митохондрий, что проявляется в изменении активности дыхания и аутофагии митохондрий головного мозга. Полученные данные вносят вклад в понимание молекулярных механизмов функционирования митохондрий в норме и при патологии для разработки эффективных методов терапии заболеваний нервной системы.

Ключевые слова: убиквитин; кофилин; митохондрии; аутофагия; ингибитор деубиквитирующих ферментов PR619.

Как цитировать: Kovaleva T.F., Maksimova N.S., Pchelin P.V., Pershin V.I., Tkachenko N.M., Gainullin M.R., Mukhina I.V. A new cofilin-dependent mechanism for the regulation of brain mitochondria biogenesis and degradation. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(1): 6–15, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.1.01>

English

A New Cofilin-Dependent Mechanism for the Regulation of Brain Mitochondria Biogenesis and Degradation

T.F. Kovaleva, PhD, Senior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine¹;

N.S. Maksimova, PhD Student, Junior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine¹;

P.V. Pchelin, Laboratory Assistant, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine¹;

V.I. Pershin, Laboratory Assistant, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine¹;

N.M. Tkachenko, Junior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine¹;

M.R. Gainullin, MD, PhD, Senior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine¹; Researcher^{2, 3};

I.V. Mukhina, DSc, Professor, Director of the Institute of Fundamental Medicine¹; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov¹; Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine⁴

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²Norwegian PSC Research Center, Department of Transplantation Medicine, Division of Surgery, Inflammatory Diseases and Transplantation, Oslo University Hospital Rikshospitalet, P.O. Box 4950, Nydalen, Oslo, 0424, Norway;

³Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Oslo, P.O. Box 1171, Blindern, Oslo, 0318, Norway;

⁴National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

The aim was to study the role of post-translational modifications of cofilin in the regulation of respiration and autophagy in murine brain mitochondria.

Materials and Methods. The experiments were performed with C57BL/6 mice. To obtain cytoplasmic and mitochondrial fractions of the brain tissue, differential centrifugation was used. Expressions of cofilin, phospho-cofilin, K48- and K63-associated chains of ubiquitin, and the autophagy marker LC3B were determined using electrophoresis, immunoprecipitation and Western blot methods. To study the processes of ubiquitination, we used PR619 — the inhibitor of deubiquitinating enzymes. Respiratory activity of brain mitochondria was evaluated using high-resolution respirometry.

Results. Modification of cofilin by non-canonical K63 multiubiquitin chains in the cytoplasm and mitochondria from murine brain was demonstrated. Different levels of phospho-cofilin, cofilin, and its ubiquitinated proteoforms were found. PR619, the inhibitor of deubiquitinating enzymes, affects the expression of phosphorylated and ubiquitinated forms of cofilin in the mitochondria and cytoplasm, at the same time it changes the activity of tissue respiration and mitophagy.

Conclusion. The sensitivity of cofilin to the inhibitor of deubiquitinating enzymes indicates the existence of a new non-catabolic mechanism of cofilin modification, which may be involved in the regulation of mitochondrial functions, specifically, the mitochondrial respiration and autophagy. The data help understand the molecular mechanisms of mitochondrial function in normal and pathological conditions, which may be useful in developing novel methods for the treatment of diseases of the nervous system.

Key words: ubiquitin; cofilin; mitochondria; autophagy; PR619, deubiquitinating enzymes.

Введение

Митохондрии играют важную роль во многих внутриклеточных процессах: синтез АТФ, обмен кальция, апоптоз, синтез нуклеотидов, экспрессия ядерных генов и эпигенетические изменения. Синтез АТФ происходит при участии электрон-транспортной сети митохондрий в процессе окислительного фосфорилирования. При этом синтез энергии в митохондриях контролируется различными сигнальными путями. Установлено, что функционирование митохондрий во многом определяется активностью процессов биогенеза и деградации этих органелл. Важное значение в данной регуляции принадлежит процессу аутофагии митохондрий (митофагии), который направлен на селективное удаление поврежденных митохондрий и поддержание клеточных функций [1]. Клетки способны индуцировать митофагию в ответ на потребности в энергии. Накопление митохондрий с измененными функциями нарушает дыхательную функцию клеток и экспрессию генов, регулирующих работу митохондриальной сети [2]. При этом ряд исследований показывает, что для поддержания целостности митохондриальной ДНК решающее значение может играть именно аутофагия, а не митофагия [3].

Другим важным путем деградации в клетке является процесс убиквитилирования белков. Убиквитилирование представляет собой ковалентное присоединение убиквитина к акцепторному лизину, экспонированному на поверхности белка-мишени. Убиквитин-протеасомальная система включает в себя компоненты, ответственные за узнавание белков-мишеней, которые подлежат разрушению, и их последующую деградацию. В результате полимеризации нескольких молекул убиквитина формируются так называемые мультиубиквитиновые цепи, структура которых может варьировать. Следует отметить, что убиквитилирование обратимо, разнообразные деубиквитирующие ферменты (DUBs) способны отщеплять убиквитин от субстратов и расщеплять мультиубиквитиновые цепи. Изучение механизмов и молекулярно-физиологических последствий убиквитилирования невозможно без определения специфических сайтов модификации, так как присоединение убиквитина по разным остаткам лизина различным образом влияет на судьбу белка-мишени и может регулировать разнообразные клеточные процессы. Механизмы убиквитин-зависимой регуляции контролируют большинство процессов в клетках: пролиферацию и дифференцировку, репарацию ДНК, передачу внутриклеточного сигнала, апоптоз и иммунный ответ [4, 5]. Нарушение работы убиквитин-протеасомальной системы может приводить к развитию патологий, в том числе злокачественных новообразований и нейродегенеративных заболеваний.

Известно, что деградация белков при участии убиквитин-протеасомальной системы зависит от уровня АТФ, который используется как для убиквитилиро-

вания, так и для присоединения субстрата к протеасоме. Кроме того, некоторые компоненты системы убиквитилирования и деубиквитилирования были идентифицированы среди белков внешней мембраны митохондрий, которые имеют в том числе регуляторные функции, включая убиквитин лигазы [6]. Интересно отметить, что снижение уровня клеточного АТФ и слабый окислительный стресс могут увеличивать активность протеасомы. При митохондриальной патологии убиквитилирование и последующая деградация белков 26S-протеасомой ингибируются.

Митофагия также происходит при участии системы убиквитина. Последние исследования показывают, что в процессе митофагии важную роль играют киназа PINK1 (PTEN-induced kinase 1) и E3-убиквитин-лигаза (parkin) [7]. Однако точные молекулярные механизмы активации митофагии до конца не выяснены. Одним из этапов сигнального каскада PINK1–parkin является ремоделирование актиновых филаментов при участии киназы LIMK1 и актин-связывающего белка кофилина [8]. Parkin может связываться с LIMK1 и снижать ее активность за счет убиквитилирования, что приводит к дефосфорилированию и активации кофилина. Известно, что кофилин участвует в различных внутриклеточных процессах, в том числе в реорганизации актинового цитоскелета, регуляции экспрессии генов и программированной клеточной гибели [9, 10]. Изменения в структуре кофилина приводят к изменениям дыхательной функции клеток [11]. При этом мало данных о посттрансляционных модификациях кофилина путем убиквитилирования и его роли в регуляции функций митохондрий. Тем не менее регуляторный потенциал убиквитилирования превосходит все известные посттрансляционные модификации, а по разнообразию контролируемых функций сопоставим с фосфорилированием.

В настоящее время воздействие на убиквитин-протеасомальную систему и убиквитин-подобные сигнальные системы рассматривается как новое перспективное направление при лечении ряда заболеваний, в том числе нейродегенеративных.

Исследование роли кофилина и механизмов его регуляции путем убиквитилирования может внести новые данные в понимание молекулярных механизмов регуляции функций митохондрий в норме и при патологии и в разработку новых методов терапии заболеваний.

Целью исследования явилось изучение роли посттрансляционных модификаций кофилина в регуляции дыхания и аутофагии митохондрий головного мозга мышей.

Материалы и методы

Объект исследования. Эксперименты были выполнены на мышах линии C57BL/6. Содержание животных в сертифицированном виварии Института фундаментальной медицины Приволжского исследо-

вательского медицинского университета (Н. Новгород) соответствовало требованиям санитарно-эпидемиологических правил СП 2.2.1.3218-14, эксперименты выполнялись согласно международным правилам «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011), отвечали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и были согласованы с Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета.

Выделение цитоплазматической и митохондриальной фракций мозга. Для выделения цитоплазматической и митохондриальной фракций мозга использовали метод дифференциального центрифугирования. После цервикальной дислокации и декапитации животных выполняли отсечение ствола мозга, мозжечка и обонятельных луковиц; полушария мозга промывали в среде выделения (225 мМ маннитол; 75 мМ сахароза; 5 мМ HEPES; 1 мМ EGTA; 0,1% BSA; pH=7,4; 4°C), помещали в среду инкубации (110 мМ сахароза; 60 мМ лактобионовая кислота; 20 мМ таурин; 20 мМ HEPES; 10 мМ KH_2PO_4 ; 3 мМ MgCl_2 ; 0,5 мМ EGTA; 0,1% BSA; pH=7,2; 4°C). Головной мозг измельчали в гомогенизаторе Поттера–Эльвейема. Полученный гомогенат подвергали центрифугированию (100 г, 4°C, 10 мин). Надосадочную жидкость центрифугировали при 9500 г, 4°C, 10 мин для получения цитоплазматической фракции (супернатант) и митохондриальной фракции (осадок). Осадок ресуспендировали в среде выделения без BSA.

Полученные митохондриальную и цитоплазматическую фракции в течение 2 ч инкубировали с PBS в интактной группе, 0,25% DMSO (диметилсульфоксидом) — в контрольной и 5 мкМ ингибитором деубиквитилирующих ферментов PR619 (Abcam, США) — в экспериментальной, после чего использовали в последующих экспериментах.

Иммунопреципитация, электрофорез и иммуноблоттинг. После инкубации митохондриальную и цитоплазматическую фракции мозга ресуспендировали в буфере для лизиса RIPA при 4°C: 50 мМ трис-HCl; pH=8,0; 500 мМ NaCl; 1% NP40; 0,1% SDS; 1 мМ NEM; 0,5 мМ коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) — и обрабатывали ультразвуком. Затем образцы центрифугировали при 14000 г в течение 15 мин при 4°C. Аликвоту каждого супернатанта использовали для следующих экспериментов. Концентрацию белка выравнивали во всех экспериментальных образцах. Иммунопреципитацию проводили с антителами против кофилина (Santa Cruz Biotechnology, США) с использованием набора Immunoprecipitation Starter Pack (GE Healthcare, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Образцы белка (20 мкл/лунку) и маркеры молекулярной массы (ThermoFisher, США) разделяли в 12% SDS-геле в течение 45 мин при 20 мА в рабочем буфере (0,125 М трис-основание; 0,96 М глицин; 0,5% SDS;

pH=8,3). Образцы переносили на PVDF-мембрану в системе Immobilon-P (Merk Millipore, Германия) с использованием камеры для танк-блоттинга (Bio-Rad Laboratories, США) полусухим методом в соответствии с рекомендациями производителя. Иммуноблоттинг выполняли с использованием системы SNAP i.d.® 2.0 (Merk Millipore, США). Все процедуры вестерн-блоттинга проводили при комнатной температуре за исключением переноса на PVDF-мембрану. Мембраны блокировали 1% BSA в PBST (0,02 М PBS, содержащий 0,1% Tween-20; pH=7,4). Затем мембраны инкубировали с первичными антителами в PBST с 1% BSA.

Использовали следующие первичные антитела: кроличьи поликлональные антитела к убиквитину (Dako, США); мышинные моноклональные антитела к убиквитину, полимеризованному по остатку Lys63 (Abcam, Великобритания); мышинные моноклональные антитела к кофилину (Santa Cruz Biotechnology); мышинные моноклональные антитела к β -актину (Santa Cruz Biotechnology); кроличьи моноклональные антитела к убиквитину, полимеризованному по остатку Lys48 (Abcam); кроличьи моноклональные антитела к белку LC3B (Abcam). Удаление избытка первичных антител проводили путем промывки мембран в PBST. Вторичные анти-мышинные или анти-кроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой (Sigma-Aldrich, Германия), инкубировали с мембраной в PBST с 1% BSA в течение 10 мин при комнатной температуре. Избыток вторичных антител удаляли путем промывки мембран в PBST. Мембраны подвергали воздействию реагента ECL (GE Healthcare, США) и экспонировали на фотопленку Amersham Hyperfilm ECL (Scientific Laboratory Supplies, Великобритания). Детекцию и количественную оценку интенсивности сигнала выполняли с использованием программного обеспечения Gel Analyzer.

Оценка интенсивности митохондриального дыхания. Оценка скорости потребления кислорода производили методом флуороспирометрии высокого разрешения при помощи респирометра Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Австрия). В камеры добавляли среду инкубации (2,1 мл). Осуществляли калибровку прибора при насыщении камер кислородом и при нулевом его содержании.

В рамках проведения респирометрического эксперимента выполняли оценку митохондриального дыхания при отсутствии экзогенных субстратов (базовое дыхание, R). Оценивали интенсивность дыхания в нефосфорилирующем состоянии дыхательной цепи (при отсутствии АДФ), ассоциированной с комплексом I митохондрий, после добавления субстратов дыхания (5 мМ пируват, 2 мМ малат). Интенсивность дыхания при окислительном фосфорилировании, ассоциированную с работой комплекса I, оценивали после добавления 1,25 мМ АДФ, а ассоциированную с работой комплексов I и II — после добавления 10 мМ сукцината (P). Затем добавляли ингибитор АТФ-синтазы олигомицин (2 нг/мл) для оценки интенсивности дыхания

в нефосфорилирующем состоянии при участии комплексов I и II (L). Производили оценку максимальной скорости дыхания, связанной с работой комплексов I и II, после последовательного добавления протонифора СССР — карбонил цианид м-хлорфенил гидразона (E), а также максимальной емкости дыхательной цепи, связанной с работой комплекса II после добавления 0,5 мкМ ротенона — ингибитора комплекса I (Rot). После добавления 2,5 мкМ антимицина А (ингибитора комплекса III) регистрировали скорость потребления кислорода, не связанную с работой дыхательной цепи митохондрий, но обусловленную прочими окислительными реакциями. Для оценки работы дыхательной цепи митохондрий использовали контрольные соотношения: R/E, L/E, P/E, Rot/E, P/L (дыхательный контроль). Данные респирометрии были обработаны в программе DatLab 5.0 и нормализованы на 1 мг белка для митохондрий. Содержание белка определяли методом Брэдфорда. Скорость потребления кислорода (O_2) выражали в пикомолях за 1 с в расчете на 1 мг белка митохондрий.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего

($M \pm SEM$). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Исследование посттрансляционных модификаций кофилина в цитоплазме и митохондриях головного мозга мышей

Оценка уровня экспрессии фосфокофилина и кофилина. Для исследования внутриклеточного уровня фосфокофилина и кофилина использовали метод вестерн-блоттинга. На рис. 1 показан уровень экспрессии фосфокофилина и мономерного кофилина (17 кДа) в митохондриях и цитоплазме головного мозга мышей. Установлено, что ингибитор деубиквитирующих ферментов PR619 приводит к снижению уровня мономерного кофилина в митохондриях относительно интактной группы (PBS) и контроля (DMSO), при этом в цитоплазме отмечено увеличение уровня кофилина в 1,3 раза в сравнении с PBS. Анализ уровня экспрессии фосфокофилина при действии PR619

показал статистически значимое увеличение его в цитоплазме относительно PBS и DMSO и незначительный рост — в митохондриях. При этом в митохондриях при инкубации с PR619 отмечено снижение отношения кофилин/фосфокофилин относительно интактной группы, что указывает на инактивацию кофилина.

Анализ убиквитилирования кофилина в цитоплазме и митохондриях головного мозга. Для изучения процессов убиквитилирования кофилина были использованы методы иммунопреципитации и вестерн-блота. Вестерн-блот с анти-кофилиновыми антителами выявил наличие мономерных (17 кДа) и среднемолекулярных форм (протеоформ) кофилина в лизатах цитоплазмы и митохондрий, а также в иммунопреципитатах.

Следующим этапом явилось исследование типа убиквитиновых цепей, связанных с кофилином в цитоплазматической и митохондриальной фракциях мозга. Для этого были проанализированы иммунопреципитаты кофилина с антителами против

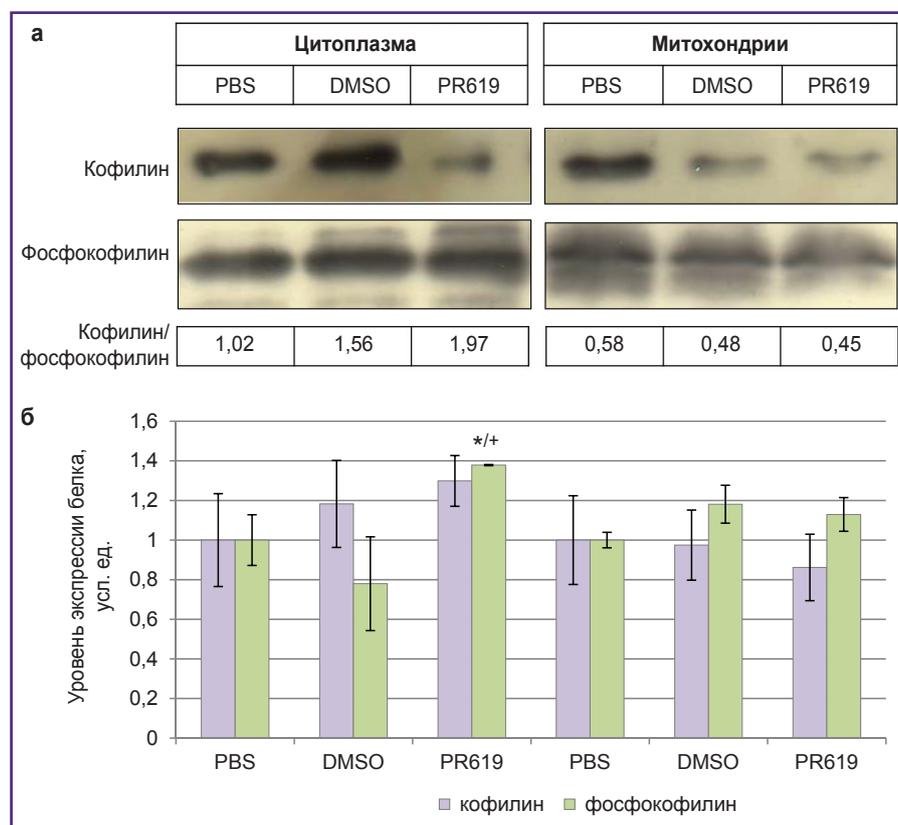


Рис. 1. Уровень экспрессии кофилина и фосфокофилина в цитоплазме и митохондриях нервных клеток головного мозга мышей при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619:

а — анализ уровня мономерного кофилина и фосфокофилина методом вестерн-блоттинга; б — изменение уровня мономерного кофилина и фосфокофилина при действии PR619; уровень мономерного кофилина и фосфокофилина нормализован по уровню экспрессии белков в интактной группе (PBS). * — статистически значимые различия значений с интактной группой, $p \leq 0,05$; + — с контролем, $p \leq 0,05$

Рис. 2. Убиквитилирование кофилина в цитоплазме и митохондриях нервных клеток головного мозга мышей при анализе методом вестерн-блоттинга

Убиквитилирование в иммунопреципитатах кофилина идентифицировали с антителами против K63-ассоциированных цепей убиквитина

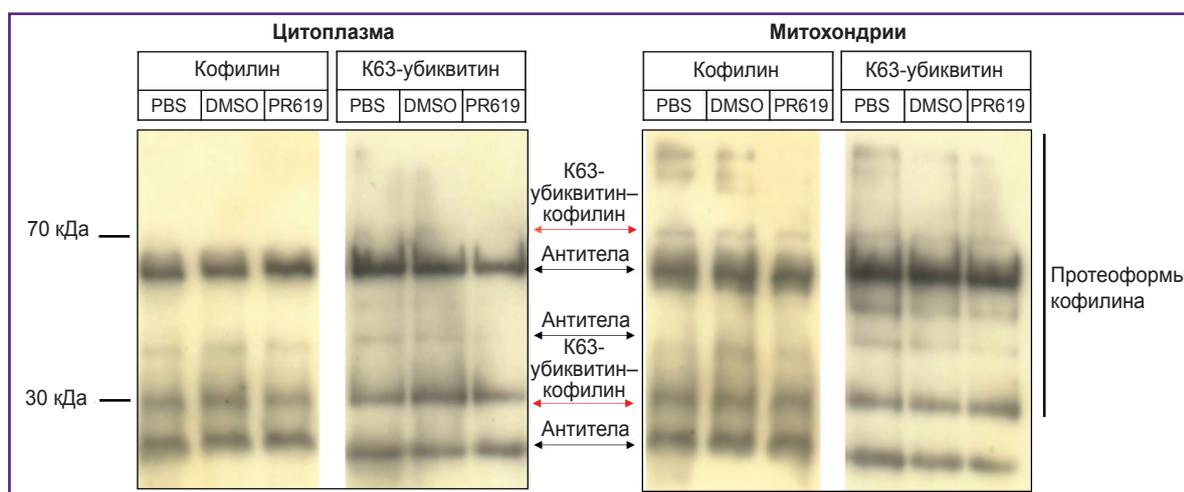
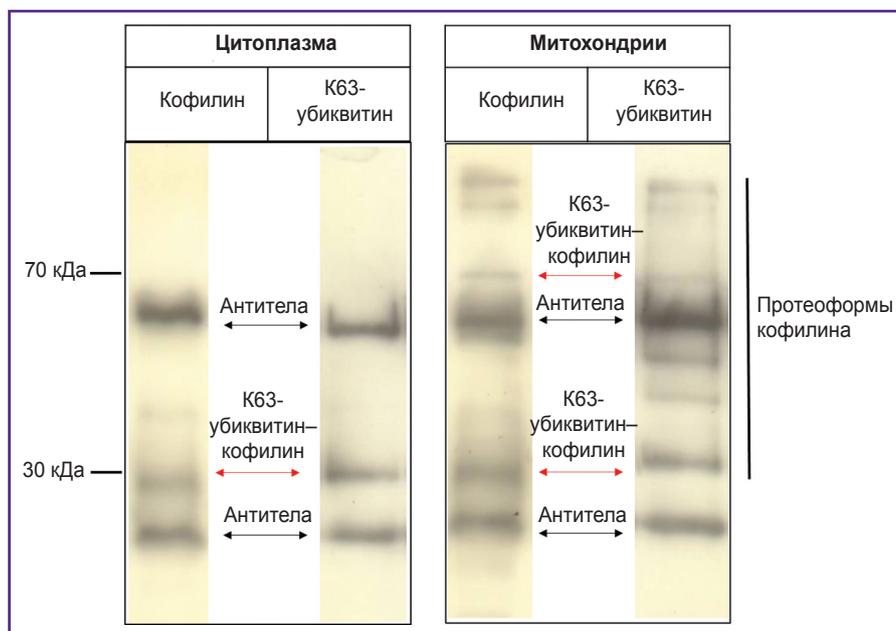


Рис. 3. Уровень экспрессии кофилина при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619 в цитоплазме и митохондриях нервных клеток головного мозга мышей при анализе методом вестерн-блоттинга

Lys48- и Lys63-ассоциированных цепей убиквитина (K63-убиквитин). Установлено присутствие в митохондриях и цитоплазме головного мозга мышей протеоформ кофилина, модифицированных по Lys48. Кроме того, кофилин на уровне среднемолекулярных масс (30 и 70 кДа) показывал специфическую перекрестную иммунореактивность с K63-цепями убиквитина, что указывает на модификацию кофилина K63-мультиубиквитиновыми цепями (рис. 2).

Анализ влияния ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619 показал увеличение уровня кофилина, модифицированного K63-мультицепями убиквитина (30 кДа), в цитоплазме в 1,5 раза относительно интактной группы, при этом не было разницы с контролем. В то же время PR619 не изменял уровень

среднемолекулярных протеоформ кофилина в митохондриях (рис. 3).

Исследование аутофагии в цитоплазме и митохондриях нервных клеток. Анализ активности процесса аутофагии в цитоплазме и митохондриях нервных клеток при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619 показал снижение уровня LC3B-I, увеличение LC3B-II и рост отношения LC3B-II/LC3B-I в митохондриях головного мозга (рис. 4). В цитоплазме отношение LC3B-II/LC3B-I не изменялось.

Анализ митохондриального дыхания. Для исследования дыхания митохондрий применяли метод высокоразрешающей флуороспирометрии (рис. 5).

Для оценки работы дыхательной цепи использовали следующие соотношения скоростей дыхания:

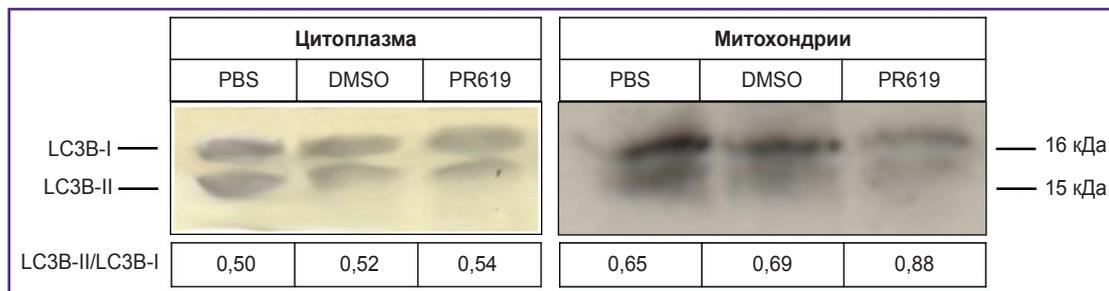


Рис. 4. Уровень экспрессии LC3B при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619 в цитоплазме и митохондриях нервных клеток головного мозга мышей при анализе методом вестерн-блоттинга

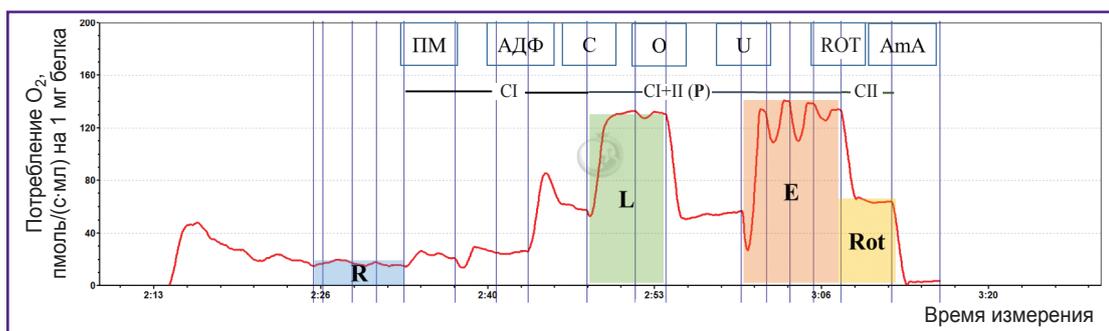


Рис. 5. График респиromетрии для митохондрий головного мозга мышей при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619:

ПМ — пируват + малат; С — сукцинат; О — олигомицин; U — разобщитель CCCP (карбонил цианид м-хлорфенил гидразон); ROT — ротенон; AmA — антимицин А. *Cl* — скорость потребления кислорода после добавления пирувата, малата и АДФ; *Cl+II (P)* — скорость потребления кислорода после добавления сукцината; *CII* — скорость потребления кислорода при работе комплекса II дыхательной цепи. *R* — рутинное дыхание на эндогенных субстратах; *L* — дыхание в нефосфорилирующем состоянии при участии комплексов I и II; *E* — максимальная скорость дыхания после титрования CCCP; *Rot* — скорость потребления кислорода после добавления ингибитора I комплекса дыхательной цепи митохондрий ротенона

Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга мышей линии C57BL/6 (M±SEM)

Группа	R/E	L/E	P/E	R/P	P/L	Rot/E
PBS (интактная)	0,10±0,03	0,19±0,04	0,92±0,01	0,11±0,04	4,69±0,02	0,29±0,07
0,25% DMSO (контрольная)	0,10±0,01	0,17±0,02	0,92±0,05	0,11±0,05	5,26±0,21*	0,28±0,06
5 мкМ PR619 (экспериментальная)	0,14±0,02**	0,39±0,05**	0,10±0,01**	0,08±0,02	4,65±0,16*	0,60±0,08**

* — статистически значимые различия значений с интактной группой, $p \leq 0,05$; + — с контролем, $p \leq 0,05$.

R/E, L/E, P/E, R/P, P/L (дыхательный контроль), Rot/E (см. таблицу). Соотношение R/E при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов увеличивалось примерно в 1,4 раза в сравнении с интактной группой и контролем. Был установлен рост в 2 раза соотношения скоростей дыхания смеси субстратов I и II комплексов дыхательной цепи и максимальной скорости дыхания на тех же субстратах (P/E) при инкубации с ингибитором деубиквитирующих ферментов PR619 в сравнении с интактной группой и контролем.

Выявлены достоверно более низкие значения отно-

шения скорости дыхания на эндогенных субстратах к дыханию на субстратах комплексов I и II (R/P) в митохондриях нервных клеток при действии PR619 относительно интактной группы и контроля и статистически значимое увеличение соотношения Rot/E.

Обсуждение

Изменения в энергетическом метаболизме (переход от окислительного фосфорилирования к гликолизу и наоборот) зависят от ремоделирования сети митохон-

дрий, включая удаление поврежденных митохондрий и биогенез [12]. При этом нарушение электронно-транспортной цепи митохондрий и синтеза АТФ может приводить к изменению активности аутофагии и митофагии.

В ходе проведенных исследований были изучены посттрансляционные модификации кофилина и его роль в регуляции функций митохондрий головного мозга мышей. Установлено, что кофилин присутствует в цитоплазме и митохондриях головного мозга в фосфорилированной и дефосфорилированной формах. При этом в митохондриях интактной группы преобладает кофилин в неактивной фосфорилированной форме. Последние исследования показали, что деление митохондрий и митофагия зависят от процессов сборки/разборки актиновых филаментов, регулируемых актин-деполимеризационной активностью кофилина [13]. Фосфорилирование/дефосфорилирование — основные механизмы регуляции активности кофилина. Дефосфорилированный кофилин может связываться с G-актином и транслоцироваться в митохондрии, что приводит к изменениям динамики актинового цитоскелета, дисфункции митохондрий, высвобождению цитохрома С и апоптозу [14]. Кофилин-опосредованная Вах-транслокация является ключевым событием в эксайтотоксичной гибели нейронов [15].

Следующим этапом явилось исследование процесса убиквитилирования кофилина. Убиквитилирование — один из важнейших механизмов посттрансляционной регуляции свойств и функций белков. Регуляторный потенциал убиквитилирования превосходит все известные посттрансляционные модификации, а по разнообразию контролируемых функций сопоставим с фосфорилированием. В частности, система убиквитина вовлечена в регуляцию клеточного цикла, передачу внутриклеточного сигнала, апоптоз и репарацию ДНК, убиквитилированию отводится важнейшая роль в патогенезе заболеваний [4, 5].

Анализ иммунопреципитатов кофилина с антителами против Lys48- и Lys63-ассоциированных цепей убиквитина показал присутствие в митохондриях и цитоплазме головного мозга среднемолекулярных протеоформ кофилина, модифицированных по лизину 48 и 63. Впервые показана неканоническая модификация кофилина K63-мультиубиквитиновыми цепями в митохондриях нервных клеток. Эти результаты соответствуют данным по модификации кофилина цепями убиквитина в эпителиальных клетках [16].

Установлено снижение значения отношения кофилин/фосфокофилин в митохондриях головного мозга мышей при инкубировании ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619 с цитоплазматической и митохондриальной фракциями головного мозга, что свидетельствует об инактивации кофилина. В то же время анализ влияния PR619 на процессы убиквитилирования показал увеличение уровня кофилина, модифицированного K63-мультицепями убиквитина (30 кДа) в цитоплазме, в митохондриях при этом было отмечено незначительное снижение их уровня, что

указывает на перераспределение среднемолекулярных протеоформ кофилина между цитоплазмой и митохондриями. Чувствительность кофилина к ингибитору деубиквитирующих ферментов может указывать на новый, некатаболический механизм регуляции данного белка.

Таким образом, впервые было продемонстрировано, что деубиквитилирование, катализируемое внутриклеточными деубиквитирующими ферментами, тесно связано с контролем уровня протеоформ кофилина. Следует отметить, что модификация кофилина K63-мультиубиквитиновыми цепями может служить сигналом для запуска различных внутриклеточных процессов. Согласно данным литературы, K63-ассоциированные цепи убиквитина также могут служить сигналом для деградации убиквитилированных белков путем аутофагии [17]. В частности, С-концевой убиквитин-связывающий домен белка p62 может связывать как Lys48-, так и Lys63-ассоциированные цепи убиквитина, но имеет более высокое сродство к Lys63-цепям убиквитина. Известно, что и аутофагия, и убиквитин-протеосомальная система являются двумя основными внутриклеточными механизмами деградации в клетке. Кроме того, показано, что Lys63-ассоциированные цепи убиквитина регулируют активацию фактора транскрипции NF-κB, репарацию ДНК, иммунный ответ, удаление поврежденных белков и митохондрий, сплайсинг и трансляцию мРНК.

Известно, что K63-убиквитилирование играет ключевую роль в протеосомальной деградации белков при формировании разветвленных K48/K63-цепей убиквитина. Интересно отметить, что специфические для K63-ассоциированных цепей убиквитина деубиквитирующие ферменты блокируют эти пути. Анализ активности процессов аутофагии в цитоплазме и митохондриях нервных клеток головного мозга мышей по уровню экспрессии LC3B (микротубулин-связанный белок легкой цепи 3) при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов PR619 показал увеличение отношения LC3B-II/LC3B-I, что может свидетельствовать об активации процесса митофагии, при этом данное отношение в цитоплазме значительно не менялось. Физиологическая роль деубиквитирующих ферментов в клетке заключается в регуляции стабильности белков и процессов убиквитилирования. Нарушение их активности может приводить к различным патологическим процессам [18]. Установлено, что USP30 деубиквитиназа способна ингибировать процесс апоптоза клеток и нарушать процесс митофагии, опосредованный белком parkin (лигаза E3) [19].

Согласно данным V. Seiberlich с соавт. [20], ингибирование деубиквитирующих ферментов приводит к накоплению убиквитилированных белков, образованию белковых агрегатов и последующему ингибированию убиквитин-протеосомальной системы. Используя олигодендроглиальную клеточную линию OLN-t40, авторы показали, что ингибирование

деубиквитирующих ферментов приводит к активации аутофагии. Таким образом, активация митофагии при действии PR619, возможно, частично компенсирует сбой в работе убиквитин-протеасомальной системы и указывает на взаимосвязь этих систем деградации.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что характер убиквителирования белков может коррелировать с митохондриальной дисфункцией. Функциональные и структурные повреждения митохондрий при различных заболеваниях приводят к нарушению энергетического метаболизма, снижению уровня АТФ, увеличению продукции активных форм кислорода и преждевременной гибели нервных клеток. В ходе данной работы на основе метода высоко-разрешающей респирометрии установлено изменение активности митохондриального дыхания при действии ингибитора деубиквитирующих ферментов широкой специфичности PR619. Увеличение соотношения скорости дыхания на эндогенных субстратах и максимальной скорости дыхания (R/E) при действии ингибитора DUBs свидетельствует о работе дыхательной цепи митохондрий со скоростью, близкой к максимальной.

Ранее нами на основе методов конфокальной флуоресцентной микроскопии и конфокальной флуоресцентной микроскопии с временным разрешением [21] показано увеличение активности дыхания митохондрий относительно гликолиза в культуре клеток гиппокампа головного мозга мышей при действии PR619, что согласуется с полученными результатами. Рост соотношения скоростей дыхания смеси субстратов I и II комплексов дыхательной цепи и максимальной скорости дыхания на тех же субстратах (P/E) свидетельствует о недостаточной способности митохондрий использовать субстраты комплексов I и II для окислительного фосфорилирования. Более низкие значения отношения скорости дыхания на эндогенных субстратах к дыханию на субстратах комплексов I и II (R/P) в митохондриях нервных клеток при действии PR619 также говорят о снижении активности синтеза АТФ. Рост соотношения Rot/E, характеризующего скорость разобщенного дыхания, чувствительного к действию ингибитора I комплекса ротенона, указывает на дисфункцию I комплекса дыхательной цепи митохондрий при действии ингибитора DUBs. В то же время повышенное соотношение R/E может свидетельствовать о снижении мембранного потенциала митохондрий головного мозга. Известно, что нарушение мембранного потенциала приводит к активации митофагии и аутофагии.

Таким образом, влияние ингибиторов деубиквитирующих ферментов на активность митохондриального дыхания и митофагии свидетельствует о вовлечении убиквитин-протеасомальной системы в регуляцию данных процессов. Перераспределение протеоформ кофилина между цитоплазмой и митохондриями при изменении функций митохондрий указывает на вовлечение данного белка в зависимости от его посттран-

сляционных модификаций в регуляцию процессов биогенеза и деградации митохондрий.

Заключение

Биогенез и деградация митохондрий влияют на различные внутриклеточные процессы и играют важную роль в развитии ряда заболеваний, в том числе злокачественных новообразований и нейродегенерации. Чувствительность кофилина к ингибитору деубиквитирующих ферментов свидетельствует о существовании нового, некатаболического механизма регуляции данного белка, который может быть вовлечен в регуляцию функций митохондрий, приводить к изменениям активности дыхания и аутофагии митохондрий головного мозга. В настоящее время воздействие на убиквитин-протеасомальную систему и убиквитин-подобные сигнальные системы рассматривается как новое перспективное направление при лечении ряда заболеваний. Понимание механизмов регуляции функций митохондрий способствует разработке новых стратегий профилактики и лечения заболеваний нервной системы.

Финансирование исследования. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект №17-75-10202) в части оценки интенсивности митохондриального дыхания и процессов убиквителирования и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18-34-00690) в части исследования аутофагии и посттрансляционных модификаций кофилина в митохондриях.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Ding W.X., Yin X.M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *J Biol Chem* 2012; 393(7): 547–564, <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>.
2. Kubli D.A., Gustafsson A.B. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 2012; 111(9): 1208–1221, <https://doi.org/10.1161/circresaha.112.265819>.
3. Suzuki S.W., Onodera J., Ohsumi Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One* 2011; 6(2): e17412, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017412>.
4. Al-Hakim A., Escibano-Diaz C., Landry M.C., O'Donnell L., Panier S., Szilard R.K., Durocher D. The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9(12): 1229–1240, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.09.011>.
5. Popovic D., Vucic D., Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med* 2014; 20(11): 1242–1253, <https://doi.org/10.1038/nm.3739>.
6. Bragoszewski P., Turek M., Chacinska A. Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system. *Open Biol* 2017; 7(4): 170007, <https://doi.org/10.1098/rsob.170007>.

7. Ashrafi G., Schlehe J.S., LaVoie M.J., Schwarz T.L. Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J Cell Biol* 2014; 206(5): 655–670, <https://doi.org/10.1083/jcb.201401070>.
8. Kim K.H., Son J.H. PINK1 gene knockdown leads to increased binding of parkin with actin filament. *Neurosci Lett* 2010; 468(3): 272–276, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.11.011>.
9. Kanellos G., Frame M.C. Cellular functions of the ADF/cofilin family at a glance. *J Cell Sci* 2016; 129: 3211–3218, <https://doi.org/10.1242/jcs.187849>.
10. Kovaleva T.F., Maksimova N.S., Zhukov I.Y., Pershin V.I., Mukhina I.V., Gainullin M.R. Cofilin: molecular and cellular functions and its role in the functioning of the nervous system. *Neurochem J* 2019; 13 (1): 11–19, <https://doi.org/10.1134/s1819712419010124>.
11. Kotiadis V.N., Leadsham J.E., Bastow E.L., Gheeraert A., Whybrew J.M., Bard M., Lappalainen P., Gourlay C.W. Identification of new surfaces of cofilin that link mitochondrial function to the control of multi-drug resistance. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 9): 2288–2299, <https://doi.org/10.1242/jcs.099390>.
12. Palikaras K., Lionaki E., Tavernarakis N. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ* 2015; 22: 1399–1401, <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.86>.
13. Li G.B., Zhang H.W., Fu R.Q., Hu X.Y., Liu L., Li Y.N., Liu Y.X., Liu X., Hu J.J., Deng Q., Luo Q.S., Zhang R., Gao N. Mitochondrial fission and mitophagy depend on cofilin-mediated actin depolymerization activity at the mitochondrial fission site. *Oncogene* 2018; 37(11): 1485–1502, <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0064-4>.
14. Madineni A. *Role of cofilin, an actin cytoskeletal protein, in ischemic conditions: potential therapeutic target for ischemic stroke [dissertation]*. University of Toledo Health Science Campus; 2013.
15. Rehklau K., Gurniak C.B., Conrad M., Friauf E., Ott M., Rust M.B. ADF/cofilin proteins translocate to mitochondria during apoptosis but are not generally required for cell death signaling. *Cell Death Differ* 2012; 19(6): 958–967, <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.180>.
16. Gainullin M.R., Zhukov I.Y., Zhou X., Mo Y., Astakhova L., Ernberg I., Matskova L. Degradation of cofilin is regulated by Cbl, AIP4 and Syk resulting in increased migration of LMP2A positive nasopharyngeal carcinoma cells. *Sci Rep* 2017; 7(1): 9012, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09540-3>.
17. Myeku N., Figueiredo-Pereira M.E. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem* 2011; 286(25): 22426–22440, <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.149252>.
18. Komander D., Clague M.J., Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(8): 550–563, <https://doi.org/10.1038/nrm2731>.
19. Swatek K.N., Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res* 2016; 26(4): 399–422, <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>.
20. Seiberlich V., Borchert J., Zhukareva V., Richter-Landsberg C. Inhibition of protein deubiquitination by PR-619 activates the autophagic pathway in OLN-t40 oligodendroglial cells. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67(1): 149–160, <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9622-8>.
21. Pershin V., Maksimova N., Mukhina I., Gainullin M., Yuditsev A., Sergeeva T. Effect of the ubiquitin-proteasome system inhibitors on the energy metabolism of nerve cells. *FEBS Open Bio* 2018; 8 (Suppl S1): 291.