

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АПОПТОЗ *IN VITRO* И *IN VIVO*: VDAC2 И КОМПЛЕКС ТОМ ВМЕСТО КАРДИОЛИПИНА

Вересов В.Г.

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, veresov@ibp.org.by*

Митохондриальный апоптоз происходит в ответ на действие разнообразных факторов, однако во всех случаях его общим критическим звеном является пермеабиллизация наружной мембраны митохондрий (НММ) с последующим освобождением из межмембранного пространства митохондрий (МПМ) в цитозоль апоптогенных факторов, таких как цитохром с, что в конечном итоге приводит к активации каспаз и разрушению клетки. У многоклеточных организмов пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий (ПНММ) контролируется проапоптотическими и антиапоптотическими белками семейства Bcl-2 [1, 2]. Исследования с использованием нокаут-моделей показали центральную роль проапоптотических белков Bax и Bak в осуществлении апоптоза. В неапоптотических клетках Bax находится в динамическом равновесии между цитозолем и митохондриями, со значительным сдвигом равновесия в сторону митохондриальной фракции при апоптозе, в то время как Bak конститутивно локализован на НММ [1, 2]. Несмотря на то, что молекулярные механизмы ПНММ являлись областью интенсивного изучения в течение продолжительного времени, они все еще остаются недостаточно ясными, а результаты часто являются противоречивыми. В настоящее время господствующим является представление, согласно которому при апоптозе белки Bax и Bak подвергаются активации BH3-only белками (такими, как Bim, Bid/tBid), что в результате приводит к самассоциации Bax и/или Bak с образованием пор в НММ, через которые происходит выход апоптогенных белков из МПМ в цитозоль, что сопровождается активацией каспаз и гибелью клеток [1, 2]. В нескольких экспериментах *in vitro* в безклеточных системах оказалось возможным воспроизвести многие характерные свойства Bax/Bak-опосредованной ПНММ, происходящей *in vivo*, используя лишь небольшое количество компонент: мембрану, содержащую кардиолипин, Bax (или Bak) и tBid [3-6]. Так как в течение продолжительного времени считалось, что пермеабиллизация кардиолипин-содержащих липосом в значительной степени реконструирует события, происходящие *in vivo*, концепция, согласно которой проапоптотическая активация Bak и Bax *in vivo* происходит в ре-

зультате совместного действия BH3-only белков и кардиолипина являлась до недавнего времени преобладающей концепцией для ПНММ *in vivo*. Однако участие кардиолипина в ПНММ до сих пор остается под вопросом. В ряде публикаций показано, что кардиолипин не нужен для ПНММ [10, 11]. Более того, в исследованиях с использованием липосом было установлено, что лишь незначительная доля Вах олигомеризуется с образованием пор, даже при использовании высоких концентраций tBid [3, 12]. Кроме того, было показано, что для пермеабиллизации НММ требуется по меньшей мере 7 % кардиолипина [3, 5, 6], в то время как в НММ его содержится существенно меньше. В работе Шафера и Куваны с соотр. было показано, что инкорпорация изолированных белков из НММ в липосомы, лишенные кардиолипина, приводила к такой же пермеабиллизации липосом в ответ на действие Вах и tBid, как и в случае большого содержания в них кардиолипина [12]. Исходя из этого было предположено, что какие-то белки НММ могут играть в пермеабиллизации НММ *in vivo* ту же роль, какую кардиолипин играет в пермеабиллизации липосом *in vitro*, и что среди этих белков, по крайней мере, один является рецептором для tBid. Если предположить, что НММ содержит мало кардиолипина, тогда как Bak конститутивно локализован на НММ, а не на других эндомембранах, то можно предположить существование в НММ некоторых нелипидных компонент, ответственных за специфичность Bak и Вах именно к этой эндомембране. Были предприняты попытки найти такие белки и после нескольких неудач VDAC2 ("voltage-dependent anion channel 2") был идентифицирован как рецептор для Bak [13]. Также были получены экспериментальные данные, согласно которым, tBid, связанный с НММ, а также комплекс TOM22/TOM40 являются рецепторами для Вах в условиях апоптоза [14-16]. Недавно было установлено, что Вах, также как и Bak, взаимодействует с VDAC2 [17]. Эти исследования, показавшие, что проапоптотическая активация Вах и Bak регулируется митохондриальными белками, добавили еще один уровень сложности в общепринятую картину апоптоза. Недавно, механизмы регуляции активации Bak и Вах митохондриальными рецепторами были рассмотрены средствами структурного моделирования [18]. Полученные результаты показали существование иерархии tBid>Bak>Вах между средствами связывания этих белков с рецептором VDAC2. В соответствии с сегодняшним пониманием конкурентно-индуцированной диссоциации транзитных белковых комплексов (ТБК), последние постоянно образуются и распадаются, и если белок-конкурент находится вблизи сайта связывания рецептора, то этот белок-конкурент может занять место первоначального лиганда, временно препятствуя повторному связыванию последнего с

рецептором. В конечном итоге устанавливается равновесие с преобладанием в связанном состоянии белков, обладающих более высоким сродством. В соответствие с этой концепцией, tBid, образующийся при апоптотических условиях, способен смещать как Bax так и Bak из комплексов VDAC2/Bax и VDAC2/Bak. Также было установлено, что комплекс $(\text{TOM40})_2/\text{TOM22}/\text{tBid}$ обладает свойством связываться с высоким сродством Bax. Позже мы установили, что комплекс VDAC2/tBid обладает высоким сродством по отношению к Bax. Это позволило предположить, что при апоптозе образуются оба рецептора, обуславливая интенсивное митохондриальное рекрутирование Bax при апоптозе. Полученные результаты, позволяют предположить центральную роль порина VDAC2 и комплекса TOM в осуществлении митохондриального апоптоза *in vivo*. Предполагаемая концепция VDAC2-опосредованной (A) и $(\text{TOM40})_2/\text{TOM22}$ -опосредованной (B) активации Bak и Bax при апоптозе представлена на Рисунке 1.

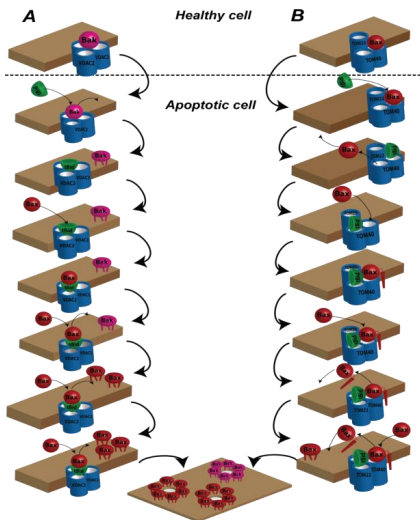


Рисунок 1 – Схематическое изображение VDAC2-опосредованной (A) и $(\text{TOM40})_2/\text{TOM22}$ -опосредованной (B) активации Bak и Bax при апоптозе.

Литература

1. Shamas-Din A., Kale J., Leber B., Andrews D.W. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – Vol. 5. – a008714.
2. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2014. – Vol. 15. – P. 49-63
3. Kuwana T., Mackey M. R., Perkins G., et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. // Cell. – 2002. – Vol. 111. – P. 331-342
4. Roucou X., Rostovtseva T., Montessuit S., Martinou J. C., Antonsson B. Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. // Biochem. J. – 2002. – Vol. 363. – P. 547-552
5. Yethon J. A., Epand R. F., Leber B., Epand R. M., Andrews D. W. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 48935-48941
6. Terrones O., Antonsson B., Yamaguchi H., et al. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID. // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 30081-30091
7. Lovell J. F., Billen L. P., Bindner S., et al. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. // Cell. – 2008. – Vol. 135. – P. 1074-1084
8. Lucken-Ardjomande S., Montessuit S., Martinou J. C. Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. // Cell Death Differ. – 2008. – Vol. 15. – P. 929-937
9. Landeta O., Landajuela A., Gil D., et al. Reconstitution of proapoptotic BAK function in liposomes reveals a dual role for mitochondrial lipids in the BAK-driven membrane permeabilization process. // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 8213-8230
10. Iverson S. L., Enoksson M., Gogvadze V., Ott M., Orrenius S., Cardiolipin is not required for Bax-mediated cytochrome c release from yeast mitochondria. // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279. – P. 1100-1107
11. Polcic P., Su X., Fowlkes J., et al. Cardiolipin and phosphatidylglycerol are not required for the in vivo action of Bcl-2 family proteins. // Cell Death Differ. – 2005. – Vol. 12. – P. 310-312
12. Schafer B., Quispe J., Choudhary V., et al. Mitochondrial outer membrane proteins assist Bid in Bax-mediated lipidic pore formation. // Mol. Biol. Cell. – 2009. – Vol. 20. – P. 2276-2285

13. Roy S. S., Ehrlich A. M., Craigen W. J., Hajnoczky G., VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. //EMBO Rep. – 2009. – Vol. 10. – P. 1341-1347
14. Bellot G., Cartron P. F., Er E., et al. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. //Cell Death Differ. – 2007. – Vol. 14. – P. 785-794
15. Ott M., Norberg E., Walter K. M., et al. The mitochondrial TOM complex is required for tBid/Bax-induced cytochrome c release. //J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 27633-27639
16. Billen L. P., Kokoski C. L., Lovell J. F., Leber B., Andrews D. W. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. //PLoS Biol. – 2008. – Vol. 6. – P. e147
17. Ma S. B., Nguyen T. N., Tan I., et al. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. //Cell Death Differ. – 2014. – Vol. 21. – P. 1925-1935
18. Veresov V. G., Davidovskii A. I. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by MTCH2, VDAC2, TOM40 and TOM22. //Cell. Signal. – 2014. – Vol. 26. – P. 370-382

СПЕКТРОСКОПИЯ ОДИНОЧНЫХ НАНООБЪЕКТОВ: ОТ МОЛЕКУЛ К БИОСТРУКТУРАМ

Зенькевич Э.И.¹, Старухин А.С.², фон Борцисковски К.³

¹*Белорусский национальный технический университет, Минск, Беларусь*

²*Институт физики им. Б.И. Степанова, Минск, Беларусь*

³*Институт физики Технического университета Хемнитца, Германия*

История развития и использования методов спектроскопии высоко-го спектрального и пространственного разрешения при исследовании свойств одиночных органических молекул, нанобъектов (квантовые точки) и биоструктур составляет немногим более 25 лет. Высокая значимость и актуальность данного направления фундаментальной науки была отмечена в 2014 г. Нобелевской премией по химии за развитие методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого пространственного разрешения (Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner). Возмож-