УДК 577.112.7

Определение белков наружной мембраны митохондрий, взаимодействующих с белком AIF

Н. П. Фадеева[1], Н. В. Антипова[1], В. О. Шендер[1], К. С. Ануфриева[1], Г. А. Степанов[2], С. Бастола[3], М. И. Шахпаронов[1], М. С. Павлюков[1]*

[1]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

[2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

[3]Университет Алабамы в Бирмингеме, 35294, Бирмингем, Алабама, США

*E-mail: marat.pav@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2017

Принята в печать 24.09.2018

РЕФЕРАТ **В ответ на неблагоприятные воздействия клетки многоклеточных организмов могут подвергаться запрограммированной гибели – апоптозу. Нарушения этого процесса приводят к развитию различных заболеваний человека. На сегодняшний день известно два типа апоптоза – каспаз-зависимый, при котором происходит расщепление клеточных белков, и каспаз-независимый, обусловленный разрывами молекул ДНК. Главную роль в апоптозе второго типа, по-видимому, более консервативном и эволюционно древнем, играет белок AIF. Ключевым этапом каспаз-независимого апоптоза является диссоциация AIF от наружной митохондриальной мембраны (НММ), однако механизм регуляции взаимодействия AIF с НММ до сих пор не установлен. В данной работе мы впервые показали, что AIF может закрепляться на НММ благодаря взаимодействию с белком Морталином. Нами подтверждено связывание этих белков *in vitro* и *in vivo*, а также картированы участки аминокислотной последовательности, необходимые для этого взаимодействия. Показано, что индукция апоптоза противоопухолевыми препаратами приводит к распаду комплекса AIF–Морталин и диссоциации AIF от НММ. Наконец, с использованием биоинформатического анализа установлено, что повышенная экспрессия Морталина в клетках глиобластомы коррелирует с плохим клиническим прогнозом. Все эти данные указывают на важную роль Морталина в регуляции каспаз-независимого апоптоза и позволяют предположить, что ингибирование взаимодействия AIF–Морталин приведет к диссоциации AIF от НММ и последующей гибели опухолевых клеток.**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **AIF, каспаз-независимый апоптоз, глиобластома, белки теплового шока.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **AIF – фактор, индуцирующий апоптоз (Apoptosis Inducing Factor); Hsp – белок теплового шока (Heat shock protein); НММ – наружная мембрана митохондрий; BiFC – бимолекулярная комплементация флуоресценции (Bimolecular Fluorescence Complementation); YFP – желтый флуоресцентный белок (Yellow Fluorescent Protein); PLA – анализ методом проксимального связывания *in situ* (proximity ligation assay).**

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение процесса апоптоза вызывает развитие широкого спектра заболеваний человека. С одной стороны, ингибирование апоптоза может способствовать опухолевой трансформации клеток [1] и инициации аутоиммунных процессов [2], с другой, избыточная активация апоптоза приводит к гибели нормальных клеток при ишемических поражениях (инфарктах и инсультах) [3]. На протяжении долгого времени предполагалось, что основными эффекторами апоптоза являются каспазы – цистеиновые протеазы, расщепляющие клеточные белки, однако в последнее время накапливается все больше данных о важной роли каспаз-независимого пути апоптоза, главную роль в котором играет белок AIF (Apoptosis Inducing Factor) [4].

Известно, что многие виды опухолей устойчивы к каспаз-зависимому пути клеточной гибели, однако все они чувствительны к апоптозу, опосредованному белком AIF [4, 5]. Подобная чувствительность объясняется тем, что AIF не только вовлечен в апоптоз, но и жизненно необходим для функционирования

митохондрий. Поэтому любые опухолевые клетки содержат значительное количество белка AIF, что делает его привлекательной мишенью для разработки противоопухолевых препаратов [6]. С другой стороны, AIF играет ключевую роль при ишемических повреждениях здоровых клеток. Недавние исследования показали, что гибель мышечных и нервных клеток при инфарктах [7] и инсультах [8] происходит исключительно посредством каспаз-независимого AIF-индуцируемого апоптоза, тогда как ингибирование AIF перед моделированием инфаркта эффективно препятствует гибели клеток, позволяя полностью восстановить функции сердца через 2 недели после модельного приступа [7].

Белок AIF, кодируемый геном *aifm1,* представляет собой NAD-связывающий флавопротеин, в норме локализующийся на мембране митохондрий. Этот белок синтезируется в виде пре-пропептида с мол. массой 67 кДа, состоящего из 613 аминокислотных остатков (fAIF). На его N-конце находится последовательность митохондриальной локализации (1–30 а.о.) и гидрофобный трансмембранный сегмент (66–84 а.о.), далее расположены две последовательности ядерного импорта, а также FAD- и NAD-связывающие домены [9, 10]. Сравнительный анализ геномов различных организмов показал, что AIF чрезвычайно консервативен, а его близкие гомологи найдены у всех многоклеточных организмов, включая растения [11]. Интересно, что удаление этого белка летально уже на самых ранних стадиях развития млекопитающих [12].

Синтезированный в цитоплазме AIF встраивается во внутреннюю мембрану митохондрий, где под воздействием пептидаз от него отщепляется N-концевой сегмент и образуется митохондриальный AIF (Δ1–54) с массой 62 кДа [10]. При индукции апоптоза этот белок диссоциирует от митохондриальной мембраны и транспортируется в ядро. В ядре AIF взаимодействует с гистоном H2AX и неактивной эндонуклеазой CypA. Образовавшийся тройной комплекс расщепляет геномную ДНК на фрагменты длиной около 50 т.п.н., что вызывает гибель клетки [13].

Необычной является кинетика диссоциации AIF от мембраны митохондрий. Согласно некоторым данным, этот процесс происходит через 12–18 ч после индукции апоптоза и является следствием активации классического, управляемого каспазами, пути программируемой клеточной гибели [14]. Однако в других работах транслокацию AIF наблюдали уже через 10–20 мин после индукции апоптоза, что намного опережает активацию каспаз-зависимого пути [15]. Столь противоречивые результаты объясняются существованием двух пулов AIF внутри клетки. Часть AIF (около 70%) закреплена на внутренней мембране митохондрий с помощью трансмембранного сегмента. Для диссоциации этих молекул необходимо нарушение целостности митохондриальной мембраны, активация протеаз и расщепление AIF между 96 и 120 а.о., что приводит к образованию растворимых Δ1–102 (57 кДа) или Δ1–118 фрагментов AIF (55 кДа) [10]. С другой стороны, около 30% AIF располагается на цитоплазматической поверхности наружной мембраны митохондрий (НММ). Эти молекулы связаны с мембраной намного слабее, и для их диссоциации достаточно изменения конформации AIF, вызванного взаимодействием с поли-ADP-рибозой, синтезируемой в ответ на повреждение ДНК [8, 16].

Предполагается, что именно высокоподвижная фракция AIF на НММ ответственна за каспаз-независимый путь апоптоза в опухолевых и нормальных клетках. Однако до сих пор не ясно, как именно AIF взаимодействует с НММ и почему происходит его диссоциация. Чтобы ответить на этот вопрос, мы определили белки, способные образовывать комплекс с AIF на НММ, и изучили как изменяется взаимодействие AIF с этими белками при индукции апоптоза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение наружной митохондриальной мембраны

НММ выделяли, как описано ранее [17], с небольшими модификациями. Печень четырех мышей, содержавшихся без еды в течение 18 ч, промывали буфером А (70 мМ сахароза, 210 мМ *D*-маннитол, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ Трис-HCl, pH 7.2), измельчали на фрагменты размером 2–4 мм и растирали тефлоновым пестиком в стеклянной ступке в 10-кратном объеме буфера А. Все операции проводили на льду. Гомогенат центрифугировали (10 мин 500*g*), после чего супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 9000*g*. Супернатант отбирали, поверхность осадка аккуратно трижды промывали небольшим объемом буфера А. Осадок ресуспендировали в буфере А, раствор центрифугировали (10 мин 500*g*), после чего супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 9000*g*. Осадок ресуспендировали в буфере А и повторно центрифугировали в течение 10 мин при 9000*g*. Супернатант отбирали, поверхность осадка аккуратно трижды промывали небольшим объемом буфера А. Осадок ресуспендировали в 35 мл буфера D (20 мМ фосфат Na, 0.02% бычий сывороточный альбумин, pH 7.2) и инкубировали в течение 20 мин во льду. Раствор центрифугировали (20 мин 35000*g*), осадок ресуспендировали в 35 мл буфера D и центрифугировали в течение 15 мин при 1900*g*. Супернатант аккуратно отбирали и центрифугировали (20 мин, 35000*g*).

Полученный желто-коричневый осадок представлял собой фракцию НММ. Белки НММ солюбилизировали в буфере PBS с добавлением 1% Тритона X-100, 0.1% дезоксихолата Na и 0.5 мМ DTT.

Масс-спектрометрия

Нужные белковые полосы вырезали из полиакриламидного геля, обесцвечивали в растворе, содержащем 50% ацетонитрила и 50 мМ бикарбонат аммония, и дегидратировали, добавляя 100% ацетонитрила. После удаления ацетонитрила проводили трипсинолиз в геле в течение 14 ч при 37˚C (буфер для трипсинолиза содержал 13 нг/мкл трипсина и 10 мМ бикарбоната аммония). Реакцию останавливали двумя объемами 0.1% раствора трифторуксусной кислоты. Пептиды экстрагировали из геля двумя объемами 50% раствора ацетонитрила в течение 1 ч. Полученные пептиды концентрировали до объема 5 мкл на вакуумной центрифуге. Далее 1 мкл смеси пептидов перемешивали на мишени с раствором матрицы (20 мг/мл 2,5-дигидроксибензойной кислоты, 50% ацетонитрила и 0.1% трифторуксусной кислоты). Масс-спектры получали на приборе MALDI Time-of-flight (Ultraflex TOF/TOF, Bruker Daltonik) в отражательном режиме регистрации положительно заряженных ионов в диапазоне масс 500–5000 Да. Данные обрабатывали при помощи программы Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics), а пики продуктов автокаталитического расщепления трипсина использовали для калибровки масс-спектрометра. Для анализа использовали следующие параметры: точность определения массы – 100 ppm, база данных SwissProt, таксономическая категория Человек, допущение одного пропущенного сайта специфического расщепления трипсином.

Конструирование плазмидных векторов

Фрагмент ДНК, кодирующий полноразмерный Морталин, амплифицировали с кДНК клеток линии U87MG с помощью ПЦР с праймерами Mort_for (AAAA AGA TCT ATG ATA AGT GCC AGC CGA-GC) и Mort_rev (ACCA GTC GAC CTG TTT TCT CCT-TTT GAT), клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pET28-Mort_FULL. Фрагмент ДНК, кодирующий N-концевой фрагмент Морталина, амплифицировали с плазмиды pET28-Mort_FULL с помощью ПЦР с праймерами Mort_for и Mort_I_rev (AATA GTC-GAC TCA GCC GGC CAA CAC ACC TC), клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pET28-Mort_I. Фрагмент ДНК, кодирующий C-концевой фрагмент Морталина, амплифицировали с плазмиды pET28-Mort_FULL с помощью ПЦР с праймерами Mort_II_for (GGGT-AGA TCT ACG GAT GTG CTG CTC) и Mort_rev, клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pET28-Mort_II. Для экспрессии AIF с последовательностью HALO был создан экспрессионный вектор pET-HALO. Фрагмент ДНК, кодирующий HALO-tag, амплифицировали с плазмиды pFC20K Halo-tag T7 SP6 Flexi (Promega) с помощью ПЦР с праймерами Halo_for (ACTA ACC GGT CGC CAC CAT GGG ATC CGA-AAT CGG TAC TGG) и Halo_rev (AATT AGA TCT-ACC GGA AAT CTC CAG AGT A) и клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции NcoI и BamHI. Полученную плазмиду назвали pET-HALO. Далее фрагмент ДНК, кодирующий полноразмерный AIF, амплифицировали с плазмиды pEBB-AIF-YC [18] с помощью ПЦР с праймерами AIF_for (AATA GAA-TTC GCT AGC TCT GGT GCA TCA GGG G) и AIF_rev (CTGT GTC GAC TCA GTC TTC ATG AAT GTT GA) и клонировали в вектор pET-HALO по сайтам рестрикции EcoRI и SalI. Полученная плазмида была названа pET-HALO-AIF. Для экспрессии AIF с His-tag последовательность, кодирующую AIF, клонировали из вектора pET-HALO-AIF в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции EcoRI и SalI и получили плазмиду pET28-AIF_FULL. Фрагмент ДНК, кодирующий apoAIF, амплифицировали с плазмиды pEBB-AIF-YC с помощью ПЦР с праймерами apoAIF_for (TAGA GAA TTC GGG CTG ACA CCA-GAA CAG A) и AIF_rev, клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции EcoRI и SalI и получили плазмиду pET28-apoAIF. Для экспрессии Морталина, соединенного с N-концевой частью YFP, создали экспрессионный вектор pTagYN-N. Фрагмент ДНК, кодирующий N-концевую часть YFP, амплифицировали с плазмиды pEBB-XIAP-YN [18] с помощью ПЦР с праймерами YN_for (AAAA-GTC GAC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-C) и YN_rev (AAAT GCGG CCGC TCA GGA TCC-GCT CAC G) и клонировали в вектор pTagCFP-N (Evrogen) по сайтам рестрикции SalI и NotI с получением плазмиды pTagYN-N. Далее последовательность, кодирующую полноразмерный Морталин, перенесли из вектора pET28-Mort_FULL в вектор pTagYN-N по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pTagYN-Mort. Отсутствие мутаций, а также правильность легирования вектора и вставки во всех случаях подтверждали с помощью секвенирования.

Индукция синтеза рекомбинантных белков в клетках *Escherichia coli*

Клетки из индивидуальных колоний *E. coli* штамм BL21(DE3) Codone+ RIL, трансформированные плазмидой, кодирующей соответствующий белок, перено-

сили с агаризованной среды в среду LB (17 мл) с необходимым антибиотиком и инкубировали в течение ночи при перемешивании и 37°C, затем переносили в колбу объемом 750 мл с 200 мл свежей среды LB с антибиотиком и инкубировали при перемешивании при 37°C до достижения оптической плотности 0.7 при λ = 600 нм. После этого для индукции транскрипции добавляли изопропил-β-*D*-тиогалактозид до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 18 ч при перемешивании и комнатной температуре.

Выделение белков *E. coli*, содержащих гексагистидиновый участок, в денатурирующих условиях

После индукции трансляции 200 мл среды LB с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 12 мл лизирующего буфера B (pH 8.0, 100 мМ NaH_2PO_4, 10 мМ Трис-HCl, 8 М мочевина) и оставляли на 1.5 ч при комнатной температуре, периодически перемешивая. Лизат центрифугировали (15 мин, 15000 об/мин, 4°C, ротор JS-20 Beckman). Супернатант инкубировали с 2 мл Ni-NTA-агарозы при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Полученную суспензию переносили в колонку. После оседания Ni-NTA-агарозы осадок промывали, пропуская через колонку 10 мл буфера B и 10 мл буфера C (буфер B с pH 6.3). Затем на колонку медленно наносили 2 мл элюирующего буфера (буфер C с добавлением 250 мМ имидазола). Инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и собирали элюат. Полученный раствор диализовали в течение ночи против PBS с добавлением 1 мМ DTT.

Выделение AIF с Halo-tag из бактерий *E. coli* в неденатурирующих условиях

После индукции транскрипции 200 мл среды LB с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 6 мл лизирующего буфера F (pH 7.9, 50 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, 0.5 мМ DTT, 0.5 мМ EDTA, 0.005% Igepal и коктейль ингибиторов протеаз). Суспензию переносили в охлажденные пробирки и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, перемешивая в течение 1 мин после каждых 2 мин обработки. Полученный лизат центрифугировали (20 мин, 15000 об/мин, 5°C, ротор JS-20 Beckman). К 1.5 мл лизата добавляли 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным лигандом Halo-tag и инкубировали при постоянном перемешивании и комнатной температуре в течение 1 ч. После этого пробирки со смесью помещали в магнитную подставку, отбирали супернатант и промывали магнитные частицы 1 мл буфера F 4 раза. Далее магнитные частицы с иммобилизованным белком использовали для изучения белок-белковых взаимодействий *in vitro*.

Изучение взаимодействия рекомбинантных белков *in vitro* методом pull down

Для получения белкового комплекса аликвоту раствора рекомбинантного белка, имеющего гексагистидиновый участок, инкубировали с 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным на них белком с HALO-последовательностью. Суспензию инкубировали в течение ночи при перемешивании и температуре +4°C. Магнитные частицы промывали 3 раза PBS, связавшиеся белки элюировали буфером SLB (100 мМ Трис-HCl pH 6.8, 4% SDS, 5% β-меркаптоэтанола, 20% глицерина, 0.02% бромфенолового синего).

Изучение белок-белковых взаимодействий *in vitro* методом преципитации белков из клеточных лизатов

Для получения белкового комплекса лизат клеток U87MG или фракцию белков HMM инкубировали с 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным белком, имеющим гексагистидиновый участок. Суспензию инкубировали в течение ночи при перемешивании и температуре +4°C. Для выделения белкового комплекса использовали набор Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit по инструкции производителя.

Иммуноблотинг

Иммуноблотинг проводили по стандартной методике [19]. Для окрашивания использовали моноклональные антитела кролика к AIF 1 : 500 (ab32516, Abcam), моноклональные антитела мыши к Морталину 1 : 250 (sc133137, Santa Cruz), конъюгированные с пероксидазой хрена моноклональные антитела мыши к γ-цепи IgG кролика 1 : 5000 (Sigma) и конъюгированные с пероксидазой хрена поликлональные антитела козы к IgG мыши 1 : 5000 (Sigma).

Культивирование клеток

Клетки линии U87MG культивировали в CO_2-инкубаторе в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ *L*-глутамина и смеси пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Для трансфекции использовали Lipofectamin LTX (Thermo Fisher, США) в соответствии с инструкцией производителя. Апоптоз вызывали, добавляя 50 мкМ цисплатина или 1 мкМ стауроспорина. Для оценки жизнеспособности клетки помещали в лунки 96-луночного планшета (по 6000 на лунку), на следующий день добавляли циспла-

тин или стауроспорин в различных концентрациях. Через 4 дня жизнеспособность клеток определяли с помощью Аламарового голубого по инструкции производителя (Thermo Fisher, США).

Исследование белок-белковых взаимодействий методом BiFC

Для изучения взаимодействия белков методом BiFC клетки линии U87MG трансфицировали плазмидами, кодирующими AIF с C-концевой частью YFP и Морталин с N-концевой частью YFP, или белок XIAP с N-концевой частью YFP в качестве положительного контроля. Через 24 ч после трансфекции с помощью конфокального микроскопа получали изображения клеток, экспрессирующих исследуемые белки. Анализировали не менее 50 трансфицированных клеток в каждом образце.

PLA-анализ

Клетки линии U87MG, находящиеся в лунках камеры Lab-Tek II, трижды промывали PBS и фиксировали 4% раствором формалина в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого клетки пермеабилизировали 0.2% раствором Тритона X-100 в течение 15 мин. Все дальнейшие действия проводили с помощью набора Duolink In Situ Orange Starter Kit (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее было показано, что AIF взаимодействует с поверхностью НММ, не встраиваясь в липидный бислой [20]. Учитывая специфичность связывания AIF с НММ, а также то, что это взаимодействие ингибируется высокими концентрациями NaCl, мы предположили, что AIF локализуется на поверхности НММ благодаря связыванию с неким белком-адаптером, закрепленным на НММ. Чтобы определить этот белок, мы изучили взаимодействия рекомбинантного AIF с белками, выделенными из НММ печени мыши с помощью ультрацентрифугирования. Далее фракцию солюбилизированных белков НММ пропускали через сорбент с иммобилизованным контрольным белком или с полноразмерным AIF (fAIF). После этого связавшиеся белки идентифицировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Один из белков, способных взаимодействовать с AIF, но не с контрольным рекомбинантным белком, был определен как Морталин (*рис. 1*) – представитель семейства белков теплового шока (Hsp), ассоциированный с внешней поверхностью НММ [21].

Белок Морталин содержит два функциональных домена. С N-конца располагается АТР-связывающий домен (1–443 а.о.), а с С-конца пептидсвязывающий домен (444–581 а.о.) [22]. Чтобы определить, какой из этих доменов важен для взаимодействия с AIF, мы проверили связывание fAIF с N- и C-концевыми фрагментами Морталина (1–433 и 433–666 а.о. соответственно, *рис. 2А*). С этой целью мы сконструировали плазмидные векторы, кодирующие фрагменты Морталина, несущие гексагистидиновый участок на С-конце, а также плазмиду, кодирующую fAIF с Halo-Tag на N-конце. Соответствующие рекомбинантные белки были выделены из клеток бактерий (*рис. 2Б*), после чего к магнитным частицам с иммобилизованным на них fAIF добавляли очищенные фрагменты Морталина. После инкубации и последующих промывок связавшиеся с сорбентом белки элюировали и разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (*рис. 2В*). Показано, что фрагмент Mort II (433–666 а.о.) взаимодействует с fAIF *in vitro*, тогда как Mort I (1–433 а.о.) к такому взаимодействию не способен.

После идентификации фрагмента Морталина, способного связываться с AIF, мы решили определить участок AIF, необходимый для данного взаимодействия. С этой целью были созданы плазмиды, кодирующие полноразмерный AIF (fAIF), а также процессированный AIF (apoAIF, 103–613 а.о., *рис. 2А*), который возникает при индукции апоптоза и после диссоциации от митохондриальной мембраны перемещается в ядро клетки. Оба белка содержат N-концевой гексагистидиновый участок. Выделенные рекомбинантные фрагменты AIF были иммобилизованы на магнитных частицах, после чего к частицам добавляли фракцию солюбилизированных белков НММ (содержащую Морталин). После инкубации и последующих промывок связавшиеся белки элюировали и проводили электрофорез в полиакриламидном геле. Наличие Морталина определяли с помощью иммуноблотинга с первичными антителами на Морталин. Согласно результатам иммунодетекции (*рис. 2Г*), эндогенный Морталин взаимодействует с полноразмерным рекомбинантным fAIF *in vitro* и не взаимодействует с apoAIF, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о том, что apoAIF не способен локализоваться на НММ [20].

Чтобы подтвердить, что AIF может взаимодействовать с Морталином не только *in vitro*, но и внутри живой клетки *in vivo*, был использован метод бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC). Этот метод основан на том, что белок YFP способен флуоресцировать, даже если его разделить на две части, при условии, что обе половины YFP находятся достаточно близко друг к другу. По этой причине мы создали плазмиды, кодирующие Морталин, соединенный с N-концевой частью YFP (Mort-YN), и fAIF, несущий С-концевой фрагмент YFP (YC-

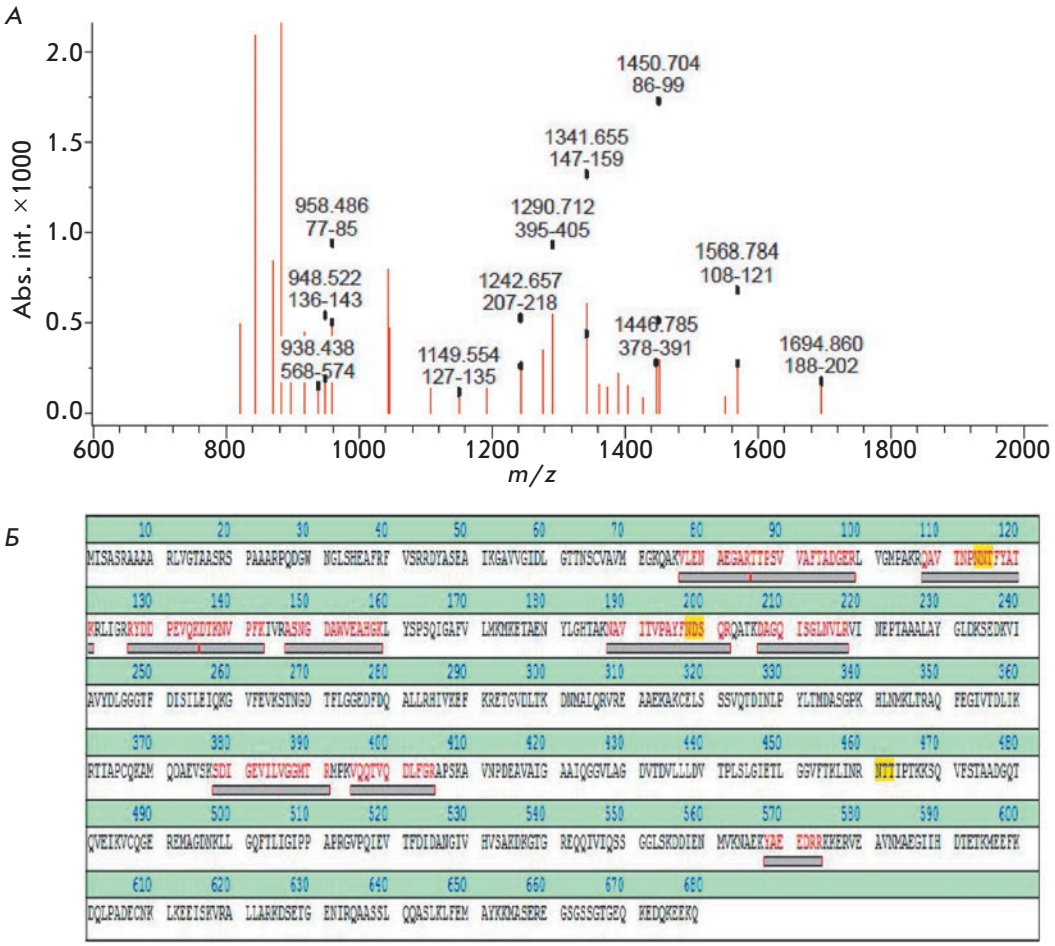


Рис. 1. Определение белка HMM, взаимодействующего с полноразмерным AIF. *А* – масс-спектр белков HMM, взаимодействующих с AIF. Указаны пептиды, относящиеся к белку Морталин. *Б* – полная аминокислотная последовательность Морталина и пептиды, идентифицированные с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

AIF) (*рис. 3А*). Этими плазмидами котрансфицировали клетки глиобластомы человека линии U87MG. Кроме того, в качестве положительного контроля клетки котрансфицировали плазмидами, кодирующими YC-AIF и белок XIAP с N-концевой частью YFP (YN-XIAP). Ранее было показано, что AIF взаимодействует с XIAP в митохондриях [18]. В качестве отрицательного контроля клетки котрансфицировали плазмидами, кодирующими YC-AIF и свободную N-концевую часть YFP (YN). Через 24 ч после трансфекции с помощью конфокального микроскопа получили изображение клеток, коэкспрессирующих пары исследуемых белков. Как видно из *рис. 3А*, в клетках коэкспрессирующих YC-AIF и Mort-YN, а также в клетках, коэкспрессирующих YC-AIF и YN-XIAP, наблюдается яркая флуоресценция YFP. Такой результат подтверждает, что AIF и Морталин действительно взаимодействуют друг с другом *in vivo*.

Получив результаты, говорящие о том, что AIF способен взаимодействовать с Морталином *in vitro* и *in vivo*, мы исследовали изменение интенсивности этого взаимодействия на ранних стадиях апоптоза. С этой целью клетки линии U87MG обрабатывали цисплатином [$Pt(NH_3)_2Cl_2$], широко используемым препаратом для химиотерапии многих типов опухолей. Чтобы определить концентрацию цисплатина, вызывающую апоптоз в большинстве клеток, мы оценили влияние различных количеств этого соединения на жизнеспособность клеток, окрашивая их Аламаровым голубым. Исходя из данных, представленных на *рис. 3Б*, для индукции апоптоза мы использовали цисплатин в концентрации 60 мкМ. Клетки обрабатывали цисплатином в течение 24 ч, после чего лизировали, и инкубировали лизат с магнитными частицами с иммобилизованным на них рекомбинантным Морталином. В качестве контроля использовали лизат нормальных, не обработанных цисплатином клеток. После инкубации и последующих промывок связавшиеся белки элюировали и проводили электрофорез в полиакриламидном геле. Присутствие AIF определяли с помощью иммуноблотинга с первичными антителами на этот белок. Из *рис. 3В* видно, что в нормальных клетках рекомбинантный Морталин взаимодействует с эндо-

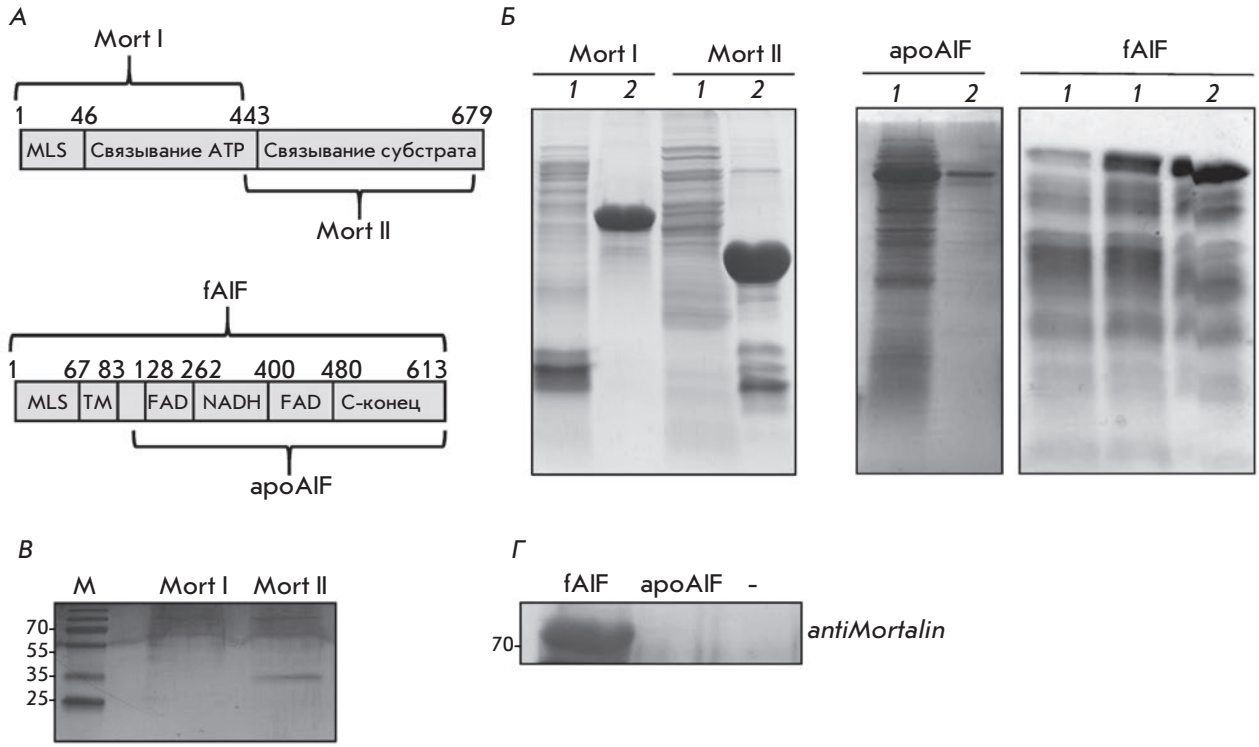


Рис. 2. Взаимодействие AIF и Морталина *in vitro*. *А* – схема белков Морталин и AIF с указанием рекомбинантных фрагментов, использованных в данной работе. *Б* – электрофореграмма, показывающая чистоту выделения рекомбинантных фрагментов Морталина и AIF из бактерий *E. coli* (*1* – до оптимизации условий экспрессии и выделения; *2* – после оптимизации условий экспрессии и выделения). *В* – электрофореграмма, показывающая взаимодействие рекомбинантных фрагментов Морталина с полноразмерным AIF, иммобилизованным на магнитных частицах. *Г* – иммунодетекция эндогенного Морталина, элюированного с магнитных частиц, на которых были иммобилизованы рекомбинантные фрагменты AIF

генным полноразмерным AIF, но при индукции апоптоза интенсивность этого взаимодействия заметно снижается.

Правильность этого результата мы подтверждали с использованием метода PLA, а также широко известного индуктора апоптоза – стауроспорина. Принцип анализа PLA заключается в том, что фиксированные и пермеабилизированные клетки инкубируют с парой первичных антител к исследуемым белкам и парой вторичных антител, конъюгированных с олигонуклеотидами. Если олигонуклеотиды, соединенные с разными антителами, оказались достаточно близко друг от друга (такое происходит в случае взаимодействия исследуемых белков), то при добавлении ДНК-полимеразы на этих нуклеотидах начинается амплификация ДНК по принципу «разматывающегося кольца». Далее клетки инкубируют с флуоресцентно меченным олигонуклеотидным зондом, который отжигается в тех местах, где амплифицировалась соответствующая ДНК. В результате внутриклеточные белок-белковые взаимодействия визуализируются в виде точечных флуоресцирующих областей, количество которых пропорционально интенсивности связывания исследуемых белков [23]. Как и в предыдущем эксперименте, мы определили концентрацию препарата, вызывающую апоптоз большинства клеток (*рис. 4А*). Используя PLA-анализ, мы изучили изменение интенсивности взаимодействия эндогенных AIF и Морталина после добавления стауроспорина (*рис. 4Б,В*). Полученные нами результаты показывают, что после индукции апоптоза интенсивность взаимодействий Морталин–AIF значительно снижается ($p < 0.05$), что соответствует данным, полученным в предыдущем эксперименте.

Исходя из результатов, описанных выше, можно предположить, что повышенное количество Морталина в раковых клетках может способствовать усилению связывания AIF с HMM, ведущему к более высокой устойчивости клеток к апоптозу и, как след-

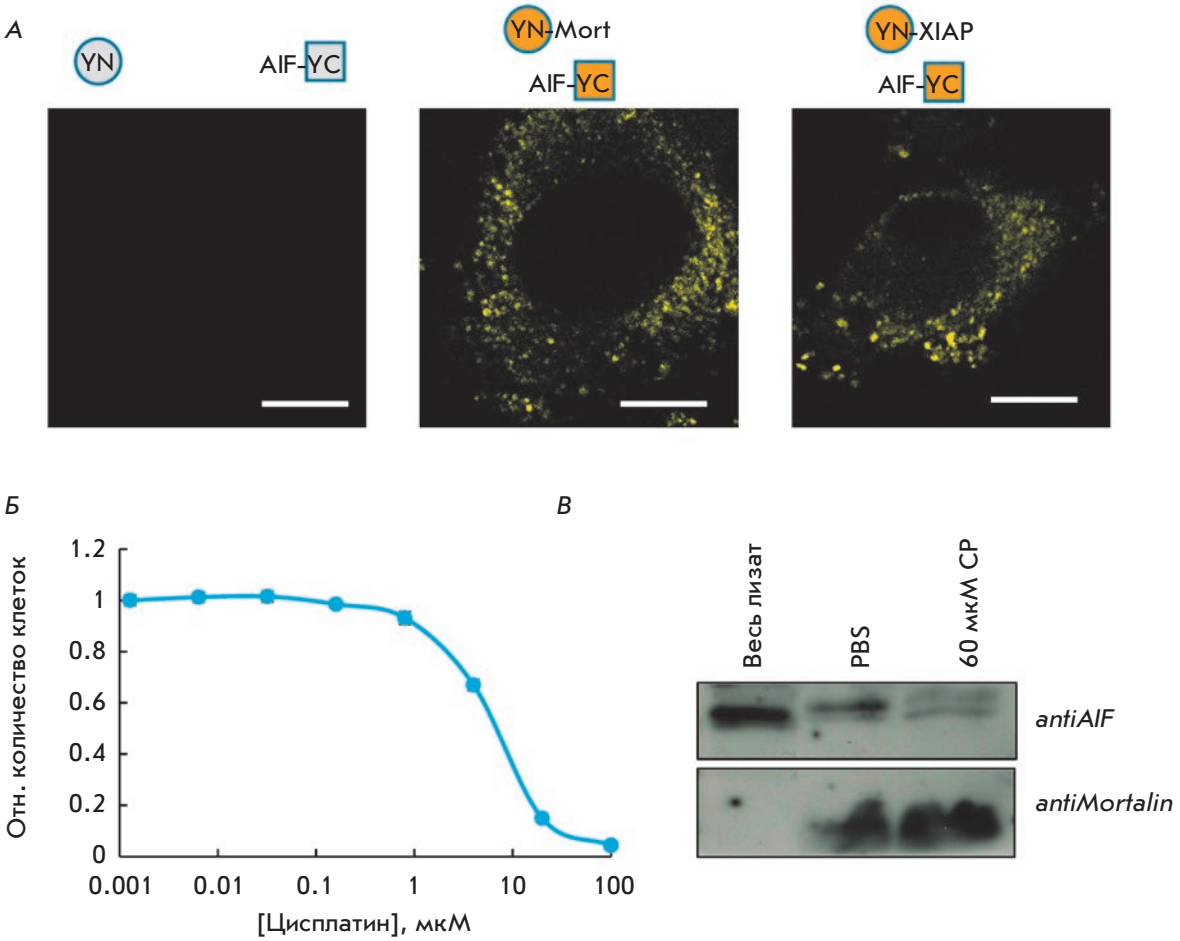


Рис. 3. Взаимодействие Морталина и AIF в живой клетке. *А* – флуоресценция YFP в клетках U87MG, коэкспрессирующих YC-AIF и YN (слева), YN-Mort (в центре) или YN-XIAP (справа). *Б* – выживаемость клеток U87MG, обработанных цисплатином в различных концентрациях. *В* – иммунодетекция эндогенного AIF из лизатов клеток U87MG, обработанных 60 мкМ цисплатина. Лизат пропускали через магнитные частицы с иммобилизованным полноразмерным Морталином, после чего связавшиеся белки элюировали и разделяли в полиакриламидном геле. В качестве контроля иммобилизации белка также проводили иммунодетекцию рекомбинантного Морталина

ствие, к более агрессивному фенотипу опухоли. Возможную связь между экспрессией Морталина и выживаемостью пациентов мы проверили с использованием общедоступной базы данных Rembrandt, содержащей информацию об экспрессии генов и выживаемостью пациентов с опухолями головного мозга. Анализ этой базы данных (*рис. 5*) показал, что более высокая экспрессия Морталина статистически значимо коррелирует с плохой выживаемостью пациентов с глиобластомой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Каспаз-независимый путь апоптоза состоит из двух стадий. Сначала AIF диссоциирует от митохондриальной мембраны, а затем цитоплазматический AIF импортируется в ядро клетки и активирует расщепление ДНК. Интересно, что вторая стадия этого процесса – перемещение AIF в ядро, ингибируется белком Hsp70, который, находясь в цитоплазме, связывается с участком AIF 150–228 а.о. [24]. Нами впервые показано, что во взаимодействии AIF с HMM участвует другой представитель семейства белков теплового шока – Морталин, связывающийся с участком 1–102 а.о. AIF. Таким образом, можно предположить, что белки теплового шока являются важными и на сегодняшний день единственно известными ингибиторами каспаз-независимого пути апоптоза. Белок Морталин может закреплять AIF на HMM и препят-

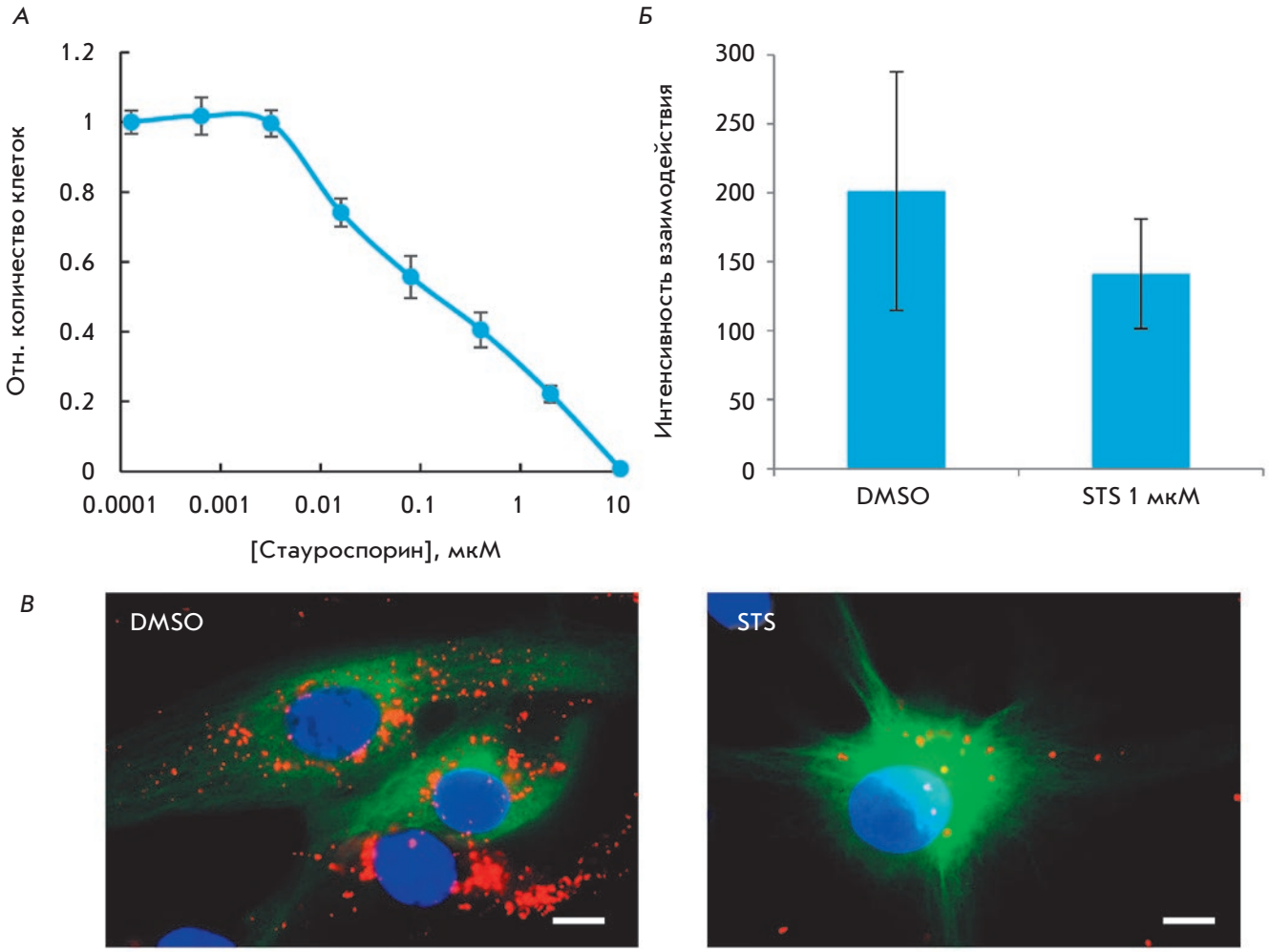


Рис. 4. Взаимодействие Морталина и AIF в фиксированных клетках. *А* – выживаемость клеток U87MG, обработанных различными концентрациями стауроспорина. *Б* – влияние стауроспорина на интенсивность взаимодействия AIF и Морталина, измеренную методом PLA, в клетках линии U87MG ($p < 0.05$). *В* – визуализация взаимодействия белков Морталина и AIF методом PLA после обработки 1 мкМ стауроспорина (STS) или DMSO

ствовать запуску апоптоза, однако если диссоциация AIF от HMM все-таки произошла, то белок Hsp70 ингибирует транслокацию AIF в ядро. Эта гипотеза хорошо согласуется с недавно опубликованными данными о том, что Морталин способен препятствовать апоптозу, закрепляя на внешней поверхности HMM другой важнейший белок, регулирующий ответ клетки на стресс, – HIF1a [21]. В подтверждение наших результатов мы показали, что повышенная экспрессия Морталина коррелирует с агрессивным фенотипом раковых клеток и, как следствие, является плохим прогностическим фактором для пациентов с опухолями головного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению каспаз-независимого пути

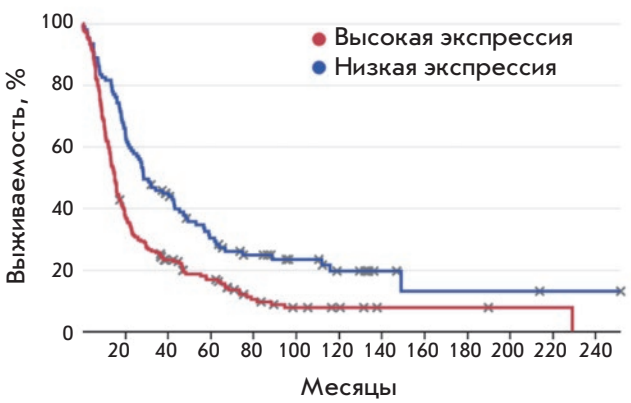


Рис. 5. Кривая Каплан–Майера, показывающая выживаемость двух групп пациентов с глиобластомой, выделенных на основании экспрессии Морталина. Данные получены из базы данных Rembrandt

апоптоза, первая и наиболее важная стадия этого процесса, а именно диссоциация AIF от наружной митохондриальной мембраны, до сих пор остается загадкой. Полученные нами результаты указывают на то, что в связывании AIF с НММ участвует белок Морталин. Для оценки вклада этого взаимодействия в локализацию AIF на НММ требуются дополнительные эксперименты. Однако имеющиеся у нас данные, а также результаты, опубликованные ранее, позволяют предположить, что при действии на клетку ДНК-повреждающих агентов в ядре вырабатывается поли-ADP-рибоза, которая перемещается в цитоплазму, где и связывается с AIF [8, 16]. Это взаимодействие приводит к изменению конформации AIF и утрате им способности связываться с Морталином, закрепляющим AIF на НММ. В результате AIF диссоциирует от НММ, после чего перемещается в ядро и вызывает цепь событий, приводящих к гибели клетки. Однако необходимы дальнейшие исследования, которые позволят подтвердить взаимодействие эндогенных AIF и Морталина и докажут, что специфическое ингибирование связывания этих белков будет приводить к диссоциации AIF от НММ и последующей гибели клетки. ●

Работа поддержана грантами РФФИ № 16-34-60136, 17-29-06056 и 18-29-01027.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reed J.C. // J. Clin. Oncol. 1999. V. 17. P. 2941–2953.
2. Kühtreiber W.M., Hayashi T., Dale E.A., Faustman D.L. // J. Mol. Endocrinol. 2003. V. 31. P. 373–399.
3. Cao G., Xing J., Xiao X., Liou A.K., Gao Y., Yin X.M., Clark R.S., Graham S.H., Chen J. // J. Neurosci. 2007. V. 27. P. 9278–9293.
4. Liu T., Biddle D., Hanks A.N., Brouha B., Yan H., Lee R.M., Leachman S.A., Grossman D. // J. Invest. Dermatol. 2006. V. 126. P. 2247–2256.
5. Mahmud H., Dälken B., Wels W.S. // Mol. Cancer Ther. 2009. V. 8. P. 1526–1535.
6. Galluzzi L., Joza N., Tasdemir E., Maiuri M.C., Hengartner M., Abrams J.M., Tavernarakis N., Penninger J., Madeo F., Kroemer G. // Cell Death Differ. 2008. V. 15. P. 1113–1123.
7. Choudhury S., Bae S., Ke Q., Lee J.Y., Kim J., Kang P.M. // Basic Res. Cardiol. 2011. V. 106. P. 397–407.
8. Wang Y., Kim N.S., Haince J.F., Kang H.C., David K.K., Andrabi S.A., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. // Sci. Signal. 2011. V. 4. № 167. P. ra20.
9. Cho B.B., Toledo-Pereyra L.H. // J. Invest. Surg. 2008. V. 21. P. 141–147.
10. Norberg E., Orrenius S., Zhivotovsky B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 396. P. 95–100.
11. Lorenzo H.K., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G. // Cell Death Differ. 1999. V. 6. P. 516–524.
12. Brown D., Yu B.D., Joza N., Bénit P., Meneses J., Firpo M., Rustin P., Penninger J.M., Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 9918–9923.
13. Baritaud M., Boujrad H., Lorenzo H.K., Krantic S., Susin S.A. // Cell Cycle. 2010. V. 9. P. 3166–3173.
14. Arnoult D., Parone P., Martinou J.C., Antonsson B., Estaquier J., Ameisen J.C. // J. Cell. Biol. 2002. V. 159. P. 923–929.
15. Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. // Science. 2002. V. 297. P. 259–263.
16. Yu S.W., Wang H., Dawson T.M., Dawson V.L. // Neurobiol. Dis. 2003. V. 14. P. 303–317.
17. Parsons D.F., Williams G.R., Chance B. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1966. V. 137. P. 643–666.
18. Wilkinson J.C., Wilkinson A.S., Galbán S., Csomos R.A., Duckett C.S. // Mol. Cell. Biol. 2008. V. 28. P. 237–247.
19. Pavlyukov M.S., Antipova N.V., Balashova M.V., Vinogradova T.V., Kopantzev E.P., Shakhparonov M.I. // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 23296–23307.
20. Yu S.W., Wang Y., Frydenlund D.S., Ottersen O.P., Dawson V.L., Dawson T.M. // ASN Neuro. 2009. V. 1(5). pii:e00021.
21. Mylonis I., Kourti M., Samiotaki M., Panayotou G., Simos G. // J. Cell. Sci. 2017. V. 130. P. 466–479.
22. Londono C., Osorio C., Gama V., Alzate O. // Biomolecules. 2012. V. 2. P. 1431–1464.
23. Maszczak-Seneczko D., Sosicka P., Olczak T., Olczak M. // Methods Mol. Biol. 2016. V. 1496. P. 133–143.
24. Gurbuxani S., Schmitt E., Cande C., Parcellier A., Hammann A., Daugas E., Kouranti I., Spahr C., Pance A., Kroemer G., et al. // Oncogene. 2003. V. 22. P. 6669–6678.