

РОЛЬ УКОРОЧЕННОЙ ФОРМЫ БЕЛКА ARF, ПРОДУКТА ГЕНА INK4A/ARF, В АКТИВАЦИИ СЕЛЕКТИВНОЙ АУТОФАГИИ МИТОХОНДРИЙ — МИТОФАГИИ

THE ROLE OF THE SHORT FORM OF THE ARF PROTEIN, A PRODUCT OF THE INK4A/ARF GENE, IN ACTIVATION OF SELECTIVE MITOCHONDRIAL AUTOPHAGY — MITOPHAGY

A. Soloviev
A. Budina
T. Anaschenkova

Summary. The article presents data on determining the role of the shortened form of the tumor suppressor ARF (smARF) in the activation of mitophagy. Using osteosarcoma cell line, we showed that ARF overexpression leads to mitochondrial degradation and autophagy activation, in which damaged mitochondria are delivered to autophagosomes for degradation by the process called mitophagy.

Keywords: autophagy, mitophagy, mitochondria, tumor suppressor, ARF.

Соловьев Александр Семенович

Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»
Aleksolo46@yandex.ru

Будина Анна Павловна

К.м.н., стажер-исследователь, Институт Вистар, Филадельфия, США

Анащенко Татьяна Александровна

К.м.н., доцент, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»

Аннотация. В статье представлены данные по определению роли укороченной формы опухолевого супрессора ARF (smARF) в активации митофагии. В экспериментах на клетках остеосаркомы человека показано, что повышение экспрессии smARF приводит к деградации митохондрий и активации аутофагии, при которой поврежденные митохондрии доставляются в аутофагосомы и элиминируются в процессе митофагии.

Ключевые слова: аутофагия, митофагия, митохондрии, опухолевый супрессор, ARF.

Актуальность проблемы

Аутофагия — генетически запрограммированный, эволюционно сохраненный катаболический процесс, который разрушает собственные клеточные белки и поврежденные или избыточные органеллы. При этом цитоплазматический материал, подлежащий удалению, заключается в двухмембранную везикулу — аутофагосому и доставляется в лизосомы для гидролитической деградации [14, 16]. В настоящее время признается существование двух типов аутофагии: селективной и неселективной [5]. В ответ на голодание активируется неселективная аутофагия, обеспечивающая клетки необходимыми питательными веществами для их выживания [16]. Селективная аутофагия направлена на удаление поврежденных органелл или белковых агрегатов даже в условиях, богатых питательными веществами [5]. Выделяют селективную аутофагию пероксисом («пексофагия»), рибосом («рибофагия»), митохондрий («митофагия») и другие. Важнейшей формой селективной аутофагии является митофагия. Митофагия играет определяющую роль в контроле качества митохондрий путем распознавания поврежденных органелл и их избирательного удаления [1, 19]. Помимо своей

основной функции по выявлению и избирательному удалению поврежденных митохондрий, митофагия может влиять на различные физиологические процессы (иммунный ответ, дифференцировку клеток, рост и др. [13, 18]. Дерегуляция митофагии приводит к различным патофизиологическим изменениям и развитию заболеваний, включая нейродегенеративные заболевания, иммунные расстройства, злокачественные новообразования [13, 16]. Исследования по изучению митофагии показывают, что потеря функции регуляторов митофагии тесно связана с развитием и прогрессированием рака [3, 4, 8].

В последние годы активно изучается участие опухолевых супрессоров в регуляции селективной и неселективной аутофагии [2, 15]. Это касается и опухолевого супрессора ARF — белкового продукта гена INK4a/ARF [10]. Последовательность мРНК ARF содержит один дополнительный метионин, который может функционировать в качестве внутреннего сайта инициации трансляции. Поэтому мРНК ARF кодирует два различных белка: ядрышковую полноразмерную форму ARF дикого типа (wt ARF) и укороченную митохондриальную изоформу — smARF [7, 12]. Учитывая важную роль опухолевого

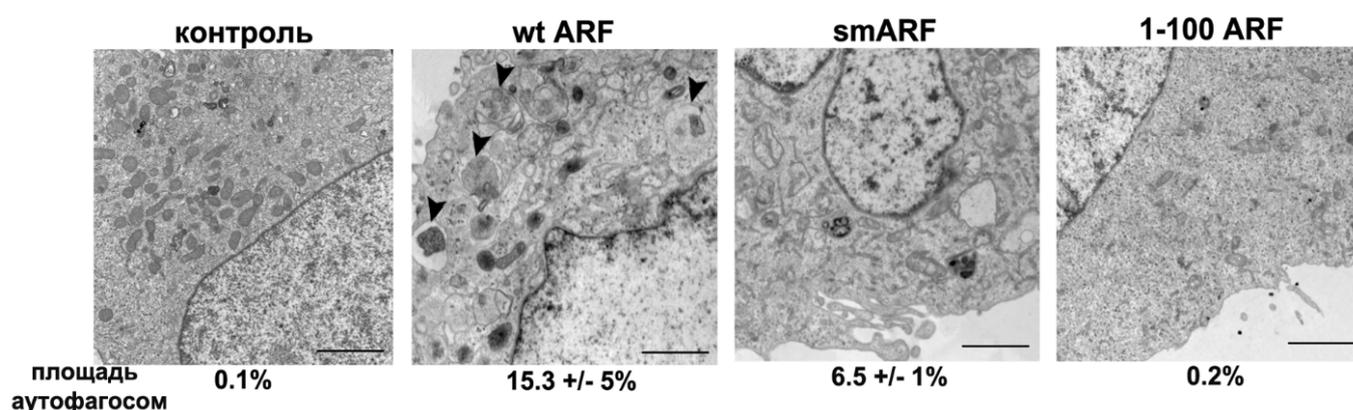


Рис. 1. Электронная микроскопия клеток U2OS-ARF до и после индукции в них ARF дикого типа (wt ARF) и smARF. Стрелками указаны аутофагосомы.

супрессора ARF в канцерогенезе [6] и митохондриальную локализацию smARF [18], важным направлением является исследование роли smARF в индукции митофагии и последующей элиминации опухолевых клеток.

Цель исследования

Целью исследования являлось определение роли укороченной формы опухолевого супрессора ARF (smARF) в активации селективной аутофагии митохондрий (митофагии).

Материал и методы

Объектом исследования служили клетки остеосаркомы человека U2OS с внедренным в них вектором pcDNA 4/TO-ARF. Экспрессия ARF в данной клеточной линии контролировалась присутствием в среде доксициклина. Культивирование клеток в присутствии 100 нг/мл доксициклина приводит к увеличению продукции ARF до уровня, сравнимого с количеством ARF в некоторых опухолях, что облегчает его исследование [10]. Локализация ARF в митохондриях подтверждалась выделением митохондриальной фракции (Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, PIERCE, США) и последующим анализом ее методом Вестерн блоттинга с использованием антител к ARF (Abcam, США), GRP75 и PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, США). Изменение трансмембранного электрохимического потенциала митохондрий ($\Delta\psi$) определяли методом проточной цитометрии с использованием красителя JC-1. Встраиваясь в митохондрии, краситель JC-1 способен изменять свои спектральные характеристики в зависимости от величины $\Delta\psi$. Регистрация подобных изменений в клетках саркомы до и после индукции smARF осуществлялась на проточном фотометре. В качестве положительного контроля деполаризации

митохондрий использовали разобщитель окислительного фосфорилирования CCCP (Карбонил цианид м-хлорфенил гидразон) (Abcam, США) в концентрации 10 мкм, вызывающий исчезновение $\Delta\psi$. Способность ARF индуцировать аутофагию/митофагию определяли методом иммуноблоттинга с использованием антител к белкам — маркерам аутофагии LC3 и его модифицированной формы (LC3-II), p62 [9, 17] и белку митохондрий NIX [4]. Активацию аутофагии определяли также методом иммуноцитофлуоресцентного анализа. С этой целью клетки остеосаркомы U2OS-ARF трансфецировали плазмидой GFP-LC3, кодирующей зеленый флуоресцентный белок GFP (Green Fluorescent Protein), слитый с белком аутофагосом LC3. При активации аутофагии белок LC3 накапливается в аутофагосомах, что приводит к накоплению GFP в аутофагосомах. Формирование аутофагосом анализировали с помощью конфокальной микроскопии, используя микроскоп Nikon E600. Кроме того, для регистрации митофагии использован маркер митохондрий митотракер красный (MitoTracker Red CMXRos, Invitrogen, США). Методом иммуноцитофлуоресцентного анализа определялась масса митохондрий с использованием клеток остеосаркомы, содержащих митохондриальный маркер DsRed (Clontech, США), с последующей оценкой количества митохондрий с помощью программы ImageJ. Полученные препараты при иммуноцитофлуоресцентном методе анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Существование комплекса ARF-NIX подтверждалось методом иммунопреципитации с последующей детекцией преципитированных белков методом иммуноблоттинга. Электронно-микроскопическое исследование клеток U2OS-smARF проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Статистическую достоверность различий оценивали путем расчета t критерия Стьюдента в программе SigmaProt V.10. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

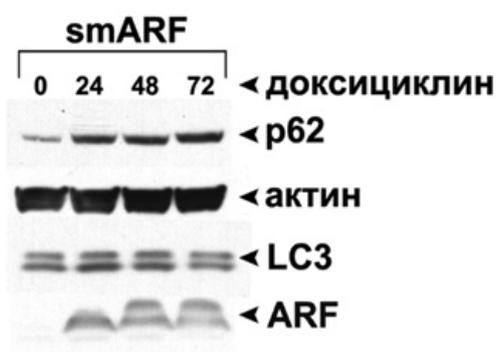


Рис. 2. Уровень маркеров аутофагии белков LC3 и p62 в клетках остеосаркомы вследствие индукции smARF.

клеточная линия U2OS-smARF

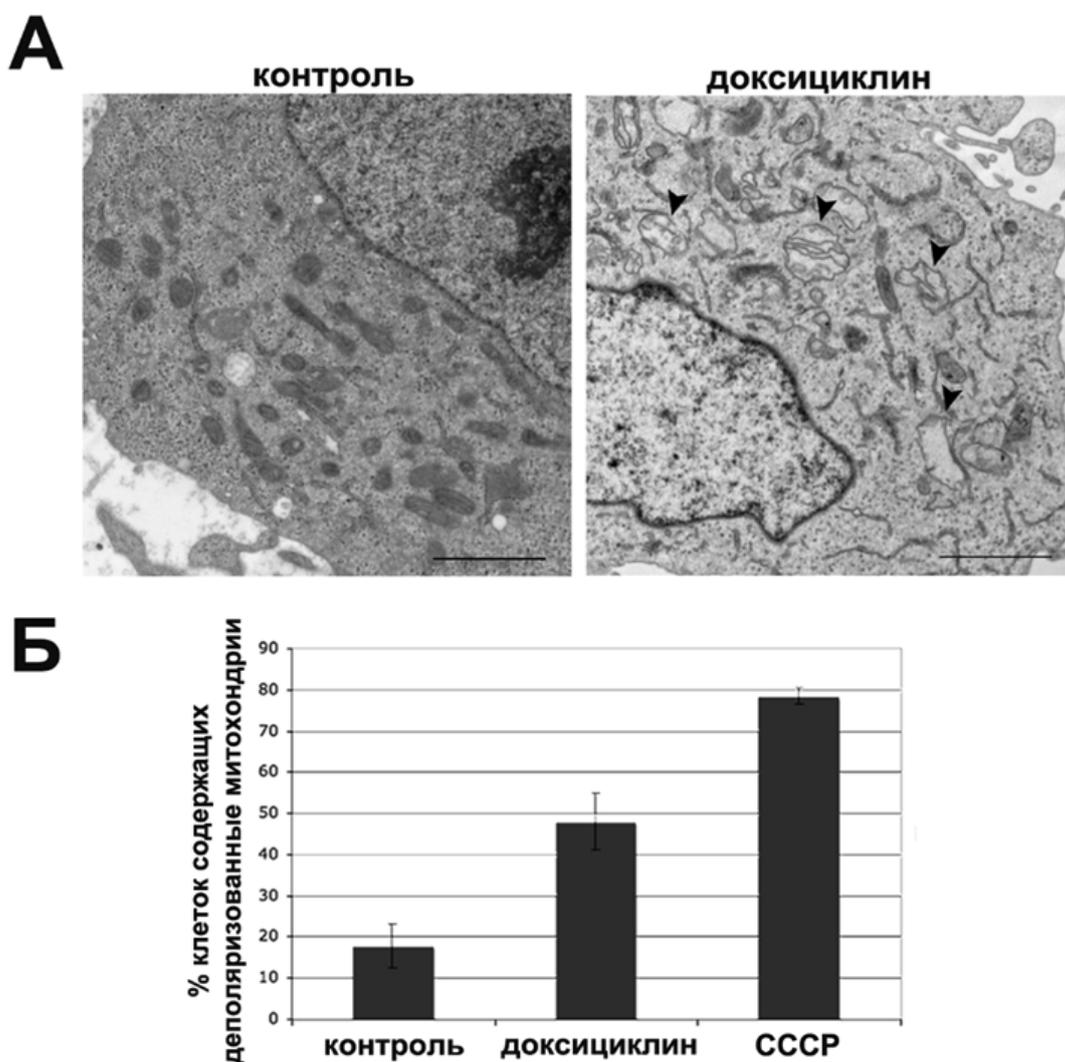


Рис. 3. Деполяризация и «набухание» митохондрий при активации smARF в клетках остеосаркомы. Стрелками указаны морфологически измененные митохондрии.

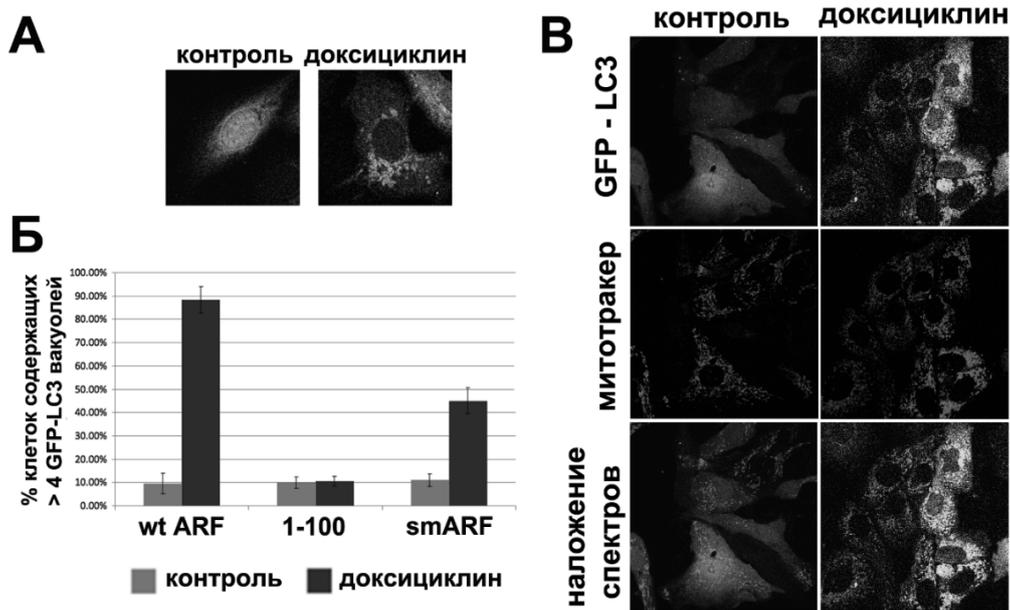


Рис. 4. Накопление и колокализация GFP-LC3-позитивных аутофагосом с маркером митохондрий митотракером красным в клетках U2OS-smARF.

Результаты исследования

В литературе имеются указания на способность smARF, подобно полноразмерному белку ARF, активировать неселективную аутофагию. [11]. Мы экспериментально проверили такую способность smARF. Данные электронной микроскопии выявили, что smARF обладает меньшей способностью по сравнению с полноразмерной формой стимулировать накопление аутофагосом в клетках остеосаркомы (рис. 1).

Индукция smARF в этих клетках даже в течение 72 часов не приводила к накоплению LC3-II и деградации белка p62, характерным для активации неселективной аутофагии (рис. 2). Эти эксперименты подтвердили, что smARF не способен активировать неселективную аутофагию.

Предполагая, что smARF может запускать селективную аутофагию митохондрий, мы провели ряд экспериментов по изучению влияния индукции smARF в митохондриях на активацию митофагии. При этом исследовалось состояние митохондрий при суперэкспрессии smARF доксициклином в клетках остеосаркомы U2OS-smARF. Для оценки влияния smARF на функциональное состояние митохондрий измерялся мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\psi$) до и после экспрессии smARF в течение 48 часов. В качестве положительного контроля деполяризации митохондрий использовали CCCP. Анализ показал, что индукция smARF вызывает

статистически значимую деполяризацию митохондрий (рис. 3 — Б), что, по мнению исследователей, может приводить к индукции митофагии [7]. Электронно-микроскопическое исследование клеток U2OS-smARF выявило изменение формы митохондрий («набухание») в клетках после активации smARF (рис. 3 — А). Изменение величины, формы и внутренней структуры митохондрий является одним из проявлений их деградации, что может индуцировать митофагию [16].

Для подтверждения индукции митофагии вследствие экспрессии smARF мы исследовали накопление аутофагосом в клетках U2OS-smARF. Клетки трансфицировали вектором GFP-LC3, содержащим белок аутофагосом LC3 с зеленой меткой GFP. Конфокальная микроскопия выявила, что активация smARF повышала количество клеток, содержащих более четырех GFP-положительных аутофагосом, что свидетельствует о стимуляции митофагии (рис. 4-А, Б). Индукция wt ARF применялась в качестве положительного, а ARFc делецией (1–100 ARF) в качестве негативного контроля образования аутофагосом в данном эксперименте.

Так как активация деградации митохондрий сопровождается образованием аутофагосом, в которые доставляются поврежденные митохондрии, одним из методов изучения митофагии является исследование колокализации аутофагосом с митохондриями при окрашивании их разными флюорохромами методом конфокальной микроскопии. Следуя данной методике, клетки остеосаркомы U2OS-smARF трансфицировали вектором GFP-

клеточная линия U2OS-smARF

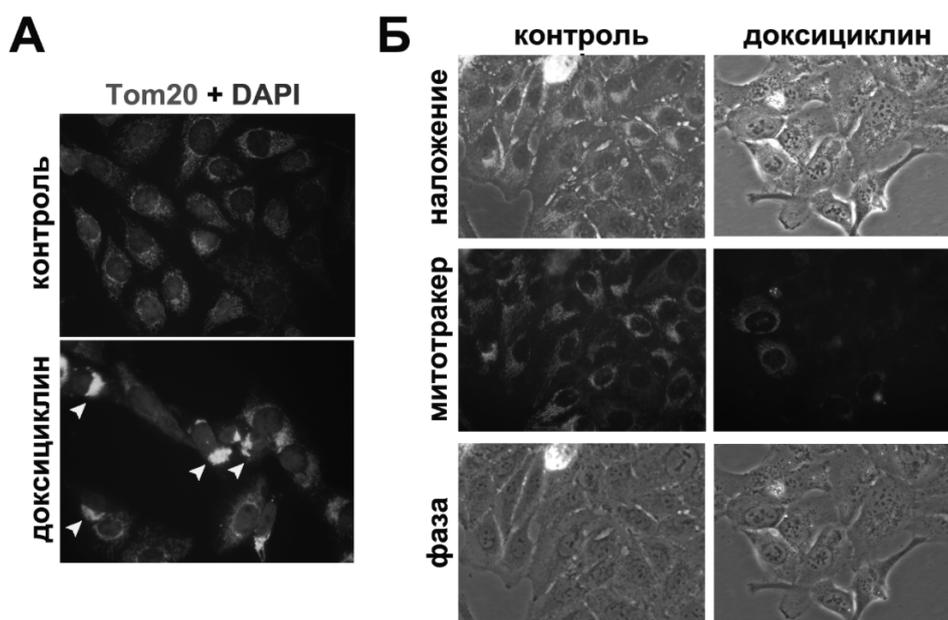


Рис. 5. Индукция smARF вызывает кластеризацию митохондрий в перинуклеарном пространстве и снижает их общую массу в клетке.

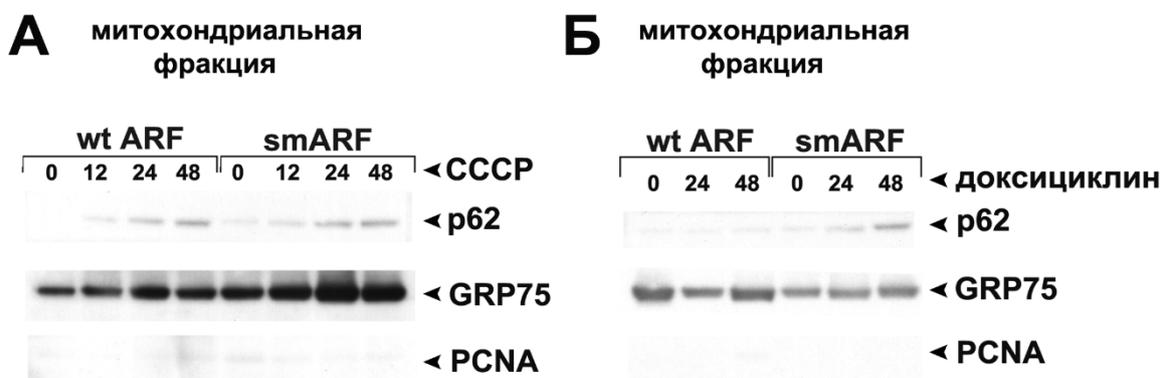


Рис. 6. Количественный анализ адаптора аутофагии белка p62 методом иммуноблоттинга.

LC3 и окрашивали митохондрии красителем митотракером красным. Индукция smARF вызвала окрашивание митохондрий в желтый цвет вследствие совпадения интенсивности этих двух флуоресценций (рис. 4-B). Это означает, что митохондрии локализованы в тех же субклеточных компартментах как и зеленый белок аутофагосом и свидетельствует об активации митофагии.

Признаком митофагии является также снижение общей массы митохондрий и фрагментация

их с формированием кластеров вокруг ядра. Нами проведена конфокальная микроскопия клеток остеосаркомы с суперэкспрессией smARF после окрашивания белка митохондрий Tom20 флуорохромом FITC и ядер красителем DAPI. Образование кластеров митохондрий в околоядерном пространстве клеток с повышенной экспрессией smARF наблюдалось у большинства клеток (рис. 5-A). Исследование динамики уменьшения массы митохондрий, являющаяся признаком деградации митохондрий, про-

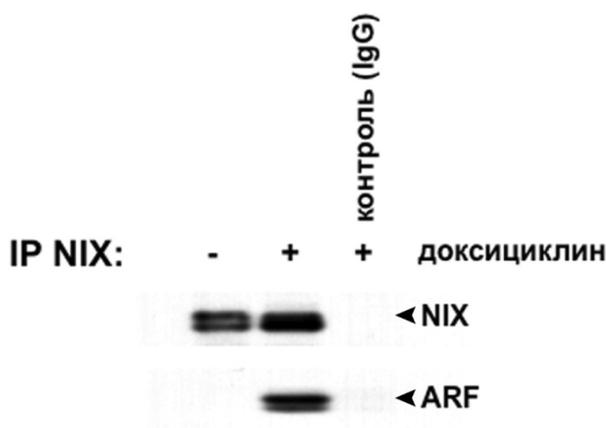


Рис. 7. Реакция коиммунопреципитации белка NIX с белком smARF до и после инкубации клеток остеосаркомы с доксициклином.

водили с использованием красителя митотракера зеленого (от англ. MitoTracker Green). Конфокальная микроскопия показала, что активация smARF в течение 48 часов существенно снизила зеленую флуоресценцию, ассоциированную с митохондриями, что свидетельствует о снижении общей массы митохондрий (рис. 5-Б).

Показано, что поврежденные митохондрии распознаются белком-адаптором аутофагии p62 и направляются в аутофагосомы для деградации [18]. Нами был проведен количественный анализ белка p62 в изолированных митохондриях клеток остеосаркомы, инкубированных с доксициклином для индукции wt ARF или smARF, а также с активатором митофагии — CCCP в качестве положительного контроля к данному эксперименту. Инкубация клеток с CCCP вызывала накопление p62 на деполаризованных митохондриях обеих клеточных линий (рис. 6 — А). Однако только активация smARF доксициклином приводила к аккумуляции p62 на поврежденных митохондриях (рис. 6 — Б), что свидетельствует о повреждении митохондрий и индукции митофагии.

Одним из известных медиаторов митофагии является белок митохондрий NIX, способный направлять разобщенные митохондрии в аутофагосомы для деградации [4]. Если активированный smARF взаимодействует с белком NIX в митохондриях, это опосредует процесс митофагии, вызванный индукцией smARF.

Для подтверждения этого предположения была проведена реакция иммунопреципитации белка NIX с белком smARF в клетках U2OS-smARF, инкубированных с доксициклином для повышения экспрессии smARF. Эксперименты показали, что smARF действительно образует комплекс с белком NIX (рис. 7).

Заключение

На основании проведенных экспериментов можно констатировать, что укороченная митохондриальная форма ARF (smARF) активирует селективную деградацию митохондрий — митофагию. Одним из возможных механизмов активации smARF — опосредованной митофагии может быть взаимодействие smARF с белком — регулятором митофагии NIX.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ashafi G., Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria // *Cell death and differentiation*. — 2013. — № 20. — P. 31–42.
2. Balaburski G.M., Hontz R. D., Murphy M. E. p53 and ARF: unexpected players in autophagy // *Trends Cell Biol.* — 2010. — № 20 (6). — P. 363–369.
3. Bernardini JP, Lazarou M., Dewson G. Parkin and mitophagy in cancer // *Oncogene*. — 2017. — № 36. — P. 1315–1327.
4. Chourasia A.H., Boland M. L., Macleod K. F. Mitophagy and cancer // *Cancer and metabolism*. — 2015. — № 3 (4).
5. Ding Wen-Xing, Yin Xiao-Ming Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis // *Biol Chem.* — 2012. — № 393 (7). — P. 547–564.
6. Fontana R., Vivo M. Dynamics of p14 ARF and focal adhesion kinase-mediated autophagy in cancer // *Cancers*. 2018. № 10. P. 221.
7. Grenier K., Kontogianna M., Fon EA. Short mitochondrial ARF triggers Parkin/Pink1-dependent mitophagy // *J Biol Chem.* — 2014. — № 289 (43). — P.29519–30.
8. Kulikov A.V., Luchkina E. A., Gogvadze V., et al. Mitophagy: Link to cancer development and therapy // *Biochemical and biophysical research communications*. — 2017. — № 482. — P. 432–439.
9. Moscat J., Karin M., Diaz-Meco M.T. P62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy // *Cell*. — 2016. — № 167 (3). — P. 606–609.

10. Pimkina J., Humbey O., Zilfou J. T., et al. ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-xl // *Journal of biological chemistry*. — 2009. — № 5 (284). — P. 2803–2810.
11. Ravinkumar B., Moreau K., Jahreiss L. et al. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures // *Nat Cell Biol* — 2010. — Vol. 12(8). — P. 747–757.
12. Reef S., Kimchi A. Nucleolar p19ARF unlike mitochondrial smARF is incapable of inducing p53-independent autophagy // *Autophagy* — 2008. — № 4 (7). — P. 866–869.
13. Um J.H., Yun J. Emerging role of mitophagy in human diseases and physiology // *BMB Rep.* — 2017. — № 50 (6). — P. 299–307.
14. White E. Autophagy and p53 // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. — 2016. — № 6 (4).
15. White E. The role of autophagy in cancer // *J Clin Invest*. — 2015. — № 125 (1). — P. 42–46.
16. Youle R. J. Mechanisms of mitophagy // *Nat Rev Mol Cell Biol*. — 2011. — № 12 (1). — P. 9–14.
17. Zhang H.M., Li S. P., Yu Y., et al. Bi-directional roles of IRF-1 on autophagy diminish its prognostic value as compared with Ki67 in liver transplantation for hepatocellular carcinoma // *Oncotarget*. — 2016. — № 7 (25). — P. 37979–37992.
18. Zhang Q., Kuang H., Chen C., et al. Jnk2 promotes stress-induced mitophagy and suppresses inflammasome activation by targeting smARF for degradation // *Nat Immunol*. — 2015. — № 16 (5). — P. 458–466.
19. Zhu J., Wang K. ZQ, Chu C. Mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival // *Autophagy*. — 2013. — № 9 (11). — P. 1663–1676.

© Соловьев Александр Семенович (Aleksolo46@yandex.ru), Будина Анна Павловна, Анащенко Татьяна Александровна.
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Смоленск