

Действие ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 на дексаметазониндуцированный апоптоз опухолевых клеток

Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Марошкина А.Н., Белкина М.В., Чечина О.Е., Зима А.П.

Action of inhibitors Heat shock proteins 90 and 27 on dexamethasone-induced apoptosis of tumor cells

Kaigorodova Ye.V., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Maroshkina A.N., Belkina M.V., Chechina O.Ye., Zima A.P.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др.

Представлено исследование программированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat в условиях культивирования с различными концентрациями дексаметазона, селективными ингибиторами Hsp90 (Heat shock protein — Hsp) (17-AAG) и Hsp27 (KRIBB3). Оценку реализации апоптоза проводили методом флуоресцентной микроскопии с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидий йодида. Ингибирование Hsp90 и Hsp27 приводит к активации апоптотической программы опухолевых клеток Jurkat и усилению дексаметазониндуцированного апоптоза. В опухолевых клетках Hsp27 и Hsp90 играют роль ингибиторов апоптоза.

Ключевые слова: опухолевые клетки, апоптоз, белки теплового шока 27 и 90.

Programmed cell death of tumor cells of line Jurkat in conditions of cultivation with various concentration of dexamethasone, selective inhibitors of Hsp90 (Heat shock protein — Hsp) (17-AAG) and Hsp27 (KRIBB3) was investigated. An estimation of realization apoptosis spent by method of fluorescent microscopy with use annexin V-FITC and propidium iodide. Inhibition of Hsp90 and Hsp27 leads to activation of tumor cells Jurkat apoptotic program and strengthening of dexamethasone-induced apoptosis. Hsp27 and Hsp90 play an antiapoptotic role in tumor cells of line Jurkat.

Key words: tumor cells, apoptosis, heat shock proteins 90 and 27.

УДК 616-006-091.818-092.4-001.36-02-001.16

Введение

Эндогенная и экзогенная регуляция апоптоза, уравновешивающего эффекты клеточной пролиферации, элиминации поврежденных, функционально неполноценных и опухолевых клеток, является актуальным аспектом теоретических исследований современной медицины. Факторы, оказывающие влияние на запуск и регуляцию программы клеточной гибели при опухолевых заболеваниях, весьма многочисленны и разнообразны [1—3, 13]. Получение новых знаний фундаментального характера об участии внутри- и внеклеточных сигнальных систем в дисрегуляции летальной программы клеток может стать основой для разработки способов терапевтической коррекции нарушений апоптоза при различных патологических состояниях.

В настоящее время наибольший интерес у исследователей вызывает проблема дисрегуляции апоптоза при

участии белков семейства TNF, каспаз, белков семейства Bcl-2, p53, гранзимов, активных форм кислорода, кальция, цитокинов, MAP-киназ. Наряду с этим важное значение в регуляции программированной гибели клеток при различных патологических процессах отводится белкам теплового шока. Белки теплового шока (Heat shock proteins — Hsps) относятся к стрессиндуцированным молекулам, которые участвуют в формировании правильной трехмерной конформации вновь синтезированных полипептидов, поддерживают функциональную активность внутриклеточных белков и элиминацию поврежденных белковых форм, а также обеспечивают транспорт протеинов через клеточные мембраны, процессы ассоциации-диссоциации внутриклеточных надмолекулярных комплексов, защиту белков от агрегации. Кроме того, белки теплового шока обладают анти- и проапоптотической функцией. В

последнее время именно белкам теплового шока отводят существенную роль в дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток, в которых данные белки экспрессируются в избытке.

Цель настоящего исследования — оценка особенностей реализации апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при действии ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 (17-AAG и KRIBB3 соответственно) и дексаметазона (классического индуктора апоптоза).

Материал и методы

Материалом для исследования являлись опухолевые клетки линии Jurkat (Т-лимфобластоидная линия человека), полученные из банка клеточных культур НИИ цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали суспензионным способом в питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», г. Санкт-Петербург), инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры каждые 2—3 сут. Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью трипанового синего.

В качестве индуктора апоптоза служил дексаметазон в различных конечных концентрациях ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} моль). Для выявления роли белков теплового шока 90 (Hsp90) и 27 (Hsp27) в регуляции апоптоза опухолевых клеток культуру Jurkat инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5% CO₂ в присутствии ингибитора Hsp90 17-AAG (Sigma Aldrich, США) в концентрации $20 \cdot 10^{-6}$ моль и ингибитора Hsp27 KRIBB3 (Sigma Aldrich, США) в концентрации $10 \cdot 10^{-6}$ моль. Все препараты растворяли в среде RPMI-1640 *ex tempore*.

Оценку реализации апоптоза проводили методом флуоресцентной микроскопии на микроскопе AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия) с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидий йодида (Catlag,

США) согласно инструкции фирмы-производителя. Метод основан на способности FITC-меченного аннексина V специфически связываться с фосфатидилсерином, пропидия йодидом, интерколорировать с молекулой ДНК.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Данные представлены в виде медианы *Me*, верхнего и нижнего квартилей *Q*₁—*Q*₃.

Результаты и обсуждение

Опухолевые клетки в процессе канцерогенеза вырабатывают собственные защитные белки, вследствие чего они значительно отличаются от нормальных клеток организма, в том числе и по способности вступать в апоптоз. Важнейшими среди основных антагонистов проапоптотических молекул в процессе программированной клеточной смерти являются белки теплового шока, в частности Hsp27 и Hsp90 [5, 18]. Для выявления роли данных белков в дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток применяли селективные ингибиторы 17-AAG и KRIBB3 совместно с индуктором апоптоза и без него.

Выбор нужной проапоптотической концентрации дексаметазона основывался на способности вызывать максимальное увеличение количества апоптотически измененных клеток и минимальное — некротизированных. При добавлении в культуру Jurkat индуктора апоптоза в концентрациях $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} моль отмечалось достоверное увеличение количества аннексин-положительных клеток по сравнению с интактной культурой. Максимальное значение числа апоптотических клеток было выявлено при действии дексаметазона в концентрации 10^{-5} моль (таблица). Глюкокортикоиды опосредуют свое действие через специфические внутриклеточные рецепторы (GR) [7, 10].

Количество апоптотических клеток в культуре Jurkat при действии дексаметазона (*Me* (*Q*₁—*Q*₃))

Показатель	Интактная культура Jurkat	Концентрация дексаметазона, моль			
		$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Количество аннексин-положительных клеток, %	1,57 (0,92—2,51)	5,78 (4,32—6,56) $p_1 < 0,001$	16,69 (12,38—18,3) $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	9,98 (8,22—18,45) $p_1 < 0,001; p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	3,25 (3,05—3,78) $p_1 < 0,001; p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05; p_4 < 0,05$

Примечание. p_1 — достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре; p_2 — по сравнению с аналогичными показателями в культуре при действии дексаметазона в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ моль; p_3 — по сравнению с аналогичными показателями

телями в культуре при действии дексаметазона в концентрации 10^{-5} моль; p_4 — по сравнению с аналогичными показателями в культуре при действии дексаметазона в концентрации 10^{-4} моль.

Ядерные GR регулируют экспрессию большого количества генов, инициируя или ингибируя генную транскрипцию [19]. Под воздействием данных гормонов увеличивается экспрессия кальмодулина [12], повышается концентрация внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата [8], снижается синтез интерлейкина-2 [9], резко возрастает образование активных форм кислорода [17]. Кроме того, апоптоз, вызванный глюкокортикоидами, реализуется через митохондриальный путь со снижением трансмембранного потенциала и выходом цитохрома *c* в цитозоль [11].

При добавлении в культуру Jurkat селективных ингибиторов белков теплового шока 27 и 90 отмечалось достоверное увеличение числа апоптотических клеток по сравнению с интактной культурой (11,59 (10,21—16,98)% и 10,22 (9,54—15,38)% соответственно) (рисунок). Уровень индуцированного апоптоза опухолевых клеток при действии дексаметазона статистически не отличался от такового в случаях с ингибиторами Hsp90 и Hsp27. Совместное применение дексаметазона как с ингибитором KRIBB3, так и с ингибитором 17-AAG приводило к увеличению числа аннексин-положительных клеток до значений 32,91 (30,77—42,45)% и 34,45 (27,45—37,59)% соответственно (рисунок).

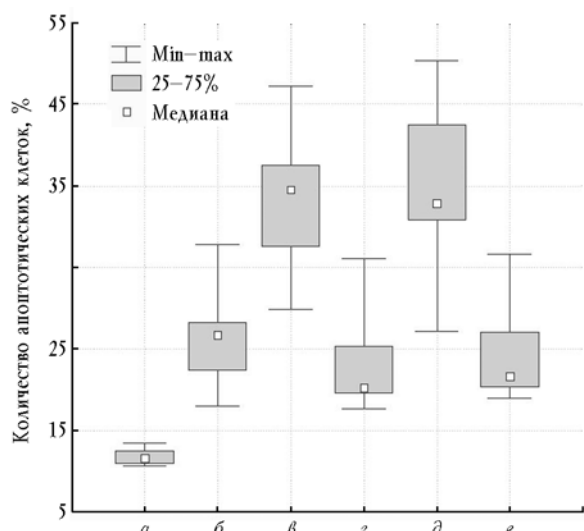
дексаметазоном в концентрации 10^{-5} моль и ингибитором KRIBB3; e — опухолевые клетки, инкубированные с ингибитором KRIBB3

Белки теплового шока способны модулировать процесс программированной гибели клетки на различных этапах. Так, Hsp препятствуют деятельности проапоптотических белков, которые способствуют выходу белков межмембранного пространства митохондрий и активации каспаз. Кроме того, данные белки могут непосредственно связывать цитохром *c*, находящийся в цитоплазме [15]. Hsp нарушают сборку апоптосомы, непосредственно связываясь с Araf-1, что предотвращает активацию прокаспазы-9 [5].

Однако известна также и проапоптотическая роль белков теплового шока: Hsp27 может способствовать TNF-зависимому апоптозу, ингибируя IκB-деградацию, а Hsp90, взаимодействуя с проапоптотическим белком, индуцирует митохондриальный путь программированной клеточной гибели [4].

Результаты представленного исследования показали, что ингибирование Hsp27 и Hsp90 приводит к активации как спонтанного апоптоза опухолевых клеток, так и индуцированного дексаметазоном (рисунок). Полученные в указанном аспекте данные позволяют считать, что Hsp27 и Hsp90 оказывают антиапоптотический эффект в опухолевых клетках линии Jurkat.

Молекулярные механизмы антиапоптотической активности Hsp27 еще недостаточно изучены и, вероятно, могут различаться в зависимости от типа клеток. В настоящее время в литературе постулируются три основных пути влияния малых белков теплового шока (sHsp) на процессы апоптоза. Во-первых, sHsp могут влиять на функционирование и передачу сигнала от рецептора Fas/Apo-1 внутрь клетки, во-вторых, они могут тем или иным способом влиять на выход цитохрома *c* из митохондрий и, наконец, эти белки могут влиять на формирование апоптосомы и активацию каскада каспаз. Имеются сведения, что Hsp27 индуцирует протеосомальную деградацию ингибитора NF-κB [14], а также подавляет активацию прокаспазы-9 и прокаспазы-3 [18]. По мнению J. Lewis и соавт. (2000), в клеточной линии U-937 белок Hsp90 препятствует формированию апоптосомы, взаимодействуя с RIP-1-киназой, а это предопределяет выживание клеток при участии NF-κB.



Уровень апоптотических клеток линии Jurkat при ингибировании белков теплового шока 90 и 27: *a* — интактная культура опухолевых клеток Jurkat; *б* — опухолевые клетки, инкубированные с дексаметазоном в концентрации 10^{-5} моль; *в* — опухолевые клетки, инкубированные с дексаметазоном в концентрации 10^{-5} моль и ингибитором 17-AAG; *г* — опухолевые клетки, инкубированные с ингибитором 17-AAG; *д* — опухолевые клетки, инкубированные с

Также было показано, что в клетках острой миелоидной лейкемии Hsp27 предотвращает лекарственно-индуцированный апоптоз [16]. В многочисленных клетках миеломы угнетение активности или снижение содержания Hsp27 может восстановить апоптотический ответ на дексаметазон через активацию каспазо-зависимого пути [6], что согласуется с результатами данного исследования.

Заключение

Таким образом, ингибирование белков теплового шока 90 и 27 приводит к активации апоптотической программы опухолевых клеток Т-лимфобластного лейкоза человека и усилению дексаметазониндуцированного апоптоза. Применение селективных ингибиторов белков теплового шока в качестве индукторов апоптоза опухолевых клеток открывает большие перспективы в лечении онкологических заболеваний.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» за 2009—2013 гг. (ГК № П1203; ГК 02.740.11.0311).

Литература

1. Балушкина Н.Н., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх. патологии. 2001. № 1. С. 51—59.
2. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Жукова О.Б. Молекулярные основы дисрегуляции программированной гибели лимфоцитов при хронической вирусной инфекции // Бюл. сиб. медицины. 2006. Т. 5, № 2. С. 23—31.
3. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю. и др. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94, № 6. С. 710—718.
4. Arya R., Mallik M., Lakhota S.C. Heat shock genes — integrating cell survival and death // J. Biosci. 2007. V. 32, № 3. P. 595—610.
5. Beere H.M. «The stress of dying»: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis // J. Cell Sci. 2004. V. 117, Pt. 13. P. 2641—2651.
6. Chauhan D., Li G., Hideshima T. et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance // Blood. 2003. V. 102, № 9. P. 3379—3386.
7. Distelhorst C.W., DUBYAK G. Role of calcium in glucocorticosteroid-induced apoptosis of thymocytes and lymphoma cells: resurrection of old theories by new findings // Blood. 1998. V. 91, №3. P. 731—734.
8. Dowd D.R., Miesfeld R.L. Evidence that glucocorticoid and cyclic AMP-induced apoptotic pathways in lymphocytes share distal events // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12, № 8. P. 3600—3608.
9. Evan G., Littlewood T. A matter of life and cell death // Science. 1998. V. 281, № 5381. P. 1317—1322.
10. Giguère V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G. et al. Functional domains of the human glucocorticoid receptor // Cell. 1986. V. 46. № 5. P. 645—652.
11. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis // Science. 1998. V. 281, № 5381. P. 1309—1312.
12. Kofler R. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells // Histochem. Cell. Biol. 2000. V. 114, № 1. P. 1—7.
13. Negroni L., Samson M., Guignon J.M. et al. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation // Mol. Cancer. Ther. 2007. V. 6, № 10. P. 2747—2756.
14. Parcellier A., Schmitt E., Gurbuxani S. et al. Hsp27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23, № 16. P. 5790—5802.
15. Paul C., Manero F., Gonin S. et al. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release // Mol. Cell. Biol. 2002. V. 22, № 3. P. 816—834.
16. Schepers H., Geugien M., van der Toorn M. et al. HSP27 protects AML cells against VP-16-induced apoptosis through modulation of p38 and c-Jun // Exp. Hematol. 2005. V. 33, № 6. P. 660—670.
17. Smets L.A., Salomons G., van den Berg J. Glucocorticoid induced apoptosis in leukemia // Adv. Exp. Med. Biol. 1999. V. 457. P. 607—614.
18. Sreedhar A.S., Kalmár E., Csermely P. et al. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance // FEBS Lett. 2004. V. 562, № 1—3. P. 11—5.
19. Yamamoto K.R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks // Annu. Rev. Genet. 1985. V. 19. P. 209—252.

Поступила в редакцию 28.09.2009 г.

Утверждена к печати 17.03.2010 г.

Сведения об авторах

Е.В. Кайгородова — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Н.В. Рязанцева — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

В.В. Новицкий — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

А.Н. Марошкина — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др.

Действие ингибиторов белков теплового шока 90 и 27...

М.В. Белкина — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

О.Е. Чечина — канд. мед. наук, руководитель НОЦ молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).

А.П. Зима — д-р мед. наук, доцент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Кайгородова Евгения Викторовна, тел./факс (8-3822) 53-33-09, тел. 8-960-971-16-13, e-mail: zlobinae@mail.ru