

ГБОУ Московская Гимназия на Юго-Западе № 1543  
Лаборатория митохондриальной медицины ФГБУ Национальный медицинский  
исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.  
Кулакова Министерства здравоохранения РФ

# Роль митохондрий в регулировании креатинового челнока и индукции апоптоза в раковых клетках

Е.Р. Лосева  
Д.В. Третьяков

Научный руководитель:  
к.б.н. Михаил Юрьевич Высоких

Москва, 2019

## **Оглавление**

Введение.....	3
Методы исследования.....	13
Результаты исследования.....	16
Обсуждение результатов.....	22
Выводы.....	24
Благодарности.....	24
Список литературы.....	25
Приложения.....	26

## Введение

Раковая опухоль – это новообразование в ткани, возникающее при неконтролируемой пролиферации клеток с большим потенциалом деления, способных перемещаться по организму и создавать вторичные опухолевые очаги (метастазы). Вследствие мутаций, вызывающих поломку генов, ответственных за клеточный цикл, подобные клетки перестают дифференцироваться и начинают быстро делиться (Л. Кассимерис, В.Р. Линганна, Д. Плоннер, «Клетки по Льюину», 2016), обычно формируя уплотнение с последующей миграцией в ближайшие лимфатические узлы и формированием очагов вторичной инвазии.

В норме тканевые предшественники, замещающие выбывающие клетки, подвергаются воздействию внешних факторов, индуцирующих их дифференцировку для восполнения и поддержания пула клеток, обеспечивающих ткани выполнение специализированных функций. Так, например, происходящие из недифференцированных стволовых клеток, клетки желудочно-кишечного тракта, обновляющиеся очень часто вследствие условий функционирования в агрессивной среде, подразделяются на эпителиальные (внутренний слой), клетки соединительной ткани и гладкомышечного слоя и клетки верхней серозной оболочки. Каждый отдельный слой стенки желудка или кишечника, таким образом, выполняет свою конкретную функцию, в то же время, даже в составе одного слоя могут встречаться клетки с различиями по функциям. Все типы клеток взаимосвязаны между собой, и в случае дефекта клеток любого типа возникает патологическое состояние дисбаланса клеточного состава. Причиной патологии может послужить заражение вирусом, открепление эпителиальных клеток от базальной мембраны (с последующим воспалением) или повреждение самих клеток под воздействием мутагенов, и именно поэтому одной из важнейших задач организма является «контроль качества» клеток тканей для замещения поврежденных или старых клеток новыми. Для выполнения этой задачи и коррекции причин и последствий нарушения тканевого гомеостаза существует несколько механизмов.

Во-первых, зараженные вирусом клетки способна распознавать иммунная система организма (Nicholson, L., 2016). Дифференцированные клетки, как правило, секретируют на своей поверхности МНС1 (major histocompatibility complex, основной комплекс гистосовместимости), демонстрирующий Т-киллерам фрагменты почти всех белков, находящихся в клетке. В случае распознавания антигена вирусного происхождения, Т-киллеры встраивают в мембрану зараженных клеток перфорины (белки, повреждающие мембрану) и индуцируют гибель атакуемых клеток, впрыскивая протеолитические ферменты (гранзимы) – рис. 1. Во-вторых, при разрушении или ослаблении межклеточных контактов, приводящих к повышению подвижности клетки, происходит активация специфического процесса самоуничтожения клетки, называемого апоптозом (рис. 2).

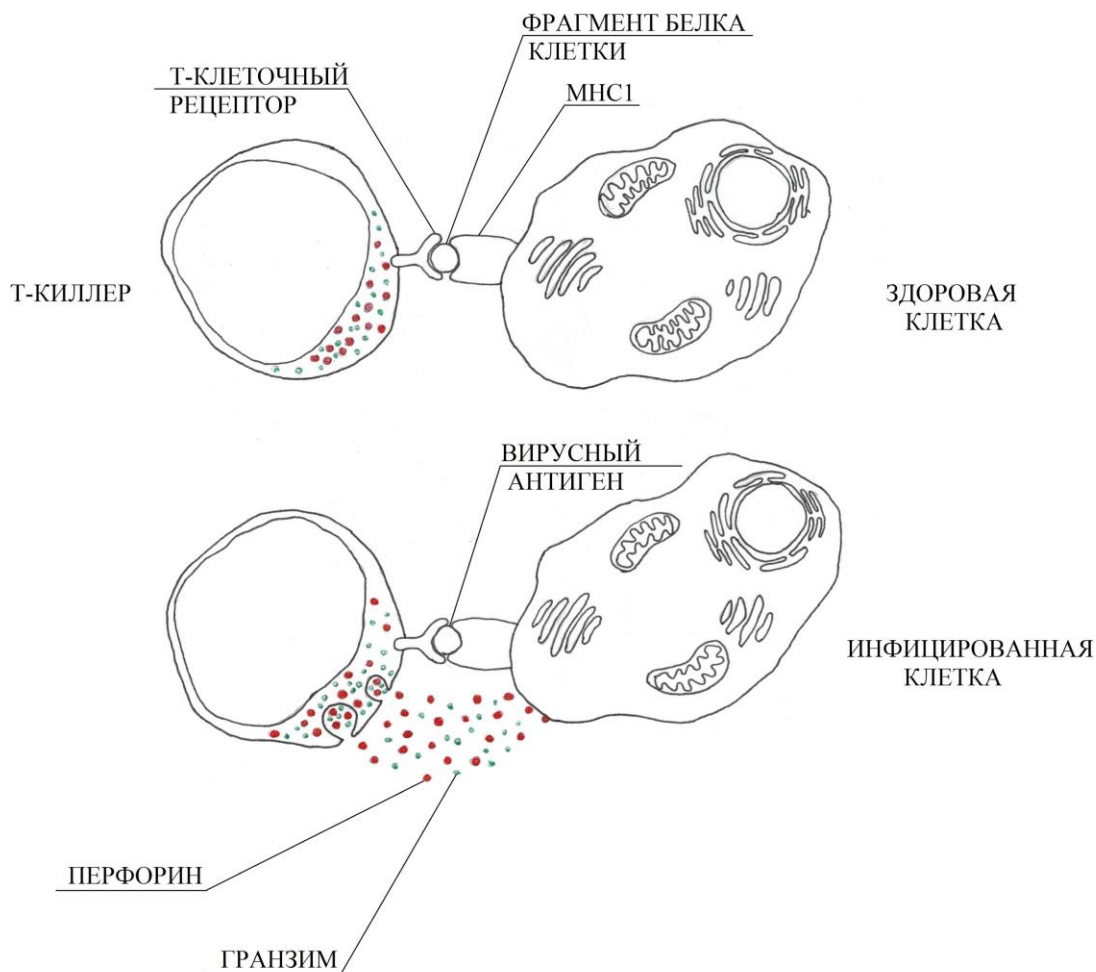


Рис. 1. Уничтожение Т-киллером инфицированной клетки. В первом случае Т-киллер подходит к здоровой клетке и “сканирует” ее МНС при помощи Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR). Во втором случае он подходит к зараженной клетке, продуцирующей не только свои белки, но и белки вируса. Поскольку МНС демонстрирует почти все производящиеся в клетке белки, Т-киллер распознает вирусный антиген и запускает смерть клетки. Он секретирует белки перфорины (красные круги), которые встраиваются в мембрану зараженной клетки и образуют в ней поры, нарушая целостность мембраны и понижая ее потенциал. Также Т-киллер секретирует протеазы гранзимы (зеленые круги), проходящие через перфориновый канал и расщепляющие содержимое клетки.

В отличие от некроза – альтернативного пути гибели поврежденной клетки, сопровождающегося неконтролируемым разрывом мембраны и опорожнением содержимого клетки во внеклеточное пространство с последующей индукцией воспаления, апоптоз (один из вариантов запрограммированной клеточной гибели) – это процесс самоуничтожения клетки с формированием апоптотических телец, изолирующих содержимое клетки от контакта с внеклеточной средой (Хи, Х., et al., 2018).

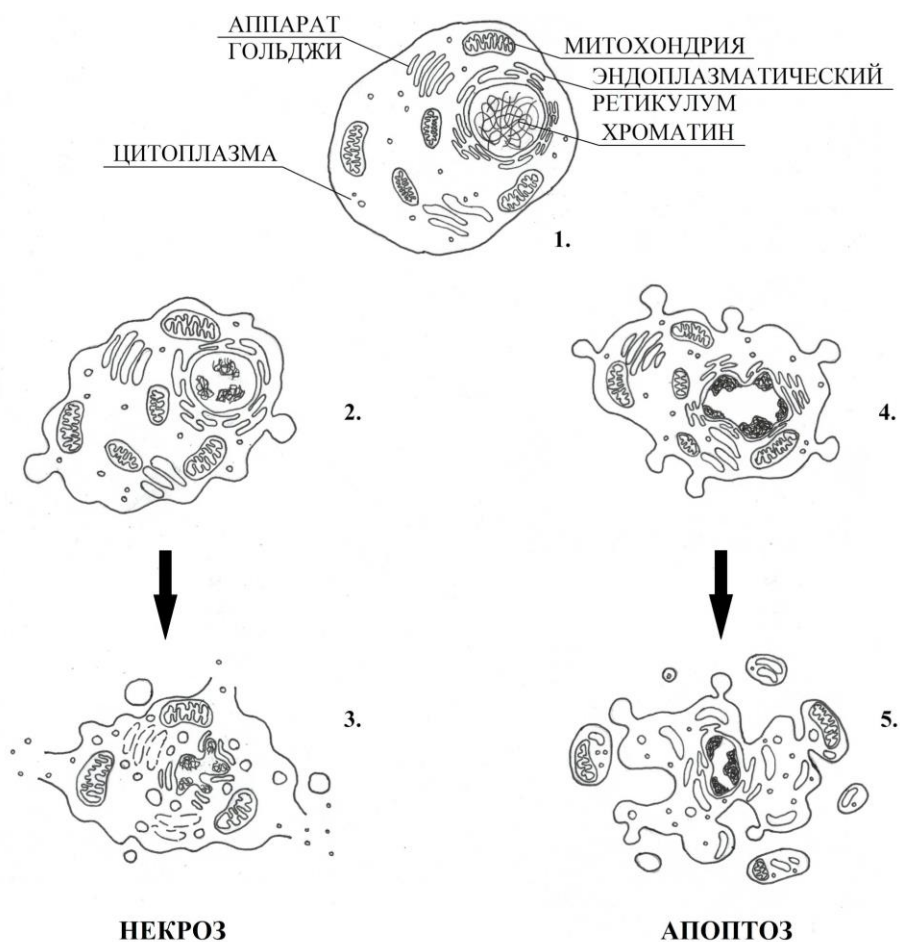


Рис. 2. Сравнение некроза и апоптоза. Некроз могут вызвать травмы, ожоги, заражение или воздействие на клетку токсичных веществ. При некрозе клетка набухает и начинается процесс блеббинга, когда мембрана начинает частично отслаиваться от цитоскелетных белков и пузырится в этих местах, после чего мембрана клетки разрывается и ее содержимое вытекает наружу. Это привлекает множество нейтрофилов и возникает локальное воспаление. В случае апоптоза также происходит блеббинг, хроматин переходит из эу- в гетерохроматин, а ядро фрагментируется. Затем на мембране образуются выпячивания и формируются апоптотические тельца. Содержимое клетки целиком оказывается в мембранных пузырьках. Фермент флоппаза переносит фосфолипид фосфатидилсерин на внешний слой мембраны, что является сигналом для фагоцитов, захватывающих апоптотические тельца. На рисунке изображены под номером 1 – Нормальная клетка, 2 – Блеббинг некротической клетки, 3 – Разрыв мембраны, 4 – Блеббинг апоптотической клетки, 5 – Формирование апоптотических телец.

Ведущую роль в распаде клетки на апоптотические тельца играют ферменты каспазы, относящиеся к классу цистеиновых протеиназ, расщепляющих белки клетки. При этом, каспазы делятся на эффекторные, непосредственно разрушающие клеточные структуры, и инициаторные, активирующие эффекторные каспазы посредством их расщепления (процессинга). Действие эффекторных каспаз приводит к разрушению

белков цитоскелета и ядра, гистонов ДНК, белков эндоплазматического ретикулума и других органелл клетки. В хронологическом плане апоптоз делится на несколько стадий, включая рецепцию сигнала, активацию про-апоптотических сигнальных белков, процессинг и активацию каспаз, деградацию белков и органелл клетки, и, наконец, изоляцию содержимого клетки путем формирования окруженных фрагментами клеточной мембраны апоптотических телец, впоследствии утилизируемых клетками иммунной системы без активации провоспалительных каскадов. В связи с этим, апоптоз имеет также огромное значение в эмбриогенезе, поскольку путем прицельного элиминирования групп клеток в определенных местах и последующего сворачивания или изгиба клеточных пластов обеспечивает формирование органов и специфических тканевых структур. На рисунке 3 представлен пример формирования нервной трубки в результате гибели части клеток нервной складки апоптотическим путем. Третий основной тип гибели клеток – аутофагию, также имеющую огромное значение в поддержании тканевого гомеостаза в онтогенезе, мы рассмотрим далее.

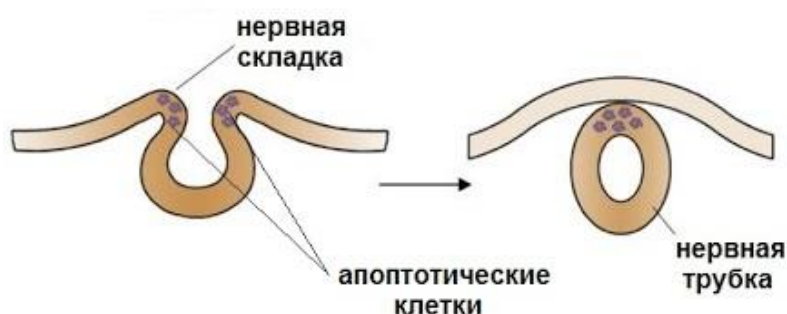


Рис. 3. Формирование нервной трубки. При прогибе нервной пластинки образуется нервный желобок. По его краям возникают нервные валики, которые смыкаются друг с другом, формируя нервную трубку. При этом клетки, находящиеся с краев нервных валиков, погибают путем апоптоза, отделяя нервную трубку верхнего слоя - эктодермы.

Апоптоз имеет два варианта индукции: внешний (через так называемые «рецепторы смерти») и внутренний (связанный со стрессом клетки). В первом случае «рецепторы смерти» (Fas, TNF) активируются определенными внеклеточными лигандами и происходит сборка белкового комплекса, активирующего инициаторные каспазы. Во втором случае апоптоз запускается при серьезных повреждениях ДНК или под влиянием стрессовых факторов, и инициируется через митохондрии. Выход из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль цитохрома С, белка-переносчика электронов в электрон-транспортной цепи, является решающим моментом для инициации каспаз. Попадающий в цитозоль цитохром С связывается с активирующей апоптотическую протеазу фактором-1 (АРАФ-1) и прокаспазой 9, формируя апоптосому, а уже она активирует инициаторные каспазы (рис. 4).

Интересно, что структура митохондрий – двумембранных органелл, отвечающих за обеспечение клетки АТФ, синтез стероидных гормонов, гема и многое другое, – не предполагает свободного выхода из мембранного пространства даже такого небольшого белка, как цитохром С (13 кДа), поскольку диаметр канала внешней

мембраны (белка VDAC1) всего 2 нанометра, что недостаточно для свободной диффузии цитохрома С (2,5 на 2,5 на 3,7 нанометров [2]). Не говоря уже о том, что при индукции апоптоза из митохондрий выходит и ряд других белков - более крупных, чем цитохром С, например, апоптоз-индуцирующий фактор (Aif, 36 кДа), эндонуклеаза G (EndoG, гомодимер, 50кДа) и др.

Существует два пути преодоления барьера внешней мембраны митохондрий для высокомолекулярных соединений с размерностью, препятствующей свободной диффузии молекул через канал VDAC1 – специфический и неспецифический.

Специфический путь состоит в формировании в мембране пор более крупного, чем у VDAC1, размера. Это происходит при участии белков, способных к встраиванию в мембрану и последующей олигомеризации с вытеснением липида и образованием крупного водного канала в середине белкового комплекса. В основном в этом участвуют белки Bax или Bak семейства Bcl-2, при этом белок Bcl-2 образует гетеродимер с Bax/Bak и блокирует его транслокацию к митохондрию после прохождения проапоптотического сигнала.

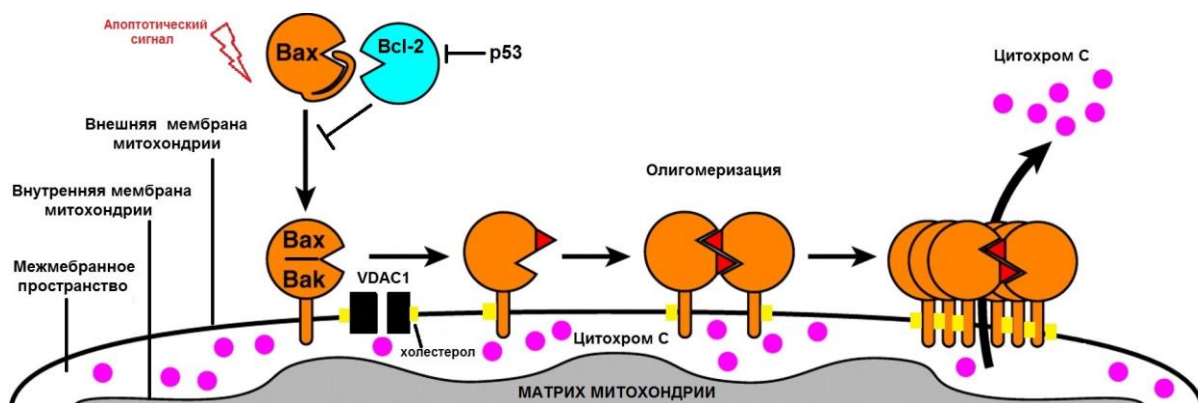


Рис. 4. Высвобождение цитохрома С из межмембранного пространства митохондрии в матрикс. Белок Bcl-2 блокирует апоптоз, формируя гетеродимер с Bax – белком, формирующим пору. При индукции апоптоза p53 понижает экспрессию Bcl-2, благодаря чему Bax активируется, встраивается своим “хвостом” в мембрану митохондрии и, соединяясь друг с другом и с VDAC, образует пору для выхода цитохрома С.

Регуляция обоих путей апоптотической гибели клетки – и по внешнему пути через «рецепторы смерти», и по внутреннему, определяется белком p53, выполняющим роль супрессора опухолевого роста. Основной функцией этого белка является способность регулировать экспрессию генов, вовлеченных в контроль клеточного цикла и программированной клеточной гибели. Его активация приводит, с одной стороны, к повышению чувствительности клетки к про-апоптотическим лигандам, с другой стороны, напрямую индуцирует выход цитохрома С из митохондрии и запускает апоптоз. В результате рецепции клеткой про-апоптотического сигнала активированный p53 повышает в клетке уровень про-апоптотических белков, к которым относятся упомянутые выше белки, а также APAF-1, и уменьшает экспрессию анти-апоптотических белков (Bcl-

2, Bcl-xL). При транслокации про-апоптотических белков из цитозоля к внешней мембране митохондрии в участки расположения холестерина и белка VDAC1 (основной транспортный белок внешней мембраны, обеспечивающий трансмембранный перенос метаболитов между митохондрией и цитозолем) сначала происходит связывание этих белков. Далее после олигомеризации белка формируются каналоподобные структуры диаметром до 4 нм, что позволяет специальной фракции цитохрома C, не вовлеченного в перенос электрона в дыхательной цепи, покинуть межмембранное пространство митохондрий и, как уже упоминалось выше, связавшись с белком APAF-1 и дезоксиАТФ, запустить апоптотический каскад (рис. 4).

Таким образом, p53 зависимая индукция белков Bax/Bid и репрессия Bcl-2 приводит к подавлению опухолевого роста посредством апоптотической гибели клетки при наличии в последней достаточного количества АТФ, необходимого для перестройки цитоскелета и мембран для формирования апоптотических телец.

Альтернативный путь выхода цитохрома C последующей индукцией апоптоза реализуется при возникновении неспецифической транзитной поры (PTP pore – permeability transition pore). Феномен открытия мегаканала, достаточного для выхода белков из митохондрии наблюдается при перегрузке митохондрий ионами  $Ca^{2+}$  (Mazure N., 2017). Процесс носит экспоненциальный характер – на начальном этапе через небольшой канал в матрикс митохондрии начинает поступать вода (концентрация белка в матриксе значительно выше, чем в цитозоле) в результате чего растет онкотическое давление, направленное наружу. Это приводит к резкому набуханию митохондрии, расправлению крист и разрыву внутренней мембраны, площадь которой существенно больше таковой для внешней мембраны (рис. 5). Интересно, что выход цитохрома C также носит двуступенчатый характер - сначала, как и при индукции Bax, выходит фракция белка, сосредоточенного в участках связывания проапоптогенов, а далее происходит массовый выброс. Подобная последовательность позволяет предположить регулируемый характер выброса цитохрома на ранней стадии процесса.

Для реализации феномена PTP необходимо формирование белок-белкового комплекса сложного состава. Минимальной единицей, необходимой для открытия поры, является гетеродимер VDAC1 с транслокатором адениновых нуклеотидов из внутренней мембраны митохондрий, осуществляющим обмен цитозольного АДФ на митохондриальный АТФ. Однако, оказалось, что с этими мембранными белками, выполняющими роль платформы, связываются цитозольный белок гексокиназа, катализирующий первую реакцию гликолиза (Azoulay-Zohar H. et al., 2004) и межмембранная креатинкиназа, фосфорилирующая креатин за счет митохондриального АТФ. Помимо такого функционального сопряжения энергопреобразующих процессов, эти белки, обладающие симметричной олигомерной структурой, стабилизируют структуру комплекса транслокатора и VDAC1, затрудняя открытие поры и ставя его в зависимость от своего состояния. При распаде олигомеров на димеры и мономеры происходит ослабление ингибирующего действия на PTP, а реассоциация в олигомер зависит от того насколько могут быть повреждены участки белков, ответственные за взаимодействие в составе комплексов. Стоит отметить, что эффективность взаимодействия олигомеров этих ферментов с мембранными белками также находится в зависимости от состояния VDAC1

и транслокатора. Для последнего это способность связывать адениновые нуклеотиды, в то время как состояние VDAC1 модулируется его соседом – еще одним белком внешней мембраны – PBR, отвечающим за транспорт холестерина, стероидных гормонов и гема между митохондрией и цитозолем (Gatliff J., Campanella M., 2015).

Отметим, что связывание гексокиназы на поверхности митохондрии с VDAC1 потенциально приводит к конкуренции с Вах/Вак за эти обогащенные холестерином участки мембраны, в которых локализованы каналоформер и PBR (Veenman L. et al., 2008) (рис. 5). Важно, что сродство антиапоптотического белка Bcl-2 к этим же участкам выше, чем у родственных ему Вах и Вак. Таким образом, прочность связывания гексокиназы не только напрямую контролирует эффективность индукции апоптоза при действии проапоптогенов, но и опосредованно – через формирование участка связывания ингибитора апоптоза Bcl-2, снижая вероятность выхода цитохрома С.

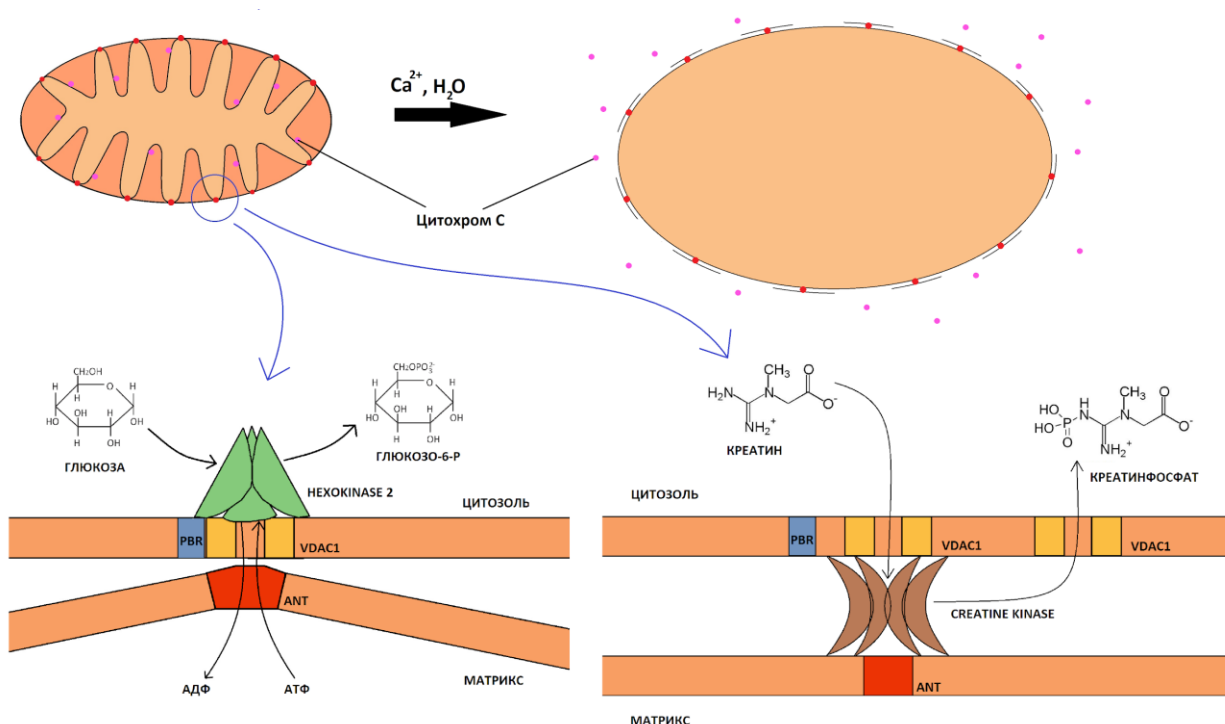


Рис. 5. Белковые комплексы на поверхности митохондрий. Повышение концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке приводит к образованию пор PTP, через которые в матрикс митохондрии начинает поступать вода. В связи с тем, что площадь внутренней мембраны сильно больше площади внешней, последняя разрывается, однако частично остается связанной с внутренней мембраной в местах скопления белковых комплексов с VDAC1. Это могут быть комплексы с гексокиназой (слева) или комплексы с креатинкиназой (справа). В первом варианте гексокиназа связывается с каналом VDAC1, что позволяет ей использовать образующийся в митохондрии АТФ и отдавать обратно АДФ. В роли транспортера АТФ наружу и АДФ внутрь митохондрии выступает белок ANT, находящийся на внутренней мембране. При втором варианте VDAC1 оказывается связанным с митохондриальной креатинкиназой. Креатинкиназа осуществляет реакцию превращения креатина в креатинфосфат, перенося молекулу фосфата с АТФ на креатин, и потому со стороны внутренней мембраны митохондрии она также

*взаимодействует с ANT, поставляющим ей АТФ.*

Хотя непосредственная причина открытия РТР – это повышение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле и накопление кальция в матриксе митохондрий, этому событию предшествует снижение уровня внутриклеточного АТФ, приводящее к замедлению откачки  $\text{Ca}^{2+}$  из цитозоля цистерны ЭПР. В свою очередь, падение уровня АТФ определяется снижением активности синтеза АТФ в митохондриях, то есть падением эффективности окисления субстратов и, в конечном итоге снижением мембранного потенциала митохондрий. Причиной снижения эффективности окисления субстратов митохондриями являются изменения в белках - компонентах комплексов дыхательной цепи, появляющиеся вследствие накопления мутаций в соответствующих генах при генотоксическом стрессе. В клетке существует механизм распознавания таких митохондрий с критично поврежденной дыхательной цепью, которые уже не способны эффективно окислять субстраты и поддерживать мембранный потенциал на уровне, достаточном для синтеза АТФ. Распознавание и уничтожение поврежденных митохондрий, потенциально способных привести клетку к апоптозу через открытие РТР и выход цитохрома С в ответ на перегрузку кальцием, реализуется при помощи каскада реакций, в совокупности формирующих систему контроля качества митохондрий. На первой стадии длинные митохондрии при помощи специального белка, относящегося к семейству ГТФаз – DRP1 (dynamin related protein) нарезаются на фрагменты. Вследствие случайного характера распределения в полученных фрагментах поврежденных и неповрежденных комплексов дыхательных цепей, эти небольшие митохондрии в итоге имеют разный мембранный потенциал, что позволяет произвести селекцию по этому признаку при помощи специальной группы белков, распознающих и транспортирующих такие митохондрии в специальные органеллы транзитного типа – аутофагосомы. Аутофагосомы – это органеллы везикулярного типа, изолирующие поврежденные молекулы и их агрегаты, внутриклеточные структуры и целые органеллы, потерявшие способность выполнять свои функции. После заключения поврежденных структур в везикулу, аутофагосома сливается с лизосомой и их общее содержимое подвергается воздействию протеаз при низком рН и участии других компонентов, разрушающих мембраны. При высоком уровне повреждения клеточных структур реализуется не только микроаутофагия с уничтожением поврежденных органелл, но и макроаутофагия с лизисом всей клетки, представляя собой третий распространенный тип клеточной гибели и способ поддержания тканевого гомеостаза.

Митохондрии, прошедшие систему контроля качества, далее интегрируются в друг с другом в крупные кластеры путем слияния, опосредованного двумя другими белками, также относящимися к ГТФамам – Mfn1 (митофузин 1) отвечает за слияние внешней мембраны и OPA1 (optic atrophy, дефицит по этому белку вызывает атрофию зрительного нерва и слепоту) – за слияние внутренней мембраны. В итоге работы системы контроля качества и ремоделинга митохондриальной системы формируется новое состояние клетки, отличающееся снижением доли митохондрий, потенциально способных к индукции гибели клетки путем реализации РТР и апоптоза, что и происходит при достижении клеткой нижнего порога соответствия состояния органелл и клеточных систем способности выполнять свои функции.

В случае здоровой ткани старые или плохо выполняющие свои функции клетки непрерывно заменяются на новые, чаще всего происходящие из дифференцированных стволовых. Клеточный цикл таких клеток налажен, они делятся и функционируют строго под контролем белков-регуляторов. При нарушении баланса систем контроля у отдельных клеток иммунная система, соседние клетки или сама клетка запускают программы клеточной гибели, а стволовые клетки делятся с последующей дифференцировкой в недостающие компоненты ткани.

В недифференцирующейся и пролиферирующей клетке, избегающей уничтожения иммунной системой или в результате индукции запрограммированной клеточной гибели, реализуется стратегия выживания, направленная на выключение митохондрий как платформы индукции апоптоза. Как мы можем предположить из приведенных фактов, для этого необходимо не только провести процедуру контроля качества состояния митохондрий, но и как-то зафиксировать ситуацию сохранения состояния митохондрий, не способных открывать пору или отвечать на проапоптогены. Известно, что при работе дыхательной цепи происходит образование свободных радикалов кислорода, обладающих способностью повреждать белки и липиды. Следовательно, снижение активности дыхания минимизирует риск повреждения митохондрий при условии функционирования механизма контроля качества. Однако, известно, что митохондрии являются основным местом синтеза АТФ в клетке, поэтому снижение активности митохондрий приведет к дефициту так необходимой для пролиферации и инвазии свободной энергии.

В большинстве случаев раковые клетки переходят на гликолиз как основной источник энергии (*Lopez-Lazaro M. 2008*), и для этого повышают экспрессию гликолитических ферментов, чтобы покрыть возросшую потребность в энергии (для деления, движения, секретирования и работы помп mDR). Образующиеся в процессе гликолиза НАДН окисляются до НАД<sup>+</sup> в дополнительной реакции превращения пирувата в лактат, осуществляемой лактатдегидрогеназой. Это необходимо потому, что при возрастающей эффективности гликолиза все молекулы НАД<sup>+</sup> восстановятся до НАДН и гликолиз остановится. В то же время, лактат закисляет среду клетки, и поэтому опухолевая клетка с помощью оверэкспрессии лактатных транспортеров выбрасывает его во внешнюю среду, где лактат поглощают здоровые клетки и преобразуют в пируват.

Однако недостаток НАД<sup>+</sup> – не единственная проблема клетки с высоким уровнем экспрессии гликолитических ферментов. Один из ферментов гликолиза, фосфофруктокиназа, ингибируется при высокой концентрации АТФ (*Альбертс Б. и др., «Молекулярная биология клетки», 2018*), тем самым блокируя дальнейший гликолиз. Для предотвращения остановки гликолиза необходимо создать определенный буфер, который позволит переносить энергию АТФ на другое соединение, не теряя ее. Таким буфером выступает креатиновый челнок.

Креатиновый челнок состоит из трех главных участников: митохондриальной креатинкиназы, цитозольной креатинкиназы и соединения креатина. Креатин – азотсодержащая карбоновая кислота, своеобразная клеточная валюта, находящаяся преимущественно в мозговой и мышечной ткани. Креатин является субстратом для фермента креатинкиназы.

Креатинкиназа (код фермента 2.7.3.2) – это фермент, катализирующий обратимую реакцию образования фосфокреатина из креатина и АТФ.



Тем самым уровень АТФ в клетке не превышает барьера ингибирования ФФК, а количество энергии, доступной для клетки значительно выше, так как часть ее конвертирован в фосфокреатин, образуя энергетический буфер, поскольку ферменты не ингибируются этим соединением. Также фосфокреатин быстрее диффундирует в клетке в связи с меньшим по сравнению с молекулами АТФ размером.

Существует два типа креатинкиназ: цитозольная и митохондриальная. Цитозольный фермент креатинкиназа представляет собой белок-димер с четвертичной структурой и имеет несколько изоформ: СК-ВВ (от «brain»), СК-ММ (от «muscles») и СК-МВ (смешанная форма). Митохондриальная же креатинкиназа является октамером и также имеет изоформы, а именно “общую” umtСК (“ubiquitous”), которая находится во всех клетках, и саркомерную smtСК (“sarcomeric”), находящуюся в мышечных клетках. Октамер митохондриальной креатинкиназы благодаря своей структуре связывается с внешней и внутренней мембраной, тем самым образуя «жесткую конструкцию» удерживая внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий в определенной форме.

В митохондрии креатинкиназа располагается в межмембранном пространстве. В норме она связана с другими белками, в том числе с неспецифичным каналом во внешней мембране, – белком VDAC1, переносящем в межмембранное пространство в том числе молекулы креатина и в цитозоль молекулы креатинфосфата, а также с белком ANT, переносчиком АТФ в межмембранное пространство из матрикса, и с сопряженным переносом АДФ из межмембранного пространства в матрикс (*Schlattner, U., Kay, L., & Tokarska-Schlattner, M., 2018*).

В опухолевой клетке в связи с превращением большей части пирувата в лактат активность окислительного фосфорилирования падает, в результате чего в меньших количествах образуются активные формы кислорода (АФК).

Активные формы кислорода обычно нарушают работу митохондриальной креатинкиназы. MtСК, будучи октамером, в межмембранном пространстве под действием АФК распадается на димеры, которые впоследствии окисляются. Следовательно, при низком уровне образования АФК продуктивность креатинкиназы возрастает.

Опухолевым клеткам необходимо сохранить митохондрии с находящейся в них креатинкиназой, и для этой цели они увеличивают динамику слияния и разделения митохондрий. Для этой цели клетки используют несколько белков: DRP1, который разделяет митохондрии, а также Mfn1 (митофузин 1) и OPA1, задействованные в слиянии митохондрий в длинные нити (*Chan, D. C., 2006*). Тем самым, активно сливая и разделяя митохондрии, раковая клетка способна избегать митофагии и сохранять креатиновый челнок, поскольку “контроль” не успевает уследить за митохондриями.

Для того, чтобы митохондрии ускоренно сливались и делились, другой mitoфузин Mfn2,

также находящийся на внешней мембране митохондрий, прикрепляется к эндоплазматическому ретикулуму, что позволяет удерживать фрагментированные митохондрии рядом для их последующего слияния. Однако предположительно экспрессия Mfn2 не должна измениться в раковых клетках, поскольку этот процесс происходит и в здоровых клетках.

Трансмембранный белок OPA1 имеет выходящую в матрикс структуру, связывающую митохондриальную ДНК (*Elachouri, G. et al., 2010*). К этой митохондриальной ДНК может также присоединиться белок TFAM, активирующий транскрипцию и репликацию митохондриальной ДНК. Как уже упоминалось выше, именно состояние мтДНК, контролирующее митохондриальные белки, будет определять эффективность работы дыхательной цепи, величину мембранного потенциала и вероятность апоптоза после индукции по пути открытия РТР. Следовательно, при увеличении темпов фрагментации митохондрий и их селекции, также необходимо увеличить скорость репликации мтДНК, в связи с чем важен контроль экспрессии белка TFAM.

В связи с вышеизложенным была поставлена задача исследования профиля экспрессии группы ключевых белков, контролирующих метаболизм опухолевой клетки – гексокиназы Hex2 и креатинкиназы митохондрий (mtCK), белков, контролирующих способность к индукции запрограммированной клеточной гибели – Bcl-2, p53, Bax, а также белков, контролирующих состояние митохондрий VDAC1, PBR, DRP1, Mfn2, OPA1, TFAM1.

## Методы исследования

Предметом нашего исследования стали несколько белков, а именно p53, Bcl-2, mtCK, Mfn2, OPA1, Drp1, Hex2, TFAM, VDAC, PBR.

У нас были парные пробы нормальной и опухолевой ткани женщин с различными видами рака, такими как рак молочной железы, рак тела матки и рак шейки матки (табл. 1). Мы измеряли экспрессию генов этих белков на стадии РНК и белка в парах нормальных и опухолевых клеток, используя метод Вестерн-блоттинга, а также ПЦР в реальном времени на гены *TP53* и *Bcl-2*.

Табл. 1. Число пар образцов нормальной и опухолевой ткани женщин с различными типами рака. От каждой пациентки брали часть опухолевой и часть нормальной ткани.

	Рак молочной железы	Рак тела матки	Рак шейки матки
Число пар образцов нормальной и опухолевой ткани	14	5	4

## Выделение РНК

Для выполнения работы использовали образцы тканей рака молочной железы, рака шейки матки и рака тела матки из коллекции, предоставленной лабораторией. Для выделения РНК мы использовали только часть перетертой ткани. Выделение РНК происходило по протоколу. [1]

А именно: пробы тканей гомогенизировали в реагенте Extract RNA фирмы Евроген в соотношении 1 мл реагента на 100 мг ткани, а затем инкубировали их при комнатной температуре 10 минут. После чего центрифугировали лизат 10 минут при температуре +24 °С на 15 000 g и полученный супернатант перелили в новые пробирки. Затем мы добавили к пробам хлороформ в расчете 0,2 мл хлороформа на 1 мл реагента, вручную перемешали, и после пятиминутной инкубации поместили в центрифугу на 12 000 gcf при +4 на 15 минут. В ходе центрифугирования смеси разделились на три фазы: нижнюю фенол-хлороформную фазу желтоватого оттенка, среднюю белковую фазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу, в которой находится РНК. Мы отобрали верхнюю фазу, добавили по 0,5 мл изопропилового спирта на 1 мл реагента, использованного в начале, инкубировали смеси 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали в течении 10 минут на 12 000 gcf при +25 °С. В результате на дне пробирок оказался белый осадок - РНК, который мы оставили в пробирках, отобрав супернатант и добавив 2 мл 75% этанола на 1 мл использованного изопропанола. Далее мы центрифугировали пробирки с РНК в течение 5 минут на максимальной скорости при комнатной температуре, удалили этанол, оставили осадок РНК сушиться в течении 7 минут, разбавили mQ и поставили в термостат на +55 °С на 5 минут.

## Определение концентрации нуклеиновых кислот

Для определения концентрации мы использовали Implen Nanophotometer N60 touch. Пред использованием и после использования прибора мы промывали головку mQ.

## Обратная транскрипция

Для того, чтобы в дальнейшем поставить ПЦР, нам требовалось получить ДНК из РНК. Для этого мы использовали нуклеотиды (dNTPs), рандомные праймеры, обратную транскриптазу MMLV, 5x буфер, DTT и воду, свободную от РНКаз от Еврогена. Действуя по протоколу, мы смешали РНК, воду и праймеры и поставили в термостат при +70 °С на две минуты и поместили в лед. Далее мы добавили к стоку смесь нуклеотидов, буфера, DTT, воды и ревертазы и отправили пробы в амплификатор (термостат), где пробы 40 минут стояли при 40 °С, а после 10 минут при 70 °С. Полученные образцы ДНК мы хранили в холодильнике при температуре -20 °С.

## ПЦР

Мы ставили ПЦР в реальном времени на основе полученной ранее кДНК наших образцов.

Для измерения флуоресценции мы использовали краситель SYBR Green. Также нам понадобились полимеразы, праймеры (forward и reverse) на интересующие нас гены, буфер и нуклеотиды (dNTPs) [3].

Программа, выставленная на амплификаторе, отображена в табл. 2.

Табл. 2. Температурная программа амплификатора для проведения ПЦР в реальном времени. Фаза 2 повторялась 30 циклов.

	1	2.1	2.2	2.3	3	4
t, °C	95,0 °C	94,0 °C	60,0 °C	67,0 °C	95,0 °C	10,0 °C
Время, min	5:00	0:10	0:20	0:15	0:15	Хранение

## Вестерн-блот

Для определения количества белка в клетках мы использовали метод Вестерн-блот. Суть данного метода заключается в том, что смесь белков в SDS, выделенных из образца, проходит электрофорез, а затем эти белки переносятся на нитроцеллюлозную мембрану, после чего нитроцеллюлозная мембрана обрабатывается антителами на интересующий нас белок.

Образцы ткани для проведения Вестерн-блота промывают в PBS, замораживают в жидком азоте и хранят на -80. Для того, чтобы сделать смесь белков для электрофореза, образец ткани перетирают в ступке в жидком азоте до состояния песка. Затем к 100 мг песка добавляют 1 мл RIPA (100 mM NaCl; 1% Triton x100; 0,5% дезоксихолат Na; 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0), гомогенизируют при помощи стержней и обрабатывают ультразвуком на льду (3 пульса). Далее концентрацию белков в пробе измеряют на спектрофотометре (mg/ml), добавляют трехкратный SB (10% глицерин; 1% SDS; 0,0625 M Tris-HCl; 5%  $\beta$ -mercaptoethanol; 0,05% бромфенол синий) и помещают на 5 минут в термостат при 65 °C.

Полученные образцы прошли электрофорез в полиакриламидном геле в ЭФ буфере (0,025M Tris; 0,192M глицин; 0,1% SDS), а после мы провели электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану в CAPS (10 mM CAPS; 10% EtOH; pH 11) под действием электрического тока.

Нитроцеллюлозную мембрану с нанесенными на нее белками мы поместили на 10 минут в уксусную кислоту, а затем в краситель Ponceau S (0,3% Ponceau S; 1% Acetic acid) для проявления белков. Затем мы 3 раза прокачали мембраны на качалке, чтобы смыть лишний краситель в 1x TBST (NaCl 137 mM; Tris 19 mM; 0,001% Tween 20). После этого мы обработали мембраны смесью содержащей пероксидазу хрена HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit от компании Invitrogen. Хемилюминесценцию мы измеряли в хемилюминесцентном детекторе ChemiDoc MP Imaging System от компании Bio-Rad.

Анализ хемилюминесценции белков проводился в программе ImageLab, в качестве нормирующего белка мы использовали тубулин.

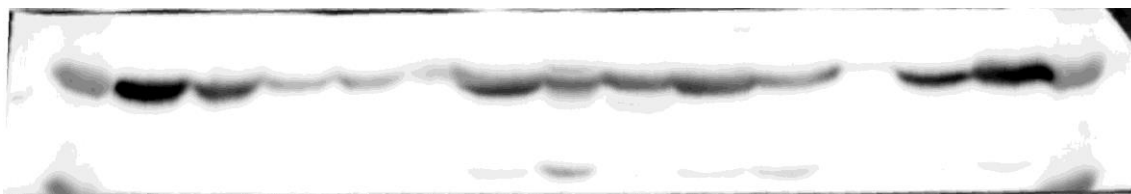


Рис. № 6. Пример хемиллюминесценции окрашенной нитроцеллюлозной мембраны на тубулин (нормирующий белок). Слева и справа находится маркер, обозначающий примерное расположение белков массой 55 кДа.

Поскольку мы имели две группы, нормальную и опухолевую ткань одного и того же пациента, наши измерения были парными и мы сравнивали значения в первой и второй группе для каждой женщины.

Мы использовали язык программирования R для обработки и визуализации полученных нами данных.

## Результаты исследования

Всего мы поставили ПЦР в реальном времени на *TP53* и *Bcl-2*, а также Вестерн-блот на p53, Bcl-2, mtCK, OPA1, DRP1, TFAM, Mfn2, VDAC, Hex2 и PBR.

### ПЦР в реальном времени

В качестве нормирующего белка мы использовали актин.

Мы использовали критерий Вилкоксона для зависимых выборок для проверки различий в транскрипции генов *TP53* и *Bcl-2* в раке молочной железы, но статистически достоверной разницы не обнаружили ( $p = 0,148$  и  $0,13$  соответственно).

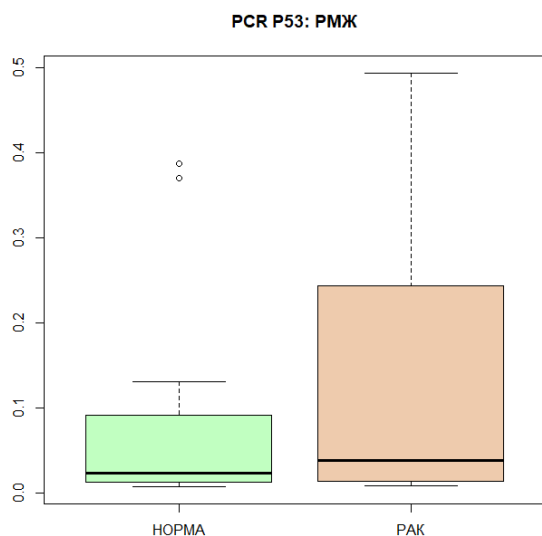


Рис. № 7. Диаграмма размаха количества РНК *TP53* в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,148$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

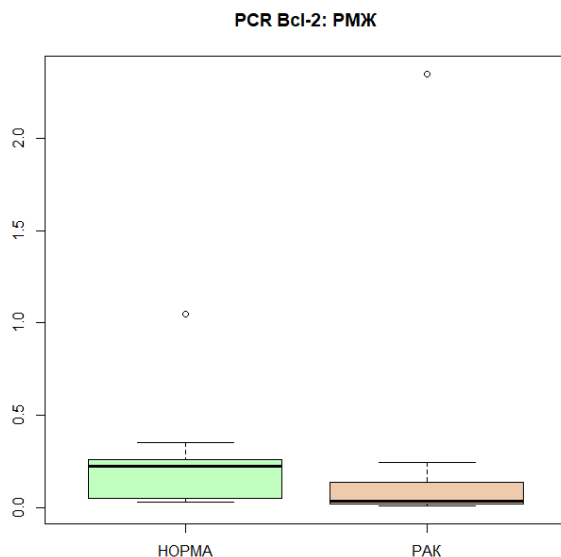


Рис. № 8. Диаграмма размаха количества РНК Bcl-2 в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,13$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## Вестерн-блот

В качестве нормирующего белка мы использовали тубулин.

Мы также использовали парный критерий Вилкоксона для сравнения данных. Поскольку мы анализировали по-отдельности каждый тип рака, не каждый белок попал во все три вида рака из-за недостаточного количества данных.

В целом мы обнаружили повышенную экспрессию белков Bcl-2 (рак молочной железы,  $p = 0,0001$ ), mtCK (рак молочной железы,  $p = 0,033$ ; рак тела матки,  $p = 0,031$ ), OPA1 (рак молочной железы,  $p = 0,0001$ ), DRP1 (рак молочной железы,  $p = 0,0005$ ), TFAM (рак тела матки,  $p = 0,047$ ), VDAC (рак молочной железы,  $p = 0,0002$ ), Hex2 (рак тела матки,  $p = 0,031$ ), PBR (рак молочной железы,  $p = 0,005$ ). Результаты изменения относительного количества белков в общем виде отображены в табл. 3.

Поскольку мы анализировали по-отдельности каждый тип рака, каждый белок не попал во все три вида рака из-за недостаточного количества данных.

Табл. 3. Изменение относительного количества исследуемых белков в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью. В таблице отображены изменения по каждому типу рака. ↑ – повышенное количество белка в опухолевой ткани, = – количество белка в опухолевой ткани не изменилось.

Белки	Рак молочной железы	Рак тела матки	Рак шейки матки
Bcl-2	↑		=
mtCK	↑	↑	=
VDAC	↑	Нет данных	Нет данных
Hex2	Нет данных	↑	=
OPA1	↑	Нет данных	Нет данных
Drp1	↑	Нет данных	Нет данных
TFAM	Нет данных	↑	=
Mfn2	Нет данных	=	=
PBR	↑	Нет данных	Нет данных

## Mfn2

Мы рассматривали по этому белку клетки рака шейки матки и рака тела матки. Но достоверных изменений количества белка обнаружено не было ( $p = 0,1875$  и  $p = 0,3750$  соответственно). (см. приложения, рис. № 17.)

## mtCK

Мы рассматривали данный белок в трёх видах рака и увидели изменение в количестве белка в пользу опухолевых клеток в случае рака молочной железы ( $p = 0,0327$ ), а также в случае рака тела матки ( $p = 0,0313$ ). В случае же рака шейки матки значительных изменений не наблюдалось ( $p = 0,3125$ ). (см. приложения, рис. № 18.)

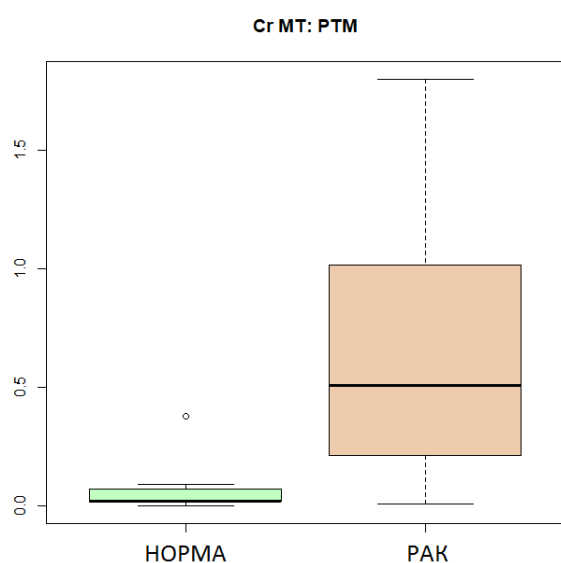


Рис. № 9. Диаграмма размаха количества белка mtCK (Cr MT) в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0313$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## DRP1

Рассмотрение этого белка было возможным лишь по раку молочной железы из-за недостатка статистических данных. В данном виде рака мы наблюдали изменение в количестве белка в опухолевых клетках ( $p = 0,0005$ ).

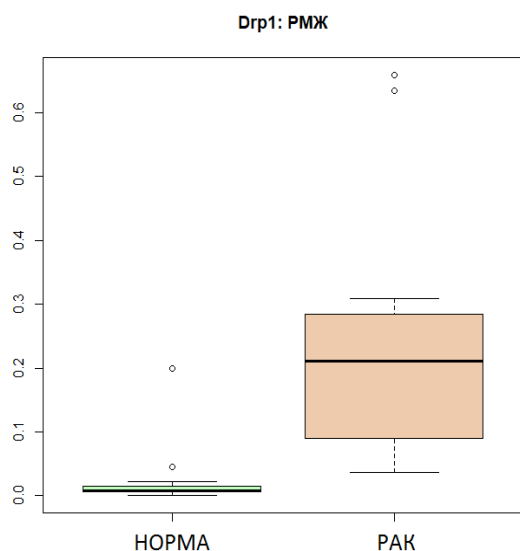


Рис. № 10. Диаграмма размаха количества белка *DRP1* в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0005$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## Hex2

Рассмотрение данного белка не проходило по раку молочной железы в виду недостатка статистических данных. Было обнаружено изменение количества белка в опухолевых клетках рака тела матки ( $p = 0,0313$ ). Изменение в клетках рака шейки матки недостоверно ( $p = 0,1563$ ). (см. приложения, рис. № 19.)

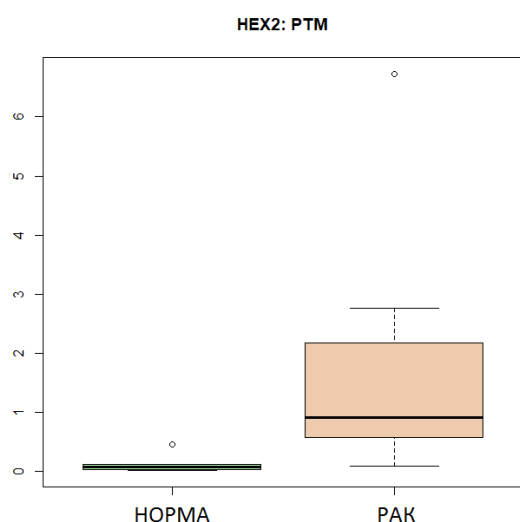


Рис. № 11. Диаграмма размаха количества белка *Hex2* в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0313$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## Вс1-2

Рассматривая этот белок во всех трех видах рака, мы увидели изменения в экспрессии в пользу опухоли только в случае рака молочной железы ( $p = 0,0001$ ), в остальных же случаях статистически значимых различий не наблюдалось (рак шейки матки:  $p = 0,69$ ; рак тела матки:  $p = 0,69$ ). (см. приложения, рис. № 20.)

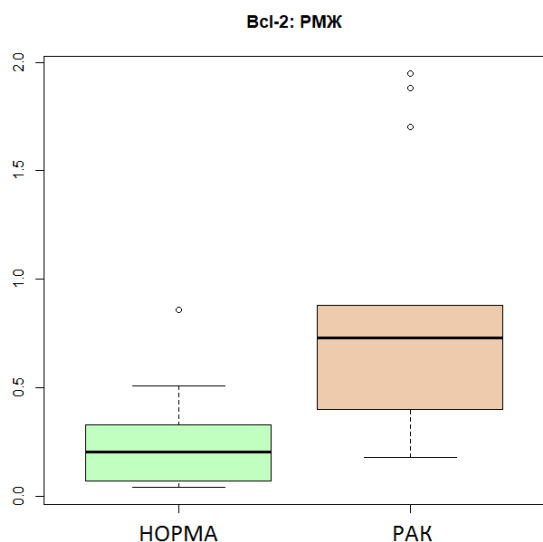


Рис. № 12. Диаграмма размаха количества белка Вс1-2 в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0001$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## ОРА1

Данный белок мы рассматривали лишь в клетках рака молочной железы из-за недостатка статистических данных. Было обнаружено изменение количества белка в опухолевых клетках ( $p = 0,0001$ )

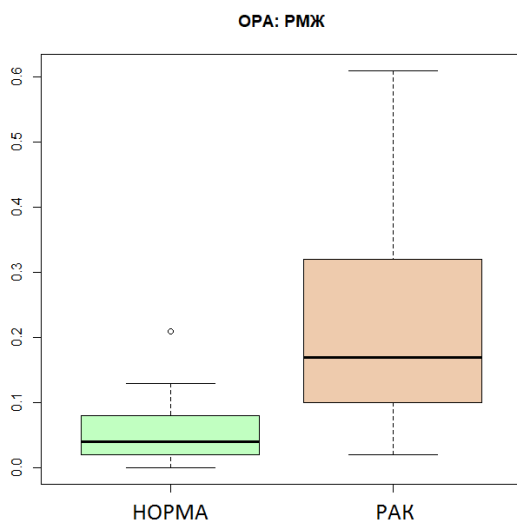


Рис. № 13. Диаграмма размаха количества белка ОРА1 в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0001$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## PBR (TSPO)

Рассмотрение этого белка было возможным лишь по раку молочной железы из-за недостатка статистических данных. В данном виде рака мы наблюдали изменение в количестве белка в опухолевых клетках ( $p = 0,0049$ ).

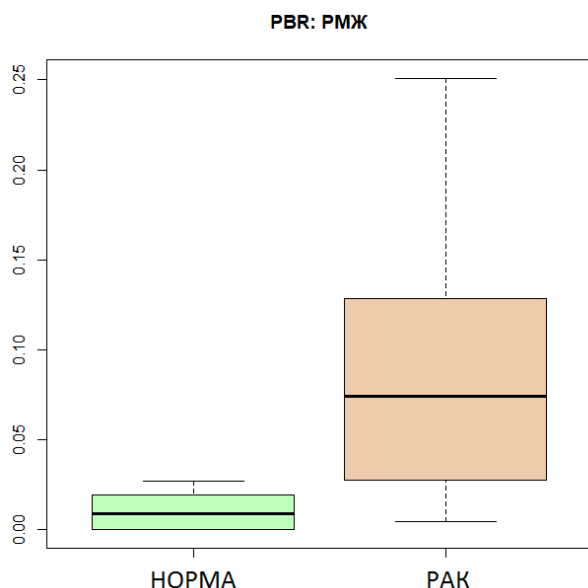


Рис. № 14. Диаграмма размаха количества белка PBR в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0049$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## TFAM

Рассмотрение данного белка не проходило по раку молочной железы в виду недостатка статистических данных. Было обнаружено изменение количества белка в опухолевых клетках рака тела матки ( $p = 0,0469$ ). Изменение в клетках рака шейки матки недостоверно ( $p = 0,1563$ , рис. 21).

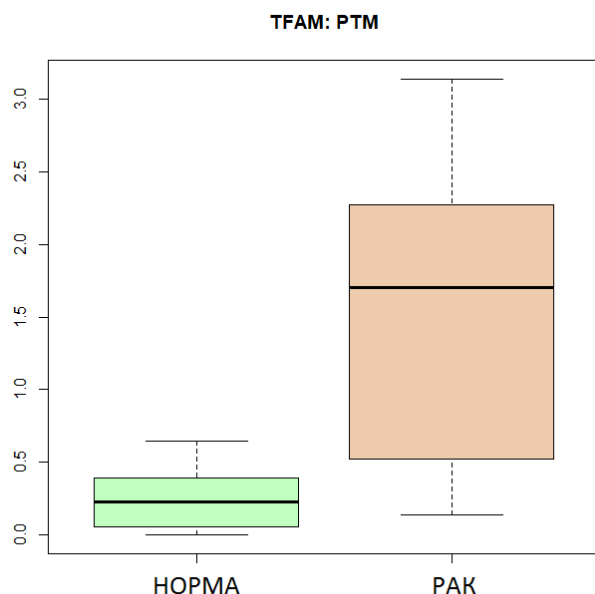


Рис. № 15. Диаграмма размаха количества белка TFAM в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0469$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## VDAC

Данный белок, в виду недостатка статистических данных мы рассматривали только по одному виду рака. В итоге были найдены изменения в количестве белка в опухолевых клетках рака молочной железы ( $p = 0,0002$ ).

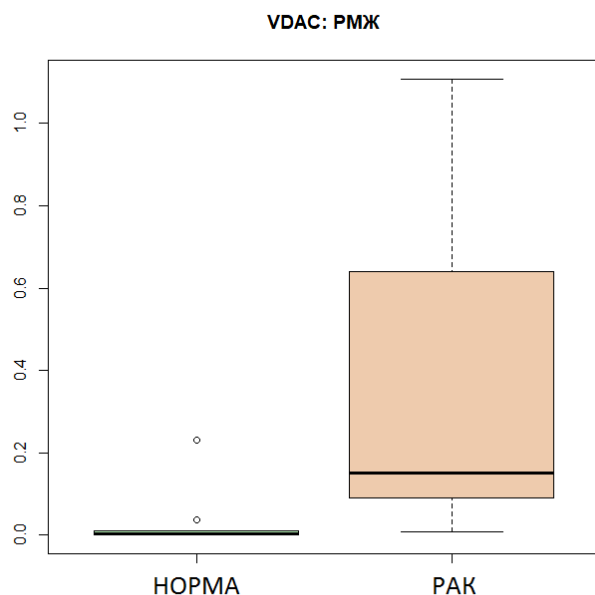


Рис. № 16. Диаграмма размаха количества белка VDAC в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0002$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

## Обсуждение результатов

Нами было обнаружено повышение относительной экспрессии следующих белков при раке молочной железы: Bcl-2, mtCK, OPA1, DRP1, VDAC, PBR. А также повышение экспрессии белков mtCK, Hex2, TFAM в раке тела матки. Экспрессия Mfn2 ни в одном из типов опухолей (рак тела матки, рак шейки матки) не изменялась по сравнению с группой нормы.

Хотя нормальные здоровые клетки способны запускать апоптоз при повреждениях ДНК, раковые клетки этого избегают, тем самым поддерживая неограниченный рост опухоли. В них повышается экспрессия белка Bcl-2, ответственного за формирование гетеродимера с Bax - белком, формирующим во внешней мембране митохондрий пору для выхода цитохрома C. Известно, что при индукции апоптоза белок p53 понижает экспрессию Bcl-2, изменяя уровень его транскрипции, однако мы не наблюдали изменение экспрессии p53 в раковых клетках по сравнению с группой «норма». Можно предположить, что наблюдаемое нами повышение количества белка Bcl-2 в выбранных нами для исследования опухолях не регулируется напрямую экспрессией p53. Вместе с тем, по данным ПЦР мы не обнаружили изменения транскрипции Bcl-2 - это, по всей видимости, свидетельствует о том, что повышение количества данного белка в клетках происходит за счет изменения времени его полужизни или (и) регулируется на пост-трансляционном

уровне.

Повышенная экспрессия гексокиназы Hex2 в раковых клетках говорит о том, что гликолиз в них протекает активнее, т.к. гексокиназа катализирует первую реакцию, “задавая темп” всему процессу. В связи с этим повышается экспрессия и митохондриальной креатинкиназы mtCK, фосфорилирующей молекулы креатина за счет переноса фосфатной группы с АТФ, поскольку иначе повышенная концентрация АТФ будет ингибировать другой фермент гликолиза - фосфофруктокиназу.

Мы также наблюдали повышенное количество белка-канала во внешней мембране митохондрий VDAC. Этот белок отвечает за транспорт метаболитов из цитозоля в межмембранное пространство митохондрии и наоборот. В частности, он переносит креатин в митохондрии и креатинфосфат в цитозоль, а поскольку реакция превращения креатина в креатинфосфат протекает чаще, можно предположить, что одной из причин повышенной экспрессии VDAC является потребность в транспорте молекул креатина и креатинфосфата.

Помимо этого, VDAC связан и с апоптозом. Один из путей индукции апоптоза путем выхода цитохрома С - формирование РТР поры из VDAC и ANT - белка-антипортера АТФ/АДФ на внутренней мембране митохондрий. Их связывание вызывает образование поры, сквозь которую проходит вода в матрикс (поскольку концентрация белков в матриксе сильно больше) и в результате внешняя мембрана митохондрий разрывается и цитохром С выходит наружу. Однако для предотвращения связывания VDAC и ANT вышеупомянутые Hex2 и mtCK стабилизируют весь комплекс. Так, гексокиназа связывается с VDAC с внешней стороны митохондрий, не позволяя ему связываться с транслокатором и в то же время конкурируя с про-апоптотическим белком Bax, а митохондриальная креатинкиназа удерживает VDAC и ANT в межмембранном пространстве. Таким образом, повышенное количество Hex2 и mtCK можно связать не только с непосредственно осуществляемыми ими реакциями, но и с поддержанием нормальной структуры белков на внешней и внутренней мембране митохондрий, тем самым блокируя апоптоз, как и Bcl-2.

Рядом с VDAC локализуется еще один белок, чью повышенную экспрессию в опухолевых клетках мы наблюдали - PBR. Этот белок отвечает за транспорт холестерина, стероидных гормонов и гема между митохондрией и цитозолем, но также помимо прочего модулирует состояние VDAC. Возможно, увеличение количества PBR связано не с его взаимодействием с VDAC, а с выполнением его транспортных функций.

В связи с тем, что в перешедших на гликолитический способ получения энергии клетках практически весь получаемый пируват в конечной реакции преобразуется в лактат, в митохондрии пируват не поступает и окислительного фосфорилирования почти не происходит. Это не только снижает количество образуемых АФК (разрушающих октамер креатинкиназы и тем самым снижающих стабильность VDAC и ANT и, как следствие, вызывающих апоптоз), но и снижает мембранный потенциал митохондрий, обычно создаваемый за счет электрон-транспортной цепи. Митохондрии с пониженным мембранным потенциалом воспринимаются клеткой как дефектные и подлежат митофагии, однако раковая клетка избегает и этого. Наблюдаемая нами повышенная

экспрессия белков, отвечающих за слияние (OPA1) и деление (Drp1) митохондрий в раковых клетках, вероятно, поддерживает динамичность митохондрий, помогая избежать элиминации. В то же время мы не наблюдали изменения количества Mfn2 в раковых клетках. Mfn2 связывает митохондрии с ЭПР, что определяет их локацию. Наши данные согласуются с данными литературы. Так, повышение уровня этих белков слияния/деления митохондрий наблюдали Ferreira-da-Silva, A. et al. (2015) в раковых клетках щитовидки, а Zhao, J. et al. (2012) обнаружили повышенную экспрессию Drp1 в клетках опухоли молочной железы, что коррелировало с метастазированием.

В связи с возросшей активностью деления и слияния митохондрий повышается количество и белка TFAM, связанного с мтДНК и регулирующего репликацию и транскрипцию.

Полученные нами результаты изменения митохондриальных белков свидетельствует о наличии различных механизмов регуляции митохондриального биогенеза, транскрипционной активности мтДНК и гликолиза в разных типах рака.

## **Выводы**

1. Мы наблюдали повышение уровня Bcl-2, mtCK, OPA1, Drp1, VDAC и PBR в клетках рака молочной железы и mtCK, TFAM и Hex2 в раке тела матки. Уровень Mfn2 остался неизменным во всех типах рака.
2. В опухолевых клетках в связи с избеганием апоптоза наблюдалось повышение количества анти-апоптотического белка Bcl-2, а также белков Hex2 и mtCK, предотвращающих формирование РТР.
3. В клетках рака тела матки увеличилась концентрация Hex2, что свидетельствует о повышенной активности гликолиза.
4. В раковых клетках молочной железы увеличилась активность процесса слияния и деления митохондрий, осуществляемого белками OPA1 и Drp1. Mfn2 связывает митохондрии с цистернами ЭПР и его экспрессия осталась на том же уровне.

## **Благодарности**

Мы хотим поблагодарить Сергея Менделевича Глаголева за организацию научной практики в лаборатории, нашего научного руководителя Михаила Юрьевича Высоких за возможность работать на базе лаборатории митохондриальной медицины ФГБУ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова и помощь в написании работы, и нашего рецензента Константина Геннадьевича Лямзаева. Марию Владимировну Марей за организацию нашей работы, Полину Андреевну Вишнякову и Юлию Алексеевну Суханову за обучение методам и помощь с возникавшими вопросами, а также весь рабочий коллектив за дружескую атмосферу. Отдельно хочу поблагодарить Надежду Сергеевну Глаголеву за помощь и поддержку.

## Список литературы и используемых ресурсов

[1]<http://evrogen.ru/kit-user-manuals/extractRNA.pdf>

[2]<https://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?s=n&v=0&id=108067>

[3][http://evrogen.ru/kit-user-manuals/qPCRmix-HS-SYBR\\_PK147.pdf](http://evrogen.ru/kit-user-manuals/qPCRmix-HS-SYBR_PK147.pdf)

Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., & Shoshan-Barmatz, V. (2004). *In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death*. *Biochemical Journal*, 377(2), 347–355

Chan D. (2006). *Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development*. *Cell*, 125(7), 1241–1252

Elachouri G., Vidoni S., Zanna C., Pattyn A., Boukhaddaoui H., Gaget K., Yu-Wai-Man P., Giuseppe Gasparre G., Sarzi E., Delette C., Olichon A., Loiseau D., Reynier P., Chinnery P., Rotig A., Carelli V., Hamel C., Rugolo M., Lenaers G. (2010). *OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution*. *Genome Research*, 21(1), 12–20

Ferreira-da-Silva A., Valacca C., Rios E., Pópulo H., Soares P., Sobrinho-Simões M., Scorrano L., Máximo V., Campello, S. (2015). *Mitochondrial Dynamics Protein Drp1 Is Overexpressed in Oncocytic Thyroid Tumors and Regulates Cancer Cell Migration*. *PLOS ONE*, 10(3), e0122308.

Gatliff J., Campanella M. (2015). *TSPO is a REDOX regulator of cell mitophagy*. *Biochemical Society Transactions*, 43(4), 543–552

Lopez-Lazaro M. (2008). *The Warburg Effect: Why and How Do Cancer Cells Activate Glycolysis in the Presence of Oxygen?* *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(3), 305–312

Mazure, N. (2017). *VDAC in cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 665–673

Nicholson, L. (2016). *The immune system*. *Essays In Biochemistry*, 60(3), 275–301

Schlattner U., Kay L., Tokarska-Schlattner M. (2018). *Mitochondrial Proteolipid Complexes of Creatine Kinase*. *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, 365–408

Veenman L., Shandalov Y., Gavish M. (2008). *VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis*, *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (2008) 199–205

Xu X., Lai Y., Hua Z.-C. (2018). *Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials*. Bioscience Reports, 39(1)

Zhao J., Zhang J., Yu M., Xie Y., Huang Y., Wolff D., Abel P., Tu, Y. (2012). *Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells*. Oncogene, 32(40), 4814–4824

Альбертс Б., Брей Д., Хопкин К., Джонсон А., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уолтер П.. *Основы молекулярной биологии клетки*. 2-е издание. Ред. С.М. Глаголев, Д.В. Ребриков. Москва: Лаборатория знаний, 2016

Кассимерис Л., Лингаппа В.Р., Плоппер Д.. *Клетки по Льюину*. 2-е издание. Пер. И.В. Филлипович. Москва: Лаборатория знаний, 2016

## Приложения

### Графики вестерн-блота

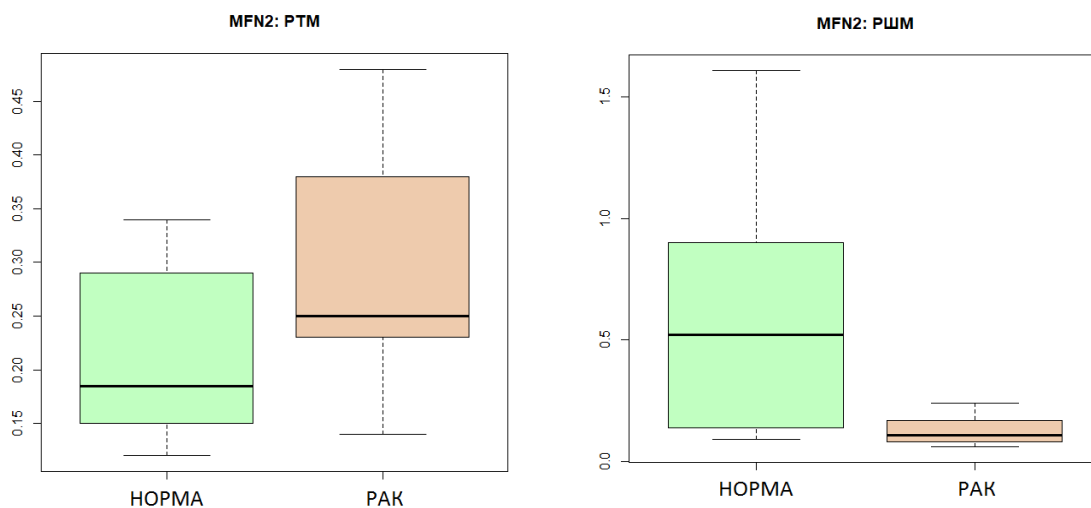


Рис. № 17. Диаграммы размаха количества белка *Mfn2* в нормальной и опухолевой ткани рака тела матки ( $p = 0,1875$ ) слева и рака шейки матки ( $p = 0,3750$ ) справа. На графиках изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

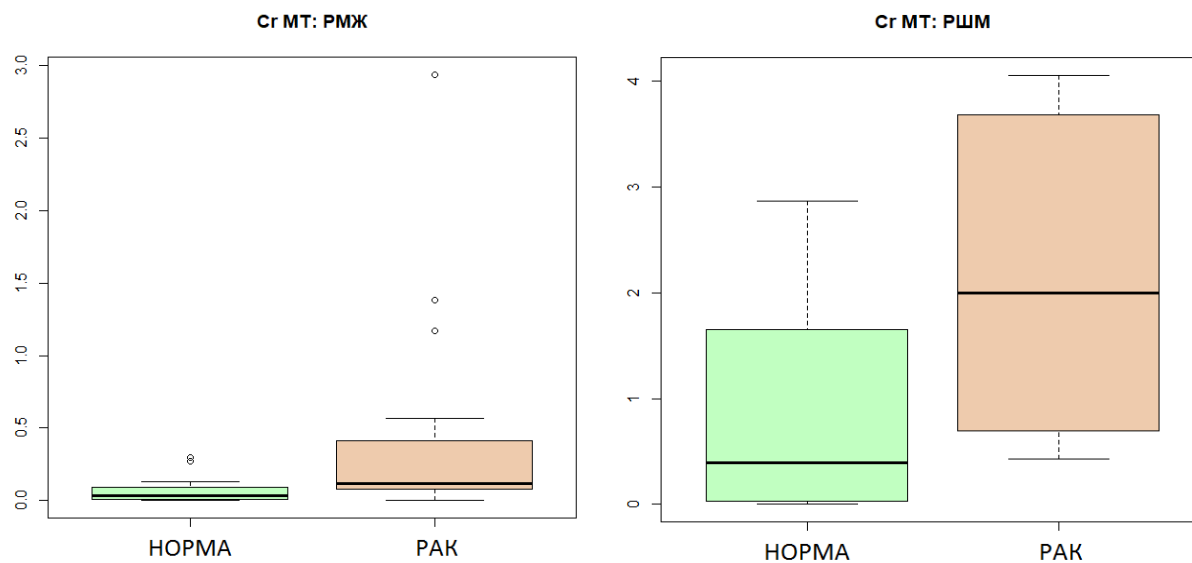


Рис. № 18. Диаграммы размаха количества белка *mtCK* (*Cr MT*) в нормальной и опухолевой ткани рака молочной железы ( $p = 0,0327$ ) слева и рака шейки матки ( $p = 0,3125$ ) справа. На графиках изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

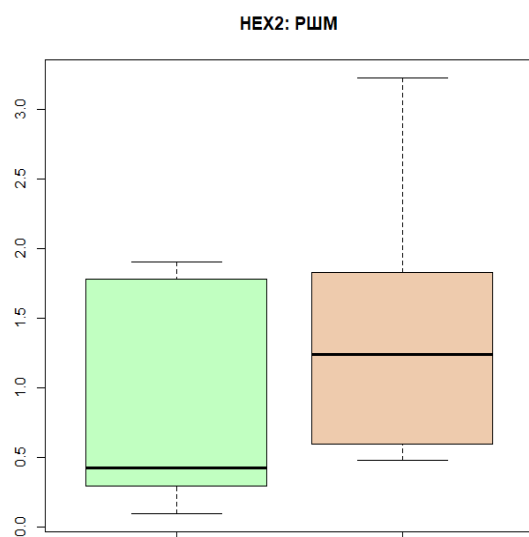


Рис. № 19. Диаграмма размаха количества белка *Hex2* в нормальной и опухолевой ткани рака шейки матки ( $p = 0,0313$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

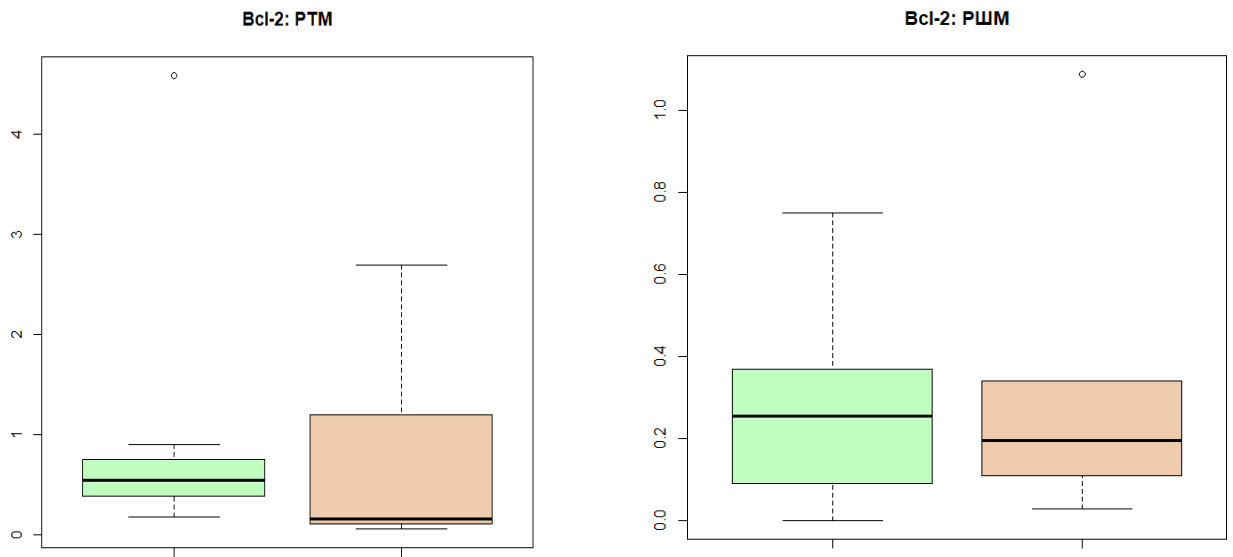


Рис. № 20. Диаграммы размаха количества белка *Bcl-2* в нормальной и опухолевой ткани рака тела матки ( $p = 0,69$ ) слева и рака шейки матки ( $p = 0,69$ ) справа. На графиках изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

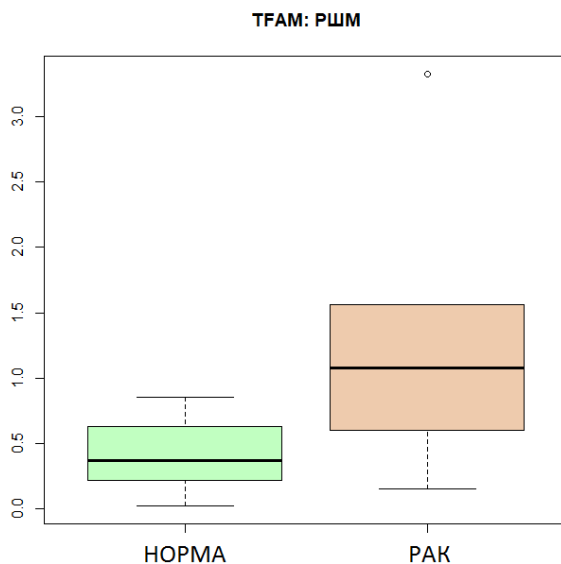


Рис. № 21. Диаграмма размаха количества белка *TFAM* в нормальной и опухолевой ткани рака шейки матки ( $p = 0,1563$ ). На графике изображены медиана, верхний и нижний квартили, максимальные и минимальные значения и выбросы. Левый столбец отображает значение для нормальных клеток, а правый для опухолевых.

