

УДК 577.12

## ДЕГРАДАЦИЯ Mcl-1 В УСЛОВИЯХ НЕДОСТАТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРОИСХОДИТ НЕЗАВИСИМО ОТ АУТОФАГИИ

© 2020 Н.В. Первушин<sup>1</sup>, В.В. Сеничкин<sup>1</sup>, А.А. Капуста<sup>1</sup>, А.С. Горбунова<sup>1</sup>,  
В.О. Каминский<sup>2</sup>, Б. Животовский<sup>1,2</sup>, Г.С. Копейна<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: lirroster@gmail.com

<sup>2</sup> Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, 17177 Стокгольм, Швеция

Поступила в редакцию 10.07.2020

После доработки 07.08.2020

Принята к публикации 26.08.2020

В условиях недостатка питательных веществ в опухолевых клетках наблюдается деградация антиапоптотического белка Mcl-1, являющегося мишенью таргетной терапии онкологических заболеваний. При этом происходит усиление чувствительности злокачественных клеток к химиотерапевтическим препаратам. Показано, что ограничение питательных веществ (ОПВ) ведет к блокированию синтеза белка Mcl-1, однако механизмы деградации Mcl-1 в таких условиях остаются невыясненными. В данной работе исследовали вклад аутофагии и протеасомной деградации в регуляцию уровня Mcl-1 при недостатке питательных веществ. Установлено, что снижение уровня белка Mcl-1 в опухолевых клетках в указанных условиях не зависит от процесса макроаутофагии и происходит в результате его протеасомной деградации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** апоптоз, аутофагия, Mcl-1, недостаток питательных веществ, аденокарцинома.

DOI: 10.31857/S0320972520100115

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач современной медицины является борьба с онкологическими заболеваниями. По данным Всемирной организации здравоохранения, опухолевые заболевания ежегодно уносят жизни ~10 млн человек. Установлено, что одними из важнейших причин появле-

ния и роста опухолей являются мутации в генетическом материале клеток и последующее неконтролируемое деление перерожденных клеток. В процессе онкогенеза клетки способны приобретать устойчивость к различным типам программируемой клеточной гибели (ПКГ), включая апоптоз, который имеет большое значение в противоопухолевой защите организма [1, 2]. В регуляции апоптоза участвуют различные гены и их продукты, среди которых важную роль играют белки семейства Bcl-2, представленного как антиапоптотическими, так и проапоптотическими членами. Повышенная экспрессия антиапоптотических белков данного семейства (Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1) является одним из распространенных механизмов устойчивости опухолевых клеток к апоптозу. Среди антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 выделяется белок Mcl-1, который имеет ряд особенностей, отличающих его от других белков. Во-первых, Mcl-1 (37,2 кДа) по мол. массе превосходит такие антиапоптотические белки, как Bcl-2 и Bcl-xL (оба – 26 кДа), что связано с наличием большого N-концевого регуляторного участка, включающего в себя последовательности сигнала митохондриальной локализации и PEST (PEST-последовательности, богатые пролином, глутаминовой кислотой, серином и треонином, присущи белкам, подверженным быстрой дегра-

Принятые сокращения: Atg proteins – семейство белков, участвующих в процессе макроаутофагии; Bcl-2 – белок В-клеточной лейкемии/лимфомы-2; ECL – усиливающий хемилюминесценцию субстрат, содержащий люминол; ERK – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; FACS – сортировка клеток с активированной флуоресценцией; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; HBSS – среда, обедненная питательными веществами; Hsp – белки теплового шока; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; Mcl-1 – белок лейкемии миелоидных клеток-1; mTORC1 – комплекс 1, содержащий мишень рапамицина млекопитающих; PARP – поли(ADP-рибозо)-полимераза; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PBS – фосфатный солевой буфер; PEST-последовательности – последовательности, богатые пролином (P), глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T); PMSF – фенилметилсульфонилфторид; SD – депривация сыворотки; SDS – додецил сульфат натрия; Ub – убиквитин; USP9X – деубиквитиназа, убиквитин-специфичная пептидаза 9; ЙП – йодид пропидия; ОПВ – ограничение питательных веществ; ПААГ – полиакриламидный гель; ПКГ – программируемая клеточная гибель.

\* Адресат для корреспонденции.

дации), что, в свою очередь, обуславливает короткое время полужизни данного белка [3]. Во-вторых, Mcl-1 способен быстро деградировать в результате действия различных стрессовых стимулов [4]. Кроме того, как и другие антиапоптотические белки семейства Bcl-2, Mcl-1 является необходимым фактором для выживания различных типов клеток и может быть рассмотрен в качестве возможной мишени таргетной терапии онкологических заболеваний [5–7].

Несколькими исследовательскими группами (включая нашу) было показано, что антиапоптотический белок Mcl-1 подвержен деградации в условиях ограничения питательных веществ (ОПВ) [8–10]. Однако механизмы этого процесса в настоящее время недостаточно изучены. Так как ОПВ является одним из основных стимулов активации аутофагии, можно предположить, что снижение уровня Mcl-1 в раковых клетках в условиях недостатка питательных веществ происходит по этому механизму, представляющему собой высококонсервативный процесс катаболизма различных клеточных компонентов в аутолизосомах.

Аутофагия является не только одним из типов ПКГ, но и важным адаптационным механизмом, поскольку она отвечает за утилизацию поврежденных органелл и белков [11]. В зависимости от механизмов доставки компонентов клеток к лизосомам различают несколько типов аутофагии, такие как шаперон-зависимую аутофагию, микроаутофагию и макроаутофагию. В случае микроаутофагии транспорт макромолекул и фрагментов мембран клеток в лизосому обеспечивается путем инвагинации ее мембраны. Этот тип часто наблюдается у дрожжевых микроорганизмов, но редко встречается у млекопитающих [12]. В случае макроаутофагии происходит образование аутофагосом, представляющих собой двухмембранные структуры, которые изолируют цитоплазматические компоненты, подлежащие деградации. Далее аутофагосомы сливаются с лизосомами, что ведет к образованию аутофаголизосом, в которых содержимое аутофагосом подвергается расщеплению. Контроль макроаутофагии, которая включает в себя процессы деградации рибосом, эндоплазматического ретикулума, митохондрий и других органелл, а также нуклеиновых кислот, липидов, белков, обеспечивается специфическими белками семейства Atg [13]. Данный вид аутофагии является наиболее изученным в настоящее время, поэтому в дальнейшем термин «аутофагия» будет использоваться для обозначения макроаутофагии. Наконец, существует шаперон-зависимая аутофагия, для которой не требуется формирования везикул. Этот тип ау-

тофагии осуществляется при участии белков-шаперонов цитоплазмы семейства Hsp-70 и различных вспомогательных белков, регулирующих направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы в полость лизосомы для последующей деградации [14].

Как было отмечено выше, основным стимулом к активации аутофагии наряду с поврежденными органеллами или денатурированными белками является недостаток питательных веществ. В этой работе нами были использованы два экспериментальных подхода для создания условий ОПВ: культивирование клеток в бессывороточной среде (условия SD) и среде HBSS.

Первый подход представляет собой условия депривации сыворотки (SD). Удаление сыворотки из культуральной среды может приводить к различным биохимическим и молекулярным изменениям в раковых клетках, поскольку сыворотка содержит не только питательные вещества (белки, витамины, жирные кислоты и т.д.), но и факторы роста, которые стимулируют молекулярные каскады, регулирующие клеточный рост и пролиферацию – PI3K/Akt/mTORC1 и Ras/Raf/MAPK [15, 16]. Снижение доступности питательных веществ стимулирует процессы аутофагии напрямую, в то время как уменьшение стимуляции каскадов PI3K/Akt/mTORC1 и Ras/Raf/MAPK ведет к ослаблению антиапоптотической защиты раковых клеток и подавлению метаболических процессов, способствуя активации процессов аутофагии [17].

Второй экспериментальной моделью условий ОПВ является культивирование клеток в среде HBSS, которая является более сильным стимулом активации аутофагии по сравнению с условиями SD, так как в случае HBSS клетки культивируются в водно-солевом растворе, содержащем D-глюкозу, и полностью лишены не только сыворотки, что достигается при использовании модели SD, но и всех аминокислот [18].

Необходимо подчеркнуть, что процессы аутофагии и апоптоза находятся в тесной взаимосвязи. Так, например, антиапоптотические белки, в том числе и Mcl-1, препятствуют не только апоптозу, но и аутофагическим процессам за счет нейтрализации белка Beclin-1, который способствует протеканию аутофагии [19]. Кроме того, Mcl-1 может не только взаимодействовать с Beclin-1, но и вести к уменьшению его уровня, что происходит в результате конкуренции между Mcl-1 и Beclin-1 за связывание с деубиквитиназой USP9X, препятствующей протеасомной деградации обоих белков [20]. Таким образом, уменьшение концентрации Mcl-1 может стимулировать аутофагию, однако клеточный ответ (апоптотический или аутофагический) в резуль-

тате снижения уровня Mcl-1 будет определяться балансом апоптотических (про- и антиапоптотические белки семейства Bcl-2) и аутофагических (Atg-белки) факторов. Наконец, аутофагия играет двойственную роль в развитии опухолевых заболеваний. С одной стороны, она может стимулировать клеточную гибель, регулируя деградацию про- и антиапоптотических факторов (например, белков семейства Bcl-2 [21]). С другой стороны, данный процесс позволяет адаптироваться клеткам к стрессовым условиям, так как повышает выработку энергии и удаляет поврежденные органеллы.

Другим возможным механизмом снижения уровня антиапоптотического белка Mcl-1 в условиях ОПВ могут являться процессы протеасомной деградации. В ряде работ была показана значимость этого механизма для Mcl-1, что детально рассмотрено в работе [6]. Убиквитинирование Mcl-1 и его последующая деградация в протеасомах в ответ на действие различных стимулов определяет короткое время жизни данного белка [6]. Стоит отметить, что степень убиквитинирования Mcl-1, как и других белков, контролируется балансом активностей убиквитинлигаз (Mule, Parkin, Trim17 и др.) и деубиквитиназ (USP9X, USP13, Ku70 и др.), что наглядно демонстрирует тесную взаимосвязь процессов апоптоза и протеасомной деградации [6].

Убиквитинлигазы обеспечивают деградацию своих субстратов за счет присоединения остатков убиквитина. Деубиквитиназы, напротив, повышают стабильность белков, противодействуя работе убиквитинлигаз. Первой убиквитинлигазой, для которой была обнаружена способность регуляции Mcl-1, была Mule. Интересно, что Mule способна избирательно контролировать уровень Mcl-1, не взаимодействуя с антиапоптотическими белками Bcl-xL или Bcl-2. Также в качестве убиквитинлигазы Mcl-1 был отмечен белок Parkin, участвующий в процессах митофагии (селективное разрушение митохондрий путем аутофагии). Убиквитинлигаза Trim17 и деубиквитиназа USP9X регулируют деградацию Mcl-1 после его фосфорилирования. Наконец, к деубиквитиназам Mcl-1 относится белок Ku70, участвующий в репарации ДНК [6].

Ранее нами было показано, что ингибирование протеасомной деградации в клетках аденокарциномы яичника Caov-4 и аденокарциномы шейки матки HeLa, культивируемых как в стандартных условиях, так и при ОПВ, приводило к стабилизации Mcl-1 [8]. Однако не была исследована роль процессов аутофагии в регуляции уровня Mcl-1 в условиях ОПВ.

Целью настоящей работы являлась оценка вклада аутофагии в уменьшение уровня анти-

апоптотического белка Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ в опухолевых клетках. В качестве экспериментальной модели были использованы клетки трех раковых линий человека — аденокарциномы яичника Caov-4, шейки матки HeLa и легкого U1810. Для индукции апоптотической гибели применяли химиотерапевтический ДНК-повреждающий агент цисплатин, который используют для лечения этих типов рака.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток.** Исследования были проведены на культурах клеток линий аденокарциномы яичника Caov-4, шейки матки HeLa и легкого U1810 (клетки дикого типа и нокаутные по аутофагии — U1810 ATG13KO). Клетки выращивали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5%-ная CO<sub>2</sub>) при 37°C в среде DMEM («Gibco», США) или RPMI («Gibco»), содержащей 10%-ную телячью сыворотку («Gibco») и 5 мл раствора пирувата натрия с исходной концентрацией 11 мг/мл («ПанЭко», Россия) в присутствии антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, 100 ед/мл). Для экспериментов были взяты клетки в логарифмической фазе роста.

**Экспериментальная модель ОПВ.** Условия ограничения питательных веществ создавали с помощью двух моделей: 1) условия SD: культивирование клеток в среде DMEM и RPMI в присутствии только антибиотиков без добавления телячьей сыворотки и пирувата; 2) условия HBSS: культивирование клеток в водно-солевом растворе, в котором присутствовала D-глюкоза, но отсутствовали аминокислоты и сыворотка.

**Реагенты.** В экспериментах были использованы индуктор клеточной гибели цисплатин («ТЕВА», Израиль) в концентрации 70 мкМ, ингибитор аутофагии Бафиломицин А1 («Sigma», США) в концентрации 50 нМ, ингибитор протеасом MG-132 («Sigma») в концентрации 10 мкМ и селективный антагонист белка Mcl-1 S63845 («Active Biochem», Китай) в указанных в эксперименте концентрациях.

**FACS-анализ.** После культивирования клеток в условиях, указанных в описании эксперимента, клетки отделяли от культурального пластика с помощью 0,25%-ного трипсина («Gibco») и переносили в кондиционированную среду. Затем клетки центрифугировали (200–300 г, 5 мин, 4°C), дважды промывали холодным раствором PBS («ПанЭко») и осадок ресуспендировали в PBS (100 мкл на 1 млн клеток). ~100 тыс. клеток (10 мкл) переносили в 200 мкл 1x аннексин-связывающего буфера («BD Biosciences»,

США), и анализ популяции клеток проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II («BD Biosciences») и программного обеспечения («BD FACSDiva», США), как описано ранее [8].

**Гель-электрофорез белков в ПААГ в присутствии SDS и Вестерн-блот-анализ.** Клеточный осадок ресуспендировали в  $50 \pm 25$  мкл RIPA-буфера (50 mM Tris HCl, pH 7,4, 137 mM NaCl, 0,1%-ный SDS, 0,5%-ный дезоксихолат, 1%-ный Triton X-100, 0,01%-ный PMSF, коктейль ингибиторов протеаз («Roche», Швейцария)) и инкубировали на льду в течение 20 мин. После центрифугирования (16 000 g, 15 мин, 4°C) часть супернатанта была взята для определения количества белка в лизатах с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США). Другую часть супернатанта использовали для Вестерн-блот-анализа, как описано ранее [8]. В экспериментах были использованы первичные антитела к следующим белкам: PARP («Abcam», ab74290, Великобритания), p62 («Abcam», ab56416), LC3B («Abcam», ab51520), Mcl-1 («Cell Signaling», США), K48-Ub («Cell Signaling», #4289S), total Ub («Cell Signaling», #3933), тубулин-альфа («Abcam», ab4074, Великобритания), GAPDH («Cell Signaling», #2118). В качестве вторичных использовали антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, к кроличьему или мышинному IgG («Abcam», ab97200 и ab97046 соответственно). Разведения антител были выбраны в соответствии с рекомендациями производителя.

**Статистический анализ** проводили с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Обработку результатов измерений концентрации белка, клеточной гибели (FACS-анализ), а также статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Депривация сыворотки ведет к усилению процессов аутофагии в раковых клетках независимо от присутствия цисплатина.** Согласно литературным данным, удаление факторов роста и питательных веществ из среды может приводить к усилению процессов аутофагии [22, 23]. Для оценки потенциальной роли аутофагии в деградации белка Mcl-1 был проведен анализ уровня аутофагии при использовании цисплатина как в стандартной, так и бессывороточной средах.

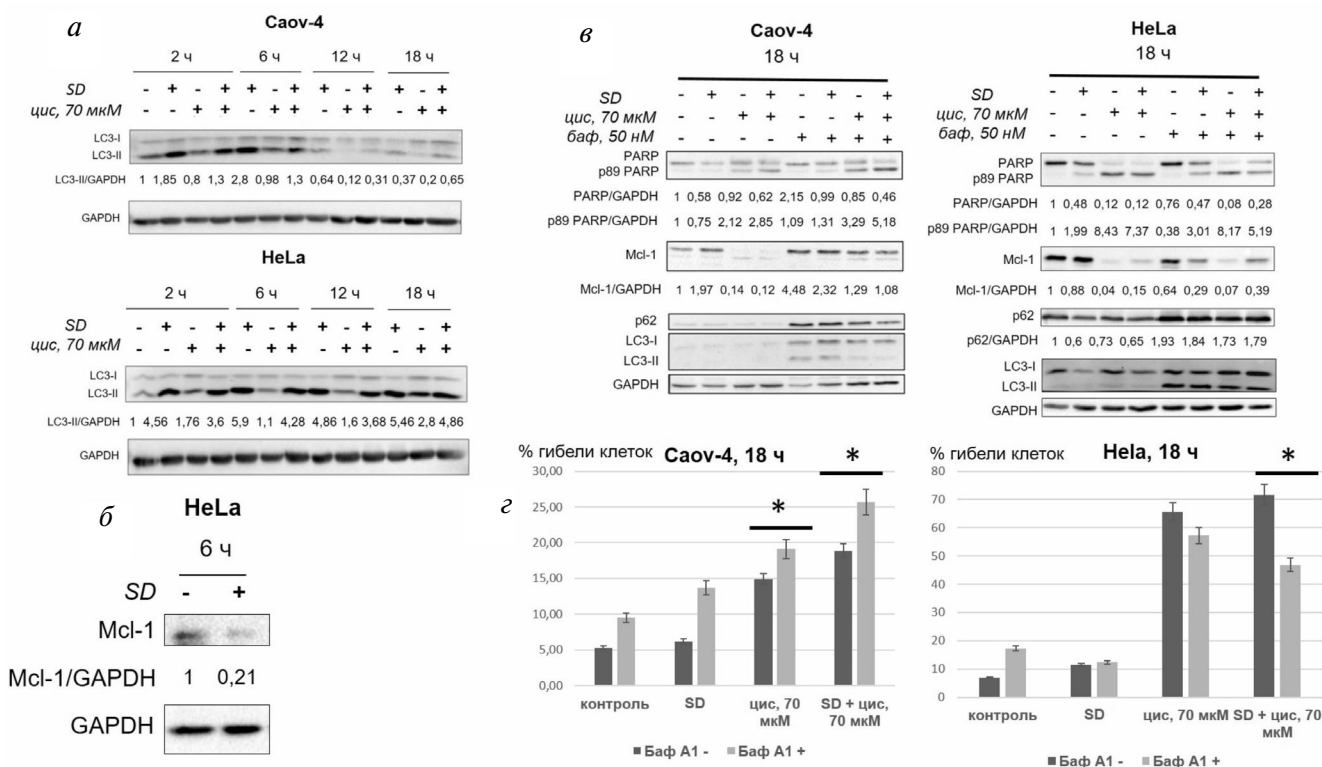
Для определения интенсивности процессов аутофагии в выбранной экспериментальной мо-

дели исследовали уровень маркера аутофагии белка LC3 в клетках линий Caov-4 и HeLa во всех анализируемых группах. Стимулирование аутофагии приводит к конъюгации LC3-I с фосфатидилэтаноламином и появлению активной формы LC3-II, которая обладает большей электрофоретической подвижностью и детектируется в геле ниже, чем LC3-I [24]. Таким образом, повышение соотношения LC3-II/ LC3-I, как правило, свидетельствует об усилении в клетке процессов аутофагии [25].

Для анализа уровня аутофагии клетки Caov-4 и HeLa инкубировали в стандартной среде или в условиях SD с добавлением цисплатина или без него в течение 2, 6, 12 или 18 ч, в качестве контроля использовали инкубацию клеток в течение 2 ч в стандартной среде.

Вестерн-блот-анализ показал, что в условиях SD происходило накопление LC3-II, что свидетельствует о выраженном усилении аутофагии уже спустя 2 ч культивирования вне зависимости от присутствия цисплатина (рис. 1, *a*). По мере протекания процессов аутофагии в клетках может наблюдаться снижение уровня LC3-II за счет интенсивной деградации этого белка. Данный феномен широко известен из научной литературы, поэтому для корректной оценки интенсивности аутофагии рекомендуют использовать ингибиторы протеаз или проводить оценку уровня LC3-II в различные временные точки [24]. Последний подход был применен в рамках настоящей работы, и выраженное накопление LC3-II в ранние часы инкубации позволило сделать вывод об интенсификации процессов аутофагии в условиях SD.

Обработка клеток цисплатином может приводить к накоплению активных форм кислорода (АФК) и, соответственно, повреждениям клеточных органелл [26]. В таких условиях в клетке будут дополнительно стимулироваться процессы аутофагии для удаления поврежденных структур и поддержания жизнеспособности. Поэтому уровень маркеров аутофагии был также проанализирован в клетках обеих линий, инкубированных в присутствии цисплатина в стандартной или бессывороточной среде. Показано, что добавление цисплатина не влияло значительным образом на перераспределение двух форм LC3 в течение 18 ч после начала инкубации (рис. 1, *a*). Некоторое снижение уровня LC3-II в сравнении с культивированием клеток Caov-4 и HeLa в условиях SD может быть следствием взаимного влияния между апоптозом и аутофагией. Как было замечено ранее, запуск апоптоза может препятствовать протеканию аутофагии, а подавление аутофагии может усиливать апоптотический ответ клеток [19].



**Рис. 1.** а – Анализ индукции аутофагии в клетках Caov-4 и HeLa в условиях ОПВ; б – анализ изменений уровня Mcl-1 в условиях ОПВ в клетках HeLa; в – анализ изменений уровня Mcl-1 и оценка клеточной гибели в клетках Caov-4 и HeLa при действии ингибитора аутофагии Бафиломицина А1 (50 нМ) методом Вестерн-блота; г – оценка клеточной гибели в клетках Caov-4 и HeLa при действии ингибитора аутофагии Бафиломицина А1 (50 нМ) методом проточной цитофлуориметрии с окраской Аннексином V-FITC и йодидом пропидия; % гибели клеток – суммарный % популяции Аннексин/ИП +/-, Аннексин/ИП ++ и Аннексин/ИП -/+ клеток. SD – депривация сыворотки; циc, 70 мкМ – 70 мкМ цисплатина; ч – часы инкубации; баф, 50 нМ – 50 нМ ингибитора аутофагии Бафиломицина; LC3I и LC3II – нелипидированная и липидированная формы LC3 соответственно; GAPDH – белковый маркер загрузки геля. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, n = 3; \* p < 0,05 (U-тест)

**Ингибирование аутофагии оказывает разнонаправленный эффект на выживаемость раковых клеток.** Как отмечено выше, в процессе аутофагии происходит деградация различных белков. По данным Вестерн-блот-анализа было выявлено, что в клетках Caov-4 и HeLa обработка цисплатином приводила к выраженному падению Mcl-1 как в нормальной, так и в бессывороточной среде (рис. 1, в).

Примечательно, что в выбранных временных рамках (18 ч инкубации) использование бессывороточной среды без добавления цисплатина по сравнению со стандартными условиями культивации приводило к незначительному понижению уровня Mcl-1 в клетках HeLa и даже к некоторому повышению уровня этого белка в клетках Caov-4, в то время как более короткий интервал инкубации (6 ч) в условиях SD на этих клеточных линиях вел к понижению уровня Mcl-1, которое было особенно выражено в клетках HeLa (рис. 1, б). Данный феномен был описан нами ранее [8]. Это обстоятельство демон-

стрирует уникальность условий SD, биологические эффекты которых зависят как от типа клеточных линий, так и от времени культивирования [16].

Также была проведена оценка влияния ингибиторов аутофагии на уровень антиапоптоического белка Mcl-1. С этой целью клетки Caov-4 и HeLa были предварительно обработаны ингибитором аутофагии Бафиломицином А1 (ингибитор Н(+)-АТФазы вакуолярного типа, который влияет на слияние аутофагосом с лизосомами) в концентрации 50 нМ, после чего клеточную гибель индуцировали 70 мкМ цисплатина в стандартной или бессывороточной средах в течение 18 ч. Как уже было упомянуто ранее, об эффективности ингибирования аутофагии судили по накоплению форм LC3-I и LC3-II, а также по уровню белка p62, который отвечает за доставку убиквитинилированных белков в аутофагосомы.

Вестерн-блот-анализ показал, что действие Бафиломицина А1 ведет к стабилизации Mcl-1 в

зависимости от способа обработки и типа клеток. Так, в клетках Саов-4 Бафиломицин А1 вел к стабилизации Mcl-1 в клетках, обработанных цисплатином, как в стандартной, так и в бессывороточной средах. В клетках HeLa стабилизирующий эффект Бафиломицина А1 на Mcl-1 наблюдался только при обработке цисплатином в условиях SD (рис. 1, в).

Клеточная гибель регистрировалась по появлению одного из маркеров апоптоза – фрагмента р89 белка PARP (поли(АДР-рибозо)-полимеразы). PARP участвует в процессе репарации повреждений ДНК. Расщепление PARP эффекторными каспазами ведет к его инактивации и свидетельствует об интенсивности протекания процессов апоптоза в клетке [27]. Стоит отметить, что добавление Бафиломицина А1 снижало протеолиз PARP и накопление его фрагмента р89 после обработки клеток HeLa цисплатином в условиях SD, что свидетельствовало об уменьшении уровня клеточной гибели, в то время как в клетках Саов-4 аналогичные условия вели к увеличению гибели клеток (рис. 1, в).

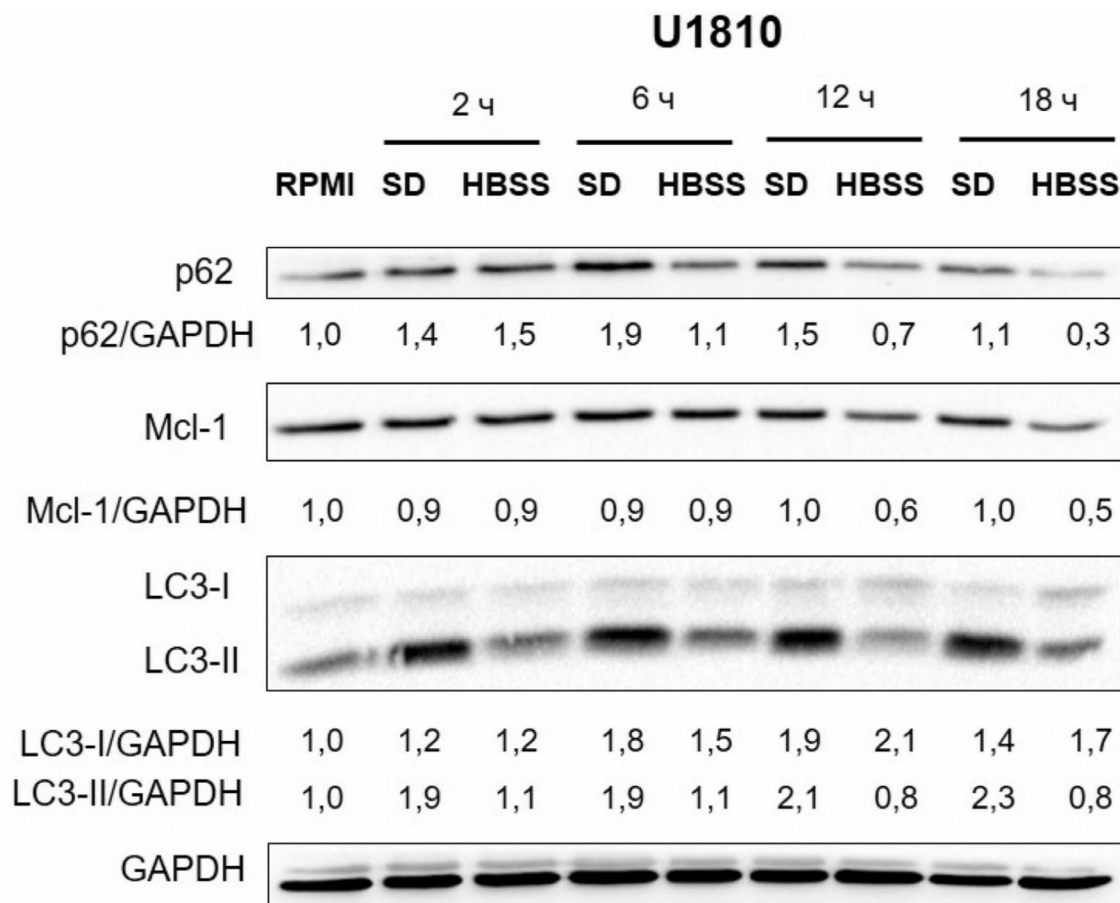
С целью количественной оценки влияния ингибирования аутофагии посредством Бафиломицина А1 на величину апоптотической популяции при действии цисплатина был проведен цитофлуориметрический анализ с окраской Аннексином V-FITC и йодидом пропидия клеток Саов-4 и HeLa, обработанных Бафиломицином А1 в конечной концентрации 50 нМ. Время инкубации обеих клеточных линий с цисплатином составляло 18 ч. Показано, что в клетках Саов-4 при действии цисплатина независимо от среды культивирования Бафиломицин А1 ведет к небольшому увеличению популяции гибнущих клеток (т.е. клеток, которые прокрашивались Аннексином V-FITC и/или йодидом пропидия). В то же время в клетках HeLa Бафиломицин А1 приводил к выраженному снижению (свыше 20% от общего числа клеток в популяции) клеточной гибели при действии цисплатина в условиях SD, в то время как в стандартной среде эффект был минимален (рис. 1, з).

Ингибирование аутофагии может оказывать различный эффект на выживаемость опухолевых клеток, зависящий не только от типа клеток, но и от способа индукции клеточной гибели. Подобный результат согласуется с современными представлениями о роли аутофагии в ответе опухолевых клеток на различные химиотерапевтические соединения [28]. Поскольку ингибирование аутофагии затрагивает множество анти- и проапоптотических факторов, различающийся ответ клеток Саов-4 и HeLa на действие Бафиломицина А1 может быть вызван стабилизацией различных белков. Стоит отметить, что

накопление Mcl-1 при ингибировании аутофагии в клетках HeLa, обработанных цисплатином в условиях SD, коррелирует со снижением клеточной гибели. Следовательно, Mcl-1 может представляться одним из факторов, который отвечает за наблюдаемый феномен. Так, ингибирование Mcl-1 с помощью ВНЗ-миметика S63845 приводило к более высокому уровню гибели клеток линии HeLa по сравнению с клетками Саов-4, что говорило о зависимости жизнеспособности клеток HeLa от этого белка [Рис. S1 в приложении этой статьи на сайте журнала (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) и сайте Springer ([link.springer.com](http://link.springer.com))].

**Снижение уровня Mcl-1 в клетках U1810 наблюдается в условиях HBSS, но не в условиях SD.** С целью анализа процессов аутофагии в нашей лаборатории была создана мутантная линия клеток аденокарциномы легкого U1810, нокаутных по гену *ATG13*, кодирующему одноименный белок, отвечающий за формирование фагосом [29]. Для дальнейшего изучения вклада аутофагии в уменьшение уровня белка Mcl-1 в раковых клетках использовали как данную нокаутную линию U1810 ATG13KO, так и клетки дикого типа U1810. В экспериментах использовали не только условия SD, но и вторую модель ОПВ – культивирование клеток в среде HBSS [18]. Для анализа уровня аутофагии клетки U1810 инкубировали в стандартной среде (среда RPMI), в условиях ОПВ в течение 2, 6, 12 или 18 ч, в качестве контроля клетки инкубировали в течение 2 ч в стандартной среде. Методом Вестерн-блот-анализа был оценен уровень белка Mcl-1, а также уровень маркеров аутофагии (белков LC3 и p62). Показано, что условия SD не влияли на уровень белка Mcl-1 в клетках U1810, в то время как культивация клеток в среде HBSS на более поздних временных точках (12 и 18 ч) приводила к снижению уровня Mcl-1 практически в 2 раза (рис. 2).

Важно отметить, что и условия SD, и условия HBSS приводили к эффективному запуску аутофагии, несмотря на различие уровней LC3-II в используемых экспериментальных моделях. Эту разницу можно объяснить тем, что при усилении уровня аутофагии деградация LC3-II может происходить быстрее преобразования формы LC3-I в LC3-II, что осложняет анализ изменения соотношения LC3-II/LC3-I в разных условиях. Такая деградация отражается в сниженном соотношении LC3-II/LC3-I и может быть неправильно интерпретирована [24, 30]. Тем не менее, в условиях HBSS наблюдалась более выраженная деградация белка p62, чем в условиях SD, что свидетельствует о высокой интенсивности процесса аутофагии.



**Рис. 2.** Анализ индукции аутофагии и изменений уровня Mcl-1 в клетках U1810 в условиях ОПВ методом Вестерн-блота. SD (депривация сыворотки); HBSS – культуральная среда, обедненная питательными веществами; ч – часы инкубации; LC3-I и LC3-II – нелипидированная и липидированная формы LC3 соответственно; GAPDH – белковый маркер загрузки геля

Таким образом, более «жесткие» условия ОПВ, полученные с помощью культивирования клеток U1810 в среде HBSS, приводили к выраженной деградации белка Mcl-1, чего не наблюдалось в случае инкубирования в бессывороточной среде.

**Снижение уровня Mcl-1 в клетках U1810 в условиях HBSS происходит как при генетическом нокауте Atg13, так и при ингибировании аутофагии с помощью Бафиломицина А1.** Для выяснения причин деградации Mcl-1 в условиях, стимулирующих аутофагию, к клеткам U1810, растущим в стандартных условиях и среде HBSS, был добавлен ингибитор аутофагии Бафиломицин А1 в концентрации 50 нМ. Аналогичным образом были обработаны клетки U1810 ATG13KO, в которых нарушена возможность протекания процесса аутофагии. Клетки культивировали в указанных условиях в течение 18 ч. Методом Вестерн-блот-анализа был оценен уровень белка Mcl-1, а также уровень маркеров аутофагии (белков LC3 и p62). Показано, что снижение уровня Mcl-1 в условиях HBSS наб-

людалось как в случае нокаутных по аутофагии клеток U1810 ATG13KO, так и при применении Бафиломицина А1 (рис. 3). Таким образом, суммируя полученные результаты, сделан вывод, что деградация Mcl-1, наблюдаемая в условиях ОПВ, не связана с процессами аутофагии.

**Снижение уровня Mcl-1 в клетках U1810 в условиях HBSS происходит вследствие протеасомной деградации белков.** Как было показано выше, деградация Mcl-1 при культивировании в среде HBSS происходила вне зависимости от процессов аутофагии. Вследствие этого было выдвинуто предположение, что потенциальной причиной снижения уровня данного антиапоптотического белка может стать усиление протеасомной деградации в условиях резкого ограничения питательных веществ. С этой целью к клеткам U1810, культивируемым в стандартных условиях или в среде HBSS, был добавлен ингибитор протеасом MG-132 в концентрации 10 мкМ за 2 ч до приготовления клеточных лизатов. Аналогичным образом были обработаны клетки U1810 ATG13KO, в которых нарушена

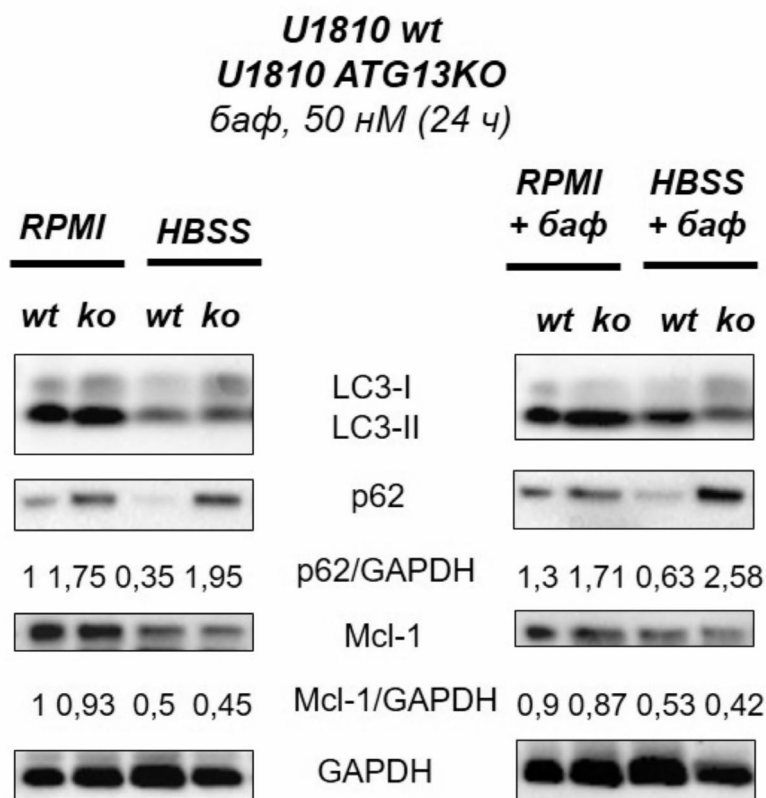


возможность протекания процессов аутофагии. Методом Вестерн-блот-анализа оценивали уровень белка Mcl-1, а также уровень маркеров протеасомной деградации белков (общего убиквитина и убиквитина K48 – цепи полиубиквитина, конъюгированные через остаток лизина K48). Было показано, что уровень короткоживущего белка Mcl-1 возрастал в несколько раз под действием ингибитора протеасом MG-132 в обеих линиях клеток при культивировании в стандартной среде, причем более выраженное увеличение Mcl-1 наблюдалось в клетках U1810 ATG13KO (рис. 4). Кроме того, в стандартных условиях роста уровень общего убиквитина и убиквитина K48 был выше в клетках U1810 ATG13KO по сравнению с клетками дикого типа. Данная разница увеличивалась при обработке клеток ингибитором протеасом MG-132, что свидетельствует о том, что в нокаутных по аутофагии клетках U1810 ATG13KO более интенсивно происходят процессы протеасомной деградации по сравнению с клетками U1810 при культивировании в стандартной среде. В условиях HBSS наблюдалось уменьшение стабилизации Mcl-1 в клетках U1810 при обработке MG-132, в

то время как в аналогичных условиях в клетках U1810 ATG13KO – отсутствие этой стабилизации, что, по-видимому, связано с усилением гибели нокаутных по аутофагии клеток при культивировании в среде HBSS [31]. Более того, в условиях HBSS снижался уровень общего убиквитина и убиквитина K48, наибольшая разница с инкубацией в нормальной среде была детектирована при использовании ингибитора протеасом. Суммарно эти данные свидетельствуют о том, что выращивание клеток в среде HBSS ведет к торможению процессов протеасомной деградации, что согласуется с литературными данными [32]. Таким образом, было продемонстрировано, что в условиях недостатка питательных веществ деградация антиапоптотического белка Mcl-1 происходила по протеасомному пути (рис. 4).

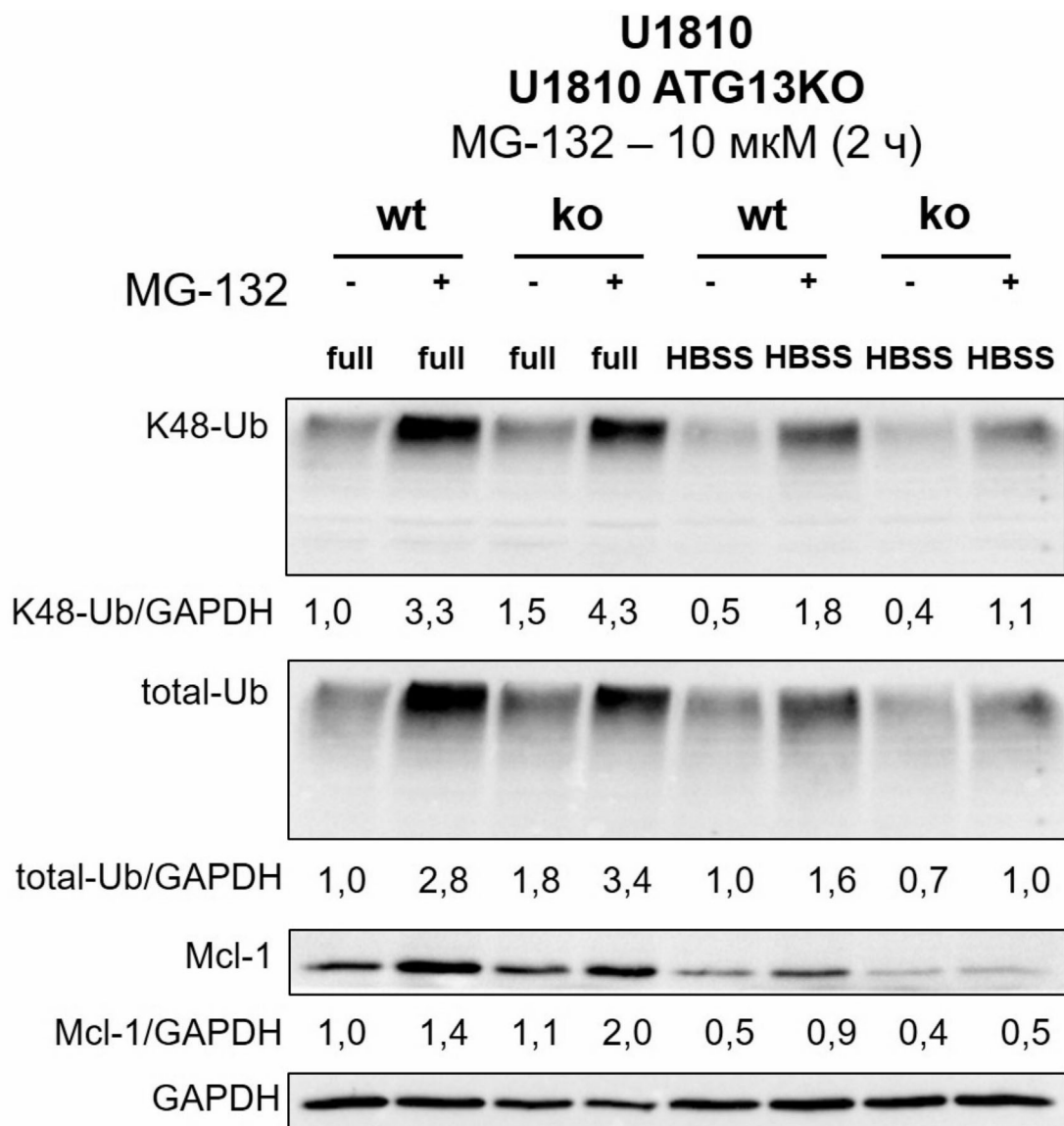
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе были изучены механизмы деградации антиапоптотического белка Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ. С



**Рис. 3.** Анализ индукции аутофагии и изменений уровня Mcl-1 в клетках U1810 и U1810 ATG13KO при действии ингибитора аутофагии Бафиломицина A1 (50 нМ) методом Вестерн-блота. Wt – клетки U1810; KO – клетки U1810 ATG13KO; баф, 50 нМ – 50 нМ ингибитора аутофагии Бафиломицина A1; HBSS – культуральная среда, обедненная питательными веществами; ч – часы инкубации; LC3-I и LC3-II – нелипидированная и липидированная формы LC3 соответственно; GAPDH – белковый маркер загрузки геля





**Рис. 4.** Анализ изменений уровня Mcl-1 и количественной оценки убиквитинилирования в стандартных условиях и условиях ОПВ в клетках U1810 и U1810 ATG13KO методом Вестерн-блота. MG-132 – 10 мкМ ингибитора протеасом MG-132; HBSS – культуральная среда, обедненная питательными веществами; ч – часы инкубации; K48-Ub – цепи полиубиквитина, конъюгированные через остаток лизина K48; total Ub – общий убиквитин; GAPDH – белковый маркер загрузки геля

помощью двух экспериментальных моделей ОПВ (условия SD и культивирование в среде HBSS) было показано, что удаление факторов роста и питательных веществ из среды приводило к усилению процессов аутофагии в раковых клетках, что согласуется с литературными данными [22, 23]. Ранее нами было выявлено блокирование синтеза антиапоптотического белка Mcl-1 в условиях ОПВ [8]. В настоящей работе показано, что в условиях SD цисплатин приводил к выраженному уменьшению уровня Mcl-1 в клетках Saov-4 и HeLa. Важно отметить, что отличительная особенность условий бессывороточного культивирования заключается в зависи-

мости наблюдаемых биологических эффектов от типов клеточных линий и времени их инкубации [16]. Нами было показано, что длительное (18 ч) культивирование клеток в условиях ОПВ с использованием бессывороточной среды вело к слабому снижению уровня Mcl-1 в клетках HeLa или даже к незначительному повышению количества этого белка в клетках Saov-4 по сравнению со стандартными условиями. Однако краткосрочное (6 ч) культивирование в условиях SD приводило к понижению уровня Mcl-1 в данных клеточных линиях, которое было особенно выражено для клеток HeLa [8]. Этот эффект может быть объяснен тем, что на поздних часах бессы-

вороточного культивирования клеток происходит реактивация сигнальных путей, например, ERK1/2 каскада, активность которого меняется волнообразно в условиях SD [16]. Показано, что ERK1/2 каскад регулирует уровень Mcl-1 посредством модуляции активности киназы PKC [33]. Данное обстоятельство может лежать в основе наблюдаемых колебаний уровня Mcl-1 в опухолевых клетках в условиях SD.

При сравнении двух экспериментальных моделей ОПВ на клетках U1810 было установлено, что более сильный стимулятор процессов аутофагии (среда HBSS) приводил к значительной деградации Mcl-1, которая не наблюдалась в условиях SD в данной линии клеток. Было предположено, что такой эффект обусловлен активацией процессов аутофагии. Однако использование нокаутных по аутофагии клеток U1810 ATG13KO или применение ингибитора аутофагии Бафиломицина А1 не предотвращало падения уровня Mcl-1, что свидетельствовало об ином механизме его деградации. Как нами было показано ранее, ингибирование протеасомной деградации увеличивало уровень Mcl-1 в клетках Saov-4 и HeLa независимо от условий культивирования (стандартных или при ОПВ) [8]. Настоящая работа подтверждает полученные ранее данные, показывая, что уровень Mcl-1 повышается при ингибировании протеасомной деградации с помощью MG-132.

Последующее изучение интенсивности процессов протеасомной деградации показало, что в условиях ОПВ происходило снижение активности протеасом. Однако, по-видимому, активности данной системы было достаточно для деградации короткоживущего белка Mcl-1. Данное обстоятельство можно объяснить тем, что клетки в условиях нехватки питательных веществ могут блокировать работу протеасом, переходя к процессу «протеафагии» с последующей элиминацией протеасом в аутофаго- или лизосомах. Данный механизм направлен на ослабление энергетически затратного процесса разрушения белков в условиях ОПВ [34]. При этом использование ингибитора протеасом приводило к стабилизации Mcl-1 в условиях ОПВ в клетках U1810, что говорит о протеасомо-зависимой деградации данного белка. Отсутствие стабилизации Mcl-1 в

аналогичных условиях в клетках U1810 ATG13KO, вероятно, связано с тем, что наблюдаемое нами ранее торможение синтеза этого короткоживущего белка [8], а также запуск апоптотической гибели в нокаутных по аутофагии клетках [31] не дают возможности восстановить его внутриклеточный уровень. Необходимо отметить, что при усилении клеточной гибели антиапоптотический белок Mcl-1 подвергается каспаза-зависимому расщеплению [35-36], что препятствует его накоплению в клетках линии U1810 ATG13KO даже при действии MG-132.

Таким образом, полученные данные о механизме деградации Mcl-1 в условиях ОПВ могут внести вклад в понимание процессов жизнедеятельности опухолевых клеток и развитие новых терапевтических стратегий онкологических заболеваний. Так, в настоящее время активно исследуются возможности корректировки питания или использования химических миметиков ОПВ при лечении некоторых заболеваний [37]. Эффективность подобных подходов будет в том числе определяться балансом апоптотических и аутофагических факторов. Следовательно, короткоживущий антиапоптотический белок Mcl-1 может быть существенным прогностическим фактором для оценки успешности таких подходов в терапии.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант 19-15-00125). Работа в лабораториях авторов также поддержана РФФИ (гранты 18-29-09005, 20-015-00500), Шведским (190345) и Стокгольмским (181301) онкологическими фондами.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 10, 2020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jin, Z., and El-Deiry, W. S. (2005) Overview of cell death signaling pathways, *Cancer Biol. Ther.*, **4**, 139-163, doi: 10.4161/cbt.4.2.1508.
2. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science*, **234**, 364-368, doi: 10.1126/science.2876518.
4. Kale, J., Osterlund, E. J., and Andrews, D. W. (2018) BCL-2 family proteins: changing partners in the dance

- towards death, *Cell Death Differ.*, **25**, 65-80, doi: 10.1038/cdd.2017.186.
5. Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2019) Molecular comprehension of Mcl-1: from gene structure to cancer therapy, *Trends Cell Biol.*, **29**, 549-562, doi: 10.1016/j.tcb.2019.03.004.
  6. Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Gorbunova, A. S., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation, *Cell Death Differ.*, **27**, 405-419, doi: 10.1038/s41418-019-0486-3.
  7. Pervushin, N. V., Senichkin, V. V., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Mcl-1 as a "barrier" in cancer treatment: can we target it now? *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **351**, 23-55, doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.01.002.
  8. Senichkin, V. V., Kopeina, G. S., Prokhorova, E. A., Zamaraev, A. V., Lavrik, I. N., and Zhivotovsky, B. (2018) Modulation of Mcl-1 transcription by serum deprivation sensitizes cancer cells to cisplatin, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 557-566, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.11.021.
  9. Meynet, O., Zunino, B., Happo, L., Pradelli, L. A., Chiche, J., et al. (2013) Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice, *Blood*, **122**, 2402-2411, doi: 10.1182/blood-2013-01-478651.
  10. Bhat, M., Yanagiya, A., Graber, T., Razumilava, N., Bronk, S., et al. (2017) Metformin requires 4E-BPs to induce apoptosis and repress translation of Mcl-1 in hepatocellular carcinoma cells, *Oncotarget*, **8**, 50542-50556, doi: 10.18632/oncotarget.10671.
  11. Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function, *Genes Dev.*, **21**, 2861-2873, doi: 10.1101/gad.1599207.
  12. Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R. J. (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum, *Autophagy*, **7**, 673-682, doi: 10.4161/autophagy.7.7.14733.
  13. Klionsky, D. J., Baehrecke, E. H., Brumell, J. H., Chu, C. T., Codogno, P., et al. (2011) A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd Edn.), *Autophagy*, **7**, 1273-1294, doi: 10.4161/autophagy.7.11.17661.
  14. Cuervo, A. M., and Wong, E. (2014) Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging, *Cell Res.*, **24**, 92-104, doi: 10.1038/cr.2013.153.
  15. Levin, V. A., Panchabhai, S. C., Shen, L., Kornblau, S. M., Qiu, Y., and Baggerly, K. A. (2010) Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines, *J. Proteome Res.*, **9**, 179-191, doi: 10.1021/pr900392b.
  16. Pirkmajer, S., and Chibalin, A. V. (2011) Serum starvation: caveat emptor, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **301**, 272-279, doi: 10.1152/ajpcell.00091.2011.
  17. Green, D. R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2014) Cell biology. Metabolic control of cell death, *Science*, **345**, 1250256, doi: 10.1126/science.1250256.
  18. Mejlvang, J., Olsvik, H., Svenning, S., Bruun, J. A., Abudu, Y. P., et al. (2018) Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy, *J. Cell Biol.*, **217**, 3640-3655, doi: 10.1083/jcb.201711002.
  19. Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., et al. (2007) Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1, *EMBO J.*, **26**, 2527-2539, doi: 10.1038/sj.emboj.7601689.
  20. Elgendy, M., Ciro, M., Abdel-Aziz, A. K., Belmonte, G., Zuffo, R. D., Mercurio, C., Miracco, C., Lanfrancone, L., Foiani, M., and Minucci, S. (2014) Beclin-1 restrains tumorigenesis through Mcl-1 destabilization in an autophagy-independent reciprocal manner, *Nat. Commun.*, **5**, 5637, doi: 10.1038/ncomms6637.
  21. Maiuri, M. C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J. M., Tajeddine, N., Hickman, J. A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007) BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L), *Autophagy*, **3**, 374-376, doi: 10.4161/autophagy.4237.
  22. Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng, J., Yu, L., and Zhu, W. G. (2010) Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 665-675, doi: 10.1038/ncb2069.
  23. Steiger-Barraissoul, S., and Rami, A. (2009) Serum deprivation induced autophagy and predominantly an AIF-dependent apoptosis in hippocampal HT22 neurons, *Apoptosis*, **14**, 1274-1288, doi: 10.1007/s10495-009-0396-9.
  24. Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting, *Autophagy*, **3**, 542-545, doi: 10.4161/autophagy.4600.
  25. 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.
  26. Kaminsky, V. O., Piskunova, T., Zborovskaya, I. B., Tchekina, E. M., and Zhivotovsky, B. (2012) Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation, *Autophagy*, **8**, 1032-1044, doi: 10.4161/autophagy.20123.
  27. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature*, **371**, 346-347, doi: 10.1038/371346a0.
  28. Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., and Pan, H. (2013) Autophagy and chemotherapy resistance: A promising therapeutic target for cancer treatment, *Cell Death Dis.*, **4**, e838, doi: 10.1038/cddis.2013.350.
  29. Mercer, C. A., Kaliappan, A., and Dennis, P. B. (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy, *Autophagy*, **5**, 649-662, doi: 10.4161/autophagy.5.5.8249.
  30. Kaminsky, V., Abdi, A., and Zhivotovsky, B. (2011) A quantitative assay for the monitoring of autophagosome accumulation in different phases of the cell cycle, *Autophagy*, **7**, 83-90, doi: 10.4161/autophagy.7.1.13893.
  31. Allavena, G., Cuomo, F., Baumgartner, G., Bele, T., Sellgren, A., et al. (2018) Suppressed translation as a mechanism of initiation of CASP8 (caspase 8)-dependent apoptosis in autophagy-deficient NSCLC cells under nutrient limitation, *Autophagy*, **14**, 252-268, doi: 10.1080/15548627.2017.1405192.
  32. Hoeller, D., and Dikic, I. (2016) How the proteasome is degraded, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 13266-13268, doi: 10.1073/pnas.1616535113.
  33. Pal, D., and Basu, A. (2017) Protein kinase C-eta regulates Mcl-1 level via ERK1, *Cell. Signal.*, **40**, 166-171, doi: 10.1016/j.cellsig.2017.09.012.
  34. Marshall, R. S., and Vierstra, R. D. (2018) To save or degrade: balancing proteasome homeostasis to maximize cell survival, *Autophagy*, **14**, 2029-2031, doi: 10.1080/15548627.2018.1515531.
  35. Ryu, Y. K., Hall, C. P., Patrick Reynolds, C., and Kang, M. H. (2014) Caspase-dependent Mcl-1 cleavage and effect of Mcl-1 phosphorylation in ABT-737-induced apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia cell lines, *Exp. Biol. Med.*, **239**, 1390-1402, doi: 10.1177/1535370214538745.
  36. Herrant, M., Jacquet, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auberger, P. (2004) Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract

- Bim-induced apoptosis, *Oncogene*, **23**, 7863-7873, doi: 10.1038/sj.onc.1208069.
37. Kopeina, G. S., Senichkin, V. V., and Zhivotovsky, B. (2017) Caloric restriction – a promising anti-cancer approach: from molecular mechanisms to clinical trials, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, **1867**, 29-41, doi: 10.1016/j.bbcan.2016.11.002.

## NUTRIENT DEPRIVATION PROMOTES Mcl-1 DEGRADATION IN AN AUTOPHAGY-INDEPENDENT MANNER

**N. V. Pervushin<sup>1</sup>, V. V. Senichkin<sup>1</sup>, A. A. Kapusta<sup>1</sup>, A. S. Gorbunova<sup>1</sup>,  
V.O. Kaminsky<sup>2</sup>, B. Zhivotovsky<sup>1,2</sup>, and G. S. Kopeina<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: lirroster@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, 17177 Stockholm, Sweden

Received July 10, 2020

Revised August 7, 2020

Accepted August 26, 2020

The antiapoptotic protein Mcl-1, which is an attractive target for cancer treatment, is degraded under nutrient deprivation conditions in different types of cancer. This process sensitizes cancer cells to chemotherapy. It has been found that nutrient deprivation leads to suppression of Mcl-1 synthesis; however, the mechanisms of Mcl-1 degradation under such conditions remain to be elucidated. In this study, we have investigated the contribution of autophagy and proteasomal degradation to the regulation of the level of Mcl-1 protein under nutrient deprivation conditions. We found that these circumstances cause a decrease in the level of Mcl-1 in cancer cells in a macroautophagy-independent manner via proteasomal degradation.

**Keywords:** apoptosis, autophagy, Mcl-1, nutrient deprivation, adenocarcinoma