

УДК 577.24

НАРУШЕНИЕ КООРДИНИРОВАННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ BIF-1, BAX И Beclin-1 ПРИ ПЕРВИЧНОЙ И МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЕ

© 2020 Ж. Франгеж¹, С.М.С. Джафари², Р.Е. Хангер², Г.-У. Симон^{1,3,*}

¹ Institute of Pharmacology, University of Bern, Bern, Switzerland; E-mail: hus@pki.unibe.ch

² Department of Dermatology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland

³ Department of Clinical Immunology and Allergology, Sechenov University, 119991 Moscow, Russia

Поступила в редакцию 08.07.2020

После доработки 08.07.2020

Принята к публикации 12.07.2020

Меланома является одной из наиболее агрессивных и устойчивых к действию лекарств форм рака. Несмотря на появление новых многообещающих стратегий для её лечения, прогноз у больных с метастатической меланомой остается плохим. Он часто ассоциируется с большой вероятностью рецидива болезни. Эндофилин B1, также известный как BIF-1, является многофункциональным белком, который вовлечен в различные биологические процессы, включая аутофагию и апоптоз. BIF-1 участвует в развитии апоптоза, связываясь с BAX и способствуя его транслокации на внешнюю мембрану митохондрий. С другой стороны, показано, что BIF-1 может взаимодействовать с Beclin-1 через белок UVRAG и способствовать процессу аутофагии. В ряде работ была предположена значительная роль BIF-1 в развитии и прогрессировании рака. Например, было обнаружено, что экспрессия BIF-1 снижается как в случае первичной меланомы, так и при её метастатической форме, и снижение уровня экспрессии BIF-1 ассоциируется с общей выживаемостью больных с меланомой. В настоящей работе показано, что у больных с меланомой снижена экспрессия Beclin-1 и активной формы белка BAX. Однако при отчетливо выраженной положительной корреляции между экспрессией BIF-1 и Beclin-1, а также между белками BIF-1 и BAX доброкачественных невусов, эта корреляция утрачивалась в клетках первичной и метастатической меланомы. Эти данные свидетельствуют о том, что есть нарушение функционирования проксимальных молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию BIF-1, Beclin-1 и BAX при первичной и метастатической меланоме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз, аутофагия, BAX, Beclin-1, BIF-1, меланома.

DOI: 10.31857/S0320972520100103

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на появление новых обещающих терапевтических подходов, таких как иммунотерапия или таргетная терапия, прогноз больных с метастатической меланомой остается плохим, который часто ассоциируется с высокой частотой рецидива опухолей. К сожалению, в настоящее время прогностические факторы, которые используются в клинике, часто недостаточны для выявления больных с высоким риском развития меланомы. BIF-1, также известный как эндофилин B1 или взаимодействующий с BAX белок 1 (BAX-interacting protein 1), принадлежит к белковому семейству эндофилинов, которые являются цитоплазматическими белками, участвующими во многих биологических процессах, таких как динамика митохондриальных мембран, апоптоз, аутофагия, извлечение сигнальных везикул, а также трафик рецептор-

ных тирозиновых киназ и внутриклеточная передача сигнала [1]. Ранее было показано, что экспрессия BIF-1 при первичной и метастатической меланоме снижается по сравнению со здоровыми тканями, и пониженные уровни BIF-1 ассоциируются с менее благоприятным клиническим исходом [2].

Белок BIF-1 чаще обнаруживается в цитозоле. Часть белка также располагается во внутриклеточных мембранных компартментах, включая комплекс Гольджи и митохондрии [3–6]. Было показано, что этот белок необходим для поддержания морфологии и функционирования митохондрий [2, 4]. После того, как было установлено, что этот белок является взаимодействующим партнером белка BAX, в нескольких работах была подробно изучена его роль в процессе апоптоза. Кроме того, было показано, что снижение экспрессии BIF-1 в клетках HeLa вызывало задержку конформационных изменений белков BAX и BAK, высвобождение цитохрома c и активацию каспазы-3, индуцированную различными внут-

* Адресат для корреспонденции.

ренными сигналами гибели клетки [3, 6]. Кроме участия в активации белка BAX, также было показано, что BIF-1 образует комплекс с Beclin-1 через белок UVRAG и положительно модулирует образование аутофагосом [7]. Участие BIF-1 в аутофагии и апоптозе привело к появлению работ, посвященных изучению его роли в канцерогенезе. Показано, что BIF-1 экспрессируется в незначительных количествах, за исключением меланомы [2], при инвазивных формах рака мочевого пузыря и желчного пузыря [8], а также в случае колоректальной аденокарциномы [9]. Напротив, в случае гепатоцеллюлярной карциномы обнаружено повышение его экспрессии [10]. Более того, отсутствие BIF-1 в клетках меланомы приводило к повышенному образованию АТФ, метаболическому закислению клеток и повышению интенсивности митохондриального дыхания, что ассоциировалось с большей степенью пролиферации клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [2].

Поскольку BIF-1 играет роль в процессах апоптоза и аутофагии, было решено изучить корреляцию между экспрессией апоптотических или аутофагических белков и BIF-1 в доброкачественных невусах по сравнению с тканями при первичной и метастатической меланоме. Показано, что экспрессия активной формы белка BAX у больных с метастатической меланомой понижена. Кроме того, обнаружено, что у больных с метастатической меланомой также снижена, по сравнению с доброкачественными невусами, экспрессия основного аутофагического белка Beclin-1. Более того, в клетках первичной и метастатической меланомы исчезает положительная корреляция между BIF-1 и активной формой BAX, белком Beclin-1 или белком LC3B, являющимся маркером аутофагии. Эти данные свидетельствуют о том, что при первичной и метастатической меланоме нарушается регуляция экспрессии белков BIF-1, Beclin-1 и BAX.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

План исследования и больные. Тканевой микрочип (ТМА – Tissue Micro Array) был создан в Отделении патологии (г. Берн, Швейцария). Выполнение данной работы было одобрено Комитетом по этике Кантона (г. Берн). Целью данного когортного исследования являлось изучение роли BIF-1, BAX, LC3B и Beclin-1 в патогенезе меланомы кожи. ТМА включала сохраненные образцы ткани 65 меланоцитических невусов, 41 первичной и 30 метастатических меланом, полученных за период от 2003 по 2015 г. от больных в Отделении дерматологии (Inselspital, Берн).

Иммуногистохимия. Иммуногистохимический анализ проводили как описано ранее [2, 11, 12]. Погруженные в парафин кусочки ткани освобождали от парафина и воды с помощью различных разведений этанола, и затем проводили выявление антигена. Иммуногистохимическое окрашивание осуществляли на приборе Dako REAL Detection System, используя набор с щелочной фосфатазой (Alkaline Phosphatase/RED kit), также содержащий вторичные антитела, в соответствии с инструкциями производителя (Agilent Technologies, K5005). Были использованы следующие первичные антитела: моноклональные антитела против эндофилина B1/BIF-1 (Novus Biologicals, NBP2-24733; 1:100), кроличьи поликлональные антитела против Beclin-1 (Abgent, США; 1:100), моноклональные антитела против белка BAX (клон 6A7, Santa Cruz Biotechnology, США; 1:100) и кроличьи поликлональные антитела против белка LC3B (Abgent, 1:100). Интенсивность окрашивания определяли с помощью программы QuPath [2, 13]. Полученные данные были представлены в виде средних значений оптической плотности (OD) или же использовали программу Image Pro Plus, и данные представляли в виде интегрированной оптической плотности (IOD – integrated optical density) [11, 12].

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) с использованием программного пакета Prism Software v6 (GraphPad, Ла Джолла, США). Достоверные значения были представлены следующим образом: $p \geq 0,05^{ns}$, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ и $p \leq 0,0001^{****}$. Для проведения анализа данные больных с первичной и метастатической меланомой были разделены на две группы в соответствии со средними значениями экспрессии активной формы белка BAX или Beclin-1 в их опухолях. Группа «Высокий уровень экспрессии BAX или Beclin-1» включала больных с уровнем экспрессии BAX или Beclin-1, превышающим среднее значение экспрессии для всей популяции. Группа «Низкий уровень экспрессии BAX или Beclin-1» включала больных с уровнем белков BAX или Beclin-1, который был ниже среднего значения для популяции в целом. Общая выживаемость (OS – overall survival) была определена как время от начала исследования до смерти от любой причины. Выживаемость в отсутствие заболевания (DFS – disease-free survival) была определена как время от случайного распределения до повторного заболевания или его прогрессирования. Это было проанализировано с помощью логрангового критерия и показано на графике в виде кривых выживаемости Каплана–Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Снижение экспрессии активной формы белка VAX у больных с метастатической меланомой. Ранее нами было предположено, что белок VIF-1 является опухолевым репрессором при меланоме, так как он ограничивает рост опухоли, ингибируя функционирование митохондрий. В ряде работ было показано, что VIF-1 усиливает апоптоз, способствуя конформационным изменениям в белках VAX и VAK и транслокации белка VAX в митохондрию [3, 6]. Апоптоз является ключевым механизмом клеточной гибели, с по-

мощью которого удаляются поврежденные клетки, а также трансформированные клетки, которые потенциально могут превратиться в опухолевые клетки. Было решено сначала изучить экспрессию конформационно активной формы белка VAX на различных стадиях развития меланомы с использованием изготовленного на заказ тканевого микрочипа (ТМА) [2]. ТМА содержал 64 образца доброкачественных невусов, 41 образец первичной меланомы и 30 образцов метастатической меланомы. Иммуногистохимический анализ с помощью ТМА выявил постепенное снижение экспрессии активного VAX из добро-

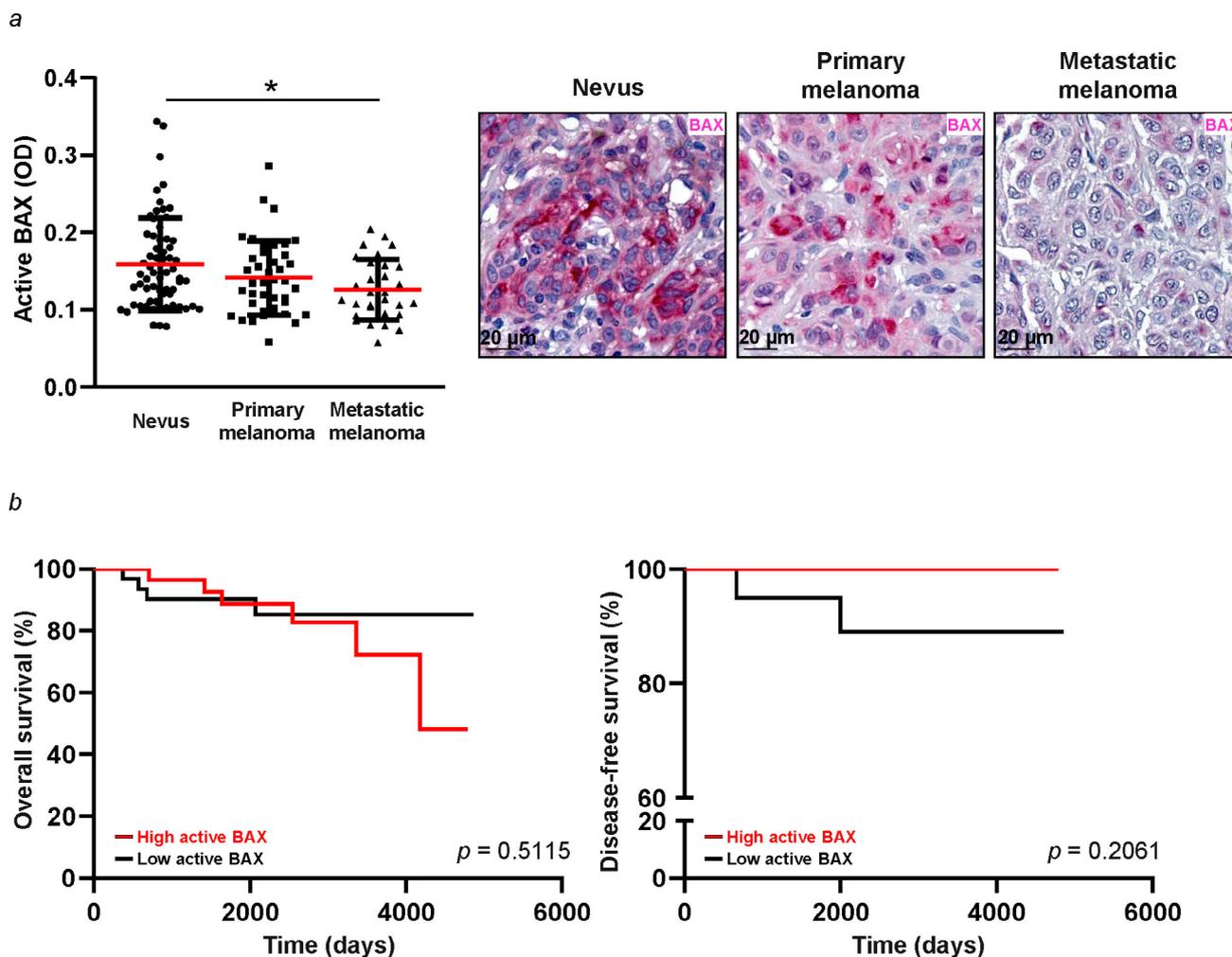


Рис. 1. Экспрессия активной мономерной формы белка VAX при метастатических меланоммах понижена по сравнению с доброкачественными меланоцитарическими невусами. *a* – Иммуногистохимия. Измерение интенсивности сигнала активной мономерной формы белка VAX. Представлены значения интенсивности IOD для отдельных больных. Красными линиями показаны средние из всех значений. Статистические различия были проанализированы с помощью одностороннего метода ANOVA с использованием теста Крускал–Уоллис (Kruskal–Wallis) и пост-хок теста Данна (Dunn's *post hoc* test) (левая панель). Представлены репрезентативные изображения 65 доброкачественных невусов, 41 первичной и 30 метастатических меланом (правая панель); *b* – те же самые больные, находящиеся под наблюдением, были разбиты на две группы («повышенная» и «пониженная») на основании средних значений экспрессии белка VAX в их опухолях. Показаны кривые Каплан–Мейер (Kaplan–Meier) для общей выживаемости и для не связанной с болезнями выживаемостью. (С цветными вариантами рис. 1 и 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

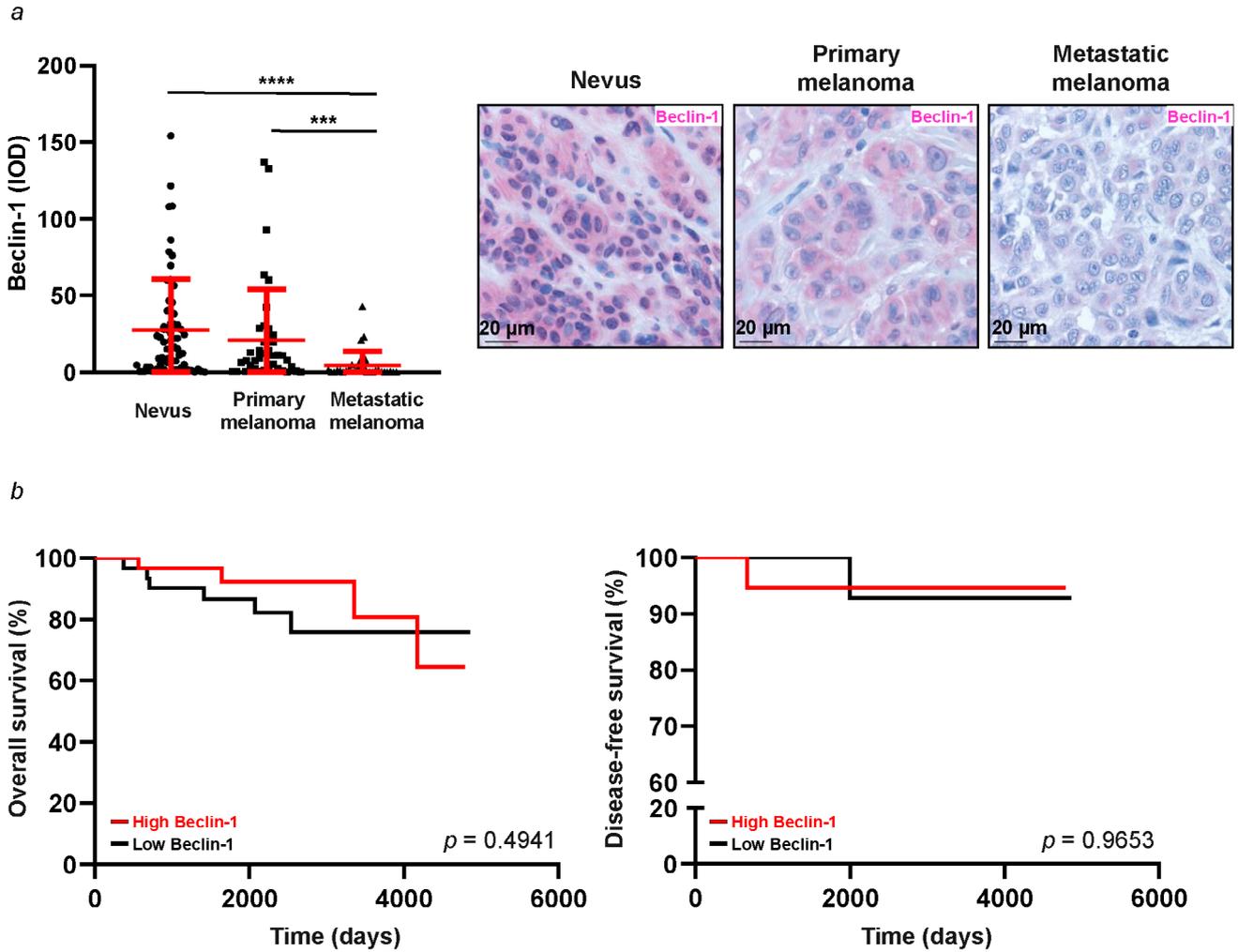


Рис. 2. Экспрессия белка Beclin-1 при метастатических меланоммах понижена по сравнению с доброкачественными меланоцитическими невусами. *a* – Иммуногистохимия. Измерение интенсивности сигнала белка Beclin-1. Представлены значения интенсивности (интегрированная оптическая плотность (IOD) для отдельных больных). Красными линиями представлены средние показатели всех значений. Статистические различия были проанализированы с помощью одно-стороннего метода ANOVA с использованием теста Крускал-Уоллис (Kruskal-Wallis) и пост-хок теста Данна (Dunn's *post hoc* test) (левая панель). Представлены репрезентативные изображения 65 доброкачественных невусов, 41 первичной и 30 метастатических меланом (правая панель); *b* – те же самые больные, находящиеся под наблюдением, были разбиты на две группы («повышенная» и «пониженная») на основании средних значений экспрессии белка Beclin-1 в их опухолях. Показаны кривые Каплан–Мейер для общей и для не связанной с болезнями выживаемостью

качественных невусов, далее из первичной меланомы и наконец из метастатической меланомы (рис. 1, *a*). Экспрессия активного белка VAX существенно снижалась в метастатической меланоме (среднее значение IOD = 0,1116 ± 0,03897) в сравнении с доброкачественными невусами (среднее значение IOD = 0,1588 ± 0,05966). К нашему удивлению, дальнейшая разбивка больных согласно их средней экспрессии белка VAX в группах с повышенной IOD > 0,1344 для первичной меланомы и IOD > 0,1274 в случае метастатической меланомы или с низкой экспрессией активной формы белка VAX показало, что активная форма VAX не влияет на показатели OS или DFS больных меланомой (рис. 1, *b*).

Пониженная экспрессия белка Beclin-1 у больных с метастатической меланомой. Помимо апоптоза, также показано, что существует корреляция между белком VIF-1 и процессом аутофагии. VIF-1 взаимодействует с Beclin-1, связываясь с белком UVRAG, действует как положительный медиатор PI(3)-киназ III класса и аутофагии [7]. Далее была изучена экспрессия белка Beclin-1 в доброкачественных невусах и тканях у больных меланомой. Обнаружено небольшое снижение уровня экспрессии Beclin-1 при первичной меланоме и выраженное снижение экспрессии Beclin-1 у больных с метастатической меланомой по сравнению с доброкачественными невусами (рис. 2, *a*). Интересно, что разделение больных

согласно усредненной экспрессии белка Veclin-1 в группах с повышенной (IOD > 9316,11 при первичной меланоме и IOD > 808,272 в случае метастатических меланом) экспрессией или в случае пониженной экспрессии этого белка показало, что уровень экспрессии белка Veclin-1 не оказывает влияния на показатели OS или DFS больных меланомой (рис. 2, *b*).

При первичной или метастатической меланоме исчезает корреляция между экспрессией BIF-1 и активных форм белка VAX, Veclin-1 или LC3B. Поскольку BIF-1 связан с аутофагией и апоптозом и в связи с тем, что эти процессы важны для предотвращения развития и прогрессирования опухолей, нами была изучена возможность того, что белки, вовлеченные в процессы аутофагии или апоптоза, имеют картину экспрессии, сход-

ную с таковой в случае экспрессии белка BIF-1 в доброкачественных невусах и у больных меланомой. С этой целью мы проанализировали корреляцию между BIF-1 и активной формой белка VAX и Veclin-1. Была выявлена строгая корреляция между BIF-1 и активной формой VAX в доброкачественных невусах (рис. 3, *a*), что позволяет предположить сходный или одинаковый механизм регуляции этих двух белков в меланоцитах. Интересно, что в тканях первичной и метастатической меланом не обнаружена корреляция между BIF-1 и активной формой белка VAX (рис. 3, *b* и *c*).

Кроме того, помимо взаимодействия с белком VAX, BIF-1 также образует комплекс с белком Veclin-1 через белок UVRAG, оказывая влияние на индукцию аутофагии [7]. Veclin-1 явля-

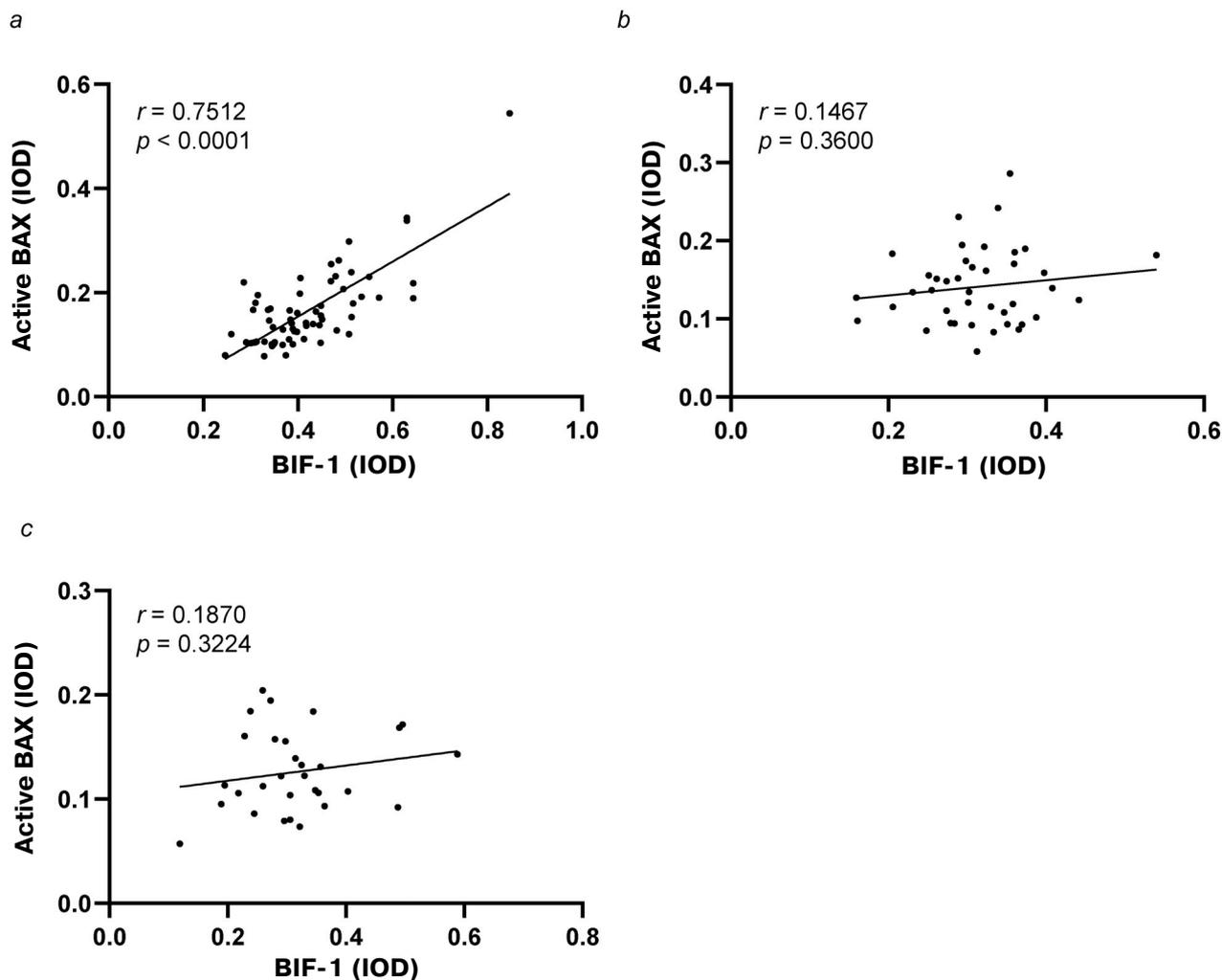


Рис. 3. BIF-1 положительно коррелирует с активной мономерной формой белка VAX в доброкачественных невусах и не выявлено корреляции в образцах тканей при первичной или метастатической меланоме. *a-c* – На точечной диаграмме показана корреляция между средними значениями IOD активной мономерной формы белка VAX и белком BIF-1 в образцах из доброкачественных невусов (*a*), первичной меланомы (*b*) и метастатической меланомы (*c*). Представленные значения r и p показывают корреляцию Пирсона

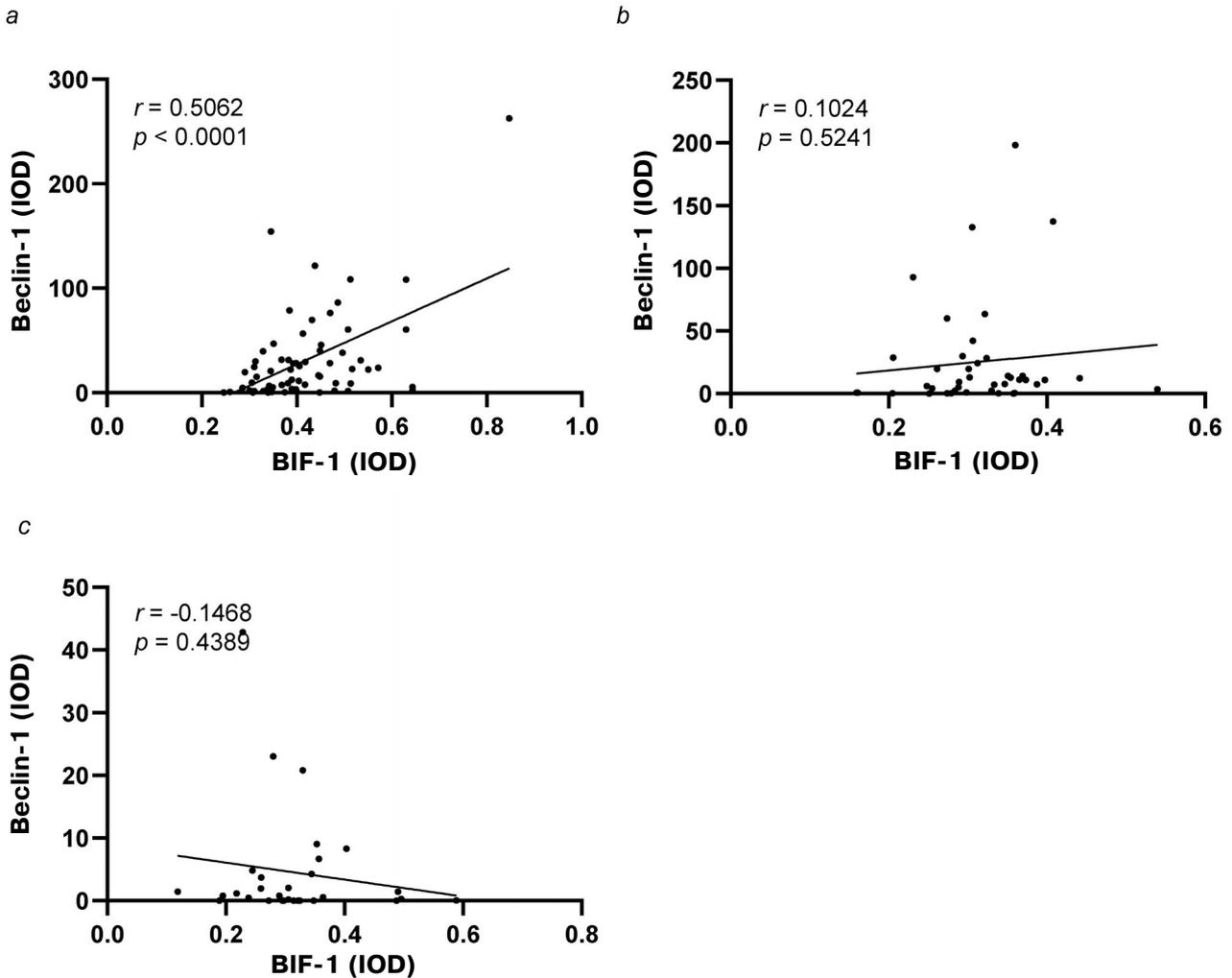


Рис. 4. VIF-1 положительно коррелирует с белком Beclin-1 в доброкачественных невусах, и нет корреляции в образцах тканей при первичной или метастатической меланоме. (a–c) На точечной диаграмме показана корреляция между значениями IOD для белка Beclin-1 и средними значениями оптической плотности белка VIF-1 в образцах доброкачественных невусов (a), первичной меланомы (b) и метастатической меланомы (c). Представленные значения r и p показывают корреляцию Пирсона

ется центральным регулятором процесса аутофагии и действует на начальной стадии аутофагии, участвуя в образовании мембраны, которая охватывает цитоплазматический материал [14]. Поэтому также была изучена экспрессия белка Beclin-1 и выявлена строгая корреляция между активной формой белка VAX и белком Beclin-1 в доброкачественных невусах (рис. 4, a) и отсутствие такой корреляции в тканях при первичной и метастатической меланоме (рис. 4, b, c).

В связи с тем, что VIF-1 является положительным регулятором аутофагии, мы также изучили корреляцию между экспрессией VIF-1 и экспрессией белка LC3B – широко используемого маркера аутофагии. После расщепления и связывания с фосфатидилэтаноламином (PE) LC3 обнаруживается на внутренней и внешней

мембранах аутофагосом [15]. В соответствии с ролью VIF-1 в процессе аутофагии была обнаружена строгая положительная корреляция между уровнем белков VIF-1 и LC3B в доброкачественных невусах (рис. 5, a) и отсутствие такой корреляции в тканях при первичной и метастатической меланоме (рис. 5, b, c). Эти результаты означают, что проксимальная регуляция экспрессии VIF-1, Beclin-1 и VAX в клетках первичной и метастатической меланом нарушена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белок VIF-1 был ассоциирован с несколькими биологическими процессами, в частности, с апоптозом, во время которого этот белок взаи-

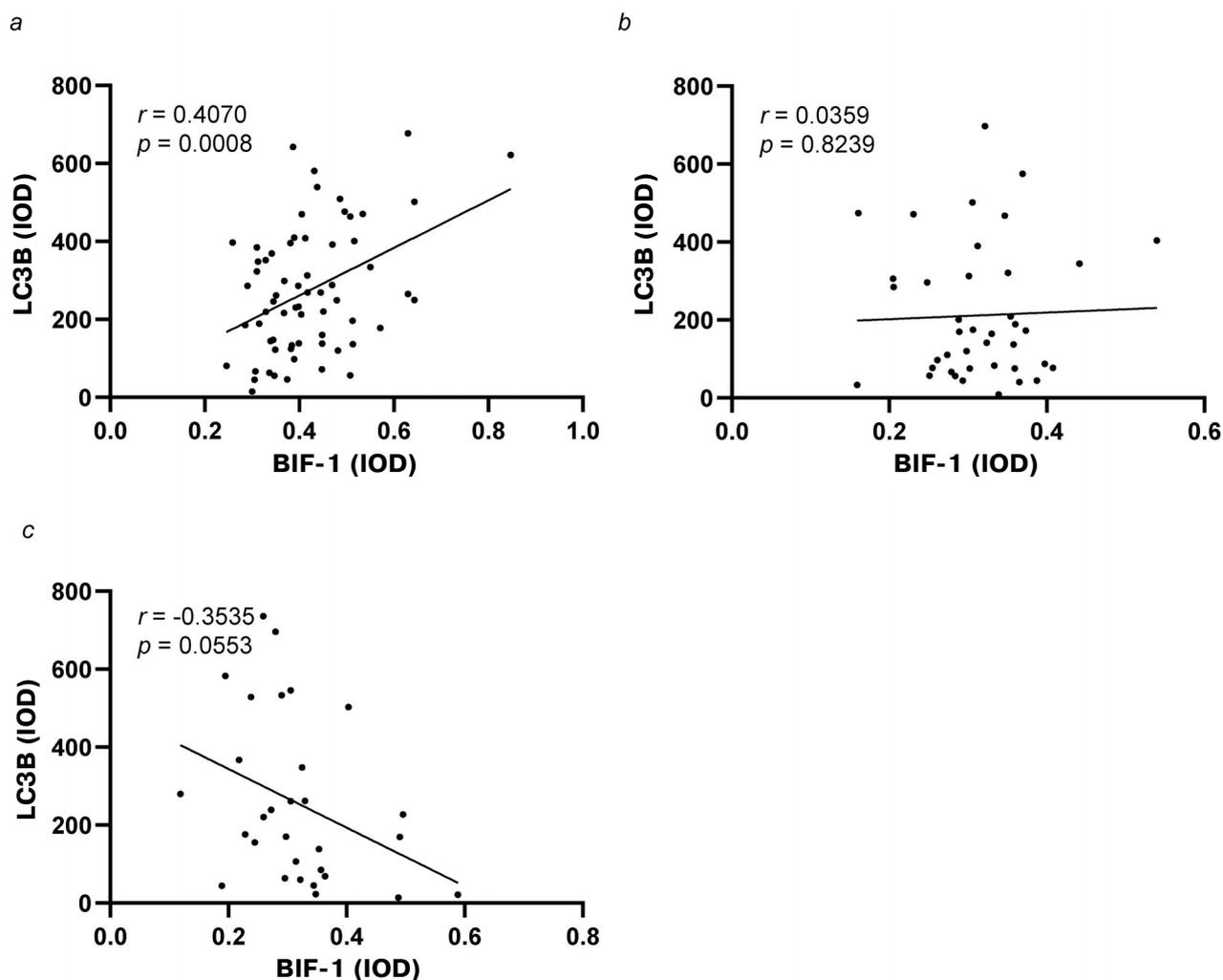


Рис. 5. BIF-1 положительно коррелирует с LC3B в доброкачественных невусах и нет такой корреляции в образцах первичной или метастатической меланом. *a–c* – На точечной диаграмме показана корреляция между значениями IOD для белка LC3B и средними значениями IOD для белка BIF-1 в образцах тканей доброкачественных невусов (*a*), первичной меланомы (*b*) и метастатической меланомы (*c*). Представленные значения r и p показывают корреляцию Пирсона

модействует с белком BAX и способствует его конформационным изменениям во время гибели клетки [3, 6]. Поэтому мы поставили своей целью изучить ось BIF-1-BAX axis в нашей группе больных меланомой. Используя антитела, чувствительные к конформации белка BAX и распознающие его активированную форму, мы выявили соответствующее снижение уровня активной формы белка BAX, ассоциированное со снижением уровня белка BIF-1 в кусочках ткани из метастатической меланомы по сравнению с доброкачественными невусами. Более того, нами была обнаружена положительная корреляция между уровнем экспрессии белка BIF-1 и активной формой белка BAX в невусах, в которых был активирован митохондриальный апоптотический путь [16]. Напротив, эта корреляция не сохранялась в клетках меланомы, что позво-

ляет предположить, что устойчивость к апоптозу, часто возникающая в опухолях меланомы, может быть, по крайней мере, частично, объяснена снижением экспрессии белка BIF-1.

Аутофагия и апоптоз представляют два ключевых внутриклеточных процесса, играющих роль в определении судьбы клетки, и они оказывают большое влияние на развитие и прогрессирование неоплазм [17]. Апоптоз является наиболее распространенной физиологической формой гибели клетки в отсутствие воспаления [18]. Внутренний путь апоптоза регулируется семейством белков BCL-2 и включает пермеабиллизацию внешней митохондриальной мембраны (MOMP – mitochondrial outer membrane permeabilization), которая приводит к высвобождению проапоптотических факторов, таких как цитохром *c* и SMAC/DIABLO, из митохондрий в ци-

тозоль. За МOMP следует процесс активации каскада каспаз, который приводит к гибели клетки [19]. В клетках здоровой ткани центральные проапоптотические регуляторы, белки BAX и BAK перемещаются между внешней митохондриальной мембраной (ОММ – outer mitochondrial membrane) и цитозолем [20, 21]. В условиях апоптоза белки BAX и BAK активируются и подвергаются димеризации и сборке на ОММ, в которой они образуют мультимерные поры [21]. Баланс взаимодействий между проапоптотическими и антиапоптотическими белками, такими как Bcl-2 или Bcl-XL, обеспечивает соответствующую регуляцию апоптоза в ответ на клеточные стрессы и другие факторы, запускающие процессы гибели клетки [19].

Было показано, что утрата экспрессии BAX является отрицательным прогностическим маркером отдельных типов опухолей, таких как рак молочной железы, яичников, поджелудочной железы и пищевода [22–25]. Кроме того, Fecker et al. недавно показали, что отсутствие экспрессии белка BAX в первичных поверхностно-распространяющихся меланомас ассоциирована с прогрессированием опухоли и снижением выживаемости больных [26]. Более того, снижение уровня экспрессии белка BAX в меланоме на стадии IIa ассоциировалось с повышенным риском развития метастазов и плохим прогнозом [27].

Представляет интерес, что белок Beclin-1 был идентифицирован в качестве взаимодействующего партнера белков Bcl-2, Bcl-XL и MCL-1. Такие взаимодействия могут регулировать перекрестные связи между апоптотическим и аутофагическим сигнальными путями [17]. Кроме участия в активации белка BAX, BIF-1 также образует комплекс с белком Beclin-1 через белок UVRAG и положительно регулирует процесс образования аутофагосом [7]. В настоящей работе было показано, что экспрессия Beclin-1 в тканях меланомы понижена в сравнении с его экспрессией в ткани доброкачественных невусов. Кроме того, в дополнение к положительной корреляции между BIF-1 и BAX мы также наблюдали строгую корреляцию между экспрессией в меланоцитах белков BIF-1 и Beclin-1, которая не была обнаружена в тканях первичной и метастатической меланомы. Более того, мы также наблюдали аналогичную картину корреляции между BIF-1 и маркером аутофагии – белком LC3B.

В ряде работ была отмечена роль аутофагии в подавлении роста опухолей. Ген *Beclin-1* был описан в качестве гена-супрессора опухолей, так как было обнаружено, что его аллель от 40% до 75% случаев рака молочной железы, яичников и простаты человека [28]. Кроме того, потеря аллеля гена *Beclin-1* у мышей приводила к по-

вышенной встречаемости опухолей, таких как В-клеточная лимфома, гепатоцеллюлярная карцинома и аденокарцинома легких [29]. Связь между ролью белка Beclin-1 при меланоме была недавно описана в работе, в которой показано, что пониженная экспрессия белка Beclin-1 коррелирует с инвазивностью и снижением уровня выживаемости в течение 5 лет после проведения хирургической операции [30].

Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что проксимальная регуляция, ответственная за координированную экспрессию BIF-1, Beclin-1 и BAX в меланоцитах, по-видимому, отсутствует в клетках первичной и метастатической меланомы. Вероятно, что пониженная экспрессия BIF-1, Beclin-1 и BAX и ожидаемый нефункционирующий проксимальный регуляторный механизм вносят вклад в развитие опухоли и устойчивость к действию лекарств в клетках меланомы.

Финансирование. Выполнение данной работы проходило при финансовой поддержке Швейцарского национального научного фонда (Swiss National Science Foundation, грант No. 310030_184816 был предоставлен H.U.S.) и Европейской программы науки и инноваций (European Union Horizon 2020 Research and Innovation Program; грант фонда Марии Склодовской No. 642295; MEL-PLEX). Изображения были получены на оборудовании, предоставленном Центром микроскопии университета г. Берн.

Вклад авторов. Ж.Ф. задумал, спланировал и осуществил работу, проанализировал и интерпретировал полученные результаты и написал текст статьи. S.M.S.J. провел эксперименты; R.E.H. осуществлял клинический уход за больными меланомой; H.U.S. осуществлял общее руководство работой, консультировал проведение экспериментов, обеспечил доступ к лабораторному оборудованию и редактировал статью; все авторы прочли и одобрили итоговый вариант статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Соответствие этическим нормам. Все процедуры, выполненные в настоящем исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитетов по этике и в соответствии с Хельсинкской декларацией от 1964 г. и её последующих изменений или со сравнимыми этическими стандартами. От каждого участника исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kjaerulff, O., Brodin, L., and Jung, A. (2011) The structure and function of endophilin proteins, *Cell Biochem. Biophys.*, **60**, 137-154, doi: 10.1007/s12013-010-9137-5.
- Franguez, Z., Fernandez-Marrero, Y., Stojkov, D., Seyed Jafari, S. M., Hunger, R. E., Djonov, V., Riether, C., and Simon, H. U. (2020) BIF-1 inhibits both mitochondrial and glycolytic ATP production: its downregulation promotes melanoma growth, *Oncogene*, doi: 10.1038/s41388-020-1339-8.
- Cuddeback, S. M., Yamaguchi, H., Komatsu, K., Miyashita, T., Yamada, M., Wu, C., Singh, S., and Wang, H. G. (2001) Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax, *J. Biol. Chem.*, **276**, 20559-20565, doi: 10.1074/jbc.M101527200.
- Karbowski, M., Jeong, S. Y., and Youle, R. J. (2004) Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology, *J. Cell Biol.*, **166**, 1027-1039, doi: 10.1083/jcb.200407046.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., and De Camilli, P. (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions, *J. Cell Biol.*, **155**, 193-200, doi: 10.1083/jcb.200107075.
- Takahashi, Y., Karbowski, M., Yamaguchi, H., Kazi, A., Wu, J., Sebti, S. M., Youle, R. J., and Wang, H. G. (2005) Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 9369-9382, doi: 10.1128/MCB.25.21.9369-9382.2005.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuaing, H. D., Sun, M., et al. (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1142-1151, doi: 10.1038/ncb1634.
- Kim, S. Y., Oh, Y. L., Kim, K. M., Jeong, E. G., Kim, M. S., Yoo, N. J., and Lee, S. H. (2008) Decreased expression of Bax-interacting factor-1 (Bif-1) in invasive urinary bladder and gallbladder cancers, *Pathology*, **40**, 553-557, doi: 10.1080/00313020802320440.
- Coppola, D., Khalil, F., Eschrich, S. A., Boulware, D., Yeatman, T., and Wang, H. G. (2008) Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma, *Cancer*, **113**, 2665-2670, doi: 10.1002/cncr.23892.
- Fan, R., Miao, Y., Shan, X., Qian, H., Song, C., Wu, G., Chen, Y., and Zha, W. (2012) Bif-1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and correlates with shortened patient survival, *Oncol. Lett.*, **3**, 851-854, doi: 10.3892/ol.2012.562.
- Liu, H., He, Z., Bode, P., Moch, H., and Simon, H. U. (2018) Downregulation of autophagy-related proteins 1, 5, and 16 in testicular germ cell tumors parallels lowered LC3B and elevated p62 levels, suggesting reduced basal autophagy, *Front. Oncol.*, **8**, 366, doi: 10.3389/fonc.2018.00366.
- Liu, H., He, Z., von Rutte, T., Yousefi, S., Hunger, R. E., and Simon, H. U. (2013) Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma, *Sci. Transl. Med.*, **5**, 202ra123, doi: 10.1126/scitranslmed.3005864.
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernandez, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., et al. (2017) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 16878, doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
- Yu, L., Chen, Y., and Tooze, S. A. (2018) Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms, *Autophagy*, **14**, 207-215, doi: 10.1080/15548627.2017.1378838.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008) LC3 and Autophagy, *Methods Mol. Biol.*, **445**, 77-88, doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
- Sprecher, E., Bergman, R., Meilick, A., Kerner, H., Manov, L., Reiter, I., Shafer, Y., Maor, G., and Friedman-Birnbaum, R. (1999) Apoptosis, Fas and Fas-ligand expression in melanocytic tumors, *J. Cutan. Pathol.*, **26**, 72-77, doi: 10.1111/j.1600-0560.1999.tb01805.x.
- Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., and Bhutia, S. K. (2014) Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, **19**, 555-566, doi: 10.1007/s10495-014-0967-2.
- Nagata, S., and Tanaka, M. (2017) Programmed cell death and the immune system, *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 333-340, doi: 10.1038/nri.2016.153.
- Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 175-193, doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
- Todt, F., Cakir, Z., Reichenbach, F., Emschermann, F., Lauterwasser, J., et al. (2015) Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak, *EMBO J.*, **34**, 67-80, doi: 10.15252/embj.201488806.
- Tait, S. W., and Green, D. R. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 621-632, doi: 10.1038/nrm2952.
- Guner, D., Sturm, I., Hemmati, P., Hermann, S., Hauptmann, S., Wurm, R., Budach, V., Dorken, B., Lorenz, M., and Daniel, P. T. (2003) Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis, *Int. J. Cancer*, **103**, 445-454, doi: 10.1002/ijc.10850.
- Tai, Y. T., Lee, S., Niloff, E., Weisman, C., Strobel, T., and Cannistra, S. A. (1998) BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer, *J. Clin. Oncol.*, **16**, 2583-2590, doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2583.
- Friess, H., Lu, Z., Graber, H. U., Zimmermann, A., Adler, G., Korc, M., Schmid, R. M., and Buchler, M. W. (1998) *bax*, but not *bcl-2*, influences the prognosis of human pancreatic cancer, *Gut*, **43**, 414-421, doi: 10.1136/gut.43.3.414.
- Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K., Krajewska, M., Wasenius, V. M., Niskanen, E., Nordling, S., and Reed, J. C. (1995) Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma, *Cancer Res.*, **55**, 4471-4478.
- Fecker, L. F., Geilen, C. C., Tchernev, G., Trefzer, U., Assaf, C., Kurbanov, B. M., Schwarz, C., Daniel, P. T., and Eberle, J. (2006) Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis, *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1366-1371, doi: 10.1038/sj.jid.5700192.
- Tchernev, G., and Orfanos, C. E. (2007) Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings, *J. Cutan. Pathol.*, **34**, 247-256, doi: 10.1111/j.1600-0560.2006.00700.x.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1, *Nature*, **402**, 672-676, doi: 10.1038/45257.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., et al. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene, *J. Clin. Invest.*, **112**, 1809-1820, doi: 10.1172/JCI20039.
- Sivridis, E., Koukourakis, M. I., Mendrinos, S. E., Karpouzis, A., Fiska, A., Kouskousis, C., and Giatromanolaki, A. (2011) Beclin-1 and LC3A expression in cutaneous malignant melanomas: a biphasic survival pattern for beclin-1, *Melanoma Res.*, **21**, 188-195, doi: 10.1097/CMR.0b013e328346612c.

LOSS OF CONCURRENT REGULATION OF THE EXPRESSION OF BIF-1, BAX AND Beclin-1 IN PRIMARY AND METASTATIC MELANOMA**Ž. Frangež¹, S. M. Seyed Jafari², R. E. Hunger², and H.-U. Simon^{1,3*}**¹ *Institute of Pharmacology, University of Bern, Bern, Switzerland; E-mail: hus@pki.unibe.ch*² *Department of Dermatology, Inselspital, Bern University Hospital, University of Bern, Bern, Switzerland*³ *Department of Clinical Immunology and Allergology, Sechenov University, 119991 Moscow, Russia*

Received July 8, 2020

Revised July 8, 2020

Accepted July 12, 2020

Melanoma is one of the most aggressive and drug-resistant cancers. Despite novel promising therapeutic strategies, the prognosis of metastatic melanoma patients remains poor and it is often associated with high relapse rates. Endophilin B1, also known as BIF-1, is a multifunctional protein involved in several biological processes such as autophagy and apoptosis. BIF-1 promotes apoptosis through binding to BAX and its translocation to the mitochondrial outer membrane. On the other hand, BIF-1 can interact with Beclin-1 through UVRAG to promote autophagy. Several reports suggest an ambiguous role of BIF-1 in cancer development and progression. For example, it has been demonstrated that the expression of BIF-1 is reduced in both primary and metastatic melanoma and that the reduction of BIF-1 expression is associated with reduced overall survival of melanoma patients. Here we show that the expression of Beclin-1 and active form of BAX are also reduced in the melanoma patients. However, while we observed strong positive correlations between the expression of BIF-1 and Beclin-1 as well as between BIF-1 and BAX in benign nevi, these correlations were lost in the primary and metastatic melanoma cells. These data indicate disruption in the proximal molecular mechanisms which regulate expression of BIF-1, Beclin-1, and BAX in the primary and metastatic melanoma.

Keywords: apoptosis, autophagy, BAX, Beclin-1, BIF-1, melanoma