

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.085.23

Действие противоопухолевого препарата ONC201 на число митохондриальных нуклеоидов в культуре клеток рака молочной железы BT474

А.А. Мишуков¹ , А.В. Бережнов² , М.И. Кобякова³ , Я.В. Евстратова³ ,
Е.Ю. Мндлян³ , Э.Л. Холмухамедов^{3,*} 

¹Биотехнологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 51;

²Институт биофизики клетки, Российская академия наук, Россия,
Московская область, г. Пущино, 142290, ул. Институтская, д. 3;

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Российская академия наук,
Россия, Московская область, г. Пущино, 142290, ул. Институтская, д. 3

*e-mail: ekhson@gmail.com

Исследовано действие цитостатического противоопухолевого препарата ONC201 на число митохондриальных нуклеоидов в клетке и средний размер митохондрий в культуре клеток рака молочной железы человека линии BT474. Показано, что инкубация клеток BT474 в течение 24 ч с ONC201 (10 мкМ) снижает количество нуклеоидов с 262 ± 46 до 140 ± 27 на клетку, а увеличение длительности инкубации до 48 ч сопровождается снижением количества митохондриальных нуклеоидов до 67 ± 22 на клетку. Обнаружено, что ONC201-индуцированное изменение числа нуклеоидов на клетку зависело от длительности присутствия агента в среде инкубации. Кратковременное (24 ч) и длительное (48 ч) воздействия на клетки однократной дозы ONC201 приводили к обратимому и/или необратимому изменению количества нуклеоидов на клетку. Так, после 24 ч обработки и последующей инкубации клеток в свободной от ONC201 среде (отмывка) в течение 120 ч, наблюдалось восстановление количества нуклеоидов до 211 ± 47 на клетку. Напротив, 120-часовая отмывка клеток, после 48 ч обработки, не приводила к восстановлению количества нуклеоидов, и их количество оставалось на уровне 70 ± 59 на клетку. Изменение количества митохондриальных нуклеоидов, независимо от длительности обработки клеток препаратом ONC201, положительно коррелирует с изменением среднего размера митохондрий как показателя их морфологии. Заключается, что ONC201 оказывает цитостатическое действие на клетки BT474 в культуре, подавляет пролиферацию клеток, индуцирует зависящее от длительности обработки обратимое или необратимое уменьшение числа митохондриальных нуклеоидов и фрагментацию митохондрий.

Ключевые слова: конфокальная флуоресцентная микроскопия, культура клеток BT474, ONC201, фрагментация митохондрий, митохондриальные нуклеоиды, митохондриальная ДНК, анализ изображений

ONC201 является перспективным экспериментальным противоопухолевым препаратом из класса имипридонов [1], который в настоящее время проходит многочисленные клинические испытания в США [1, 2]. Единственная на сегодняшний день мишень ONC201 была определена как митохондриальная казеинолитическая протеаза P (ClpP) [2–4]. Однако, несмотря на успешные результаты клинических исследований, механизм действия ONC201 на клетки млекопитающих до конца не выявлен [3–5]. На сегодняшний день достоверно известно, что фармакологические препараты (в особенности противовирусные и химиотерапевтические) способны индуцировать митохондриальную дисфункцию через уменьшение

количества мтДНК [6]. Наряду с описанными в литературе данными о цитотоксическом действии ONC201 на некоторые клеточные линии [1, 3–5] имеются также результаты исследований, которые указывают на то, что противоопухолевые свойства ONC201, возможно, обусловлены его цитостатическим действием [3]. Недавно было показано, что препарат вызывает значительные изменения в структуре митохондрий, нарушение их морфологии со сдвигом в сторону фрагментации, ингибирование митохондриального дыхания и приводит к потере мтДНК [4, 5]. Из более чем 1500 митохондриальных белков только 13 кодируются мтДНК, являющихся функциональными субъединицами комплексов окислительного фос-

форилирования [7, 8]. Эти 13 ключевых субъединиц необходимы для поддержания нормального функционирования митохондрий: синтеза внутриклеточной АТФ, участия в поддержании Ca^{2+} -гомеостаза клеток, метаболизма нуклеотидов, липидов, аминокислот, коферментов и генерации активных форм кислорода, и нарушение содержания этих белков в митохондриях сопровождается тяжкими патологиями [9–12]. Несмотря на то, что внутриклеточная мишень противоопухолевого агента ONC201 выявлена как митохондриальная казеинолитическая протеаза (ClpP) – фермент, непосредственно вовлеченный в систему контроля качества митохондриальных белков [3–5] – механизм ONC201-индуцированного нарушения митохондриальных функций в клетках млекопитающих остается невыясненным [4, 13].

Демонстрация нарушений в структуре митохондрий и изменения содержания мтДНК в опухолевых клетках под действием этого агента указывает на ключевую роль митохондрий и мтДНК в механизме адаптации клеток к стрессовым воздействиям [4, 14, 15]. Анализ имеющихся в литературе данных указывает на то, что ONC201-индуцированная фрагментация митохондрий и уменьшение содержания мтДНК в культивируемых опухолевых клетках зависят от режима обработки клеток и данные, полученные после 12–24-часовой обработки клеток, отличаются от данных, представленных в работах, в которых клетки подвергались воздействию этого препарата в течение 72 ч и более [5, 16, 17]. Основываясь на этих наблюдениях, мы предположили, что реакция клеток на внешний стресс (10 мкМ ONC201) зависит от длительности обработки клеток препаратом и, по всей видимости, является двухэтапной, т.е. *кратковременная* обработка клеток этим препаратом с последующей отмывкой будет принципиально отличаться от *долговременной* обработки. Для проверки этого предположения и определения временной зависимости действия препарата ONC201 на клетки BT474 (рак молочной железы человека) по динамике изменения содержания нуклеотидов (отражающих содержание мтДНК) и среднего размера митохондрий (степени фрагментации) под действием ONC201 в настоящей работе мы выбрали метод количественной конфокальной флуоресцентной микроскопии [14, 18, 19]. Мы показали, что однократная и *кратковременная* (24 ч) обработка клеток BT474 препаратом ONC201 (10 мкМ) в культуре сопровождается фрагментацией митохондрий и уменьшением количества нуклеотидов на клетку. Однако последующая инкубация клеток в течение 120 ч в свежей среде инкубации, не содержащей препарата, приводила к частичному восстановлению морфологии митохондрий и исходного числа нуклеотидов на клетку. Совершенно другая картина наблюдалась

после однократной, но более *длительной* (48 ч) обработки клеток 10 мкМ ONC201, последующая инкубация клеток в течение 120 ч в свежей среде, не содержащей препарата, сопровождалась необратимым уменьшением числа нуклеотидов и среднего размера митохондрий. Необходимо отметить, что в обоих случаях, независимо от длительности обработки клеток BT474 препаратом ONC201, наблюдалось подавление пролиферации клеток без индукции клеточной гибели. Выявленная зависимость действия препарата ONC201 на число нуклеотидов и морфологию митохондрий в клетках BT474 от *длительности* обработки указывает на участие медленных и необратимых изменений в клетках, сопровождающихся их трансформацией и переходом из пролиферирующего состояния в состояние так называемого «клеточного старения». Полученные результаты могут обеспечить основу выяснения деталей молекулярных механизмов, участвующих в адаптационной трансформации клеток рака молочной железы человека под действием противоопухолевого агента ONC201.

Материалы и методы

Клеточная культура. В работе использовали культуру клеток рака молочной железы человека BT474 (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клетки инкубировали в полной среде DMEM/F12 (50:50, #C420E, #C600п, ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (#F7524, Sigma, Германия), 2 мМ L-глутамин (#F032, ПанЭко, Россия), 24 мкг/мл дифлюкана (Pfizer, США), смесь антибиотика и антимикотика (A5955, Sigma, Германия) при 37°C и 5% CO_2 .

Обработка клеток BT474 агентом ONC201. Клетки BT474 высевали на чашки Петри (SPL Life Sciences, Корея) диаметром 35 мм при плотности 5000 клеток/см² в полной среде DMEM/F12 и инкубировали 16–18 ч в инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 / 95% воздуха при 37°C и 95% влажности перед добавлением ONC201. Далее среду инкубации заменяли на аналогичную с добавлением ONC201 (SelleckChem, США) в концентрации 10 мкМ. Далее клетки инкубировали в течение 24 или 48 ч в CO_2 -инкубаторе. После 24 или 48 ч обработки клеток ONC201, как описано выше, среда инкубации заменялась полной средой DMEM/F12 без добавления ONC201, далее клетки инкубировали в течение 120 ч в инкубаторе с полной заменой среды инкубации каждые 24 ч.

Конфокальная флуоресцентная микроскопия клеток BT474. Для конфокальной микроскопии клетки, высаженные на чашки Петри, нагружали флуоресцентными красителями, как описано ранее [20, 21], с небольшими модификациями. Для визуализации *клеточных ядер* был использован Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen, США), *ядра кле-*

ток и митохондриальные нуклеоиды были помечены с помощью SYBR Green I (S7563, Invitrogen, США), а митохондрии прокрашивались MitoTracker Deep Red 633 (MTDR, M-22426, Molecular Probes, США). Среду инкубации заменяли на раствор Хенкса (P020п, ПанЭко, Россия), содержащий 2 мкг/мл Hoechst 33342, SYBR Green I в разведении 1:200000 и 150 нМ MTDR (M-22426, Molecular Probes, США), клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термостате. После окрашивания клетки трижды отмывали раствором Хенкса, не содержащим красителей.

Трехцветные флуоресцентные изображения были получены с использованием сканирующего конфокального флуоресцентного микроскопа Leica TCS SP5 на базе DM6000 CS (Leica Microsystems, Германия) в режиме последовательного сканирования каналов с применением иммерсионного объектива HCX PL APO lambda blue 63×, NA = 1,4 (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции красителя Hoechst 33342 осуществляли с помощью диодного лазера 405 нм, возбуждение SYBR green – линией 488 нм аргонного лазера, а MTDR – линией 633 нм гелий-неонового лазера. Регистрацию флуоресценции Hoechst 33342, SYBR Green I и MTDR производили при длинах волн 440 ± 20 нм, 540 ± 15 нм и 710 ± 25 нм соответственно. Толщина оптического среза составляла 0,773 мкм.

Обработка и анализ изображений клеток BT474 проводились с использованием программы Fiji ImageJ [22]. Для автоматизации процесса получения количественных данных о числе митохондриальных нуклеоидов и размере митохондрий нами был специально разработан макрос, исходный код которого доступен по требованию. Принцип работы макроса представлен на рис. 1.

На первом шаге трехцветное изображение разделяется на 3 канала (8 бит каждый) соответствующие полученному флуоресцентному сигналу от Hoechst 33342 (ядра клеток), SYBR Green I (ядра и митохондриальные нуклеоиды) и MTDR

(митохондрии). Далее следует ряд модификаций отдельных каналов для 1) подсчета количества клеток (по числу ядер); 2) получения «чистого» изображения митохондриальных нуклеоидов в канале SYBR Green I; 3) оценки количества митохондриальных нуклеоидов; 4) оценки среднего размера митохондрий.

При использованных нами протоколах подготовки клеток для флуоресцентной конфокальной микроскопии, SYBR Green I прокрашивает ядра клеток и митохондриальные нуклеоиды, а Hoechst 33342 – только ядра (рис. 2А). Для получения «чистого» изображения нуклеоидов необходимо вычесть сигнал Hoechst 33342 из канала SYBR Green I. Для этого в процессе реализации алгоритма макроса с использованием канала Hoechst 33342 создаются маски ядер в бинарном формате, после предварительного усиления контраста и установки порога бинаризации по методу «Otsu». Далее маска ядер используется как для автоматического подсчета количества ядер (функция «Analyze particles»), так и для вычитания изображения ядер из канала SYBR Green I. Эта операция производится на следующем этапе, результатом чего является изображение, соответствующее флуоресцентному сигналу SYBR Green I только от митохондриальных нуклеоидов. Затем следуют операции по вычитанию фона по алгоритму «Rolling ball», применения фильтров «Unsharp Mask» и «Median», применение метода «Otsu» для бинаризации изображения. В результате получается адаптированное изображение (маска) митохондриальных нуклеоидов, количество которых оценивается функцией «Analyze particles».

На следующем этапе автоматически подсчитывается количество и средний размер митохондрий через анализ канала исходного изображения, соответствующий флуоресценции MTDR. Этот процесс аналогичен обработке данных канала SYBR Green I, за исключением вычитания маски ядер.

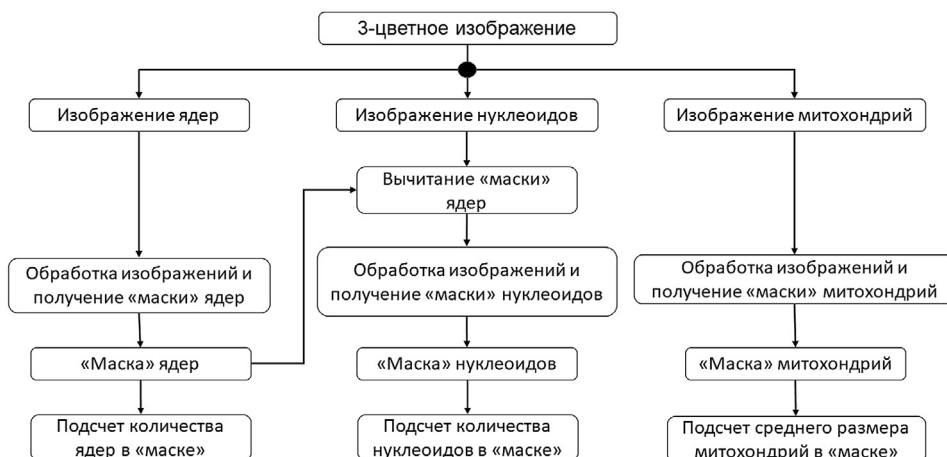


Рис. 1. Схема обработки конфокальных 3-цветных изображений для анализа количества митохондриальных нуклеоидов на клетку и среднего размера митохондрий. Описание алгоритма и деталей в тексте. Разработанный макрос доступен по требованию.

Статистический анализ. Анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel. Для статистического анализа количества нуклеоидов и среднего размера митохондрий использовалась программа GraphPad Prism 9 с применением однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с *post-hoc*-тестом Бонферрони [23]. Для выявления корреляции между изменениями количества нуклеоидов и среднего размера митохондрий рассчитывался коэффициент корреляции Пирсона. Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз, и для каждой временной точки (0 ч, 24 ч и 48 ч) было проанализировано не менее 300 клеток, как указано в подписях к рисункам. Результаты количественной оценки числа митохондриальных нуклеоидов в клетках и размера митохондрий представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение (Mean $\pm$ SD).

Результаты

Изменение числа нуклеоидов. Инкубация клеток рака молочной железы человека BT474 с противораковым препаратом ONC201 сопровождается существенными изменениями морфологии митохондриального ретикулума, а именно – среднего размера митохондрий, а также уменьшением числа нуклеоидов в клетках. Несмотря на то, что эти изменения сопутствуют ответу клеток млекопитающих на внешний стресс [9, 24, 25], мы не обнаружили заметной потери жизнеспособности клеток BT474 и увеличения интенсивности клеточной гибели под действием препарата ONC201. На рис. 2 приведены типичные конфокальные изображения клеток BT474, окрашенных Hoechst

33342 (ядерная ДНК, синяя флуоресценция), SYBR Green I (ядерная и митохондриальная ДНК, зеленая флуоресценция) и MTDR (митохондрии, красная флуоресценция). Видно, что области флуоресцентного сигнала SYBR Green I находятся внутри областей, соответствующих флуоресценции MTDR, что отражает внутримитохондриальную локализацию нуклеоидов (рис. 2А, совмещение). В культивируемых клетках BT474, подверженных действию противоракового препарата ONC201, наблюдаются изменения как содержания митохондриальных нуклеоидов, так и морфологии самих митохондрий, которые зависят от длительности инкубации клеток с этим препаратом. Количественный анализ изображений показал, что число регистрируемых нуклеоидов достоверно уменьшается с 262 ± 46 на клетку в контрольной группе в отсутствие ONC201 (рис. 2Б, белая заливка) до 140 ± 27 на клетку после 24 ч инкубации (рис. 2Б, черная заливка) и до 67 ± 22 на клетку после 48 ч инкубации клеток в присутствии 10 мкМ ONC201 (рис. 2Б, серая заливка).

Изменение среднего размера митохондрий. Наряду с уменьшением числа митохондриальных нуклеоидов наблюдается изменение морфологии митохондриальной сети клеток, что проявляется в фрагментации, т.е. уменьшении количества и размеров тубулярных форм, увеличении числа мелких митохондрий и уменьшении среднего размера митохондрий (рис. 2, красная флуоресценция MTDR). При этом средний размер митохондрий в клетках, инкубированных с ONC201 в течение 24 ч, оцененный по флуоресценции MTDR, уменьшается с $2,96 \pm 0,46$ мкм² в контроле

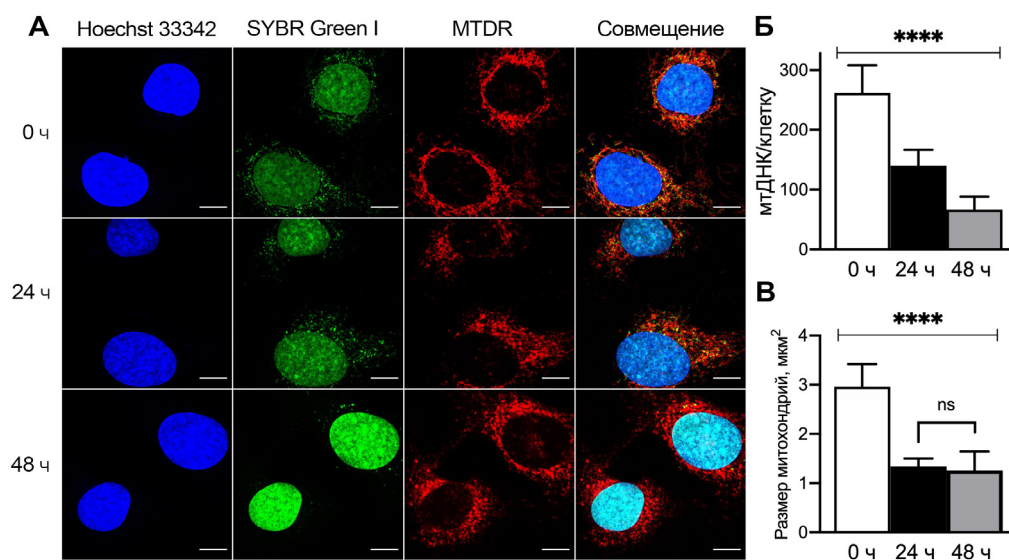


Рис. 2. Действие 10 мкМ ONC201 на число нуклеоидов и морфологию митохондрий в клетках рака молочной железы человека BT474. **А.** Типичные конфокальные изображения клеток BT474, подвергнутых обработке ONC201 (10 мкМ), шкала в нижнем правом углу изображений равна 10 мкм. **Б.** Изменение количества нуклеоидов под действием ONC201 во времени. **В.** Изменение среднего размера митохондрий под действием ONC201 во времени. На графиках приведены средние значения $\pm$ стандартные отклонения, полученные в не менее чем трех независимых экспериментах. Для количественного анализа использовано: 381 клетка (0 ч), 316 клеток (24 ч), 604 клетки (24 ч, 5 сут отмывки), 340 клеток (48 ч) и 518 клеток (48 ч, 5 сут отмывки). Для выявления различий использовался однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с *post-hoc*-тестом Бонферрони ($n = 3$, $p < 0,05$).

(рис. 2В, белая заливка) до $1,34 \pm 0,16$ мкм² в клетках, инкубированных 24 ч с ONC201 (рис. 2В, черная заливка), с тенденцией к дальнейшему уменьшению среднего размера митохондрий до $1,26 \pm 0,38$ мкм² при увеличении времени инкубации клеток с ONC201 до 48 ч (рис. 2В, серая заливка).

Таким образом, обработка клеток BT474 противоопухолевым препаратом ONC201 сопровождается значимыми изменениями числа нуклеоидов в клетках и фрагментацией митохондриальной сети. Аналогичные изменения содержания нуклеоидов и среднего размера (морфологии) митохондрий, индуцированные противоопухолевыми препаратами, с различными механизмами действия, наблюдались в экспериментах на ряде клеточных линий [1, 3, 5, 6]. Известно, что препарат ONC201 обладает выраженным цитостатическим действием [2]. Возникает естественный вопрос, являются ли обратимыми наблюдаемые нами изменения.

Обратимость действия ONC201 на число нуклеоидов и фрагментацию митохондрий в клетках BT474. Для ответа на поставленный вопрос нами была выбрана экспериментальная клеточная модель, в которой число нуклеоидов и средний размер митохондрий непосредственно после инкубации клеток с 10 мкМ препарата ONC201 (в течение 24 ч или 48 ч) сравнивались с данными, полученными через 120 ч после отмывки клеток от ONC201 с регулярной (каждые 24 ч) заменой среды инкубации на свежую, не содержащую препарат.

Удаление препарата ONC201 из среды инкубации после 24 ч обработки приводило к обратимым изменениям – среднее количество нуклеоидов в клетках возросло с 140 ± 27 до 211 ± 47 на клетку (рис. 3А, 24 ч обработки, штрих-заливка). Однако обработка клеток ONC201 в течение 48 ч приводила к необратимым изменениям: после обработки число нуклеоидов уменьшилось с 262 ± 46

до 67 ± 22 на клетку, но после 120-часовой отмывки осталось на уровне 70 ± 59 на клетку (рис. 3А, 48 ч обработки, штрих-заливка).

Отмывка клеток BT474 от ONC201 в течение 120 ч со сменой среды инкубации каждые 24 ч на свежую среду, не содержащую препарат, сопровождалась частичным восстановлением исходной морфологии митохондрий (среднего размера), которое зависело от длительности первичной обработки клеток препаратом. Так, после 24 ч инкубации клеток BT474 с 10 мкМ ONC201 митохондрии претерпевали фрагментацию и средний размер митохондрий изменялся от $2,97 \pm 0,46$ мкм² в контроле (рис. 3Б, 24 ч обработки, белая заливка) до $1,34 \pm 0,16$ мкм² в клетках, обработанных ONC201 (рис. 3Б, 24 ч обработки, черная заливка). При 120-часовой отмывке клеток от препарата после 24 ч инкубации с ONC201 средний размер митохондрий был $2,08 \pm 0,31$ мкм², что составляет около 70% от значения в контрольной группе (рис. 3Б, 24 ч обработки, штрих-заливка). Однако средний размер митохондрий в клетках, обработанных ONC201 в течение 48 ч, после 120-часовой отмывки клеток не восстанавливался, а продолжал уменьшаться, достигая величины $0,88 \pm 0,18$ мкм² (рис. 3Б, 48 ч обработки, штрих-заливка).

Обсуждение

В настоящей работе исследована временная зависимость действия противоопухолевого препарата ONC201 на изменение числа митохондриальных нуклеоидов и средний размер митохондрий в культуре клеток рака молочной железы человека BT474. Известно, что химиотерапевтические агенты в условиях *in vitro* способны вызывать в том числе и значительные изменения в структуре митохондриальной сети, сопровождающиеся нарушениями морфологии митохондрий со сдвигом в сторону

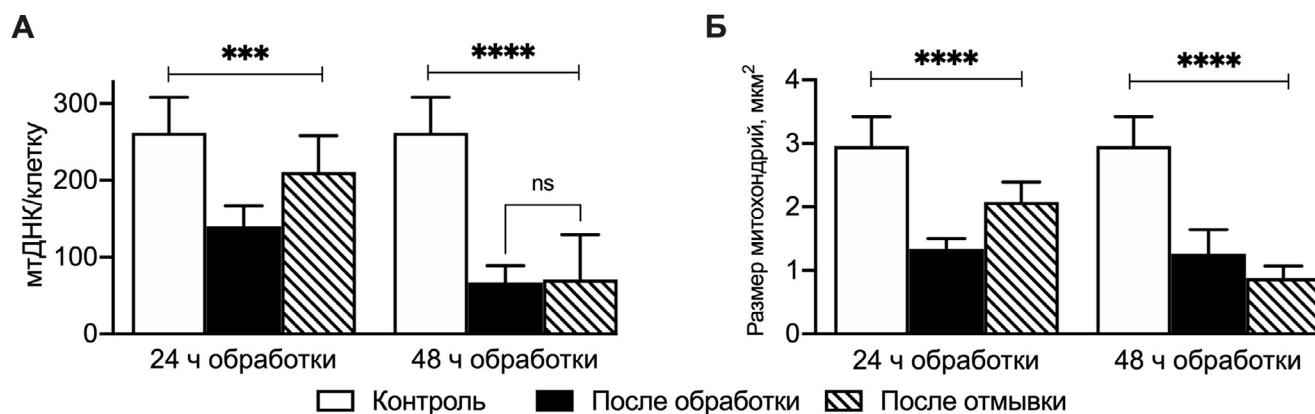


Рис. 3. Обратимость изменений морфологии митохондрий и количества нуклеоидов в клетках BT474 после отмывки ONC201. А. Количество нуклеоидов на клетку до обработки (белая заливка), после обработки ONC201 (черная заливка) и после 120 ч отмывки (штрих заливка) для 24-часовой (левая группа) и 48-часовой обработки ONC201 (правая группа). Б. средний размер митохондрий до обработки (белая заливка), после обработки ONC201 (черная заливка) и после 120 ч отмывки (штрих заливка) для 24-часовой (левая группа) и 48-часовой обработки ONC201 (правая группа). На графиках приведены средние значения $\pm$ стандартные отклонения, полученные в не менее чем трех независимых экспериментах. Для количественного анализа использовано: 381 клетка (0 ч), 316 клеток (24 ч), 604 клетки (24 ч, 5 сут отмывки), 340 клеток (48 ч) и 518 клеток (48 ч, 5 сут отмывки). Для выявления различий использовался однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с *post-hoc*-тестом Бонферрони ($n = 3$, $p < 0,05$).

фрагментации, ингибированием митохондриального дыхания и потерей мтДНК [4, 5, 26, 27]. Отличительной особенностью действия ONC201 является то, что максимальный эффект однократного воздействия препаратом ONC201, оцениваемый по содержанию мтДНК проявляется не сразу, а зависит от *длительности* обработки клеток и указывает на развитие действия препарата во времени [5, 15, 16, 28, 29]. В настоящей работе мы сравнили влияние 24- и 48-часовой инкубации клеток с 10 мкМ ONC201 на количество митохондриальных нуклеоидов и средний размер митохондрий в культуре клеток BT474. Также мы предприняли попытку оценить обратимость действия препарата на указанные параметры клеток через 120 ч после отмывки клеток от ONC201. Мы показали, что под действием ONC201 количество нуклеоидов на клетку и средний размер митохондрий могут изменяться как обратимо, так и необратимо – в зависимости от длительности предварительной обработки клеток этим агентом. Так 120-часовая отмывка клеток от агента после 24 ч обработки ONC201 сопровождается восстановлением количества нуклеоидов, в то время как после 48 ч обработки ONC201 такая отмывка не приводит к восстановлению количества нуклеоидов (рис. 2), что указывает на сложную динамику влияния ONC201 на митохондриальную сеть. Сходные результаты были получены и при измерении среднего размера митохондрий в клетках (рис. 3А и 3Б, 24 ч обработки). Интересно отметить наличие положительной корреляции между числом нуклеоидов и морфологией митохондрий – с уменьшением числа нуклеоидов митохондрии претерпевают фрагментацию. При этом коэффициент корреляции Пирсона (r) для числа нуклеоидов и среднего размера митохондрий

составил 0,69 в случае с 24-часовой обработкой ONC201 и 0,84 – для эксперимента с 48-часовой обработкой.

Таким образом, методом анализа цифровых конфокальных флуоресцентных изображений с применением специально разработанного макроса в настоящей работе показано, что однократная обработка клеток BT474 препаратом ONC201, в зависимости от длительности обработки, приводит как к обратимому, так и к необратимому снижению числа нуклеоидов, фрагментации митохондрий и подавлению пролиферации клеток в обоих случаях, причем без индукции клеточной гибели. Полученные результаты являются отправной точкой для дальнейшего исследования причин дестабилизирующего действия противоопухолевого препарата на морфологию внутриклеточных митохондрий и число митохондриальных нуклеоидов, выявления молекулярных механизмов, ответственных за обратимое и необратимое изменение морфологии митохондрий и числа нуклеоидов, а также оценки связи между числом нуклеоидов и адаптационной трансформацией клеток BT474 рака молочной железы человека под действием противоопухолевого агента ONC201.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20-145, Э.Л.Х.). А.А.М. выражает благодарность коллективу Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН за поддержку при выполнении этой работы. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allen J.E., Kline C.L., Prabhu V.V., et al. Discovery and clinical introduction of first-in-class imipridone ONC201 // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. N 45. P. 74380–74392.
2. Arrillaga-Romany I., Chi A.S., Allen J.E., Oster W., Wen P.Y., Batchelor T.T. A phase 2 study of the first imipridone ONC201, a selective DRD2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8. N 45. P. 79298–79304.
3. Graves P.R., Aponte-Collazo L.J., Fennell E.M. J., et al. Mitochondrial protease ClpP is a target for the anticancer compounds ONC201 and related analogues // *ACS Chem. Biol*. 2019. Vol. 14. N 5. P. 1020–1029.
4. Ishizawa J., Zarabi S.F., Davis R.E., et al. Mitochondrial ClpP-mediated proteolysis induces selective cancer cell lethality // *Cancer Cell*. 2019. Vol. 35. N 5. P. 721–737.
5. Greer Y.E., Porat-Shliom N., Nagashima K., et al. ONC201 kills breast cancer cells in vitro by targeting mitochondria // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9. N 26. P. 18454–18479.
6. Stoker M.L., Newport E., Hulit J.C., West A.P., Morten K.J. Impact of pharmacological agents on mitochondrial function: a growing opportunity? // *Biochem. Soc. Trans*. 2019. Vol. 47. N 6. P. 1757–1772.
7. Taanman J.W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication // *Biochim. Biophys. Acta* 1999. Vol. 1410. N 2. P. 103–123.
8. Calvo S.E., Mootha V.K. The mitochondrial proteome and human disease // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2010. Vol. 11. P. 25–44.
9. Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death // *Science*. 2014. Vol. 345. N 6203: 1250256.
10. Porporato P. E., Filigheddu N., Pedro J.M.B., Kroemer G., Galluzzi L. Mitochondrial metabolism and cancer // *Cell Res*. 2018. Vol. 28. N 3. P. 265–280.
11. Fontana G.A., Gahlon H.L. Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation // *Nucleic Acids Res*. 2020. Vol. 48. N 20. P. 11244–11258.

12. La Morgia C., Maresca A., Caporali L., Valentino M.L., Carelli V. Mitochondrial diseases in adults // *J. Intern. Med.* 2020. Vol. 287. N 6. P. 592–608.
13. Ralff M.D., Jhaveri A., Ray J.E., Zhou L., Lev A., Campbell K.S., Dicker D.T., Ross E.A., El-Deiry W.S. TRAIL receptor agonists convert the response of breast cancer cells to ONC201 from anti-proliferative to apoptotic // *Oncotarget.* 2020. Vol. 11. N 42. P. 3753–3769.
14. McArthur K., Whitehead L.W., Heddleston J.M., et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis // *Science.* 2018. Vol. 359. N 6378: eaao6047.
15. Pruss M., Dwucet A., Tanriover M., Hlavac M., Kast, R.E., Debatin K.M., Wirtz C.R., Halatsch M.E., Siegelin M.D., Westhoff M.A., Karpel-Massler G. Dual metabolic reprogramming by ONC201/TIC10 and 2-Deoxyglucose induces energy depletion and synergistic anti-cancer activity in glioblastoma // *Br. J. Cancer.* 2020. Vol. 122. N 8. P. 1146–1157.
16. Kline C.L., Van den Heuvel A.P., Allen J.E., Prabhu V.V., Dicker D.T., El-Deiry, W.S. ONC201 kills solid tumor cells by triggering an integrated stress response dependent on ATF4 activation by specific eIF2alpha kinases // *Sci. Signal.* 2016. Vol. 9. N 415: ra18.
17. Geiss C., Witzler C., Poschet G., Ruf W., Regnier-Vigouroux A. Metabolic and inflammatory reprogramming of macrophages by ONC201 translates in a pro-inflammatory environment even in presence of glioblastoma cells // *Eur. J. Immunol.* 2021. Vol. 51. N 5. P. 1246–1261.
18. Kukat C., Wurm C.A., Spähr H., Falkenberg M., Larsson N.G., Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108. N 33. P. 13534–13539.
19. Bonekamp N.A., Larsson N.G. SnapShot: Mitochondrial nucleoid // *Cell.* 2018. Vol. 172. N 1–2. P. 388–388.e1.
20. Sasaki T., Sato Y., Higashiyama T., Sasaki N. Live imaging reveals the dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Fucci2-HeLa cells // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: e11257.
21. Leonard A.P., Cameron, R.B., Speiser J.L., Wolf B.J., Peterson Y.K., Schnellmann R.G., Beeson C.C., Rohrer B. Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. Vol. 1853. N 2. P. 348–360.
22. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9. N 7. P. 676–682.
23. Armstrong R.A. When to use the Bonferroni correction // *Ophthalmic Physiol. Opt.* 2014. Vol. 34. N 5. P. 502–508.
24. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death // *Nat. Cell Biol.* 2014. Vol. 16. N 8. P. 728–736.
25. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J. M., Kepp O., Kroemer G. Regulated cell death and adaptive stress responses // *Cell Mol. Life Sci.* 2016. Vol. 73. N 11–12. P. 2405–2410.
26. Gallage, S., Gil J. Mitochondrial Dysfunction Meets Senescence // *Trends Biochem. Sci.* 2016. Vol. 41. N 3. P. 207–209.
27. Vasileiou P.V.S., Evangelou K., Vlasik K., Fildis G., Panayiotidis M.I., Chronopoulos, E., Passias P.G., Kouloukoussa M., Gorgoulis V.G., Havaki S. Mitochondrial homeostasis and cellular senescence // *Cells.* 2019. Vol. 8. N 7: 686.
28. Prabhu V.V., Morrow S., Rahman Kawakibi A., et al. ONC201 and imipridones: Anti-cancer compounds with clinical efficacy // *Neoplasia.* 2020. Vol. 22. N 12. P. 725–744.
29. Ishizawa J., Kojima K., Chachad D., et al. ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies // *Sci. Signal.* 2016. Vol. 9. N 415: ra17.

Поступила в редакцию 15.03.2021 г.

После доработки 13.04.2021 г.

Принята в печать 21.06.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Effect of ONC201 antitumor drug on the number of mitochondrial nucleoids in BT474 breast cancer cells in culture

A.A. Mishukov¹ , A.V. Berezhnov² , M.I. Kobayakova³ , Ya.V. Evstratova³ ,
E.Yu. Mndlyan³ , E.L. Holmuhamedov^{3,*} 

¹Department of Biotechnology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12, Leninskiye gory, Moscow, 119234, Russia;

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, 3 Institutskaya st., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia;

³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
3 Institutskaya st., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

*e-mail: ekhsn@gmail.com

The effect of the cytostatic antitumor drug ONC201 on the number of mitochondrial nucleoids and the average size of mitochondria in the BT474 human breast cancer cells was studied. It was shown that incubation of BT474 cells with ONC201 (10 μ M) for 24 h reduces the number

of nucleoids from 262 ± 46 to 140 ± 27 per cell, and in cells incubated with drug for 48 h the number of mitochondrial nucleoids was further reduced to 67 ± 22 per cell. It was found that the ONC201-induced change in the number of nucleoids per cell depends on the duration of treatment. Short-term (24 h) and long-term (48 h) exposure of cells to a single dose of ONC201 led to a *reversible* and *irreversible* change in the number of nucleoids per cell, respectively. Thus, after 24 h of exposure and subsequent 120 h washout with ONC201-free medium, the number of nucleoids was restored to 211 ± 47 per cell, while 120-hour washout of drug after 48 hours of treatment did not lead to the restoration of the number of nucleoids, and their number remained at the level of 70 ± 59 per cell. Changes in the number of mitochondrial nucleoids, regardless of the duration of cell treatment with ONC201, positively correlated with changes in the average size of mitochondria as an indicator of their morphology. It is concluded that ONC201 has a cytostatic effect on BT474 cells in culture, suppresses cell proliferation and induces a reversible or irreversible decrease in the number of mitochondrial nucleoids and fragmentation of mitochondria, depending on the duration of treatment.

Keywords: *confocal fluorescence microscopy, cell culture BT474, ONC201, fragmentation of mitochondria, mitochondrial nucleoids, mitochondrial DNA, image analysis*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-75-20-145.

Сведения об авторах

Мишуков Артем Алексеевич — студент биотехнологического факультета МГУ. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: artem.mishukov1999@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5464-7868>

Бережнов Алексей Валерьевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки РАН. Тел.: 8-496-773-91-25; e-mail: g_56@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0271-6179>

Кобякова Маргарита Игоревна — аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: rita49@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6846-9994>

Евстратова Яна Владимировна — аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: yannaevstratova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2044-8510>

Мндлян Екатерина Юрьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-94-20; e-mail: mndlyaneyu@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1823-828X>

Холмухамедов Эхсон Лукманович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Тел.: 8-496-773-9420; e-mail: ekhson@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0809-350X>