



УДК: 576.32/36

Ферузбек ХАСАНОВ,
Докторант Национального университета Узбекистана
Диёра ЭРГАШЕВА,
Магистрантка Национального университета Узбекистана
Сурайё ДАЛИМОВА,
Д.б.н., Профессор Национального университета Узбекистана
Артём БАЕВ,
PhD, Старший научный сотрудник Центра передовых технологий
E-mail: feruzbekkhasanov@gmail.com, baev.a.yu@gmail.com

По рецензию: д.б.н. П.Г.Мерзляка, Заведующий лабораторией биофизики мембран института Биофизики и биохимии

CORRELATION BETWEEN THE LEVEL OF INORGANIC POLYPHOSPHATES AND THE ACTIVITY OF THE ENERGY METABOLISM SYSTEMS OF THE CELL

Annotation

Inorganic polyphosphates (polyP), due to its structural similarity to the ATP molecule, have long been considered as an analogue/alternative of the ATP molecule in mammalian cells. We have shown that the stimulation of bioenergetics of isolated mitochondria through the addition of glutamate+malate or succinate led to an increase in the level of polyP. and these processes did not depend on the presence of ATP. Experiments with intact cells showed that incubation of cells in a glucose free medium led to a drop in the polyP level, the addition of glucose contributed to a significant increase in the level of polyP in cells. All these processes also were depended on the presence of rotenone and oligomycin.

Keywords: PolyP, cell bioenergetics, mitochondria, F_1F_0 -ATP synthase.

SUTEMIZUVCHILAR HUYAYRALARIDA NOORGANIK POLIFOSFATLAR DARAJASINING HUYAYRADAGI ENERGETIK METABOLIZM FAOLLIGIGA BOG'LIQLIGINI O'RGANISH

Annotatsiya

Noorganik polifosfatlar (poli-F) ATF molekulasi bilan tuzilish jihatdan o'xshashligi tufayli uzoq vaqtdan beri sutemizuvchilar hujayralarida ATF molekulasi analogi/alternativi sifatida ko'rib kelingan. Biz ushbu ishimizda glutamat+malat yoki suksinat qo'shilishi orqali ajratilgan mitoxondriyalarning bioenergetikasini rag'batlantirish poli-F darajasining oshishiga olib keldi va bu jarayonlar ATF mavjudligiga bog'liq emasligini ko'rsatdik. Intakt hujayralar bilan o'tkazilgan tajribalar shuni ko'rsatdiki, hujayralarni glyukozasiz muhitda inkubatsiya qilish poli-F darajasining pasayishiga olib keldi, glyukoza qo'shilishi hujayralardagi poli-F darajasining sezilarli darajada oshishiga yordam berdi. Barcha jarayonlar rotenon va oligomitsinning mavjudligiga bog'liq ravishda kechdi.

Kalit so'zlar: Poli-F, hujayra bioenergetikasi, mitoxondriyalar, F_1F_0 -ATF sintaza.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ УРОВНЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ ОТ АКТИВНОСТИ СИСТЕМ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТКИ

Аннотация

Неорганические полифосфаты (поли-Ф) из-за своей структурной схожести с молекулой АТФ долгое время рассматриваются в качестве аналога/альтернативы молекулы АТФ в клетках млекопитающих. В нашей работе мы показали, что стимуляция биоэнергетики изолированных митохондрий через добавку глутамата+малата или сукцината, приводила к росту уровня поли-Ф и данные процессы не зависели от присутствия АТФ. Эксперименты с интактными клетками показали, что инкубация клеток в среде лишенной глюкозы приводила к падению уровня поли-Ф, добавка глюкозы способствовала значительному повышению уровня поли-Ф в клетках. Все наблюдаемые процессы зависели от присутствия rotenона и олигомицина.

Ключевые слова: Поли-Ф, биоэнергетика клетки, митохондрии, F_1F_0 -АТФ синтаза.

Введение. Неорганические полифосфаты (поли-Ф) — это полимеры, образованные остатками ортофосфорной кислоты. Из-за своего структурного сходства с молекулой АТФ, всегда проводились параллели функций данных молекул. Метаболизм поли-Ф у микроорганизмов хорошо изучен, ферменты, участвующие в синтезе и гидролизе, поли-Ф были обнаружены десятилетия назад. Бактериальные полифосфаткиназы — ферменты, которые катализируют реакцию:



Таким образом пул поли-Ф может пополняться за счет энергии АТФ и наоборот, во время энергетического кризиса, энергия поли-Ф может использоваться для синтеза АТФ.

Литературный обзор. У млекопитающих, аналогов данных ферментов найдено не было, в связи с чем поиск ферментов отвечающих за метаболизм данных молекул в клетках млекопитающих остается актуальной задачей. Ранее показывалось, что метаболизм поли-Ф напрямую связан с биоэнергетической активностью митохондрий [2, 3], однако механизмы данных процессов все еще остаются плохо изучены. Ранее нами показывалось, что поли-Ф внесенный из вне может оказывать влияние на активность дыхательной цепи митохондрий [4], а также гидролизироваться

митохондриальной F_1F_0 АТФ-азой [5]. В своей работе, мы изучали динамику изменения уровня поли-Ф в изолированных митохондриях и интактных клетках применяя методы стимулирования и ингибирования биоэнергетической системы клетки.

Методология исследования.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования по Шнайдеру из печени белых беспородных крыс (200 г), используя в качестве среды выделения 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl, pH 7,4, как описано в [6].

Выделение тимоцитов. Тимоциты были получены из декапитированных беспородных белых крыс (100 г) продавливанием тимуса через нейлоновое сито. Для исследования использовался стандартный раствор Рингера, содержащий (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 5 глюкозы (pH 7,35). Затем клетки дважды осаждали центрифугированием в течение 6 мин при 1000×g. Осадок ресуспендировали в растворе Рингера в конечной концентрации $1 \cdot 10^8$ кл/мл. Выделение тимоцитов проводили при комнатной температуре, однако все манипуляции производили на льду, как описано в [7].

Измерение внутриклеточной концентрации неорганических полифосфатов в суспензии клеток и изолированных митохондриях. Тимоциты в концентрации $1 \cdot 10^8$ кл/мл и митохондрии в концентрации 0,5 мг/мл белка загружали 10 мМ DAPI (4', 6-диамидин-2-фенилиндол), (Molecular Probes, Eugene, OR) и инкубировали в течении 40 минут при комнатной температуре, в растворе Рингера (для тимоцитов) и в среде выделения без ЭДТА (для митохондрий), каждый 3 минуты клетки и митохондрии аккуратно пипетировали для лучшего проникновения флуорофора внутрь клеток/органелл. Затем клетки 2 раза отмывали раствором Рингера путем центрифугирования - 6 минут 1000×g, митохондрии от флуорофора не отмывали, так как в экспериментах не использовался внешний поли-Ф. Измерения проводили при помощи спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Для регистрации сигнала DAPI – поли-Ф, суспензию клеток/митохондрий возбуждали при 405 нм и сигнал регистрировали при 505 нм, при возбуждении и эмиссии использовали размер щели в 10 нм. Эксперименты с клетками проводили при 37° C, эксперименты с митохондриями проводили при 25° C, в 3 мл кварцевых кюветах, при постоянном перемешивании.

Анализ и результаты. Для исследования метаболизма поли-Ф в первой серии экспериментов мы использовали изолированные митохондрии, загруженные флуоресцентным индикатором DAPI [8]. Уровень неорганических полифосфатов в энергизованных митохондриях не менялся или слегка снижался, в отсутствии субстратов для дыхательной цепи (рис.1 А, Б). Однако добавка 5 мМ глутамата и 1 мМ малата (субстраты цикла Кребса, участвующие в синтезе НАДН – субстрата для I-го комплекса дыхательной цепи) значительно увеличивала продукцию поли-Ф в изолированных митохондриях (рисунок 1 А).

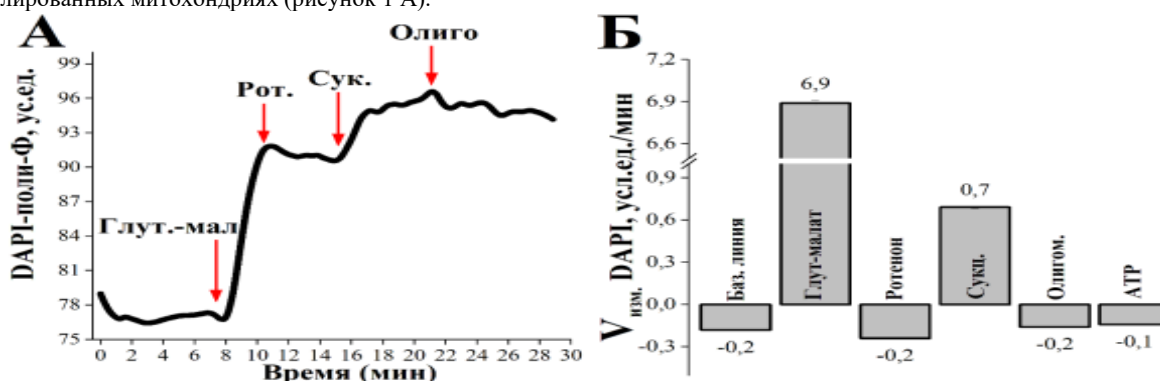


Рисунок 1. Производство поли-Ф в изолированных митохондриях. Измерение поли-Ф в изолированных митохондриях с использованием DAPI-поли-Ф флуоресценции.

Активация дыхательной цепи увеличивает продукцию поли-Ф в изолированных митохондриях, ингибиторы дыхательной цепи останавливают этот процесс, n=6.

Основываясь на ингибировании продукции поли-Ф олигомицином, мы не можем исключить, что первоначально F_0F_1 -АТФ-синтетаза продуцировала АТФ, и этот АТФ использовался для производства поли-Ф, пока неизвестными ферментами митохондрий. Чтобы проверить это, мы добавили АТФ в конце эксперимента, после блокирования F_1F_0 -АТФ синтазы олигомицином. Добавка АТФ не приводила к увеличению интенсивности флуоресценции DAPI, подтверждая, что АТФ не участвует в производстве поли-Ф в наблюдаемых процессах (Рис. 2 А). Применение АТФ в начале эксперимента перед олигомицином также не вызывало повышения уровня поли-Ф (Рис. 2 Б, n=8), что свидетельствует о том, что гидролиз АТФ в АТФ-азе не оказывает влияния на продукцию поли-Ф в митохондриях. Для подтверждения эффекта олигомицина на процессы синтеза поли-Ф, данные эксперименты также проводились в присутствии разных субстратов. Присутствие олигомицина полностью давило сукцинат опосредованное и глутамат-малат опосредованное увеличение уровня поли-Ф (рисунок 2 В, Г).

Таким образом нами было показано, что поли-Ф может продуцироваться в митохондриях при запуске энергетического метаболизма, через активацию цикла Кребса и дыхательной цепи. Ингибирование роста сигнала поли-Ф при помощи ротенона и олигомицина показывает, что метаболизм поли-Ф зависит от работы как электрон транспортный цепи (ЭПЦ) митохондрий (I-IV комплексы), которая отвечает за наращивание митохондриального потенциала (Ψ_m), так и от активности F_1F_0 -АТФ синтазы – фермента, который использует Ψ_m для синтеза АТФ. Данные результаты показывают, что F_1F_0 -АТФ синтаза может являться ферментом ответственным за синтез поли-Ф в митохондриях.

Функционирование митохондрий несмотря на то, что они являются полуавтономными органеллами, неразрывно сопряжено с их клеточным окружением. В связи с этим нами были проведены эксперименты с интактными клетками. В качестве модельных клеток нами были использованы тимоциты, выделенные из белых беспородных крыс. Так как в

предыдущих экспериментах нами было показано, что метаболизм поли-Ф неразрывно сопряжен с биоэнергетическими процессами клетки, мы предположили, что добавка энергетических субстратов может повлиять на рост уровня поли-Ф в интактных клетках.

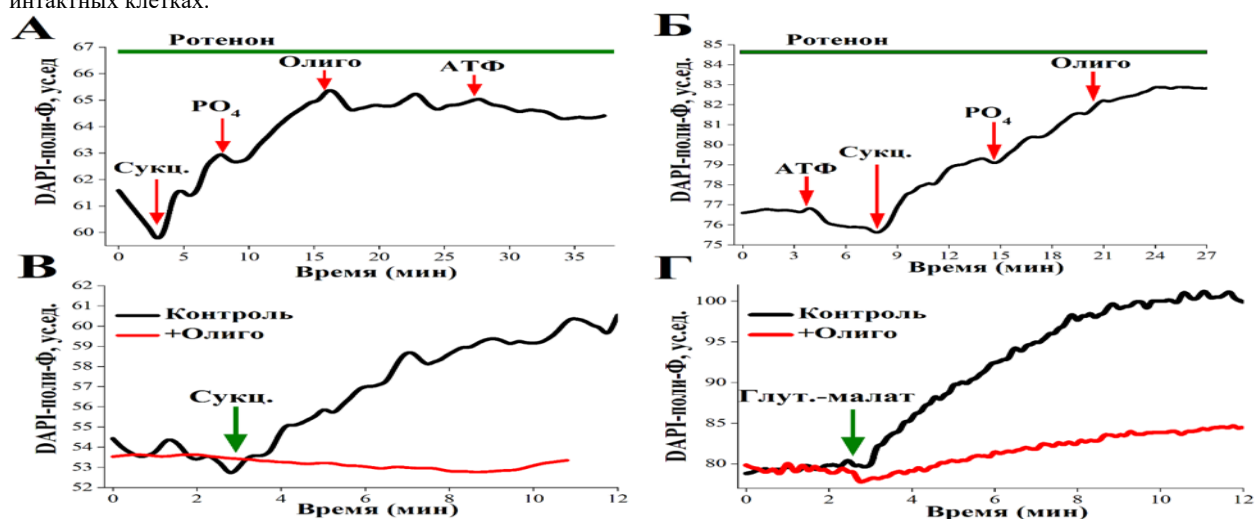


Рисунок 2. Уровень поли-Ф не зависит от внесения в систему АТФ. Измерение поли-Ф в изолированных митохондриях с использованием DAPI-поли-Ф флуоресценции.

Применение 5 мМ сукцината в присутствии ротенона (10 мМ) индуцирует повышение уровня поли-Ф, которое может быть заблокировано олигомицином (2 мкг/мл). Важно отметить, что уровень поли-Ф в митохондриях не зависел от добавки АТФ до (Б) или после олигомицина (А), $p=8$, результаты представлены от, не менее трех, различных выделений.

В большинстве солевых растворов, таких как раствор Рингера, раствор Хэнкса и т.д. в качестве энергетического субстрата используется глюкоза, в концентрации от 5 до 10 мМ. В своих экспериментах мы использовали раствор Рингера, из которого мы исключили глюкозу. Регистрация DAPI-поли-Ф сигнала в без-глюкозном растворе Рингера происходила в течении 10 минут (базовая линия) затем делалась добавка глюкозы разной концентрации. В конце каждого эксперимента делалась добавка 2 мМ CCCP, в качестве стимула, снижающего уровень поли-Ф в клетке [3].

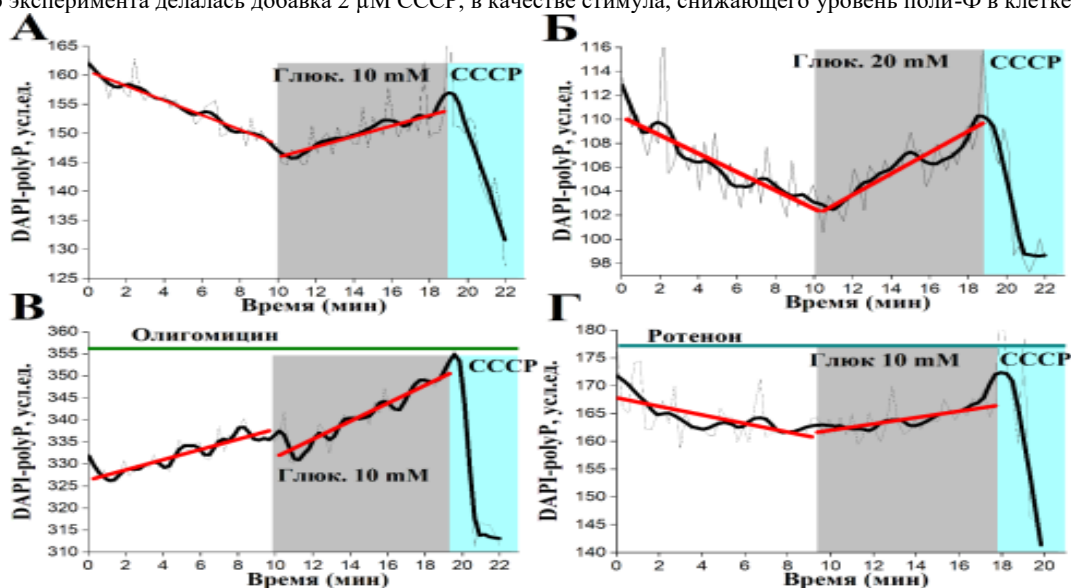


Рисунок 3. Измерение уровня поли-Ф в тимоцитах в без-глюкозной среде.

Добавка глюкозы в концентрации 10 (А) и 20 (Б) мМ приводило к значительному росту уровня поли-Ф в клетках ($p=7$); В присутствии олигомицина (В) и ротенона (Г) рост поли-Ф, опосредованный добавкой глюкозы значительно снижался ($p=6$).

Нами было показано, что в отсутствии глюкозы, во всех экспериментах происходило падение сигнала DAPI-поли-Ф (рисунок 3 А, Б). Добавка глюкозы приводила к значительному росту уровня поли-Ф в клетках. Для того, чтобы понять влияет ли концентрация глюкозы на процессы роста уровня поли-Ф нами были использованы 2 концентрации глюкозы 10 и 20 мМ. Сравнительный анализ показал, что добавка глюкозы в концентрации 10 и 20 мМ приводила к стабильному увеличению уровня поли-Ф в клетках (рисунок 3 А), однако концентрационной зависимости не наблюдалось (рисунок 4 А).

Глюкоза, попадающая в цитоплазму метаболизируется в гликолизе или же пентозофосфатном пути. Если рассматривать энергетический метаболизм конечными продуктами гликолиза и пентозофосфатного пути (одним из конечных продуктов пентозофосфатного пути является фруктозо-6-фосфат, которая в дальнейшем может метаболизироваться в гликолизе) являются пируват или же лактат. Пируват поступает в матрикс митохондрий и

метаболизму до ацетила коэнзима А, который вовлекается в цикл Кребса. Посредством чего у нас стимулируется I комплекс дыхательной цепи через NADH и II комплекс через сукцинат.

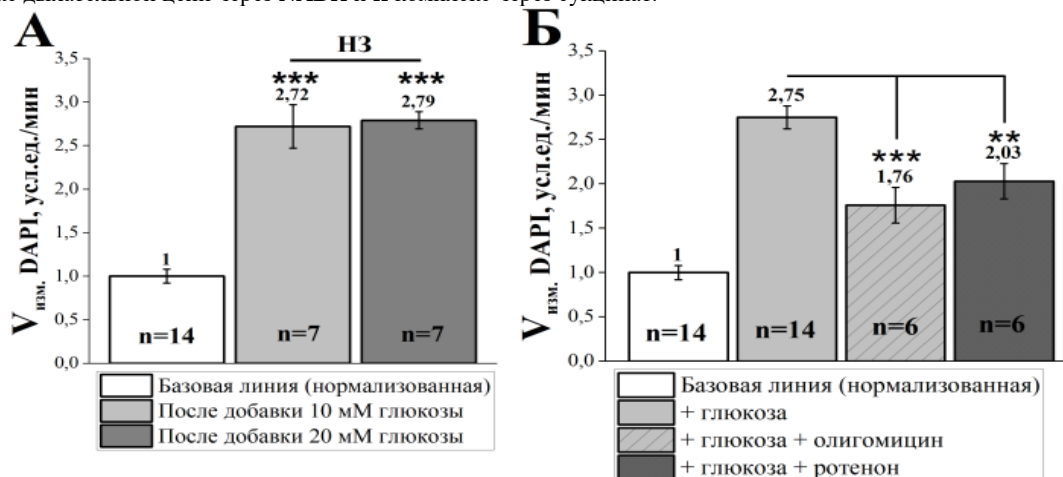


Рисунок 4. Измерение уровня поли-Ф в тимоцитах на фоне ингибиторов, статистический анализ данных. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Таким образом добавка глюкозы стимулирует, в том числе и те процессы, которые мы стимулировали и в экспериментах с изолированными митохондриями. В связи с этим в экспериментах с клетками нами были применены: ингибитор электрон транспортной цепи ротенон и ингибитор F_1F_0 -АТФ синтазы олигомицин. В данных экспериментах ингибиторы преинкубировались с клетками 2 минуты до начала эксперимента и присутствовали в кювете в течении всего эксперимента. Интересно, в присутствии олигомицина не наблюдалось падения уровня поли-Ф в без-глюкозной среде, напротив функция кривой во всех экспериментах была положительной (рисунок 3 В). Добавка глюкозы приводила к увеличению скорости продукции поли-Ф по сравнению с базовой линией, однако данная скорость была значительно ниже по сравнению с экспериментами без ингибитора (рисунок 4 Б). В присутствии ротенона сохранялась тенденция падение сигнала DAPI-поли-Ф в без-глюкозной среде, как и в контрольных экспериментах (рисунок 3 Г). Добавка глюкозы приводила к значительному росту сигнала DAPI-поли-Ф по сравнению с базовой линией, однако данный рост был значительно ниже роста, наблюдаемого в контрольных экспериментах (рисунок 4 Б).

Выводы и рекомендации. Таким образом нами было показано, что энергетические субстраты способны активировать рост уровня поли-Ф как в изолированных митохондриях так и в интактных клетках. Ингибиторы ЭТЦ и F_1F_0 -АТФ синтазы, ротенон и олигомицин, подавляли рост уровня поли-Ф как в изолированных митохондриях так и в интактных клетках. Интересно, что в присутствии олигомицина не происходило падения уровня поли-Ф в без-глюкозной среде (рисунок 3 В). F_1F_0 -АТФ синтаза митохондрий может работать в 2 режимах – в режиме синтеза АТФ с использованием Ψ_m и режиме гидролиза АТФ и наращиванием Ψ_m (в случаях, когда Ψ_m падает ниже физиологической нормы). Ранее мы показывали, что F_1F_0 -АТФ синтаза может гидролизовать поли-Ф [5]. Теоретически, если клетки долгое время находятся в без-глюкозной среде, это может повлиять на формирование Ψ_m и переключение F_1F_0 -АТФ синтазы митохондрий в режим гидролиза. Так как поли-Ф является нативным клеточным метаболитом, его гидролиз может использоваться для формирования Ψ_m в условиях дефицита субстратов или же при других патологических условиях. Так же стоит отметить, что ротенон и олигомицин полностью давили рост уровня поли-Ф в экспериментах с изолированными митохондриями, но не с интактными клетками, что может указывать на то, что поли-Ф может синтезироваться не только в митохондриях, но и в других метаболических путях.

ЛИТЕРАТУРА

- Neville N., Roberge N. & Jia Z. (2022) Polyphosphate Kinase 2 (PPK2) Enzymes: Structure, Function, and Roles in Bacterial Physiology and Virulence, *International journal of molecular sciences*. 23.
- Abramov A. Y., Fraley C., Diao, C. T., Winkfein, R., Colicos, M. A., Duchon, M. R., French, R. J. & Pavlov, E. (2007) Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 18091-6.
- Pavlov E., Aschar-Sobbi R., Campanella M., Turner R. J., Gomez-Garcia M. R. & Abramov A. Y. (2010) Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells, *The Journal of biological chemistry*. 285, 9420-8.
- Baev A.Y. & Абрамов, А. Ю., Рахматуллина Н.Ш., Левицкая, Ю.В. (2013) Влияние неорганических полифосфатов на процессы окислительного фосфорилирования митохондрий, *Вестник НУУз*. 4, 8-11.
- Baev, A. Y., Rakhmatullina, N.Sh, Tashmukamedov, B.A. (2017) Involvement of mitochondrial ATP synthase in inorganic polyphosphates metabolism, *Доклады Академии Наук Республики Узбекистан*. 2, 72-75.
- Baev, A. Y., Negoda, A. & Abramov, A. Y. (2017) Modulation of mitochondrial ion transport by inorganic polyphosphate - essential role in mitochondrial permeability transition pore, *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 49, 49-55.
- Rustamova, S. I., Tsiferova, N. A., Khamidova, O. J., Kurbannazarova, R. S., Merzlyak, P. G., Khushbaktova, Z. A., Syrov, V. N., Botirov, E. K., Eshbakova, K. A. & Sabirov, R. Z. (2019) Effect of plant flavonoids on the volume regulation of rat thymocytes under hypoosmotic stress, *Pharmacological reports : PR*. 71, 1079-1087.
- Aschar-Sobbi, R., Abramov, A. Y., Diao, C., Kargacin, M. E., Kargacin, G. J., French, R. J. & Pavlov, E. (2008) High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach, *Journal of fluorescence*. 18, 859-66.