

УЧАСТИЕ ТРАНСЛОКАТОРНОГО БЕЛКА В ИНДУКЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ ОТКРЫТИЯ ПОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6

© 2022 г. Ю. Л. Бабурина¹, Л. Д. Сотникова¹, О. В. Крестинина¹, *

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московской обл., 142290, Россия

*E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2022 г.

После доработки 02.08.2022 г.

Принята к публикации 08.08.2022 г.

Транслокационный белок (TSPO), ранее называвшийся бензодиазепиновым рецептором периферического типа (peripheral-type benzodiazepine receptor, PBR) представляет собой белок с молекулярной массой 18 кДа, локализованный во внешней митохондриальной мембране и участвующий в клеточной пролиферации и апоптозе. В настоящей работе мы обнаружили TSPO в виде мономера и димера в клетках глиомы крысы С6. Мы показали, что сниженный уровень экспрессии TSPO в клетках влияет на индукцию поры неспецифической митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition pore, мПТР). Снижение экспрессии TSPO стимулировало Ca^{2+} -индуцированное открытие мПТР. Природный эндогенный лиганд TSPO протопорфирин IX (PPIX) ускорял открытие мПТР. Стимулирующий эффект PPIX был сильнее в митохондриях клеток глиомы С6 дикого типа, чем в клетках глиомы С6 с нокдауном по TSPO. Фосфорилирование мембранных рецепторов, ионных каналов и транскрипционных факторов – важное событие внутриклеточной передачи сигналов, ответственное за регуляцию различных ферментов и многих клеточных функций. В настоящем исследовании PPIX модулировал белковое фосфорилирование. Мы предположили, что TSPO является важным белком в регуляции клеточного выживания и может участвовать в функционировании мПТР.

Ключевые слова: митохондрии, клетки глиомы С6, окислительный стресс, митохондриальная пора неспецифической проницаемости, протопорфирин IX (PPIX), транслокационный белок (TSPO)

DOI: 10.31857/S0041377122060025

Митохондрии считаются важной органеллой в клетке. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий является важнейшей предпосылкой нормальной клеточной функции, поскольку митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене, а также в поддержании окислительно-восстановительного состояния клеток и регуляции апоптоза (Nunnari, Suomalainen, 2012). Окислительный стресс считается одним из факторов риска развития митохондриальной дисфункции, что приводит к различным патологическим состояниям в организме (Kowalczyk, et al., 2021). Известно, что регулятором клеточной гибели считается открытие неспецифической поры в митохондриях (mitochondrial permeability transition pore, мПТР) (Crompton, Costi, 1990).

Окислительный стресс и пороговая концентрация Ca^{2+} рассматриваются как индукторы мПТР (Takeyama et al., 1993). Функционирование мПТР приводит к изменению проницаемости митохондриальной внутренней мембраны, сопровождающемуся падением митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), деполяризацией мембраны, повреждением внешней митохондриальной мембраны и, в конечном итоге, к клеточной смерти (Javadov, Karmazyn, 2007). Точная структура мПТР до сих пор не определена, однако считается, что регуляторами мПТР являются транслоказа адениновых нуклеотидов (ANT), потенциал-зависимый анионный канал (VDAC), TSPO, циклофилин Д и другие факторы.

TSPO, ранее известный как бензодиазепиновый рецептор периферического типа (peripheral-type benzodiazepine receptor, PBR) (Papadopoulos et al., 2006) распространен в сердце, мозге, надпочечниках, почках, слюнных железах, тромбоцитах, коже и печени (Gavish et al., 1999). Было показано, что лиганды TSPO модулируют митохондриальный и цитозольный Ca^{2+} (Campanella et al., 2008, Крестинина и др.,

Принятые сокращения. АФК – активные формы кислорода; МГ – митохондрии, изолированные из клеток глиомы С6; мПТР – пора неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore); ANT – транслоказа адениновых нуклеотидов (adenine nucleotide translocase); PPIX – протопорфирин IX; TPP – тетрафенилфосфоний; TSPO – транслокационный белок; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал.

2009), а сам TSPO может ослаблять клеточную митофагию (Gatliff et al., 2014).

К известным лигандам TSPO относятся природные, такие как протопорфирин IX (PPIX), diazepam-связывающий ингибитор (diazepam binding inhibitor) и синтетические, такие как PK11195 и Ro 5-4864. PPIX вырабатывается в клетках через синтез гема из субстрата аминолевулиновой кислоты и может использоваться для обнаружения опухолей и фотодинамической терапии. В фотодинамической терапии используется свойство PPIX инициировать образование АФК в раковых клетках при возбуждении видимым светом, что приводит к их гибели (Yoshioka et al., 2018).

Одной из посттрансляционных модификаций и важной регуляторной системой передачи сигнала является белковое фосфорилирование (дефосфорилирование), которое регулирует многие стороны клеточных функций. Эта регуляция может сильно влиять на свойства ферментативной активности белков, их структуру, субклеточную локализацию и стабильность (Lim et al., 2016). Последние несколько десятилетий митохондрии все чаще рассматриваются как центр передачи клеточных сигналов; сообщалось, что многие киназы и фосфатазы, благодаря которым осуществляется фосфорилирование (дефосфорилирование) белков, локализуются в митохондриях и играют важные функции (Lim et al., 2016). Кроме того, изменение путей фосфорилирования может привести к серьезным заболеваниям, в частности, к онкологическим. Многие сигнальные пути, включая тирозинкиназу, MAP-киназу, комплекс кадгерин–катенин, циклин-зависимую киназу и т.д., являются основными участниками циклических клеточных процессов и было показано, что нарушение регуляции фосфорилирования (дефосфорилирования) в их каскадах ассоциируется с различными типами рака (Singh et al., 2017).

В настоящей работе мы исследовали роль TSPO в транспорте Ca^{2+} при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР в митохондриях, выделенных из клеток глиомы С6, с использованием PPIX – природного высокоаффинного лиганда TSPO. Мы сравнили параметры открытия мРТР и изменение степени фосфорилирования белков в митохондриях, выделенных из клеток глиомы С6 (МГ) дикого типа и в митохондриях, выделенных из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO. Поскольку экспрессия TSPO повышена в клетках глиом, для исследования была выбрана клеточная линия глиомы С6.

Изучение участия TSPO в индукции и регуляции открытия поры неспецифической проницаемости в митохондриях представляет огромную важность как для фундаментального понимания функционирования мРТР и апоптоза, так и в прикладном плане, т. к. лиганды TSPO являются лекарственными препаратами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение митохондрий из клеточной линии глиомы С6. Клеточные линии глиомы С6 (дикого типа и с нокдауном по TSPO) подарены д-ром М. Gavish (Технион, Израиль). Митохондрии изолировали из клеток глиомы С6 дикого типа (МГ дикого типа) и из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO (МГ с нокдауном). Выделение митохондрий из клеток проводили при 4°C по опубликованной методике (Leissring et al., 2004). Монослои клеток глиомы С6 соскребали скребком, промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), осаждали при 500 g в течение 3 мин. Осадок растворяли в буфере, содержащем 0.32 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 0.02% бычьего сыровороточного альбумина (фракция V), 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4). Клеточные мембраны разрушали при помощи механического гомогенизатора Dounce (Великобритания) (40 пасов при 10000 об./мин) и осаждали при 500 g в течение 5 мин. Осадок повторно суспендировали в том же ледяном буфере и разрушали с помощью гомогенизатора Dounce. Супернатанты после двух центрифугирований осаждали при 3000 g в течение 4 мин для удаления неразрушенных клеток и ядер. Полученный супернатант центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий суспендировали в ледяной среде, содержащей 0.32 М сахарозы и 10 мМ трис-НСl (рН 7.4), и центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Выделенные митохондрии ресуспендировали в том же растворе. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (Bio-Rad Protein assay; Bio-Rad, Германия).

Оценка митохондриальных функций. Все параметры измеряли, как описано ранее (Azarashvili et al., 2007). Митохондрии (1 мг/мл) инкубировали в мультифункциональной ячейке со встроенными селективными электродами (тетрафенилфосфониевым (TPP^+), Ca^{2+} -селективным и кислородным Clark-типе O_2) в 1 мл в среды, содержащей 125 мМ КCl, 10 мМ Трис-НСl, 0.4 мМ K_2HPO_4 , 5 мМ сукцината калия и 5 мкМ ротенона, рН 7 при 25°C. Скорость потребления кислорода измеряли с помощью O_2 -электрода (Clark-типе, Россия), рассчитывали в нг-атомах O за 1 мин на 1 мг белка и измеряли в закрытой ячейке. Митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\psi$) оценивали, измеряя распределение TPP^+ между митохондриальным матриксом и инкубационной средой с помощью TPP^+ -селективного электрода (Нико Аналит, Россия). Ca^{2+} -индуцированную диссипацию мембранного потенциала выражали в виде скорости входа TPP^+ после первой и второй добавок Ca^{2+} (TPP^+ , нмоль за 1 мин на 1 мг белка). Транспорт Ca^{2+} ($V^{\text{Ca}^{2+}}$) измеряли с помощью Ca^{2+} -чувствительного электрода (Нико Аналит, Россия) и оценивали, как скорость входа Ca^{2+} после первой и второй добавок и рассчитывали, как коли-

чество нмоль $\text{Ca}_{\text{in}}^{2+}$ за 1 мин на 1 мг белка. Изменение потоков TPP^+ и Ca^{2+} измеряли в открытой ячейке.

Электрофорез и Вестерн-блот-анализ. Аликвоту клеточного и митохондриального белка (15 мкг) солибилизовали в буфере Лэммли, кипятили в течение 3 мин. Для иммуноблотинга полученные лизаты разделяли в денатурирующих условиях (12.5% SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм). Поликлональные антитела к TSPO получены от Abcam (Cambridge, Великобритания). Активность пероксидазы определяли с помощью хемилюминесцентных реагентов ECL (Pierce, Rockford, IL США). Количественную оценку плотности полос иммуноблотов проводили с использованием денситометра (GS-100 Calibrated Densitometer Bio-Rad, США) и рассчитывали с помощью программного обеспечения Gell Pro Software (Bio-Rad США).

Оценка фосфорилирования белков. Для оценки степени фосфорилирования белков аликвоты митохондриальной суспензии (15 мкг белка) добавляли олигомицин (1.5 мкМ) для предотвращения гидролиза АТФ. Затем в образец добавляли смесь меченой $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ и немеченый Mg^{2+} -АТФ для достижения конечных концентраций 2 мМ Mg^{2+} , 400 мкМ АТФ и 185000 Бк $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$. Образцы митохондрий инкубировали 3 мин при комнатной температуре, реакцию останавливали добавлением буфера Лэммли, далее образцы нагревали на кипящей водяной бане в течение 3 мин (Azarashvili et al., 2003). Солюбилизированные митохондрии, содержащие 15 мкг белка, разделяли методом электрофореза в денатурирующих условиях (15% SDS-PAGE). Радиоактивные полосы в полиакриламидных гелях визуализировали путем экспонирования на пленке Kodak X-Omat AR-5 при -80°C . Через 1 сут пленку проявляли с помощью проявителя и закрепителя. Для оценки уровня фосфорилирования белка пленки сканировали с помощью денситометра (Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Значения измеренных параметров выражали средними значениями и их среднестатистическими отклонениями из 3–4 экспериментов. Достоверности различий оценивали с использованием тестов t -критерия Стьюдента при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сначала мы проверили содержание TSPO в клеточных и митохондриальных лизатах, приготовленных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по TSPO. На рис. 1а показано распределение TSPO в клеточных лизатах. В контрольных клеточных лизатах (клетки глиомы С6 дикого типа) антитела к TSPO распознавали интенсивно окрашенные белки с молекулярной массой 36 кДа и 18 кДа, которые соответствуют димерной и мономерной формам. В клетках глиомы С6 со сниженной экспрессией TSPO полосы мономера и димера имели одинаковую интенсивность. На рис. 1а' показаны усредненные

количественные значения уровней TSPO в клетках глиомы С6. Оказалось, что мономерная форма TSPO (18 кДа) в клетках глиомы С6 с нокдауном по TSPO снижалась на 40% по сравнению с контрольными клетками (дикого типа) глиомы С6. Снижение уровня белка с молекулярной массой 36 кДа почти в 2.5 раза обнаруживалось в клетках глиомы С6 со сниженной экспрессией TSPO.

На рис. 1б показано изменение уровня TSPO в митохондриях, изолированных из исследуемых клеток глиомы С6, а ниже (рис. 1б') представлен количественный анализ содержания TSPO в изолированных митохондриях. На рисунке видно, что в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа присутствует и мономерная, и димерная формы белка (18 и 36 кДа), в то время как в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO белковые полосы не обнаружены.

Ранее было показано существование TSPO с мол. массой 36 кДа, способного связывать меченный радиоактивным изотопом PK14105 ([N-methyl-N-(1-methyl-propyl)-1(2-fluoro-5-nitrophenyl)isoquinoline-3-carboxamide]) в экстрактах митохондрий клеток CHO (Riond et al., 1989). Олигомеры TSPO также были обнаружены и другими авторами (Delavoie et al., 2003). В клетках Jurkat и лимфоцитах был обнаружен белок с мол. массой 36 кДа, что свидетельствует о наличии в этих клетках димера TSPO (Costa et al., 2006). Димерные и олигомерные формы могут образовываться в ответ на окислительный стресс в присутствии АФК. Сообщали, что, вероятно, из-за высокого уровня эндогенных свободных радикалов клетки агрессивного рака молочной железы человека содержат в основном димерную форму TSPO (Hardwick et al., 1999). Позже было сделано предположение, что АФК-индуцированное перекрестное связывание TSPO включает образование дитиозина, и TSPO может быть мишенью для АФК (Delavoie et al., 2003). В настоящем исследовании мономер и димер TSPO были обнаружены в клетках глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по TSPO, но содержание TSPO в клетках с нокдауном было ниже. Можно предположить, что TSPO принимает участие в развитии опухоли.

Далее мы исследовали функциональное состояние митохондрий, изолированных из клеток обоих типов, измеряя скорость потребления кислорода в изолированных митохондриях в присутствии сукцината в качестве дыхательного субстрата. На рис. 2а показаны кривые дыхательной активности в состояниях 2, 3 и 4. Рис. 2б отражает количественные характеристики скорости дыхания. На рисунке видно, что скорости потребления O_2 (V_2 -субстрат-зависимое дыхание не отличались в митохондриях, изолированных из клеток обоих типов, тогда как скорость потребления кислорода митохондриями в фосфорилирующем состоянии (V_3) снижалась в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 с нокдау-

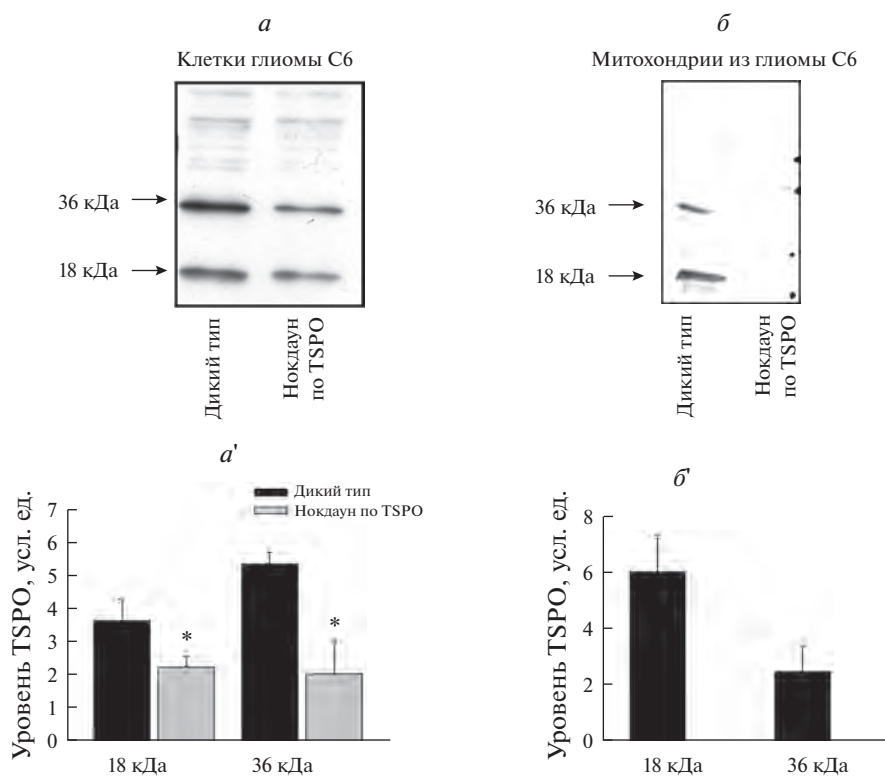


Рис. 1. Уровень TSPO в клеточных (*а, а'*) и митохондриальных (*б, б'*) лизатах клеток глиомы С6 (МГ) дикого типа и с нокдауном по TSPO. *а, б* – Иммуноблоты TSPO; *а', б'* – результаты денситометрии белковых полос, показанных соответственно на *а* и *б*. * Различия с соответствующим контролем достоверны при $P < 0.05$.

ном по TSPO на 30% по сравнению со значением V_3 в митохондриях клеток глиомы С6 дикого типа. Скорости потребления кислорода в состоянии 4, т.е. в восстановленном состоянии после истощения избытка АДФ (V_4) в митохондриях значимо не отличались. Дыхательный контроль (ДК) митохондрий, изолированных из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO, снижался на 15% по сравнению с ДК в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и составлял 3.43 и 4.01 соответственно.

В литературе есть данные о том, что в микроглии животных с нокдауном по TSPO наблюдается более низкий синтез АТФ и скорость потребления кислорода, чем в клетках дикого типа, что позволило авторам предположить, что дефицит TSPO может приводить к изменениям метаболической активности микроглии (Banati et al., 2014). Исследование функционального состояния митохондрий, выделенных из обоих типов клеток глиомы С6, показало, что снижение уровня TSPO в клетках глиомы С6 сопровождается подавлением дыхательной способности митохондрий в состоянии 3 и снижением ДК, которое могло происходить из-за нарушения работы переносчиков электронов. Кроме того, снижение TSPO в лизатах и отсутствие белка в митохондриях из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO могло привести к нарушению проницаемости мембраны.

Поэтому следующий этап нашей работы заключался в изучении изменения транспорта Ca^{2+} , пороговой концентрации Ca^{2+} (т.е. концентрации при которой происходит открытие мРТР) и мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6. При этом выясняли влияние снижения экспрессии TSPO в клетках глиомы С6 на функционирование мРТР в митохондриях и действие РРІХ на индукцию мРТР в митохондриях, изолированных из обоих типов клеток глиомы С6.

Ранее мы сообщали, что РРІХ индуцировал открытие мРТР в митохондриях, изолированных из мозга крыс (Krestinina et al., 2018).

На рис. 3а показаны кривые изменения транспорта Ca^{2+} при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР в присутствии 1 мкМ РРІХ в обоих типах клеток. Как видно на рисунке, первое добавление Ca^{2+} (50 нмоль на 1 мг белка) во всех случаях приводило к устойчивому накоплению Ca^{2+} в митохондриях с последующим восстановлением. Однако после 5-ой добавки Ca^{2+} или после 4-ой в присутствии РРІХ к МГ дикого типа происходил выход Ca^{2+} из митохондрий. В МГ с нокдауном выход Ca^{2+} из митохондрий наблюдали после 4-ой добавки Ca^{2+} , а в присутствии РРІХ – после 3-ей.

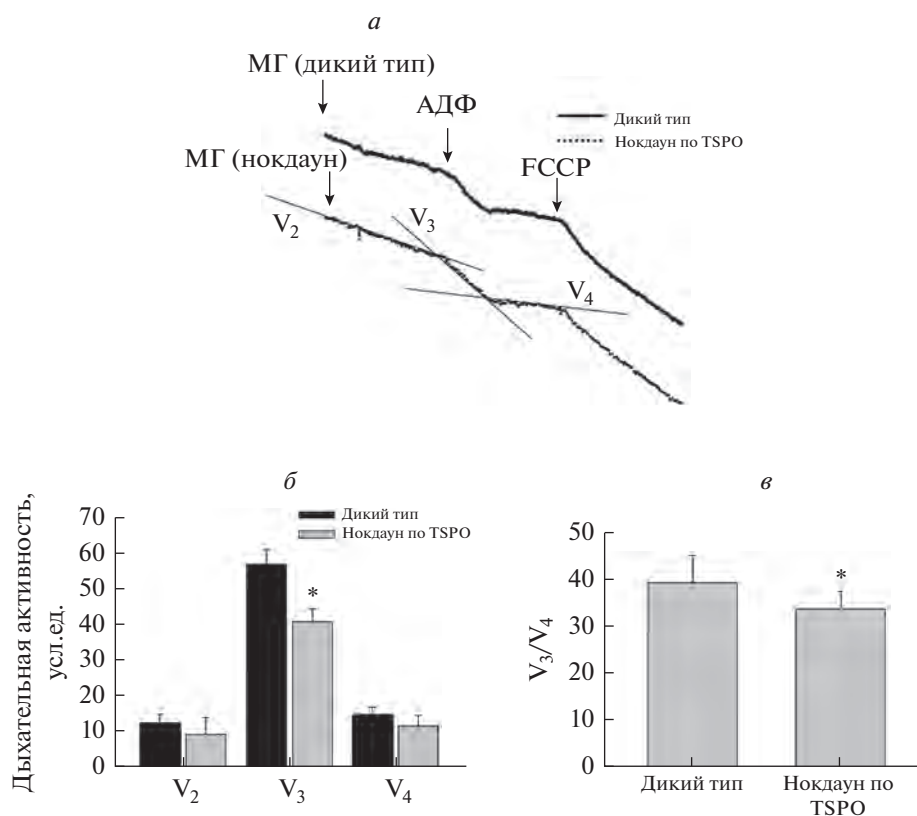


Рис. 2. Влияние TSPO на дыхательную активность в митохондриях клеток глиомы С6 дикого типа (МГ дикого типа) и с нокадауном по TSPO. *a* – Кривые изменения потребления кислорода митохондриями. Стрелками отмечены места добавления митохондрий, АДФ и FCCP (разобщителя митохондриального фосфорилирования). *б* – Показатели потребления кислорода в состоянии 2 (V_2), 3 (V_3) и 4 (V_4); потребление O_2 выражено в нг-атом O_2 за 1 мин на 1 мг белка. *в* – Дыхательный контроль (отношение V_3 к V_4); показаны средние значения и их стандартные отклонения из трех независимых экспериментов; * различие с контролем (дикого типа) достоверно при $P < 0.05$).

На рис. 3б, в показаны количественные изменения скорости входа Ca^{2+} после 1-ой ($V_1^{Ca^{2+}}$) и 2-ой ($V_2^{Ca^{2+}}$) добавок Ca^{2+} и изменение пороговой концентрации Ca^{2+} соответственно. В присутствии PPIX в МГ дикого типа, значение $V_1^{Ca^{2+}}$ снижалось на 40%, а $V_2^{Ca^{2+}}$ существенно не изменялось по сравнению с соответствующим контролем (МГ дикого типа). В МГ с нокадауном значение $V_1^{Ca^{2+}}$ снижалось на 35%, а $V_2^{Ca^{2+}}$ существенно не изменялось по сравнению с контролем (МГ дикого типа). Добавление Ca^{2+} к МГ с нокадауном в присутствии PPIX приводило к снижению $V_1^{Ca^{2+}}$ на 25%, а $V_2^{Ca^{2+}}$ – на 40% по сравнению с соответствующим контролем (МГ с нокадауном).

Пороговая концентрация Ca^{2+} в МГ с нокадауном снижалась на 50% по сравнению с МГ дикого типа. При добавлении PPIX к МГ дикого типа пороговая $[Ca^{2+}]$ снижалась на 35% по сравнению с этим параметром в МГ дикого типа, в то время как в МГ с нокадауном PPIX снижал этот параметр на 10% по сравнению с соответствующим контролем (МГ с нокадауном).

PPIX индуцировал открытие мРТР в обеих клеточных линиях, однако в МГ с нокадауном по TSPO – в более низкой степени.

Параллельно с транспортом Ca^{2+} мы изучили изменение мембранного потенциала в тех же экспериментальных условиях. Рис. 4а отражает кривые распределения иона TPP⁺ между митохондриальным матриксом и цитозолем при Ca^{2+} -индуцированном открытии мРТР. Количественные изменения в скорости входа TPP⁺ в митохондрии после 1-ой ($V_1^{TPP^+}$) и 2-ой ($V_2^{TPP^+}$) добавок Ca^{2+} показаны на рис. 4б. В присутствии PPIX, в МГ дикого типа, значение $V_1^{TPP^+}$ снижалось на 23%, а $V_2^{TPP^+}$ на 20% по сравнению с соответствующим контролем (МГ дикого типа). В МГ нокадаун, значение $V_1^{TPP^+}$ снижалось на 60%, а $V_2^{TPP^+}$ – на 50% по сравнению с контролем (МГ дикого типа). PPIX не изменял значения $V_1^{TPP^+}$

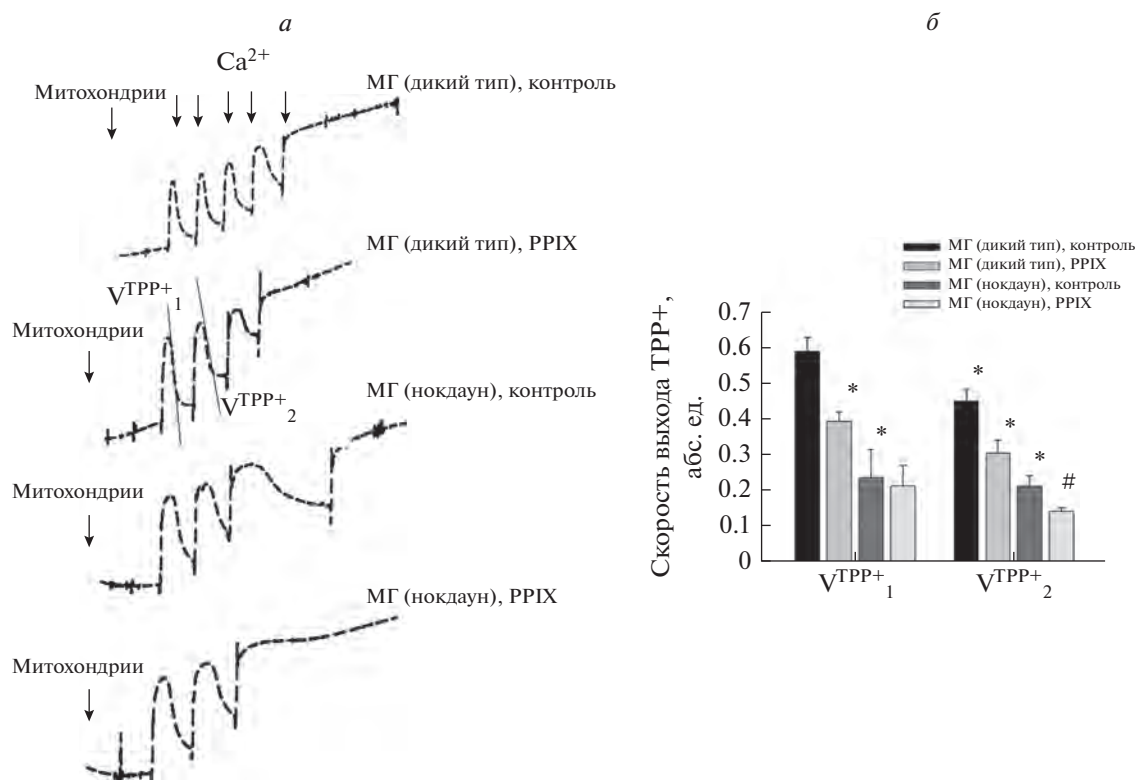


Рис. 3. Влияние нокдауна по TSPO на изменение мембранного потенциала в митохондриях (МГ), изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауна по TSPO, в присутствии PPIX. *а* – Кривые распределения TPP⁺ при Ca²⁺-индуцированном открытии мРПТР в митохондриях, изолированных из клеток обоих типов; *б* – скорость входа иона TPP⁺ в присутствии PPIX после 1-ой (V^{TPP+}₁) и 2-ой (V^{TPP+}₂) добавок Ca²⁺. Различия с соответствующим контролем (* дикий тип без добавок или # соответствующее значение митохондриального параметра в клетках глиомы С6 с нокдауном по TSPO), достоверно при $P < 0.05$.

в МГ с нокдауном, однако значение V^{TPP+}₂ снижалось на 20% по сравнению с соответствующим контролем (МГ с нокдауном).

Полученные результаты указывают на то, что подавление экспрессии гена TSPO связано со снижением емкости Ca²⁺ и скорости входа Ca²⁺ и TPP⁺ в МГ с нокдауном, которое привело к индукции открытия мРПТР. Добавление PPIX к митохондриям, изолированных из глиомы С6 обоих типов, индуцировало открытие мРПТР. Следует отметить, что стимулирующее действие PPIX на МГ дикого типа было сильнее, чем на МГ с нокдауном. Левин и соавторы (Levin et al., 2005) показали, что митохондриальные экстракты, полученные из клеток глиомы С6 с нокдауном по TSPO, более чем в 2 раза снижали способность связывать РК11195, экзогенный лиганд TSPO, по сравнению с клетками глиомы С6 дикого типа. В наших экспериментах мы наблюдали, что такая способность связывания эндогенного лиганда PPIX с TSPO также могла нарушаться из-за отсутствия TSPO в митохондриях, поэтому стимулирующее действие PPIX на МГ с нокдауном было более выраженным.

Белковое фосфорилирование (дефосфорилирование) считается одной из ключевых регуляторных

сигнальных систем, контролируемых многие аспекты клеточных функций (Lim et al., 2016). Ранее в митохондриях мозга крысы мы обнаружили белки, которые при функционировании мРПТР изменяли уровень фосфорилирования: кальпаин с молекулярной массой 67 кДа (Baburina et al., 2021), фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов (46 кДа) (Azarashvili et al., 2014), изоформы миелинового основного белка (17 и 14.4 кДа) (Крестинина et al., 2013), субъединицу F₀F₁-АТФ-азы (3.5 кДа) (Azarashvili et al., 2002). Мы обнаружили, что открытие мРПТР коррелировало с изменением степени фосфорилирования белков. В настоящей работе было изучено изменение уровней фосфорилирования мажорных белков с молекулярной массой 46, 14.4 и 3.5 кДа в митохондриях, изолированных из исследуемых типов клеток в присутствии и отсутствии PPIX.

На рис. 5а, б показана автордиограмма с включенной меченой [³²P]АТФ в митохондриальные белки клеток глиомы С6 дикого типа, и в митохондриальные белки МГ с нокдауном. На этом же рисунке (*а'*, *б'*) показаны результаты денситометрии, отражающие количественные изменения уровней фосфорилирования белков. На рис. 5а показано, что уровень фосфорилирования белка с молекулярной

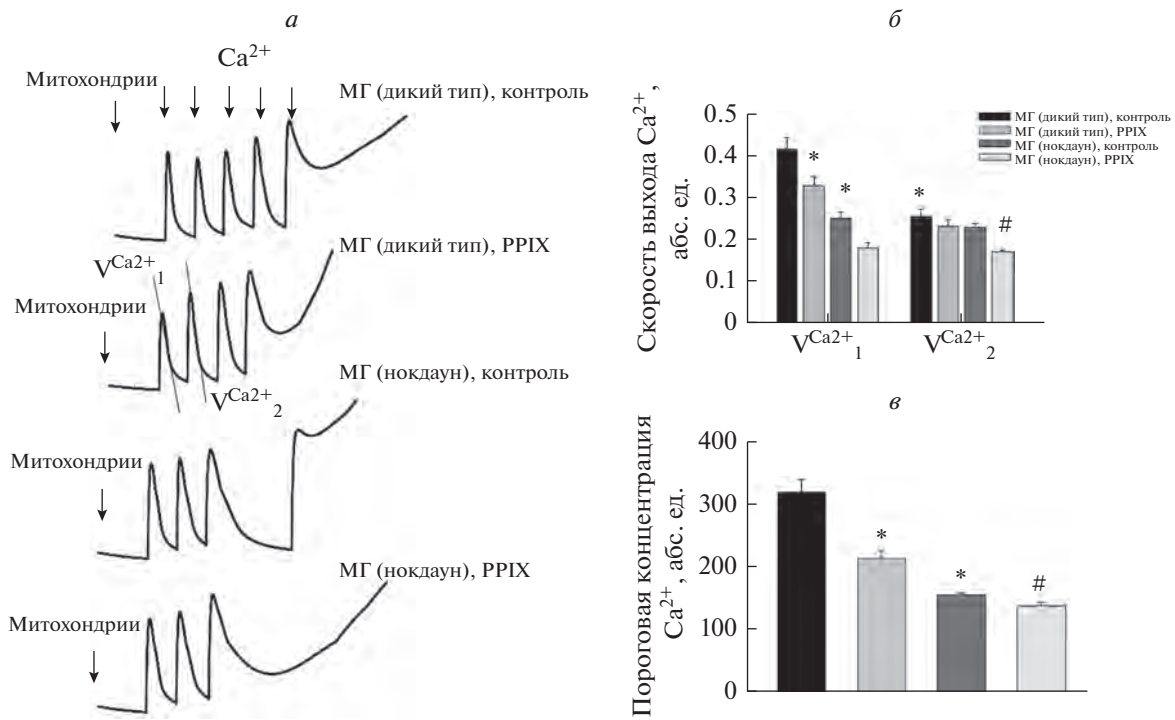


Рис. 4. Влияние нокдауна по TSPO в клетках глиомы С6 на изменение транспорта Ca²⁺ в митохондриях (МГ), изолированных из клеток дикого типа и с нокдауном по TSPO, в присутствии PPIX. *а* – Кривые транспорта Ca²⁺ в изолированных митохондриях; *б* – влияние PPIX на скорость входа Ca²⁺ в митохондрии в присутствии PPIX после 1- и 2-ой добавки Ca²⁺ к митохондриям (V_{Ca²⁺1}, V_{Ca²⁺2} соответственно); *в* – изменение пороговой концентрации Ca²⁺ в митохондриях. клетки глиомы С6 дикого типа являются контролем; показаны средние значения и их стандартные отклонения из трех независимых экспериментов; различие с контролем (* дикий тип без добавок или # соответствующее значением митохондриального параметра в клетках глиомы С6 с нокдауном по TSPO), достоверно при $P < 0.05$.

массой 46 кДа в МГ дикого типа увеличивался при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР на 60%, уровень белка с молекулярной массой 14.4 кДа не изменялся, а с молекулярной массой 3.5 кДа снижался на 45% по сравнению с контролем (без Ca²⁺-индукции). PPIX усиливал степень включения [γ-³²P]АТФ в белок 46 кДа в 4 раза, в белок 14.4 кДа – на 50%, но снижал уровень фосфорилирования белка 3.5 кДа на 50% по сравнению с контролем (без Ca²⁺-индукции). Добавление Ca²⁺ к митохондриям, инкубированным с PPIX (МГ дикого типа), снижало уровень фосфорилирования белков 46 и 3.5 кДа на 50%, но существенно не изменяло уровень фосфорилирования белка 14.4 кДа по сравнению с действием только PPIX (без Ca²⁺).

На рис. 5б показано, что в МГ с нокдауном при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР уровень фосфорилирования белка 46 кДа не изменялся, тогда как уровень белка 14.4 кДа в этих условиях повышался на 20%, а белка 3.5 кДа снижался на 45% по сравнению с контролем (без Ca²⁺). Добавление PPIX привело к повышению уровня фосфорилирования белка 46 кДа в 2 раза и снижению степени включе-

ния [γ-³²P]АТФ в белок 14.4 кДа на 25%, а в белок 3.5 кДа – на 40% по сравнению с контролем (без Ca²⁺). В присутствии PPIX при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР степень включения [γ-³²P]АТФ в белок 46 кДа не изменялась, в белок 14.4 кДа – повышалась на 40% и снижалась на 20% в случае белка 3.5 кДа по сравнению с действием одного PPIX (без Ca²⁺).

Несмотря на то, что TSPO участвует в различных биологических функциях, регуляторные пути, связанные с ним, а также первичные механизмы действия TSPO мало изучены. Ранее мы наблюдали, что некоторые мембранно-связанные белки в митохондриях мозга и печени крыс подвергались фосфорилированию, регулируемому Ca²⁺, как вторичным мессенджером (Azarashvili et al., 2002). Более того, было установлено, что уровень фосфорилирования сильно изменялся при Ca²⁺-индуцированном открытии мРТР. В настоящей работе мы предположили, что поскольку PPIX при функционировании мРТР может модулировать фосфорилирование белков, то TSPO можно считать важным участником в регуляции клеточного выживания. На основании полу-

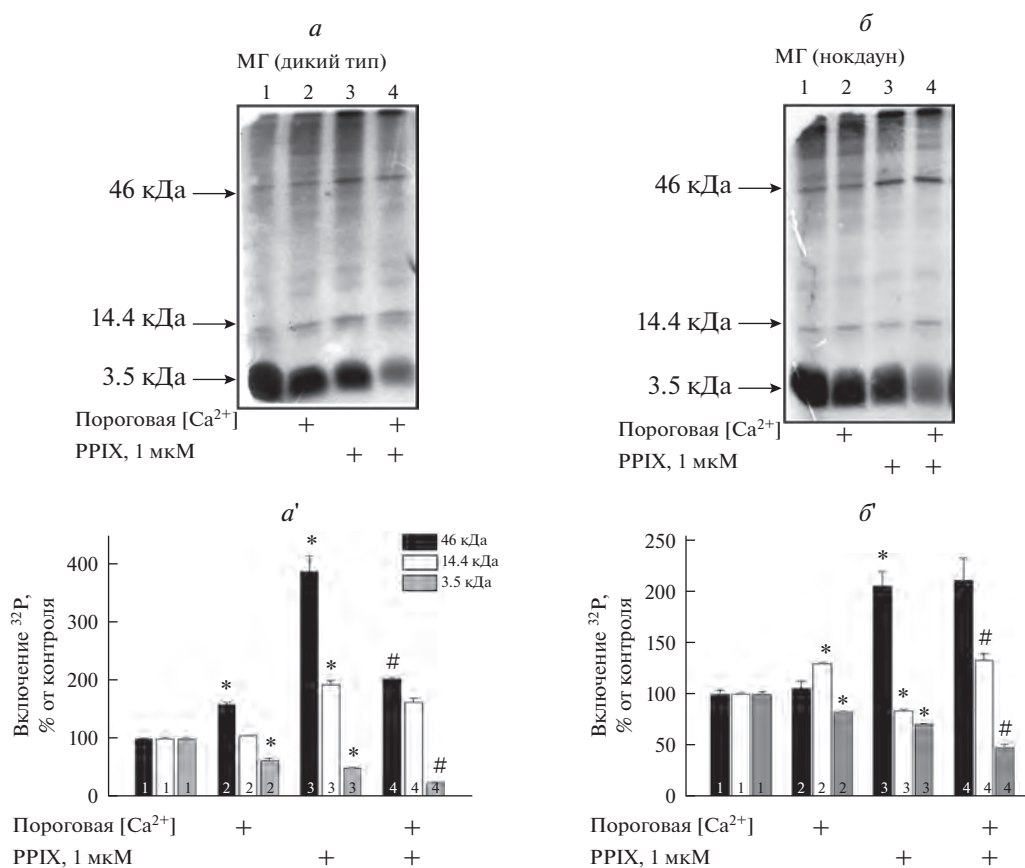


Рис. 5. Влияние РРІХ на изменение степени включения $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ в белки с молекулярной массой 46, 14.4 и 3.5 кДа митохондрий (МГ) из клеток глиомы С6 дикого типа (*а, а'*) и с нокдауном по ТSРO (*б, б'*) при открытии мРТР. Пороговая концентрация Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) – это та концентрация, при которой происходит открытие мРТР. *а, б* – Авторадиограмма включения меченой $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$. *а', б'* – Диаграмма, отражающая уровень фосфорилирования белков в митохондриях, изолированных их клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по ТSРO соответственно; изменение достоверно по сравнению с (*) соответствующим значением в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по ТSРO, или по сравнению с (#) соответствующим значением в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдауном по ТSРO в присутствии РРІХ при $P < 0.05$.

ченных результатов, мы предполагаем, что ТSРO может выполнять дополнительную роль в качестве модулятора фосфорилирования митохондриальных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы изучили участие ТSРO в функционировании мРТР. Объектом исследования были митохондрии, изолированные из клеток глиомы С6 дикого типа и с нокдаун по ТSРO. В клеточных лизатах обоих типов клеток обнаружены мономер и димер ТSРO. Поскольку в клетках глиомы С6 со сниженной экспрессией ТSРO уровень как мономерного, так и димерного белка снижался, мы предположили, что ТSРO способен участвовать в развитии опухолей. Дыхательный контроль в митохондриях, изолированных из клеток со сниженной экспрессией ТSРO был ниже, чем в митохондриях, изолированных из клеток глиомы С6 дикого типа. Кроме того, порого-

вая концентрация Ca^{2+} в митохондриях, изолированных из клеток с нокдауном по ТSРO снижалась, что ускоряло открытие мРТР, а РРІХ (лиганд ТSРO) стимулировал открытие мРТР. Изменение мембранного потенциала коррелировало с изменением пороговой $[\text{Ca}^{2+}]$. При функционировании мРТР, РРІХ был способен модулировать фосфорилирование белков, и мы предположили, что ТSРO можно считать важным регулятором клеточного выживания. На основании полученных результатов, мы предполагаем, что ТSРO является важным белком в развитии и выживании клетки и может участвовать в функционировании мРТР.

БЛАГОДАРНОСТИ

В настоящей работе были использованы приборы ЦКП Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (№ 075-01027-22-00).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Крестинина О.В., Грачев Д.Е., Одинокова И.В., Райзер Г., Евтодиенко Ю.В., Азарашвили Т.С.* 2009. Влияние лигандов периферического бензодиазепинового рецептора (PBR/TSPO) на открытие Ca^{2+} -индуцированной поры и фосфорилирование 3.5 кДа-полипептида в митохондриях мозга крыс. *Биохимия*. Т. 74. № 4. С. 522. (*Krestinina O.V., Grachev D.E., Odinokova I.V., Reiser G., Evtodienko Y.V., Azarashvili T.S.* 2009. Effect of peripheral benzodiazepine receptor (PBR/TSPO) ligands on opening of Ca^{2+} -induced pore and phosphorylation of 3.5-kDa polypeptide in rat brain mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. V. 74. № 4. P. 421.)
- Крестинина О.В., Бабурина Ю.Л., Гордеева А.Е., Азарашвили Т.С.* 2013. Идентификация фосфорилированных форм основного белка миелина, ассоциированных с митохондриями. *Нейрохимия*. Т. 30. № 4. С. 321. (*Krestinina O.V., Makarov P.R., Baburina Y.L., Gordeeva A.E., Azarashvili T.S.* 2013. The identification of phosphorylated forms of myelin basic protein associated with mitochondria. *Neurochemical J.* V. 7. № 4. P. 284.)
- Azarashvili T., Grachev D., Krestinina O., Evtodienko Y., Yurkov I., Papadopoulos V., Reiser G.* 2007. The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of Ca^{2+} -induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria. *Cell Calcium*. V. 42. P. 27.
- Azarashvili T., Krestinina O., Galvita A., Grachev D., Baburina Y., Stricker R., Reiser G.* 2014. Identification of phosphorylated form of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNase) as 46 kDa phosphoprotein in brain non-synaptic mitochondria overloaded by calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 46. P. 135.
- Azarashvili T., Krestinina O., Odinokova I., Evtodienko Y., Reiser G.* 2003. Physiological Ca^{2+} level and Ca^{2+} -induced Permeability Transition Pore control protein phosphorylation in rat brain mitochondria. *Cell Calcium*. V. 34. P. 253.
- Azarashvili T.S., Tyunela J., Odinokova I.V., Grigorjev P.A., Baumann M., Evtodienko Y.V., Saris N.E.* 2002. Phosphorylation of a peptide related to subunit c of the F_0F_1 -ATPase/ATP synthase and relationship to permeability transition pore opening in mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* V. 34. P. 279.
- Baburina Y., Sotnikova L., Krestinina O.* 2021. Identification of phosphorylated calpain 3 in rat brain mitochondria under mPTP opening. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 10613.
- Banati R.B., Middleton R., Chan R.J., Hatty C.R., Kam W.W., Quin C., Graeber M.B., Parmar A., Zahra D., Callaghan P., Fok S., Howell N.R., Gregoire M., Szabo A., Pham T., Davis E., Liu G.J.* 2014. Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSPO knockout. *Nat. Commun.* V. 5. P. 5452.
- Campanella M., Szabadkai G., Rizzuto R.* 2008. Modulation of intracellular Ca^{2+} signalling in HeLa cells by the apoptotic cell death enhancer PK11195. *Biochem. Pharmacol.* V. 76. P. 1628.
- Costa B., Salvetti A., Rossi L., Spinetti F., Lena A., Chelli B., Rechichi M., Da Pozzo E., Gremigni V., Martini C.* 2006. Peripheral benzodiazepine receptor: characterization in human T-lymphoma Jurkat cells. *Mol. Pharmacol.* V. 69. P. 37.
- Crompton M., Costi A.* 1990. A heart mitochondrial Ca^{2+} -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem. J.* V. 266. P. 33.
- Delavoie F., Li H., Hardwick M., Robert J.C., Giatzakis C., Peranzi G., Yao Z.X., Maccario J., Lacapere J.J., Papadopoulos V.* 2003. In vivo and in vitro peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: functional significance in drug ligand and cholesterol binding. *Biochemistry*. V. 42. P. 4506.
- Gatliff J., East D., Crosby J., Abeti R., Harvey R., Craigen W., Parker P., Campanella M.* 2014. TSPO interacts with VDAC1 and triggers a ROS-mediated inhibition of mitochondrial quality control. *Autophagy*. V. 10. P. 2279.
- Gavish M., Bachman I., Shoukrun R., Katz Y., Veenman L., Weisinger G., Weizman A.* 1999. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* V. 51. P. 629.
- Hardwick M., Fertikh D., Culty M., Li H., Vidic B., Papadopoulos V.* 1999. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res.* V. 59. P. 831.
- Javadov S., Karmazyn M.* 2007. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol. Biochem.* V. 20. P. 1.
- Kowalczyk P., Sulejczak D., Kleczkowska P., Bukowska-Osko I., Kucia M., Popiel M., Wietrak E., Kramkowski K., Wrzosek K., Kaczynska K.* 2021. Mitochondrial oxidative stress – a causative factor and therapeutic target in many diseases. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 13384.
- Krestinina O.V., Baburina Y.L., Odinokova I.V., Azarashvili T.S., Akatov V.S.* 2018. Melatonin Modulates Phosphorylation of 2',3'-Cyclic Nucleotide-3'-Phosphodiesterase in the Presence of Protoporphyrin IX in the Brain Mitochondria of Rats during the Functioning of the Non-Specific Mitochondrial Pore. *Neurochem. J.* V. 12. P. 33.
- Levin E., Premkumar A., Veenman L., Kugler W., Leschiner S., Spanier I., Weisinger G., Lakomek M., Weizman A., Snyder S.H., Pasternak G.W., Gavish M.* 2005. The peripheral-type benzodiazepine receptor and tumorigenicity: isoquinoline binding protein (IBP) antisense knockdown in the C6 glioma cell line. *Biochemistry*. V. 44. P. 9924.
- Leissring M.A., Farris W., Wu X.N., Christodoulou D.C., Haigis M.C., Guarente L., Selkoe D.J.* 2004. Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem. J.* V. 383. P. 439.
- Lim S., Smith K.R., Lim S.T., Tian R., Lu J., Tan M.* 2016. Regulation of mitochondrial functions by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Biosci.* V. 6. P. 25.

- Nunnari J., Suomalainen A. 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. V. 148. P. 1145.
- Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T.R., Knudsen T.B., Lacapere J.J., Lindemann P., Norenberg M.D., Nutt D., Weizman A., Zhang M.R., Gavish M. 2006. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* V. 27. P. 402.
- Riond J., Vita N., Le Fur G., Ferrara P. 1989. Characterization of a peripheral-type benzodiazepine-binding site in the mitochondria of Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett.* V. 245. P. 238.
- Singh V., Ram M., Kumar R., Prasad R., Roy B.K., Singh K.K. 2017. Phosphorylation: implications in cancer. *Protein J.* V. 36. P. 1.
- Takeyama N., Matsuo N., Tanaka T. 1993. Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca(2+)-dependent inner-membrane permeability transition. *Biochem. J.* V. 294. P. 719.
- Yoshioka E., Chelakkot V.S., Licursi M., Rutihinda S.G., Som J., Derwish L., King J.J., Pongnopparat T., Mearow K., Larjani M., Dorward A.M., Hirasawa K. 2018. Enhancement of Cancer-Specific Protoporphyrin IX Fluorescence by Targeting Oncogenic Ras/MEK Pathway. *Theranostics*. V. 8. P. 2134.

The Participation of a Translocator Protein in the Induction and Regulation of Permeability Transition Pore Opening in Mitochondria from C6 Glioma Cells

Yu. L. Baburina^a, L. D. Sotnikova^a, and O. V. Krestinina^a, *

^a*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia*

**e-mail: ovkres@mail.ru*

Translocator protein (TSPO), formerly called the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR), is an 18 kDa protein localized in the outer mitochondrial membrane and involved in cell proliferation and apoptosis. In the present work, we found TSPO as a monomer and dimer in C6 rat glioma cells. We have shown that a reduced level of TSPO expression in cells affects the induction of a mitochondrial permeability transition pore (mPTP). A decrease in TSPO expression stimulated the Ca²⁺-induced opening of mPTP. The natural endogenous TSPO ligand protoporphyrin IX (PPIX) accelerated the opening of mPTP. The stimulatory effect of PPIX was stronger in the mitochondria isolated from wild type C6 glioma cells than in mitochondria isolated from C6 glioma cells with TSPO knockdown. Phosphorylation of membrane receptors, ion channels, and transcription factors is an important intracellular signaling event responsible for the regulation of various enzymes and many cellular functions. In the present study, PPIX modulated protein phosphorylation. We hypothesized that TSPO is an important protein in the regulation of cell survival and may be involved in the functioning of mPTP.

Keywords: mitochondria, C6 glioma cells, oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore (mPTP), protoporphyrin IX (PPIX), translocator protein (TSPO)