

Конформаційні зміни флуоресцентно міченого G-актину при взаємодії з цитохромом *c* як свідчення можливого залучення білків цитоскелета до процесу апоптозу

І.М. Прудніков, А.М. Смірнов, В.М. Цивкін

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: igor.prudnikov@biph.kiev.ua

*Існуючі дані припускають участь білків цитоскелета, а саме актину, в процесі апоптозу, проте яку саме роль він при цьому відіграє, поки що невідомо. Метою нашої роботи було дослідження можливої функціональної взаємодії актину з одним із учасників апоптозу цитохромом *c*. Ми використовували мічення амінокислотних залишків очищеного з мозку щура β/γ -актину в мономерній формі (G-актин) за допомогою флуоресцентного барвника 3-(4-карбоксібенозол)хінолін-2-карбок-сальдегіду (SVQSA) як засіб моніторингу індукованих конформаційних змін у білковій молекулі. SVQSA за наявності ціаніду реагує з первинними амінами з утворенням флуоресцентного продукту. Однак ми також виявили появу іншого флуоресцентного деривату при реакції цього барвника з фенольною групою як вільного тирозину, так і його залишків у складі пептиду та білка незалежно від наявності ціаніду. При дослідженні конформаційних змін у молекулах міченого G-актину виявилось, що інтенсивність флуоресценції змінювалася в тій частині спектра, яка характерна для вищезгаданого продукту реакції з залишком тирозину, але не з аміногрупами. Зокрема, цитохром *c* у мікромолярному діапазоні концентрації зменшував флуоресценцію дозозалежним чином, що вказує на його пряму взаємодію з G-актином. Специфічні для актину токсини та інші фактори, що впливають на його полімеризацію, також зменшували інтенсивність флуоресценції міченого актину, не діючи істотно на ефект цитохрому *c*. Водночас останній не впливав на флуоресценцію інактивованого міченого актину. Таким чином, за допомогою раніше неописаного мічення SVQSA залишків тирозину вдалося дослідити конформаційні зміни в молекулі актину і встановити факт зв'язку цього білка з цитохромом *c*. Можна припустити, що актин залучений до апоптозу як регулятор утворення апоптосом зокрема через взаємодію з цитохромом *c*.*

Ключові слова: 3-(4-карбоксібенозол)хінолін-2-карбок-сальдегід (SVQSA); актин; апоптоз; тирозин; цитоскелет; цитохром *c*.

ВСТУП

Програмована клітинна загибель відіграє значну роль як у індивідуальному розвитку організмів, так і у підтримці гомеостазу тканин дорослих особин. Її найпоширенішою формою є апоптоз. Домінуючу частину інформації про це явище отримано при дослідженні ракових клітин. Особливості цих клітин, ймовірно, забезпечують їх стійкість до загибелі і є швидше спробою обійти апоптоз, ніж природним способом його розвитку. Водночас апоптоз клітин нормальних тканин

досліджено набагато гірше [1–3].

У загальноприйнятій моделі індукції апоптозу цитохром *c* вивільняється з мітохондрій у цитоплазму під дією проапоптотичних сигналів і зв'язується з цитоплазматичним білком АРАФ-1, активуючи його. При цьому АРАФ-1 гідролізує пов'язаний з ним дАТФ до дАДФ. Наступна заміна дАДФ на дАТФ або АТФ індукує утворення апоптосом, що складається з гептамерного комплексу АРАФ-1 з цитохромом *c*. Після цього апоптосома зв'язує ініціаторну прокаспазу-9,

молекули якої активуються за допомогою аутокаталітичного розщеплення і відщеплюють аутоінгібувальний регуляторний домен в ефекторній прокаспазі-3, призводячи цю цистеїнову протеазу в активну форму. Надалі каспаза-3 розщеплює низку білків, що призводить до загибелі клітини [4–8].

Актин є найпоширенішим білком у більшості еукаріотних клітин. Він локалізований в основному в цитоплазмі, але в невеликій кількості також знайдений в ядрі клітини. З актину утворені мікрофіламенти – один із основних компонентів цитоскелета. Це глобулярний білок, що складається з 376 амінокислотних залишків, з молекулярною масою близько 42 кДа. Актин є високо консервативним білком і бере участь у великій кількості білок-білкових взаємодій. Ці властивості, а також його здатність переходити між мономерним (G-актин) і полімеризованим (F-актин) станами під контролем гідролізу нуклеотидів, іонів і великої кількості білків, що зв'язують актин, роблять його важливим учасником у багатьох клітинних функціях, починаючи від рухливості клітин і підтримки форми та полярності до регуляції транскрипції. У хребетних ідентифіковано три основні групи ізоформ актину: α , β та γ . α -Актини, що знаходяться в м'язових тканинах, є основною складовою скоротливого апарата. У більшості типів клітин β - і γ -актини співіснують як компоненти цитоскелета та як медіатори внутрішньої рухливості клітин [9].

Останнім часом були опубліковані дані досліджень, які дають змогу локалізувати місце індукції апоптозу там, де багато F-актину [10]. У попередніх дослідженнях ми виявили, що індукція апоптозу в лізаті нервової тканини новонароджених щурів експоненційно залежить від концентрації білка і процес активації можливий не тільки за участю дАТФ/АТФ, але і з АДФ. Очищений G-актин повністю, дозозалежним чином пригнічував активацію апоптозу. Водночас, доданий після активації складання апоптосом, не впливав на активність вже активованої каспази-3 [11].

Вважаємо доцільним спробувати з'ясувати механізм, за допомогою якого актин може бути залучений до апоптозу, зокрема виявити факт взаємодії його і білків апоптозного комплексу. Відомо, що основні білки індують утворення актинових філаментів [12]. Цитохром *c* є таким, однак літературних даних про те, що він може вплинути на актин, ми не виявили.

Метою цієї роботи було дослідження факту прямої взаємодії актину і цитохрому *c*.

МЕТОДИКА

Реактиви. Токсини були придбані у компанії «Adipogen Inc.» (США), цитохром *c* у «MP Biomedicals» (США), АТТО-TAG CBQCA реагент для дериватизації у «Thermo Scientific» («Invitrogen», США), інші реактиви у «Sigma-Millipore» (США).

Виділення цитоплазми. Для досліджень була взята тканина головного мозку новонароджених щурів через 6–48 год після народження. Тварини були приспані двоокисом вуглецю згідно з загальноприйнятими правилами (прийнятим етичним комітетом Інституту № протоколу 2 від 12.07.2023), декапітовані, мозкова тканина охолоджена на льоду і гомогенізована в скляно-тефлоновому гомогенізаторі (для виділення мітохондрій) до 10% маса/об'єм у 20 ммоль/л тріс-НСІ-буфері (рН 7,3), 1 ммоль/л дитіотреїтолу (ДТТ), 1 ммоль/л етилендіамінтетрацтової кислоти (ЕДТА), 1 ммоль/л 4-(2-аміноетил)бензолсульфонілфторид гідрохлориду (АЕБСФ). Були тестовані кілька інших інгібіторів протеаз (пепстатин, Е64, апротинін, фірмові суміші інгібіторів протеаз «Sigma-Millipore», США), але їхнє додавання не змінило загальної картини досліджуваних процесів. Гомогенат центрифугували 4 год при 60000g на холді. Отриману цитоплазму концентрували в 5 разів у концентраторах («Millipore», США) з межею ексклюзії молекул з молекулярною масою більше ніж 3 кДа та використовували надалі для виділення актину.

Виділення актину. Актин з цитоплазми віділяли [13] з актинового згустку, який розчиняли в 0,8 моль/л тріс-НСІ (рН 8,0), з наступною іонообмінною та гель-фільтраційною хроматографією. У деяких дослідах застосовували афінну хроматографію з використанням іммобілізованої на агарозі ДНКазі 1. Після завершення реакцій мічення актину реакційну суміш розділяли на колонках з сефадексом G-25. Хроматографію проводили на хроматографі АКТЕ-10 та колонках того самого виробника («GE», США). Інактивацію міченого актину (отримання І-актину) здійснювали протягом 30 хв при 60°C [14].

Мічення амінокислот, пептидів та актину з використанням АТТО-TAG™ СВQСА. Реактив розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО) до концентрації 40 ммоль/л і додавали до розчину 200 ммоль/л боратного буфера (рН 8,3) до концентрації 0,4 ммоль/л. Концентрація ціаніду калію при міченні актину варіювала від еквімолярної щодо барвника до 4 ммоль/л. Порядок додавання речовин був такий: розчин ціаніду додавали до розчинів амінокислот, пептидів та білків, після чого в реакцію вносили барвник. Деривати амінокислот не піддавали наступному очищенню. Актин і деякі білки, що тестуються, очищали гель-фільтрацією на колонках з сефадексом G-25. Концентрація амінокислот у реакційній суміші становила 1 ммоль/л, актину – 1,0 мг/мл, пептидів – 0,1 ммоль/л. Терміни реакції також варіювали від 1 до 4 год при 24°C у темряві. Після закінчення процесу мічення білку реакційну суміш додавали 0,8 моль/л тріс-НСІ (рН 8,0) і очищали гель-фільтрацією.

Спектрофлуориметрія. Спектрофлуориметрію проводили на спектрофлуориметрі Hitachi F-400 зі змінними розмірами щілини (для збуджувального та емісійного світла), сканували зі швидкістю 30 нм за 1 хв. Використовували термостатований холдер для кварцових кювет об'ємом 0,8 мл та рідинний термостат з регульованою температурою (з точністю до 0,1°C).

РЕЗУЛЬТАТИ

Ми виявили, що за наявності СВQСА в лужних умовах (значною мірою, та слабо при нейтральному рН), флуоресценція тирозину і пептидів, що містять залишки тирозину, багаторазово збільшується при довжині хвилі світла збудження 567 нм та емісії в червоній частині спектра. Для підтвердження моделі маркування білків був обраний пептид, що містить залишок тирозину – ангіотензин 3, а в контролі порівняння використовували мілетин – пептид, у складі якого немає залишків тирозину. На рис. 1 наведено спектри емісії амінокислот і пептидів, що вивчаються, при довжинах хвиль збудження 472 і 567 нм після реакції з міткою за наявності KCNS, половина максимально ефективної концентрації якого становила $2,4 \pm 0,2$ ммоль/л (при концентрації СВQСА 0,4 ммоль/л). Реакція з тими самими учасниками, але без KCNS, не давала флуоресцентного продукту з емісією в жовтій частині спектра з максимумом при довжині хвилі 550 нм, але тирозинвмісні пептиди і тирозин показували при збудженні при 567 нм чіткий максимум флуоресценції на 610 нм (результати не наведено). Додавання KCNS призводило до багаторазового збільшення емісії флуоресценції при довжині хвилі 550 нм при відповідній довжині хвилі збудження (472 нм). Жодна з інших амінокислот не давала флуоресцентного продукту з СВQСА при довжині хвилі емісії 610 нм. Водночас при емісії світла при довжині хвилі 550 нм амінокислоти та пептиди показували появу специфічного флуоресцентного продукту KCNS-залежним чином. Максимальний квантовий вихід продукту реакції СВQСА у разі додавання в реакцію до пептидів та амінокислот 200 ммоль/л KCl збільшується приблизно вдвічі (рис. 2). Ця сіль не впливала на флуоресценцію мічених пептидів та амінокислот на довжині хвилі емісії 610 нм (при довжині хвилі світла збудження 567 нм).

Актин, виділений з цитоплазми мозку новонароджених щурів, дуже слабо мітиться

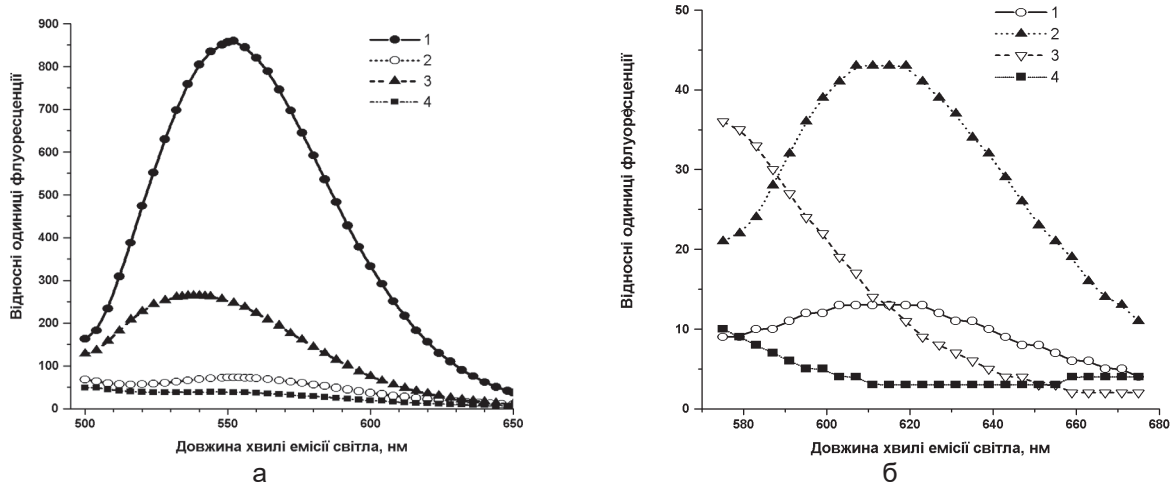


Рис. 1. Спектри флуоресцентної емісії продуктів кон'югації СВQCA з амінокислотами та пептидами при двох різних довжинах хвиль збудження. а: $\lambda = 472$ нм. 1 – аргінін, 2 – тирозин, 3 – мілетин, 4 – ангіотензин; б: $\lambda = 567$ нм. 1 – ангіотензин, 2 – тирозин, 3 – аргінін, 4 – мілетин

СВQCA в ізотонічних умовах за наявності KCNS. Зміни в концентрації боратного буфера від 20 до 200 ммоль/л не мали помітного впливу на включення флуоресцентної мітки, але додавання KCl у діапазоні від 30 до 180 ммоль/л (170 і 20 ммоль/л боратного буфера відповідно) призводило до появи інтенсивної флуоресценції у жовтій частині спектра (з виходом на плато при 70 ммоль/л KCl) на з максимумом емісії на довжині хвилі 550 нм та збудженні на 472 нм. У такому разі

флуоресценція при довжині хвилі 610 нм не змінюється. Реакція з СВQCA без KCNS дає змогу отримати білок, що мічений тільки за тирозиновими амінокислотними залишками і, відповідно, такий, що флуоресцює тільки в червоній частині спектра з максимумом на 610 нм. Додавання 1 ммоль/л тирозину в реакційну суміш для маркування актину практично повністю блокує таку флуоресценцію (результати не наведено). Очищення актину від інших продуктів реакції мічення діалізом або гель-фільтрацією дає можливість оцінити зміни, які викликають у флуоресценції міченого білка різні речовини, що впливають на його конформацію.

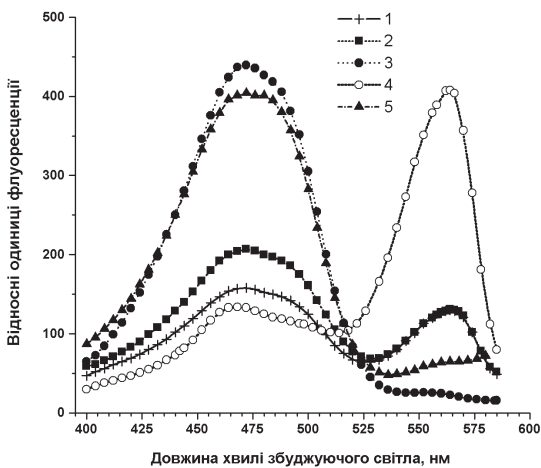


Рис. 2. Спектри збудження флуоресценції продуктів кон'югації СВQCA з амінокислотами та пептидами з емісією при $\lambda = 610$ нм: 1 – ангіотензин, 2 – ангіотензин 3 та KCl (100 ммоль/л), 3 – аргінін, 4 – тирозин, 5 – мілетин

Під час експерименту в кювету з міченим і очищеним G-актином спочатку додавали по 2 ммоль/л Mg_2SO_4 та забуференого розчину дАТФ/АТФ/АДФ, і послідовно цитохром *c* (до 32 мкмоль/л) та 70 ммоль/л KCl. Додавання до інкубаційного середовища з міченим актином ГТФ/ГДФ не впливало на інтенсивність флуоресценції білка, а АТФ/АДФ зменшувало її. Так само, інгібуючи інтенсивність флуоресценції, G-актин відреагував на наявність 70 ммоль/л KCl (максимально ефективна концентрація). Це було відзначено для G-актину, що був помічений як за наявності KCNS, так і без нього. Попереднє додавання

в інкубаційний розчин з G-актином ДНКазі 1 (білка, який деполаризує актинові філаменти і зв'язується з АТФ-сайтом актину), призводить до збільшення базальної флуоресценції міченого актину, що, як відомо, зазвичай корелює з деполімеризацією цього білка. Водночас, на тлі преінкубації (45 хв на холоді) з 1 мкмоль/л фалоїдину, що стабілізує F-актин, флуоресценція міченого актину зменшувалася приблизно вдвічі (рис. 3, а, б).

Цитохром *c* дозозалежно також зменшував інтенсивність флуоресценції G-актину в цих умовах як у контролі, так і на тлі дії ДНКазі 1 і фалоїдину, яке виглядало меншим (див. рис. 3, в). Початкове внесення в реакційну суміш КСІ викликало помітне інгібування флуоресценції, але і на цьому фоні додавання цитохрому *c* також призводило до її зміни, хоча і меншої амплітуди. Також можна сказа-

ти, що за наявності ДНКазі 1 амплітуда пригнічення флуоресценції міченого G-актину цитохромом *c* набагато більша, ніж у контролі і за наявності F-актин стабілізуючого токсину – фалоїдину (див. рис. 3, в).

Дозозалежне інгібування цитохромом *c* флуоресценції міченого G-актину за наявності фалоїдину та інших селективних для актину токсинів, таких як латранкулін В (викликає деполімеризацію F-актину) та цитохалазін D (запобігає полімеризації актину), мало впливає на ступінь пригнічувального ефекту цитохрому *c*. Незалежно від впливу токсинів на інтенсивність флуоресценції G-актину, дія цитохрому *c*, що інгібує флуоресценцію, неістотно змінювалась від контрольного значення (рис. 4).

Додавання нуклеотидів і КСІ до міченого I-актину не призводило до зміни інтенсивно-

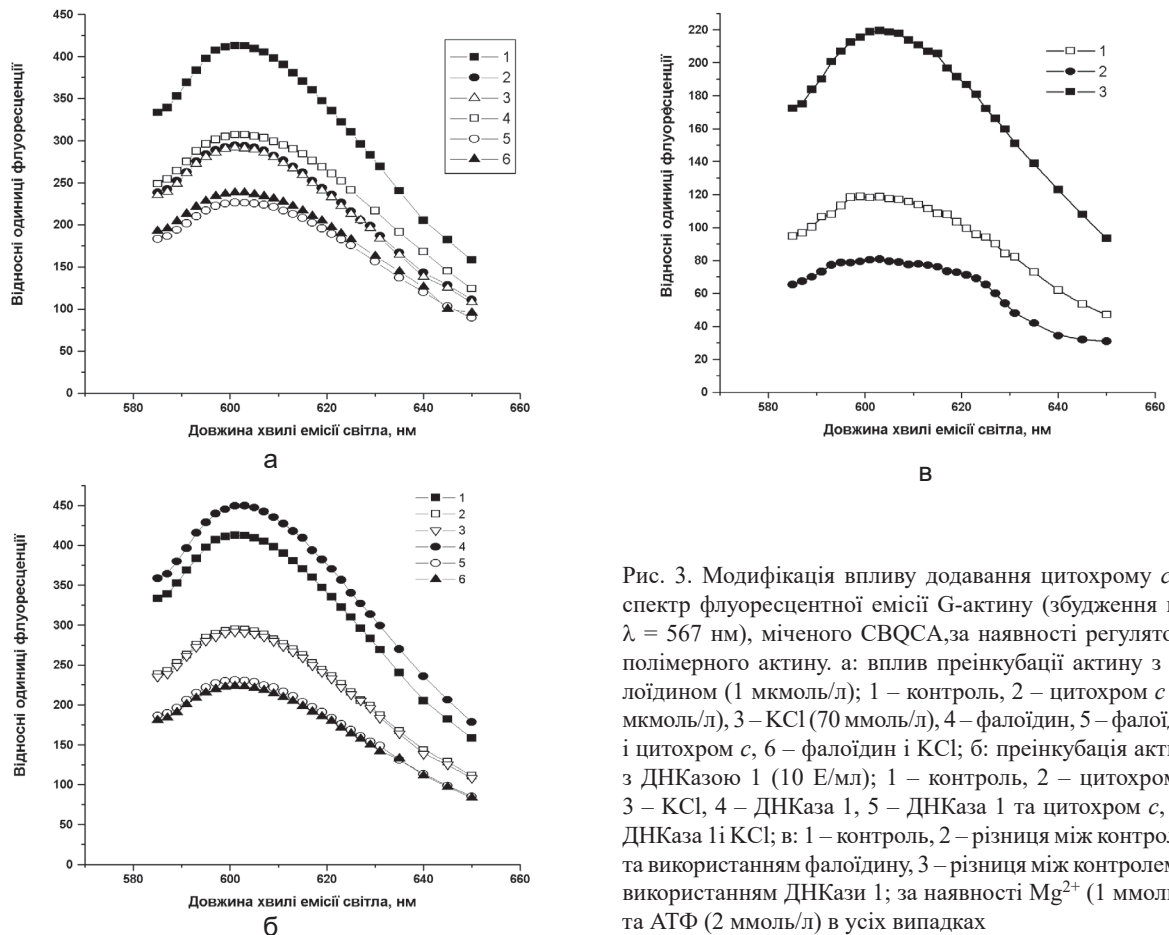


Рис. 3. Модифікація впливу додавання цитохрому *c* на спектр флуоресцентної емісії G-актину (збудження при $\lambda = 567$ нм), міченого СВQСА, за наявності регуляторів полімерного актину. а: вплив преінкубації актину з фалоїдином (1 мкмоль/л); 1 – контроль, 2 – цитохром *c* (10 мкмоль/л), 3 – КСІ (70 ммоль/л), 4 – фалоїдин, 5 – фалоїдин і цитохром *c*, 6 – фалоїдин і КСІ; б: преінкубація актину з ДНКазою 1 (10 Е/мл); 1 – контроль, 2 – цитохром *c*, 3 – КСІ, 4 – ДНКазі 1, 5 – ДНКазі 1 та цитохром *c*, 6 – ДНКазі 1 і КСІ; в: 1 – контроль, 2 – різниця між контролем та використанням фалоїдину, 3 – різниця між контролем та використанням ДНКазі 1; за наявності Mg^{2+} (1 ммоль/л) та АТФ (2 ммоль/л) в усіх випадках

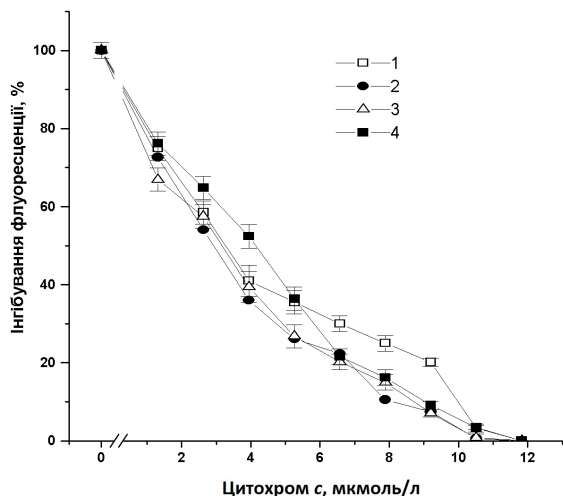


Рис. 4. Дозозалежне пригнічення цитохромом *c* флуоресценції G-актину, міченого СВQСА. 1 – контроль, 2 – фалоїдин (1 мкмоль/л), 3 – латранкулін В (1 мкмоль/л), 4 – цитохалазин D (10 мкмоль/л). Інтенсивність флуоресцентної емісії при $\lambda = 610$ нм і збудженні при $\lambda = 567$ нм. За 100% прийнято флуоресценцію в контролі за наявності Mg^{2+} (1 ммоль/л) та АТФ (2 ммоль/л). За умовний «0» прийнято значення флуоресцентної емісії після додавання KCl (70 ммоль/л)

сті флуоресценції при довжині хвилі 610 нм, а цитохрому *c* до зменшення інтенсивності флуоресценції в червоній частині спектра при збудженні на довжині хвилі 567 нм. Інтенсивність флуоресценції зменшувалася при збудженні на довжині хвилі 410 нм, що відповідає максимуму поглинання для цитохрому *c* (результати не наведені). Оскільки мічений I-актин не реагував на цитохром *c* зміною інтенсивності флуоресценції у червоній частині спектра, ми вважаємо, що така нечутливість у міченого G-актину прямо корелює з третинною структурою останнього.

ОБГОВОРЕННЯ

У роботі з'ясувалось, що поширений реактив для флуоресцентного маркування первинних аміногруп в амінокислотах і пептидах/білках у лужних умовах утворює флуоресцентний дериват з фенольною групою тирозину, що світиться у червоній частині спектра. Оскільки фенілаланін, триптофан, пролін та гістидин у цьому діапазоні не показують

флуоресценції аналогічної тирозину, ми вважаємо, що це селективний маркер фенольної групи у молекулі тирозину, який був описаний вперше. У лужному середовищі фенольна група тирозину як фенолят-аніон досить реакційноздатна і може брати участь у реакціях нуклеофільного заміщення. Поки що неможливо однозначно стверджувати яка саме реакція призводить до утворення цього деривату, але очевидно, що вона відбувається і без KCNS, на відміну від реакції з первинними аміногрупами. Ця реакція проходить як з вільним тирозином, так і з молекулами тирозину у складі пептиду (ангіотензин 3) та білка (актин), і не відбувається з амінокислотними залишками в пептиді без тирозину (мілетин). Також це не проміжна реакція або нековалентна асоціація з тирозином, оскільки актин, мічений СВQСА (незалежно від наявності KCNS у реакційній суміші), очищується при гель-фільтрації або під час діалізу, зберігаючи свою початкову флуоресценцію.

Важливою індикативною властивістю мітки, включеної в білок, динаміка інтенсивності флуоресценції, що відбувається завдяки змінам у гідратній оболонці хромофору. Наприклад, флуоресценція G-актину, міченого пірином Cys374 в С-кінцевій частині білка, збільшується під час полімеризації G-актину в філаменти [13, 15, 16]. Водночас флуоресценція G-актину, три лізинові залишки якого вдалося помітити незалежно один від одного, при полімеризації змінюється в різному напрямку [16, 17].

Зважаючи на різноманітність впливу конформації молекули на інтенсивність флуоресценції мітки, передбачити збільшення або зменшення інтенсивності свічення флуорофору важко. У наших експериментах виявилось, що флуоресценція достовірно зменшувалася за наявності в реакційному середовищі $MgATP$ та KCl. Один з 14 амінокислотних залишків тирозину в молекулі β/γ -актину знаходиться у центрі зв'язування АТФ [15]. Можна припустити, що отримані нами результати стосуються амінокислотного

залишку тирозину саме цієї локалізації.

У роботі спробували виявити взаємодію G-актину з індуктором апоптозу – цитохромом *c*. Грунтуючись на отриманих результатах, ми припускаємо, що мономери G-актину прямо взаємодіють із цим білком. Можемо це припустити, спостерігаючи зменшення інтенсивності флуоресценції мітки з виходом на плато, дозозалежно від цитохрому *c*. Водночас впливу останнього на інтенсивність флуоресценції тирозинових залишків у червоній частині спектра, у разі використання I-актину, не спостерігалось. Очевидно, що зміна інтенсивності флуоресценції характерна лише для G-актину з третинною/четвертичною структурою, характерною для нативного білка [13, 14, 16].

Зв'язування цитохрому *c* з G-актином не обов'язково призводить до його полімеризації. Хоча, це можливо, виходячи з того, що цитохром *c* – основний білок (pI: 9,6), а багато досліджених основних білків (альдолаза, гістони, лізозим, РНКаза А, спермідин і полілізин) викликають полімеризацію актину [12]. Ефект цитохрому *c* реалізується незалежно від токсинів, ДНКаз 1, MgАТФ та КСІ. Імовірно, цитохром *c* має власний сайт зв'язування з G-актином. Наприклад, може йтися про WD-ділянки білка, які є і в актину і в АРАФ-1. Саме з цими ділянками зв'язується прокаспаза-9 та АРАФ-1 при формуванні апоптосом [18, 19]. Зв'язування цитохрому *c* з G-актином змінює конформацію останнього таким чином, що мічений залишок тирозину з'являється в іншому за гідрофобністю оточенні, що призводить до зміни інтенсивності флуоресценції мітки [13].

Наші, опубліковані раніше результати, як і дані інших авторів дають змогу припустити, що G-актин є активним учасником апоптозу, хелатує прокаспазу-9 [10, 11]. Ймовірно, каспазу-3 ефективно хелатує частково полімеризований F-актин [10]. Можна припустити, що актин є місцем для ще однієї точки дії цитохрому *c*. У свою чергу це може залучати інші молекули апоптозом в утворення мультимолекулярного комплексу, що активує каспазу-3 і розташованого в межах локалізації F-актину. Таким чином, актиновий цитоскелет може бути прямо залучений до апоптозу.

тимолекулярного комплексу, що активує каспазу-3 і розташованого в межах локалізації F-актину. Таким чином, актиновий цитоскелет може бути прямо залучений до апоптозу.

ВИСНОВКИ

1. У лужному середовищі СВQСА, незалежно від наявності ціаніду, реагує з фенольним кільцем тирозину як у складі білка або пептиду, так і у вигляді вільної амінокислоти з утворенням флуоресцентного продукту. Флуоресценція цієї сполуки відрізняється за довжиною хвиль збудження та емісії світла від флуоресценції продукту залежної від ціаніду реакції СВQСА з аміногрупами. Точну її хімічну структуру ще належить встановити.

2. Цитохром *c* у мікромолярному діапазоні концентрацій зменшував флуоресценцію дозозалежно, що вказує на його пряму взаємодію з G-актином. При цьому зміни флуоресценції стосувалися продукту реакції із залишком тирозину, але не з аміногрупами.

3. Специфічні для актину токсини та інші регулятори полімеризації зменшували інтенсивність флуоресценції міченого актину, але не впливали суттєво на ефект цитохрому *c*.

4. На відміну від нативного міченого актину, цитохром *c* не впливав на флуоресценцію інактивованого міченого актину, що свідчить про пряму кореляцію флуоресценції нативного G-актину зі змінами його третинної структури.

5. Встановлений у роботі факт взаємодії актину з цитохромом *c* дає змогу припустити, що актин бере безпосередню участь в апоптозі, зокрема, як регулятор збірки апоптосом, що потребує подальших досліджень.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

I.M. Prudnikov, A.M. Smirnov, V.M. Tsyvkin

DYNAMICS OF CONFORMATIONAL CHANGES IN FLUORESCENTLY LABELED G-ACTIN UPON INTERACTION WITH CYTOCHROME *c* AS EVIDENCE OF POTENTIAL INVOLVEMENT OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN APOPTOSIS

Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: igor.prudnikov@biph.kiev.ua

Existing data suggest the involvement of cytoskeletal proteins, particularly actin, in the process of apoptosis. However, the exact role of actin remains unclear. The aim of this study was to investigate the potential functional interaction of this protein with one of the key participants in apoptosis, cytochrome *c*. We utilized fluorescent labeling of amino acid residues of rat brain-derived β/γ -actin in its monomeric form (G-actin) using the fluorescent dye 3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA) to monitor induced molecular changes. It is well known that CBQCA reacts with primary amines in the presence of cyanide to form a fluorescent product. However, we also discovered the formation of another fluorescent derivative when the dye reacted with the phenolic group of free tyrosine, as well as its residues in peptides and proteins, independent of cyanide presence. During the investigation of conformational changes in labeled G-actin molecules, we found that the fluorescence intensity varied in the spectral region characteristic of the reaction product with tyrosine residues, but not with amine groups. Specifically, cytochrome *c* at micromolar concentrations decreased fluorescence in a dose-dependent manner, indicating direct interaction with G-actin. Actin-specific toxins and other factors affecting its polymerization also reduced the fluorescence intensity of labeled actin, without significantly influencing the effect of cytochrome *c*. At the same time, cytochrome *c* had no effect on the fluorescence of inactivated labeled actin. Thus, by utilizing the previously undescribed CBQCA labeling of tyrosine residues, we were able to study conformational changes in the actin molecule and establish the interaction of this protein with cytochrome *c*. It can be hypothesized that actin is involved in apoptosis as a regulator of apoptosome assembly, particularly through its interaction with cytochrome *c*.
Key words: 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA); actin; apoptosis; cytochrome *c*; cytoskeleton; tyrosine.

REFERENCES

1. Yuan J, Ofengeim D. A guide to cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(5):379-95.
2. Flores-Romero H, Ros U, Garcia-Saez AJ. Pore formation in regulated cell death. *EMBO J.* 2020;39(23):e105753.
3. Bibo-Verdugo B, Salvesen G. Evolution of caspases and the invention of pyroptosis. *Int J Mol Sci.* 2024;25(10):5270.
4. Yuan S, Yu X, Asara JM, Heuser JE, Ludtke SJ, Akey CW. The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and

- interactions with caspase-3. *Structure.* 2011;19(8):1084-96.
5. Dorstyn L, Akey CW, Kumar S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ.* 2018;25(7):1194-208.
6. Li Y, Zhou M, Hu Q, Bai X-C, Huang W, Scheres SHW, Shi Y. Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(7):1542-7.
7. Dorstyn L, Akey CW, Kumar S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ.* 2018;25(7):1194-208.
8. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie.* 2017;135:111-25.
9. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 2011;40:169-86.
10. King VL, Campellone KG. F-actin-rich territories coordinate apoptosome assembly and caspase activation during DNA damage-induced intrinsic apoptosis. *Mol Biol Cell.* 2023;34(5):ar41.
11. Prudnikov I, Smirnov A, Tsyvkin V. The actin cytoskeleton is a key element of the apoptosome assembly in the developing brain. *Proceedings.* 2021;75(1):1-10.
12. Griffith LM, Pollard TD. Cross-linking of actin filament networks by self-association and actin-binding macromolecules. *J Biol Chem.* 1982;257(15):9135-42.
13. Zechel K. The interaction of 6-propionyl-2-(*NN*-dimethyl) aminonaphthalene (PRODAN)-labelled actin with actin-binding proteins and drugs. *Biochem J.* 1993; 290(Part 2):411-7.
14. Bertazzon A, Tian GH, Lamblin A, Tsong TY. Enthalpic and entropic contributions to actin stability: calorimetry, circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium. *Biochemistry.* 1990;29(1):291-8.
15. Miki M, Kouyama T. Domain motion in actin observed by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry.* 1994;33(33):10171-7.
16. Marushchak D, Grenklo S, Johansson T, Karlsson R, Johansson LB-A. Fluorescence depolarization studies of filamentous actin analyzed with a genetic algorithm. *Biophys J.* 2007;93(9):3291-9.
17. Barden JA, Remedios CG. Fluorescence resonance energy transfer between sites in G-actin. The spatial relationship between Cys-10, Tyr-69, Cys-374, the high-affinity metal and the nucleotide. *J Biochem.* 1987;168(1):103-9.
18. Yadav N, Gogada R, O'Malley J, Gundampati RK, Jayanthi S, Hashmi S, Lella R, Zhang D, Wang J, Kumar R, Kumar TKS, Chandra D. Molecular insights on cytochrome *c* and nucleotide regulation of apoptosome function and its implication in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(1):118573.
19. Sever AIM, Alderson TR, Rennella E, Aramini JM, Liu ZH, Harkness RW, Kay LE. Activation of caspase-9 on the apoptosome as studied by methyl-TROSY NMR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2023;120(51):e2310944120.

*Матеріал надійшов
до редакції 05.10.2024*