

УДК 576.32/.36

ВНІРЗ КАК РЕГУЛЯТОР ЦИСПЛАТИН-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА

© 2020 А.С. Горбунова¹, Т.В. Денисенко¹, М.А. Япрынцева¹, А.Д. Пивнюк¹,
Т.А. Приказчикова², В.Г. Гогвадзе^{1,3}, Б. Животовский^{1,3*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: boris.zhivotovskiy@ki.se

² Сколковский институт науки и техники, Центр наук о жизни, 121205 Москва, Россия

³ Каролинский институт, Институт медицины окружающей среды, SE-171 77 Стокгольм, Швеция

Поступила в редакцию 16.07.2020

После доработки 27.08.2020

Принята к публикации 28.08.2020

ВНІРЗ – белок семейства Bcl-2, участвующий в регуляции различных видов клеточной гибели, включая апоптоз и аутофагию. Однако его роль в этих процессах остается до конца не изученной и зависит от типа раковых клеток и факторов среды (рН, уровень O₂ и т.д.). В данной работе исследовали роль белка ВНІРЗ в регуляции апоптоза клеток аденокарциномы лёгкого. Показано, что подавление экспрессии ВНІРЗ приводит к угнетению клеточного дыхания и стимуляции продукции митохондриальных активных форм кислорода, что может потенциально повлиять на клеточную гибель. Обнаружено, что выход цитохрома c из митохондрий при индукции апоптоза цисплатином в клетках с нокаутом и нокдауном по ВНІРЗ был выше, чем в клетках дикого типа. Кроме того, снижение экспрессии ВНІРЗ приводило к увеличению активности каспазы-3 и, как следствие, накоплению маркера апоптоза – фрагмента p89 ПАРП при индукции цисплатином в сравнении с клетками дикого типа. Анализ накопления клеток во фракции SubG1 методом проточной цитофлуориметрии подтвердил усиление гибели клеток с нокаутом по ВНІРЗ. Предварительная обработка антиоксидантом Тролоксом не влияла на гибель клеток, что свидетельствует о ее независимости от активных форм кислорода. Представленные данные указывают на то, что ВНІРЗ, участвуя в контроле качества митохондрий, способен оказывать влияние на митохондриальный путь гибели клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВНІРЗ, апоптоз, митофагия, аденокарцинома легкого, цисплатин.

DOI: 10.31857/S0320972520100127

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности людей в мире, уступая лишь сердечно-сосудистым, а в некоторых развитых странах занимают лидирующую позицию. Наиболее распространённой причиной такой смертности является рак лёгкого: ежегодно от него умирает более 1,5 млн человек. Важнейшей причиной развития рака лёгкого признаётся курение, однако самый распространённый тип – аденокарцинома лёгкого (АКЛ) – в большей степени, чем другие виды, ассоциирована с генетической предрасположенностью и воздействием внешних факторов среды [1]. Раскрытие механизмов функционирования и гибели опухолевых клеток на приме-

ре рака лёгкого является важной задачей при разработке новых терапевтических препаратов, в том числе таргетной терапии.

Злокачественные опухоли развиваются из-за перерождения нормальных клеток в результате мутаций, как усиливающих пролиферацию, так и подавляющих механизмы гибели клеток. В процессах клеточной гибели важную роль играет семейство белков Bcl-2, функционально разделяющееся на про- и антиапоптотические белки. Среди проапоптотических представителей Bcl-2 семейства структурно выделяют белки, имеющие один из четырех доменов, а именно ВН3-домен, т.н. «ВН3-only» белки, регулирующие активности как про-, так и антиапоптотических членов данного семейства [2]. Один из представителей подгруппы «ВН3-only», ВНІРЗ

Принятые сокращения: АКЛ – аденокарцинома лёгкого; ПАРП – поли(АДФ-рибоза)-полимераза; ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа; КЦХФ – карбонилцианид-m-хлорфенилгидразон; СПК – скорость потребления кислорода; HRE – фактор, чувствительный к гипоксии (hypoxia responsible element); HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией (hypoxia inducible factor); siRNA – малые интерферирующие РНК (small interfering RNA); мтАФК – митохондриальные активные формы кислорода; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; wt – wild type (дикий тип).

* Адресат для корреспонденции.

(Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3) представляет собой белок с мол. массой 21,5 кДа и состоит из четырех основных доменов: PEST-домена на N-конце, атипичного BH3-домена, консервативного домена (CD) и трансмембранного домена (TM) на C-конце [3]. BH3-домен определяет способность BNIP3 связываться с комплексами Bcl-2/Bcl-1 и Bcl-X_L/Bcl-1, что приводит к высвобождению Bcl-1 и стимуляции аутофагии [4]. Регуляция клеточной гибели обеспечивается C-концевым TM-доменом, которым белок прикрепляется к наружной мембране митохондрии [3]. Благодаря TM-домену BNIP3 способен взаимодействовать с Bcl-2 и Bcl-X_L, блокируя их антиапоптотическое действие [5]. Помимо этого, BNIP3 модулирует убиквитин- и рецептор-зависимую митофагию, а также способствует транслокации E3 убиквитинлигазы Parkin в митохондрии, тем самым запуская убиквитин-зависимый тип митофагии [6]. BNIP3 способен напрямую связываться с аутофагическим белком LC3 на мембранах фагофора, обеспечивая перемещение митохондрий внутрь аутофагосомы для последующей их деградации [7].

Развитие опухолей в организме зачастую проходит в условиях гипоксии. Промотор BNIP3 включает в себя чувствительный к гипоксии элемент (HRE), с которым связывается фактор, индуцируемый гипоксией 1 (HIF-1), что приводит к увеличению транскрипции мРНК и последующему накоплению BNIP3 [8]. Накопление BNIP3 приводит к активации аутофагии и адаптации клетки к гипоксическим условиям. Таким образом, BNIP3, регулируя клеточную гибель в условиях нехватки кислорода, является потенциально важным белком в процессе канцерогенеза.

Будучи «BH3-only» белком, BNIP3 способен проявлять проапоптотические функции. Однако в ряде случаев повышенная экспрессия BNIP3 коррелирует с более агрессивным фенотипом опухоли и негативным прогнозом для пациентов [8–11]. Вследствие этого его роль в онкогенезе до сих пор остается неясной и требует более детального изучения.

Цисплатин – один из препаратов, применяемых в послеоперационной химиотерапии рака легкого, представляет собой платиносодержащее соединение, повреждающее ДНК в результате взаимодействия с пуриновыми основаниями ДНК [12]. Возникновение устойчивости к цисплатину у опухолевых клеток является серьёзной медицинской проблемой, требующей активного поиска стратегий для ее решения.

В связи с этим целью настоящей работы стало исследование роли белка BNIP3 в апоптозе,

вызванном цисплатином в клетках АКЛ. Полученные данные могут не только внести вклад в фундаментальные знания о механизмах клеточной гибели, но и способствовать разработке новых подходов к персонифицированной медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования и индукция гибели клеток. Клетки АКЛ человека линий A549 и H23, полученные из коллекции АТСС, культивировали в среде RPMI 1640 («Gibco», США), содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку (w/v) («Gibco»), 1%-ный пируват (w/v) («ПанЭко», Россия), пенициллин/стрептомицин (100 ед/мл), гидромицин В (100 мкг/мл) и генетицин (200 мкг/мл) («Gibco»), в атмосфере 5%-ной CO₂ при температуре 37°C. По достижении клетками 70% конfluenceности клеточную гибель индуцировали добавлением цисплатина («Тева», Израиль). В качестве антиоксиданта использовали водорастворимый аналог витамина Е – Тролокс («Roche», Франция).

Вестерн-блот анализ. Контрольные и обработанные цисплатином клетки лизировали с помощью RIPA-буфера (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1%-ный NP-40, 0,5%-ный дезоксихолат натрия), содержащего протеазный ингибитор («Roche», Франция). Полученные образцы смешивали с Лэмбли-буфером и инкубировали при 95°C в течение 5 мин. Разделение белков осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили при 110 В в течение 110 мин, далее мембраны помещали в 5%-ный раствор обезжиренного молока, растворенного в буфере TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1%-ный Tween 20, pH 7,4), на 45 мин при комнатной температуре для блокирования неспецифических сайтов связывания с белком. После этого мембраны отмывали в TBST (4 × 5 мин) и инкубировали с первичными антителами при 4°C ~16 ч. После этого мембрану отмывали в TBST (4 × 5 мин), добавляли раствор вторичных антител в 2,5%-ном обезжиренном молоке и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Мембрану отмывали (4 × 5 мин) в TBST, и детектировали сигнал с помощью ECL субстрата. Регистрация хемилюминесценции и анализ изображения проводили на приборе ChemiDoc™ XRS+System («Bio-Rad», США). Концентрацию белков определяли с помощью BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США). В работе использовали следу-

ющие первичные антитела в указанном разведении: цитохром *c* 1 : 1000 (11940, «Cell Signaling», Нидерланды), ПАПП 1 : 1000 (7150, «Santa Cruz Biotechnology», США), p89-ПАПП 1 : 1000 (9541, «Cell Signaling»), BNIP3 1 : 1000 (44060, «Cell Signaling»), Винкулин 1 : 10 000 (129002, «Abcam», Великобритания), и 1 : 1000 ГАФДГ (5174, «Cell Signaling»). В экспериментах также применяли вторичные антитела против мышечных (ab205719, «Abcam») и кроличьих (ab205718, «Abcam») иммуноглобулинов в разведении 1:5000.

Создание клеточных линий с нокаутом и нокдауном по BNIP3. Для получения стабильной клеточной линии с нокаутом по BNIP3, клетки A549 и H23 трансфицировали вектором CRISPR/Cas9 KoBNIP3 Plasmid («Santa Cruz Biotechnology», США) с использованием липофектамина LTX («Thermo Fisher Scientific», США). Далее проводили отбор флуоресцирующих клонов, содержащих вектор CRISPR/Cas9 KoBNIP3, на сортере FACS Aria III (BD, США) и осуществляли их дальнейшее культивирование.

Для получения линии с нокдауном по BNIP3 клетки A549 и H23 трансфицировали малыми интерферирующими РНК (siRNA) (CUCGGU-UUCUAUUUAUAAU) (100 нМ) с использованием липофектамина RNAiMAX («Thermo Fisher Scientific»). Качество нокаута и нокдауна по BNIP3 оценивали с помощью Вестерн-блот анализа.

Измерение интенсивности митохондриального дыхания. 12 000 клеток рассаживали на 96-луночный планшет («Seahorse Bioscience», США) в стандартной среде RPMI 1640, по достижении 70–80% конфлюентности клетки промывали, а затем инкубировали в среде Seahorse XF (25 мМ глюкозы, 2 мМ глутамин и 1 мМ пирувата натрия; рН 7,4) 1 ч при 37°C. Оценку скорости потребления кислорода (СПК) клетками в реальном времени проводили с помощью прибора Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer (США). В процессе оценки дыхания к клеткам добавляли последовательно 1,25 мкМ олигомицина, 1,25 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона (КЦХФ) и 1,25 мкМ ротенона/антимидина А, что позволяло оценить исходную скорость дыхания, связанного с синтезом АТФ, протонную проводимость мембраны и резервную емкость дыхательной цепи. Полученные данные были нормализованы в расчете на общее содержание белка в каждой лунке.

Получение цитозольной и митохондриальной фракций белков. Собранные с планшетов клетки после осаждения суспендировали в буфере для фракционирования (150 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0,2 мМ EGTA, 0,01%-ный дигитонин, 5 мМ Tris,

рН 7,5) и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем пробы центрифугировали при 15 000 g 10 мин, что позволяло отделить цитозольную фракцию (надосадочная жидкость) от митохондриальной (осадок). Анализ белков из данных фракций проводили методом Вестерн-блот.

Измерение уровня митохондриальных активных форм кислорода. Продукцию митохондриальных активных форм кислорода в клетках оценивали с помощью красителя MitoSOX™ Red («Molecular Probes», США) с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II («BD», США), согласно инструкции производителя.

Оценка гибели клеток по размеру популяции SubG1. После осаждения клетки ресуспендировали в DPBS, добавляли холодный 70%-ный этанол по капле при непрерывном перемешивании, после чего инкубировали не менее 60 мин при температуре –20°C. Перед измерением клетки осаждали, ресуспендировали в DPBS, добавляли пропидий йодид (50 мкг/мл) и РНКазу А (100 мкг/мл), инкубировали 15 мин, затем анализировали на проточном цитометре FACS Canto II («BD»).

Измерение активности каспазы-3. Клетки после обработки осаждали центрифугированием и осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS; по 25 мкл переносили в три лунки 96-луночного планшета, оставшиеся 25 мкл использовали для измерения белка с помощью BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific») для последующей нормализации полученных значений каспазной активности. Далее добавляли к суспензии клеток 75 мкл буфера (100 мМ HEPES, 10%-ная сахароза, 0,1%-ный Chaps, 5 мМ DTT, 0,001%-ный NP-40), содержащего флуоресцентный субстрат (40 мкМ DEVD-АМС) для измерения активности каспазы-3. Флуоресценцию измеряли на приборе Varioskan Flash («Thermo Fisher Scientific»), длина волны поглощения – 380 нм, длина волны испускания – 460 нм. Измерения проводили в течение 30 мин с интервалом в 1 мин при 37°C.

Статистическая обработка данных. Эксперименты были выполнены в трех повторах, результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Сравнение результатов проводили с использованием two-way ANOVA (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение клеточных линий с нокаутом и нокдауном по BNIP3. Для изучения роли белка

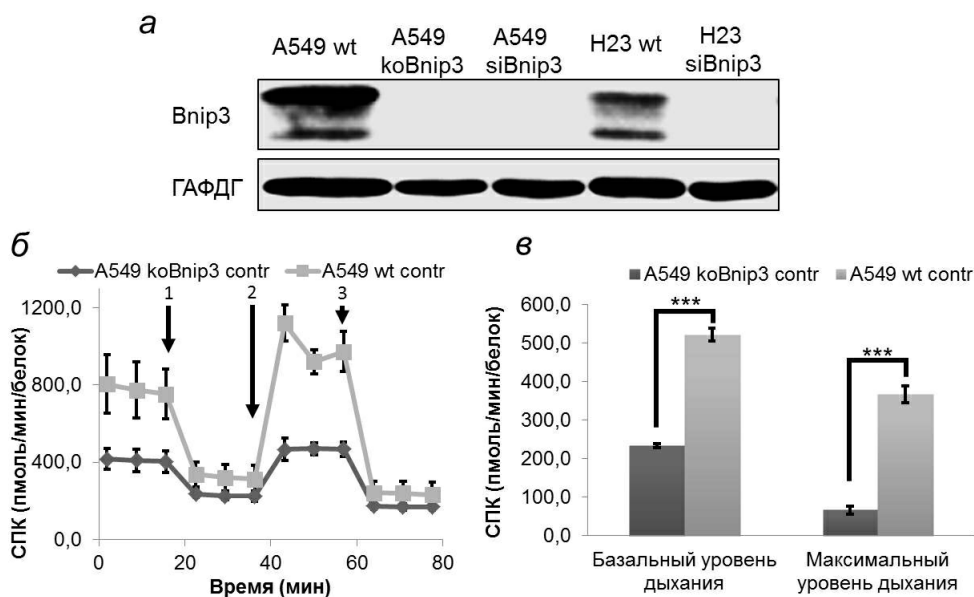


Рис. 1. *а* – Вестерн-блот анализ содержания белка BNIP3 в клетках дикого типа и дефицитных по гену *BNIP3*; *б* – оценка потребления кислорода клетками дикого типа и с дефицитом *BNIP3*. Инъекции олигомицина, КЦХФ и антимицина с ротеноном соответствуют стрелкам 1, 2 и 3 соответственно; *в* – гистограмма, отражающая максимальный (стимулируемый КЦХФ) и базальный уровни дыхания; СПК (пмоль/мин/мг белка) – скорость поглощения кислорода, нормализованная на общее содержание белка в пробе. Эксперименты были выполнены в трех повторах

BNIP3 в регуляции гибели клеток АКЛ были созданы линии клеток A549 и H23, в которых экспрессия BNIP3 была выключена с использованием методики CRISPR/Cas9. Для исключения неспецифических (off-target) эффектов CRISPR/Cas9 системы вследствие неспецифической активности эндонуклеазы Cas9 эксперименты также проводили с использованием таргетной к мРНК BNIP3 siRNA. Как показал анализ, оба метода приводили к значительному снижению содержания белка BNIP3 (рис. 1, *а*). BNIP3 на 56% гомологичен другому представителю семейства Bcl-2 – BNIP3L/NIX [13]. Однако применяемые нами методы нокаута и нокадауна BNIP3 не приводили к изменению уровня BNIP3L/NIX, что позволило направленно изучить вклад BNIP3 в процессы клеточной гибели.

Являясь адаптерным белком, обеспечивающим утилизацию поврежденных митохондрий в аутофагосоме, BNIP3 участвует в митофагии, контролируя качество митохондрий. Логично предположить, что подавление экспрессии BNIP3 может ослабить процесс митофагии и привести к появлению дефектных органелл, не способных адекватно обеспечивать энергией клетку. Для проверки этого предположения нами была проведена оценка функциональной активности митохондрий, в частности дыхания органелл с помощью прибора Seahorse Analyzer, позволяющего оценивать потребление кислоро-

да митохондриями в клетке *in situ*. Выяснилось, что нокаут BNIP3 приводил к угнетению как базального (~ в 2,5 раза), так и максимально возможного, стимулируемого протонофором КЦХФ, дыхания (~ в 7 раз) (рис. 1, *б, в*). По всей вероятности, снижение потребления кислорода клетками после нокаута BNIP3 обусловлено не снижением содержания митохондрий в клетке, а угнетением митофагии, в результате чего поврежденные и слабодышащие, митохондрии не утилизируются, но вносят вклад в снижение дыхания клеток.

Влияние BNIP3 на выход цитохрома с из митохондрий при индукции цисплатином. Одним из основных событий митохондриального пути апоптоза является выход цитохрома с из межмембранного пространства органелл. Оказавшись в цитозоле, цитохром с принимает участие в создании комплекса апоптосомы, в которой происходит активация каспазного каскада [14]. Можно предположить, что в условиях подавления митофагии, вызванной снижением уровня BNIP3, появится популяция митохондрий более чувствительная к пермеабиллизации внешней мембраны в условиях индукции апоптоза.

Оценку выхода цитохрома с при апоптозе, вызванном цисплатином (30 мкМ), исследовали в клетках A549 как дикого типа, так и с нокаутом (A549 КоBNIP3) и нокадауном (A549 siBNIP3) BNIP3. Результаты исследования показали, что выход цитохрома с из митохондрий в клетках с

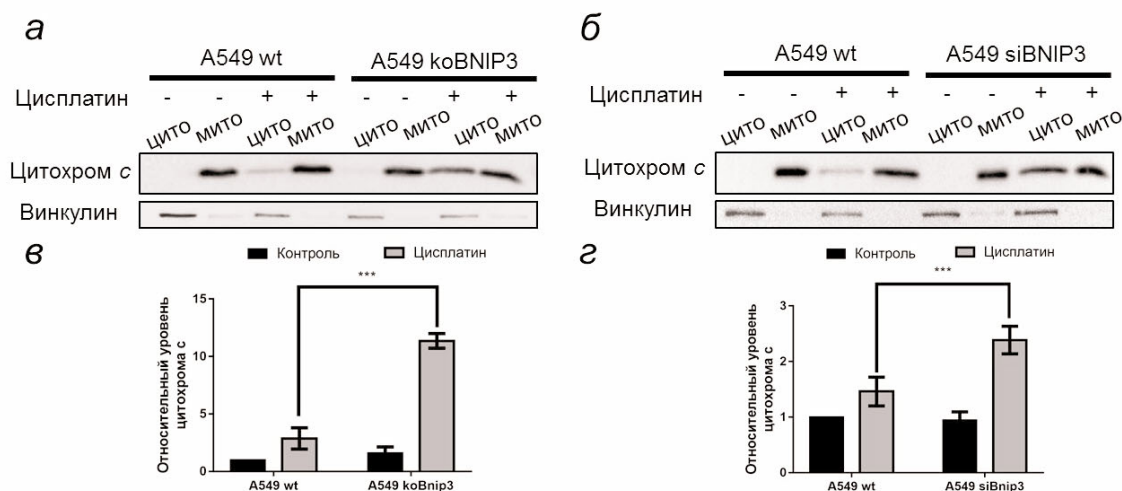


Рис. 2. Вестерн-блот-анализ содержания цитохрома *c* в цитозольной (циито) и митохондриальной (мито) фракциях линий A549 wt и A549 KoBNIP3 (*а*), A549 wt и A549 siBNIP3 (*б*) спустя 24 ч после индукции апоптоза цисплатином, и их денситометрическая оценка (*в*, *з*). Винкулин использовали в качестве контроля загрузки белка, относительно которого рассчитывали уровень цитохрома *c*. Эксперименты были выполнены в трех повторах

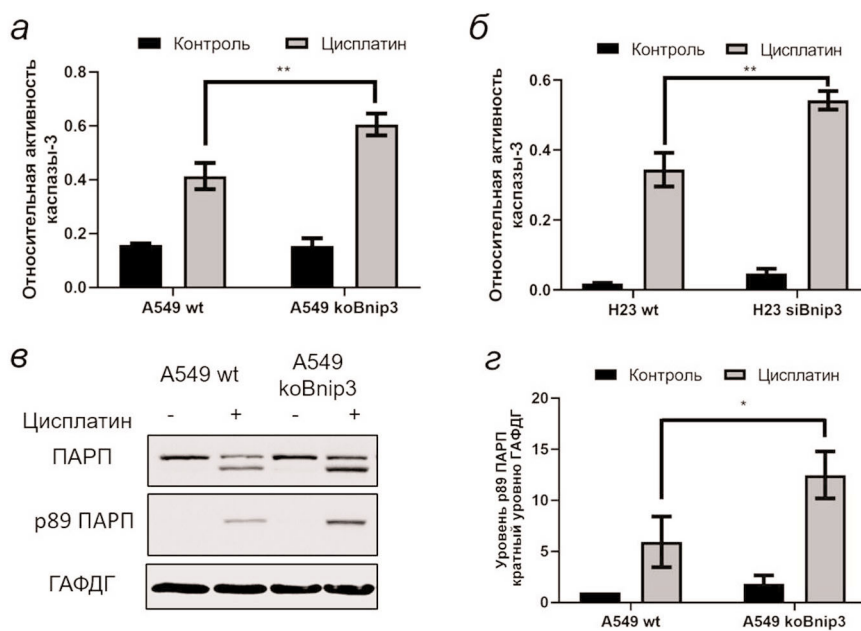


Рис. 3. Анализ активности каспазы-3 в клетках линий A549 (*а*) и H23 (*б*) дикого типа и со сниженной экспрессией BNIP3. Активность каспазы-3 нормализовали на уровень белка в образцах. Вестерн-блот маркера апоптоза – ПАРП (*в*) и гистограмма, соответствующая денситометрическому анализу уровня p89 ПАРП (*з*), в клетках линии A549 wt и A549 KoBNIP3 через 24 ч после индукции цисплатином. ГАФДГ использовали как контроль загрузки белка, относительно которого рассчитывали уровень p89 ПАРП. Эксперименты были выполнены в трех повторах

нокаутом и нокдауном по BNIP3 был более выражен, чем в контрольных клетках (рис. 2, *а–з*). При этом различия между клетками с нокаутом и с нокдауном по BNIP3 не наблюдалось, поэтому дальнейшие эксперименты проводились на линии A549 KoBNIP3 со стабильно подавленной экспрессией BNIP3.

Оценка цисплатин-индуцированного апоптоза в линиях клеток со сниженной экспрессией BNIP3. Выход цитохрома *c* приводит к стимуляции каспазного каскада и активации эффекторной каспазы-3, ответственной за появление биохимических и морфологических признаков апоптоза. Оценка показала, что подавление

экспрессии VNIP3 в клетках линий A549 и H23 статистически достоверно приводило к стимуляции активности каспазы-3 спустя 24 ч после индукции апоптоза (рис. 3, а, б). Одной из мишеней эффекторных каспаз является поли(АДФ-рибоза)-полимераза (ПАРП). Расщепление ПАРП и появление фрагмента в 89 кДа (p89) относится к характерным признакам апоптотической гибели клетки. Анализ расщепления ПАРП также продемонстрировал повышенное накопление фрагмента p89 ПАРП в нокаутных клетках по сравнению с диким типом (рис. 3, в, г).

В дополнение к описанным выше признакам апоптоза был произведён анализ популяции SubG1 в клетках A549 wt и A549 KoVNIP3 методом проточной цитофлуориметрии. Популяция SubG1 отражает апоптотическую фракцию клеток, содержащих фрагментированную ДНК. Исследование показало, что в клетках дикого типа популяция SubG1 составляла 11,8%, в то время как в нокаутной линии она была в два раза выше – 26,3%. Таким образом, нами выявлено значительное усиление чувствительности к цисплатину в клетках, дефицитных по VNIP3, по сравнению с клетками дикого типа спустя 24 ч после индукции апоптоза (рис. 4), что согласуется с данными, полученными при оценке активности каспазы-3 и расщепления ПАРП.

Изменение уровня митохондриальных активных форм кислорода при нокауте VNIP3. Выход цитохрома *c* из митохондрий способен вызвать нарушение в функционировании дыхательной

цепи, что ведет к утечке электронов и образованию супероксидного радикала [15]. Кроме того, цисплатин может вызывать образование мТАФК в результате непосредственного воздействия на митохондрии [16]. Это, в свою очередь, может внести вклад в стимуляцию клеточной гибели. Действительно, оценка содержания митохондриальных активных форм кислорода (мТАФК) с помощью метода проточной цитометрии после окрашивания флуоресцентным красителем MitoSox Red показала, что в клетках A549 KoVNIP3 их уровень после индукции апоптоза цисплатином был практически в два раза выше по сравнению с клетками дикого типа (рис. 5). Анализ проводился через 6, 12, 16 и 24 ч после индукции апоптоза. Для репрезентативности была выбрана точка 16 ч, так как именно в этот временной интервал наблюдалась максимальная разница в уровне мТАФК между линиями A549 wt и A549 KoVNIP3.

Для оценки вклада мТАФК в усиление апоптоза в линии, нокаутной по VNIP3, нами был проведен эксперимент с дополнительной обработкой клеток антиоксидантом Тролоксом, водорастворимым аналогом витамина Е. Тролокс способен предотвращать апоптоз, вызванный окислительным стрессом, индуцируемым широким спектром токсических агентов в различных внутриклеточных компартментах [17]. Клетки линии A549 wt и A549 KoVNIP3 2 ч инкубировали с различными концентрациями Тролокса в диапазоне от 100 до 500 мкМ, после чего подвергали индукции цисплатином в тече-

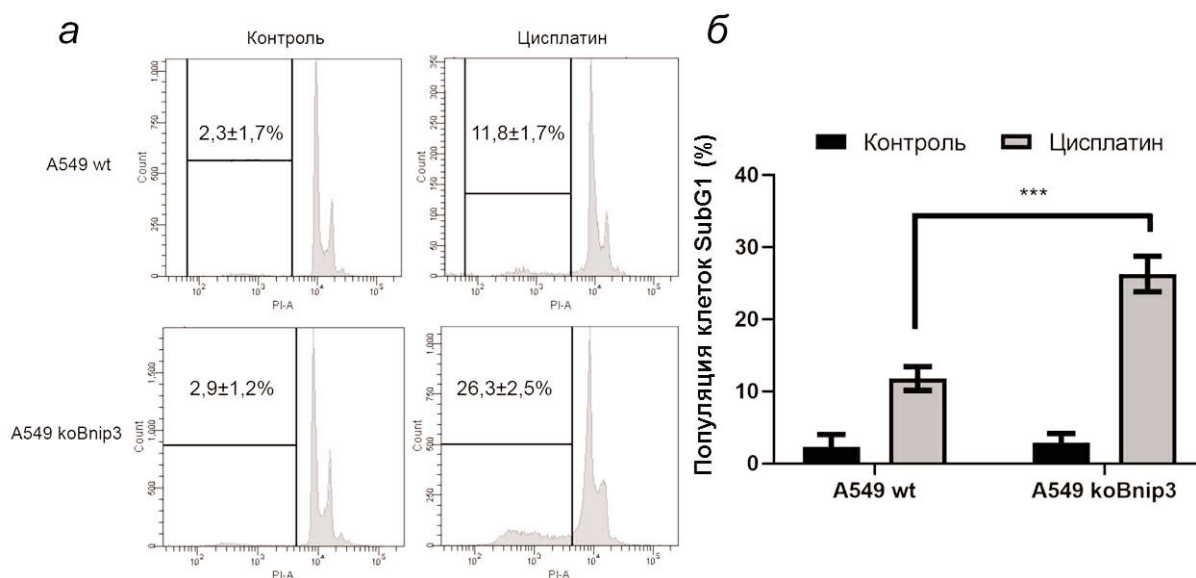


Рис. 4. Цитометрический анализ уровня апоптотической популяции SubG1 (а) клеток линии A549 wt и A549 KoVNIP3 через 24 ч после индукции цисплатином и гистограмма, соответствующая полученным результатам (б). Цитометрия была выполнена в трех повторах

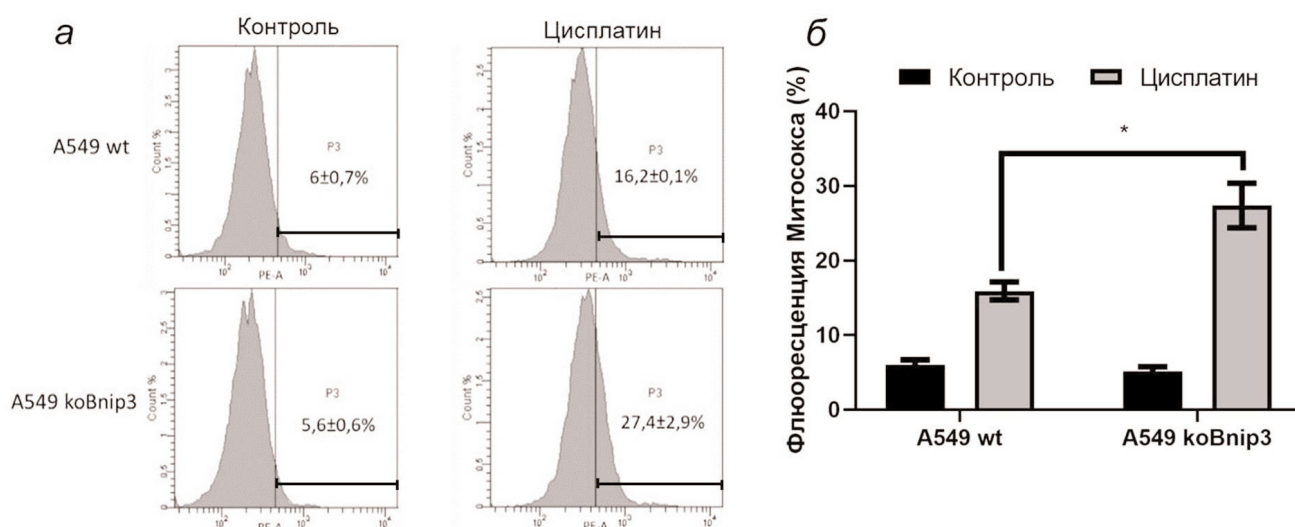


Рис. 5. Оценка мтАФК (а) в клетках линии A549 wt и A549 КоВNIP3 через 16 ч после индукции цисплатином и гистограмма, соответствующая полученным результатам (б). Цитометрия была выполнена в трех повторах

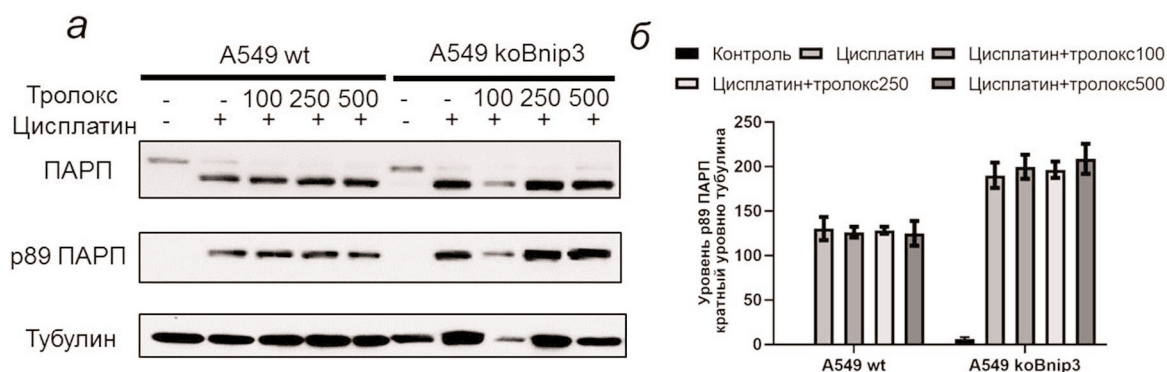


Рис. 6. Вестерн-блот-анализ маркера апоптоза – ПАРП (а) и гистограмма, соответствующая денситометрическому анализу уровня р89 ПАРП (б) в клетках линии A549 wt и A549 КоВNIP3. Тубулин использовали как контроль загрузки белка, относительно которого рассчитывали уровень р89 ПАРП. Эксперимент был выполнен в трех повторах

ние 24 ч. Данные эксперимента показали, что присутствие антиоксиданта не влияло на образование фрагмента р89 ПАРП в условиях индукции апоптоза (рис. 6). Отсутствие эффекта Тролокса на цисплатин-индуцированную гибель клеток линии A549 wt и A549 КоВNIP3 можно объяснить тем, что продукция АФК является лишь следствием пермеабиллизации митохондриальной мембраны и не вносит сколько-либо существенный вклад в прогрессию апоптоза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стимуляция апоптоза воздействием на митохондрии показала себя действенной стратеги-

ей утилизации опухолевых клеток [15, 18]. Повреждение митохондрий, дестабилизация внешней мембраны, стимуляция образования АФК – все это способствует индукции митохондриального пути апоптоза. Однако в клетке существуют системы, ответственные за поддержание контроля качества органелл. Работа этих систем по утилизации митохондрий, не справляющихся со своими функциями, способна снизить эффективность терапии. Важную роль в поддержании качества митохондрий и, следовательно, их функции как регуляторов клеточной гибели, контролируемой выходом цитохрома *c* в цитоплазму, играют белки системы митофагии, такие как PINK1-Parkin, BNIP3-Nix, а также деацетилазы семейства Сиртуинов (Sirt1-5), прямо или

опосредованно контролирующую митохондриальную аутофагию – митофагию [19]. Было показано, что накопление поврежденных митохондрий в результате ингибирования PINK1-Parkin- и Sirt3-зависимой митофагии способно усилить чувствительность к программируемой гибели клеток [20, 21]. Аналогичную роль регулятора митофагии играет белок BNIP3. Можно предположить, что он также потенциально способен регулировать гибель клеток, в частности апоптоз. В наших экспериментах клетки, дефицитные по BNIP3, демонстрировали пониженный уровень митохондриального дыхания по сравнению с клетками дикого типа вследствие того, что поврежденные митохондрии не удалялись из них (рис. 1). Присутствие в клетке популяции дефектных митохондрий делало ее более чувствительной к токсическим агентам. Действительно, нокаут по BNIP3 и, как следствие, подавление BNIP3-зависимой митофагии, существенно стимулировал выход цитохрома *c* в условиях индукции апоптоза (рис. 2). Это вызывало более интенсивную каспазную активность, что оценивалось как непосредственно, так и по накоплению продуктов расщепления одной из мишеней каспазы-3 – PARP и появлению фрагмента р89 PARP (рис. 3). Известно, что регулятор клеточного цикла белок p53 выполняет онкосупрессорную функцию, что может вносить вклад в ответ на стимуляцию клеточной гибели. Нами было установлено, что отношение фосфорилированной формы p53 (p-p53) к исходному белку увеличивается в присутствии цисплатина одинаково вне зависимости от присутствия BNIP3 как в клетках A549, так и H23. Отсутствие разницы в отношении p-p53 к p53 в клеточных линиях АКЛ дикого типа и дефицитных по BNIP3 дает основание предположить о p53-независимом механизме гибели клеток в процессе BNIP3-регулируемого апоптоза.

Данные, полученные нами на клетках АКЛ, согласуются с результатами, показанными как на опухолевых, так и на нормальных клетках [11, 22]. Клетки, имеющие поврежденные митохондрии с пониженным уровнем дыхания, более чувствительны к индукции апоптоза, что объясняется дестабилизацией электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) и облегчению выхода цитохрома *c* [17, 23, 24]. Известно, что выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму приводит к блокированию переноса электронов в ЭТЦ и утечке электронов с образованием супероксидрадикала [25]. В наших условиях нокаут по BNIP3 приводил к появлению в клетках АФК в результате как блокирования дыхательной цепи, так и подавленной митофагии. В ряде исследований было продемонстрировано, что повышенный уровень

мтАФК приводит к усилению клеточной гибели, в том числе и апоптозу [26–28]. Вместе с тем, имеются данные об отсутствии значимых эффектов АФК на гибель клеток или, наоборот, о стимуляции апоптоза при действии антиоксидантов в одиночном или совокупном воздействии с противоопухолевыми препаратами [29–31]. В наших условиях антиоксидант Тролокс не влиял на апоптоз, индуцированный цисплатином. По всей видимости, увеличение уровня мтАФК в клетках, погибающих по механизму апоптоза, является лишь следствием нарушения ЭТЦ митохондрии, обусловленного выходом цитохрома *c*, и связывание мтАФК антиоксидантом не предотвращает начавшийся процесс сборки апоптосомы, индуцированной выходом цитохрома *c*.

Полученные данные схематически представлены на рис. 7. Подавление экспрессии BNIP3 приводит к появлению поврежденных (дефектных) митохондрий, более подверженных деструктивным изменениям, в процессе индукции апоптоза. Это облегчает выход цитохрома *c*, интенсифицируя последующие этапы апоптозного каскада, в частности активацию каспазы-3. Можно предположить, что подавление митофагии в процессе противоопухолевой терапии позволит сделать ее более эффективной.

Снижению эффективности химиотерапии часто способствует приобретенная резистентность к используемому препарату, в частности к цисплатину. В этих условиях стимуляция иных

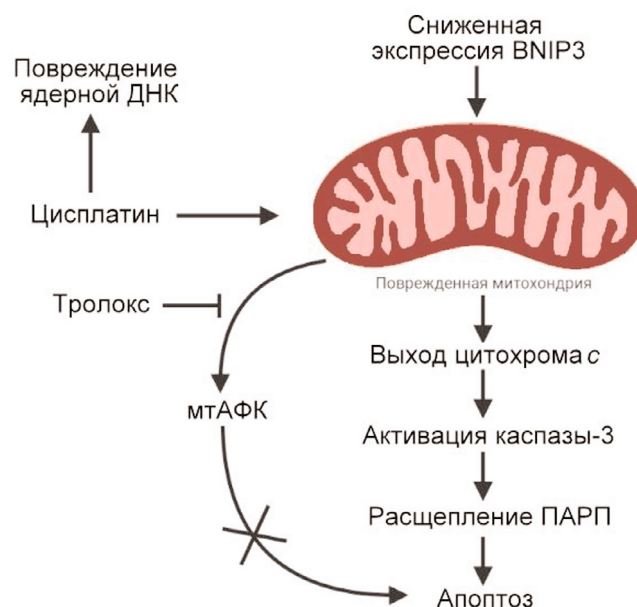


Рис. 7. Схематическое изображение регуляции цисплатин-индуцированного мтАФК-независимого апоптоза в клетках, дефицитных по BNIP3

процессов, прямо или косвенно модулирующих гибель клеток, может повысить чувствительность клеток к терапевтическому воздействию. Как было показано нами ранее, таким процессом может быть митофагия. Так, стимуляция митофагии подавляла апоптоз, вызванный цисплатином, тогда как ее ингибирование — стимулировало гибель клеток [32]. Участие белка BNIP3 в регуляции митофагии позволяет предположить, что подавление его экспрессии даст возможность обойти устойчивость опухолевых клеток к терапевтическим препаратам.

Однако следует иметь в виду, что предполагаемый подход, а именно ингибирование экспрессии BNIP3, следует рассматривать с осторожностью. Вполне возможно, что ингибиторы вызовут снижение экспрессии BNIP3 и в нормальных клетках, что также может вызывать стимуляцию гибели клеток. С этой точки зрения, поиски возможности направленного воздействия на опухолевые клетки с помощью низкомолекулярных соединений позволят обойти эту проб-

лему и помогут в разработке терапии, нацеленной на BNIP3.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант 19-15-00125). Работа лаборатории поддерживается РФФИ (гранты 20-015-00105, 20-315-90019 и 19-015-00332), а также Шведским (190345) и Стокгольмским (181301) противораковыми обществами.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории исследования механизмов апоптоза МГУ имени М.В. Ломоносова Копеиной Гелине Сергеевне за ценные советы в процессе выполнения работы.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Greulich, H. (2010) The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies, *Genes Cancer*, **1**, 1200–1210, doi: 10.1177/1947601911407324.
- Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.*, **13**, 1899–1911, doi: 10.1101/gad.13.15.1899.
- Zhang, J., and Ney, P. A. (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy, *Cell Death Differ.*, **16**, 939–946, doi: 10.1038/cdd.2009.16.
- Mazure N. M., and Pouyssegur, J. (2009) Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia, *Autophagy*, **5**, 868–869, doi: 10.4161/auto.9042.
- Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J. H., Reed, J. C., Gietz, R. D., and Greenberg, A. H. (2000) BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-XL and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites, *J. Biol. Chem.*, **275**, 1439–1448, doi: 10.1074/jbc.275.2.1439.
- Lee, Y., Lee, H.-Y., Hanna, R. A., and Gustafsson, Å. B. (2011) Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, **301**, H1924–H1931, doi: 10.1152/ajpheart.00368.2011.
- Hanna, R. A., Quinsay, M. N., Orogo, A. M., Giang, K., Rikka, S., and Gustafsson, Å. B. (2012) Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy, *J. Biol. Chem.*, **287**, 19094–19104, doi: 10.1074/jbc.M111.322933.
- Sowter, H. M., Ratcliffe, P. J., Watson, P., Greenberg, A. H., and Harris, A. L. (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors, *Cancer Res.*, **61**, 6669–6673.
- Chourasia, A. H., and Macleod, K. F. (2015) Tumor suppressor functions of BNIP3 and mitophagy, *Autophagy*, **11**, 1937–1938, doi: 10.1080/15548627.2015.1085136.
- Koop, E. A., van Laar, T., van Wichen, D. F., de Weger, R. A., van der Wall, E., and van Diest, P. J. (2009) Expression of BNIP3 in invasive breast cancer: correlations with the hypoxic response and clinicopathological features, *BMC Cancer*, **9**, 175, doi: 10.1186/1471-2407-9-175.
- Chourasia, A. H., Tracy, K., Frankenberger, C., Boland, M., Sharifi, M. N., et al. (2015) Mitophagy defects arising from BNIP3 loss promote mammary tumor progression to metastasis, *EMBO Rep.*, **16**, 1145–1163, doi: 10.15252/embr.201540759.
- Dasari, S., and Tchounwou, P. B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 364–378, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K., and Nakamura, Y. (1998) Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3, *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 230–235, PMID: 9523198.
- Jiang, X., and Wang, X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 87–106, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706.
- Cai, J., and Jones, D. P. (1999) Mitochondrial redox signaling during apoptosis, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 327–334, doi: 10.1023/a:1005423818280.
- Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S., and Doetsch, P. W. (2013) Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions, *PLoS One*, **8**, e81162, doi: 10.1371/journal.pone.0081162.
- Forrest, V. J., Kang, Y. H., McClain, D. E., Robinson, D. H., and Ramakrishnan, N. (1994) Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox, *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 675–684, doi: 10.1016/0891-5849(94)90182-1.
- Schwerdt, G., Freudinger, R., Schuster, C., Weber, F., Thews, O., and Gekle, M. (2005) Cisplatin-induced apop-

- osis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells, *Toxicol. Sci.*, **85**, 735-742, doi: 10.1093/toxsci/kfi117.
19. Vernucci, E., Tomino, C., Molinari, F., Limongi, D., Aventaggiato, M., Sansone, L., Tafani, M., and Russo, M. A. (2019) Mitophagy and oxidative stress in cancer and aging: focus on sirtuins and nanomaterials, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, 1-19, doi: 10.1155/2019/6387357.
 20. Qiao, A., Wang, K., Yuan, Y., Guan, Y., Ren, X., Li, L., Chen, X., Li, F., Chen, A. F., Zhou, J., Yang, J.-M., and Cheng, Y. (2016) Sirt3-mediated mitophagy protects tumor cells against apoptosis under hypoxia, *Oncotarget*, **7**, doi: 10.18632/oncotarget.9717.
 21. Yao, N., Wang, C., Hu, N., Li, Y., Liu, M., et al. (2019) Inhibition of PINK1/Parkin-dependent mitophagy sensitizes multidrug-resistant cancer cells to B5G1, a new betulinic acid analog, *Cell Death Dis.*, **10**, 232, doi: 10.1038/s41419-019-1470-z.
 22. Tol, M. J., Ottenhoff, R., van Eijk, M., Zelcer, N., Aten, J., et al. (2016) A PPAR γ -Bnip3 axis couples adipose mitochondrial fusion-fission balance to systemic insulin sensitivity, *Diabetes*, **65**, 2591-2605, doi: 10.2337/db16-0243.
 23. Koepke, S. J., Watkins, J. J., and Minter, S. D. (2016) Understanding the role of mitochondrial health in the mechanism of mitochondrial bioelectrocatalysis, *J. Electrochem. Soc.*, **163**, H292-H298, doi: 10.1149/2.0681605jes.
 24. Cocetta, V., Ragazzi, E., and Montopoli, M. (2019) Mitochondrial Involvement in cisplatin resistance, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3384, doi: 10.3390/ijms20143384.
 25. Zhu, Y., Li, M., Wang, X., Jin, H., Liu, S., Xu, J., and Chen, Q. (2012) Caspase cleavage of cytochrome *c1* disrupts mitochondrial function and enhances cytochrome *c* release, *Cell Res.*, **22**, 127-141, doi: 10.1038/cr.2011.82.
 26. Kleih, M., Böppe, K., Dong, M., Gaißler, A., Heine, S., Olayioye, M. A., Aulitzky, W. E., and Essmann, F. (2019) Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells, *Cell Death Dis.*, **10**, 851, doi: 10.1038/s41419-019-2081-4.
 27. Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssi re, J.-L. (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling, *Biochimie*, **84**, 131-141, doi: 10.1016/S0300-9084(02)01369-X.
 28. Sp, N., Kang, D. Y., Jo, E. S., Rugamba, A., Kim, W. S., et al. (2020) Tannic acid promotes TRAIL-induced extrinsic apoptosis by regulating mitochondrial ROS in human embryonic carcinoma cells, *Cells*, **9**, 282, doi: 10.3390/cells9020282.
 29. Monticone, M., Taherian, R., Stigliani, S., Carra, E., Monteghirfo, S., et al. (2014) NAC, Tiron and Trolox impair survival of cell cultures containing glioblastoma tumorigenic initiating cells by inhibition of cell cycle progression, *PLoS One*, **9**, e90085, doi: 10.1371/journal.pone.0090085.
 30. Diaz, Z., Colombo, M., Mann, K. K., Su, H., Smith, K. N., et al. (2005) Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines, *Blood*, **105**, 1237-1245, doi: 10.1182/blood-2004-05-1772.
 31. Zheng, J., Payne, K., Taggart, J. E., Jiang, H., Lind, S. E., and Ding, W.-Q. (2012) Trolox enhances curcumin's cytotoxicity through induction of oxidative stress, *Cell. Physiol. Biochem.*, **29**, 353-360, doi: 10.1159/000338490.
 32. Abdrakhmanov, A., Kulikov, A. V., Luchkina, E. A., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2019) Involvement of mitophagy in cisplatin-induced cell death regulation, *Biol. Chem.*, **400**, 161-170, doi: 10.1515/hsz-2018-0210.

BNIP3 AS A REGULATOR OF CISPLATIN-INDUCED APOPTOSIS

A. S. Gorbunova¹, T. V. Denisenko¹, M. A. Yaprntseva¹, A. D. Pivnyuk¹,
T. A. Prikazchikova², V. G. Gogvadze^{1,3}, and B. Zhivotovsky^{1,3*}

¹ Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: boris.zhivotovsky@ki.se

² Skolkovo Institute of Science and Technology, Center of Life Sciences, 121205 Moscow, Russia

³ Karolinska Institute, Institute of Environmental Medicine, SE-171 77 Stockholm, Sweden

Received July 16, 2020

Revised August 27, 2020

Accepted August 28, 2020

BNIP3 is a member of Bcl-2 family of proteins involved in regulation of various forms of cell death. However, its role in these processes remains unclear and varies depending on the type of cancer cells and environmental factors (pH, O₂ level, etc.). Here, the role of BNIP3 in apoptosis regulation in lung adenocarcinoma cells was investigated. The suppressed expression of BNIP3 caused inhibition of oxygen consumption and stimulated production of the mitochondrial reactive oxygen species, suggesting the role of BNIP3 in induction of mitochondrial dysfunction and its potential involvement in regulation of cell death. Indeed, cytochrome *c* release in the cells with BNIP3 knockout and knockdown was higher than in the wild-type (WT) upon apoptosis stimulation by cisplatin. Moreover, suppression of BNIP3 expression led to the increase in the caspase-3 activity and, as a consequence, accumulation of the apoptotic marker – p89 fragment of poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP) – as compared to WT cells. Analysis of the SubG1 population by flow cytometry confirmed the elevated level of apoptosis in the BNIP3 knockout cells. Pretreatment with the antioxidant Trolox did not affect cell death, indicating that it was independent on reactive oxygen species. These data show that BNIP3 is involved in maintaining normal functioning of mitochondria and, as a result, can regulate the mitochondrial pathway of cell death.

Keywords: BNIP3, apoptosis, mitophagy, lung adenocarcinoma, cisplatin