

На правах рукописи

МАРОШКИНА

Анна Николаевна

**РОЛЬ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP90 И HSP27 В
ДИЗРЕГУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПУТИ
АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (г. Томск).

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева Наталья Владимировна

доктор медицинских наук

Зима Анастасия Павловна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор, профессор кафедры
биохимии и молекулярной биологии
ГБОУ ВПО СибГМУ
Минздравсоцразвития России

Федорова Татьяна Сергеевна

доктор медицинских наук,
заведующий лабораторией
нейробиологии ФГБУ
«НИИПЗ» СО РАМН

Солонский Анатолий Владимирович

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (г. Красноярск).

Защита состоится «__» _____ 2012 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития РФ

Автореферат разослан «__» _____ 2012г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



И.В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным ВОЗ смертность в мире от злокачественных новообразований занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний [Чиссова В.И. и соавт., 2011]. Несмотря на то, что в последние годы отмечаются определенные успехи в лечении онкологических больных, противоопухолевая терапия не является совершенной и имеет множество побочных действий. Общеизвестно, что идеальным лекарством будет то, которое уничтожит опухолевые клетки, не повреждая при этом клетки нормальной ткани. Такое средство должно действовать на молекулярные мишени, приводя к остановке пролиферации раковых клеток и/или инициации программированной клеточной гибели.

В настоящее время актуальным направлением медицины является исследование молекулярных механизмов модуляции апоптоза как основного звена патогенеза злокачественных опухолей. Реализация танатогенной программы зависит от соотношения индукторов и ингибиторов апоптоза, а также от регуляторных внутриклеточных молекул, к числу которых относятся белки теплового шока [Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006; Arya R., et al., 2007; Krampe V., Al-Rubeai M., 2010]. Эти протеины обладают шаперонной активностью и играют важную роль при фолдинге и сборке белковых комплексов, способствуют приобретению белком активной конформации, препятствуют нежелательной агрегации белков, стабилизируют частично свернутые белки и облегчают их транспорт через мембраны внутри клетки. Белки теплового шока направляют поврежденные белки к протеасомам для протеолиза и поддерживают денатурированные белки в состоянии готовности к рефолдингу [Ellis R.J. et al., 2006; Arya R. et al., 2007; Lanneau D. et al., 2008].

В опухолевых клетках имеет место сверхэкспрессия протеинов семейства Hsp (heat shock proteins - белки теплового шока), которые влияют на про- и антиапоптотические молекулярные мишени, непосредственно взаимодействуя с ними или через внутриклеточные сигнальные системы [Kamal A. et al., 2004; Parcellier A. et al., 2005; Kawakami H. et al., 2007]. Известно, что под контролем белков-шаперонов находятся белки семейства Bcl-2, являющиеся основными регуляторами митохондриального пути апоптоза. Повреждение митохондрий и выход апоптогенных факторов (цитохром *c*, Smac/Diablo, AIF, Omi/HtrA2 и эндонуклеаза G) из межмембранного пространства митохондрий происходит и при индукции рецепторного и ядерного путей [Antonsson B., 2004; Бра М. и соавт., 2005; Rasola A., Bernardi P., 2007]. Таким образом, белки теплового шока, подавляя активацию митохондриального пути программированной гибели, обеспечивают резистентность опухолевых клеток к апоптозу. В частности, Hsp способны влиять на проницаемость митохондриальной мембраны, связываться с апоптогенными факторами, ингибировать образование апоптосомы и инактивировать каспазы-9 и -3 [Mosser D.D. et al., 2004; Arya R. et al., 2007; Lanneau D. et al., 2008, 2010; Joly A.L. et al., 2010].

Несмотря на большое количество экспериментальных работ о роли белков теплового шока в регуляции танатогенной программы, апоптотическая функция данных шаперонов в канцерогенезе недостаточно изучена. В связи с этим исследование механизмов модуляции митохондриального пути апоптоза белками

теплового шока в опухолевых клетках важно не только с точки зрения понимания особенностей патогенеза опухолевого процесса; при этом открываются перспективы новых направлений определения таргетной терапии злокачественных новообразований.

Цель исследования: установить роль белков теплового шока (Hsp90 и Hsp27) в молекулярных механизмах дисрегуляции митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat.

Задачи исследования:

1. Оценить уровень мРНК генов hsp90 и hsp27 и содержание фосфорилированных форм белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 в интактных опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat и при действии модулятора митохондриального пути апоптоза этопозида *in vitro*.
2. Оценить особенности изменений трансмембранного потенциала митохондрий опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat в условиях селективного ингибирования белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 с использованием 17-(Allylamino)geldanamycin (17-AAG) и 5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole (KRIBB3).
3. Установить закономерности влияния белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 на содержание проапоптотических (Bax, Bad) и антиапоптотических (Bcl-2) белков в интактных культурах клеток (клеточные линии ТНР-1 и Jurkat) и при действии селективных ингибиторов белков теплового шока.
4. Установить общие закономерности и особенности участия белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 в реализации митохондриального пути апоптоза в опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat.

Научная новизна. Получены новые данные о влиянии белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 на реализацию митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat. Впервые в условиях *in vitro* показано, что в опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat увеличена экспрессия мРНК и внутриклеточное количество фосфорилированной формы индуцибельного белка теплового шока Hsp27 на фоне сниженного количества клеток, вступивших в апоптоз. Содержание активной формы конститутивного белка Hsp90 снижено в клетках острой моноцитарной лейкемии линии ТНР-1 и в клетках Т-лимфобластного лейкоза линии Jurkat.

Впервые выявлено, что в культуре опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat ингибирование белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 приводит к повышению количества клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий на фоне увеличения количества клеток, вступивших в апоптоз. Установлено, что ингибиторы Hsp90 и Hsp27 (17-AAG и KRIBB3, соответственно) разнонаправлено влияют на соотношение белков семейства Bcl-2 (Bax, Bad и Bcl-2) в опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat, что определяет механизмы активации митохондриального пути апоптоза.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования, проведенного с использованием селективных ингибиторов к белкам теплового шока Hsp90 и Hsp27 (17-AAG и KRIBB3, соответственно), раскрывают молекулярные механизмы влияния шаперонов Hsp90 и Hsp27 на модуляцию митохондриального пути апоптоза в опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat. Установлена роль Hsp90 и Hsp27 в изменении баланса про- и антиапоптотических

белков семейства Bcl-2.

В результате проведенного исследования идентифицированы молекулярные мишени, которые могут быть использованы при разработке технологических основ таргетной терапии злокачественных новообразований.

Положения, выносимые на защиту

1. В опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 разнонаправлено изменяется уровень экспрессии мРНК и содержание фосфорилированных форм белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 на фоне снижения количества клеток, вступивших в апоптоз.
2. Белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 играют роль ингибиторов митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat.
3. Шапероны Hsp90 и Hsp27 оказывают неоднозначное влияние на белки семейства Bcl-2 в зависимости от типа опухолевых клеток: в клетках линии Jurkat изменяют соотношение белков семейства Bcl-2 (Bax и Bcl-2), в клетках линии ТНР-1 снижают содержание белка Bad.

Апробация и реализация работы. Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на II Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2009» (Россия, Пермь, 2009), X, XII конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Россия, Томск, 2009, 2011), XII межрегиональной научно-практической конференции «Вопросы сохранения и развития здоровья населения республики Хакасия» (Россия, Абакан, 2009), международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Россия, Пущино, 2009, 2011), V, VI международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Россия, Москва, 2010, 2011), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 1000-летию Ярославля «Актуальные вопросы медицинской науки» (Россия, Ярославль, 2010), 13-й, 14-й межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицины» (Россия, Абакан, 2010, 2011), XVI межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Россия, Санкт-Петербург, 2010), IV международной конференции молодых ученых-медиков (Россия, Курск, 2010), III общероссийской научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (Россия, Сочи, 2010), международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Россия, Санкт-Петербург, 2010), 6-м международном конгрессе по патофизиологии «Gene-environment interaction in health and disease» (Канада, Монреаль, 2010), VI региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Россия, Томск, 2011), 4-й международной телеконференции «Фундаментальные науки и практика» (Россия, Томск, 2011).

Исследования выполняли в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» («Идентификация молекулярных мишеней коррекций нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток» (Государственный контракт от 27.08.2009 г. № П1203) и «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и

лечения социально-значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» (Государственный контракт № 02.740.11.0311)), поддержаны грантом Президента Российской Федерации «Исследование молекулярных механизмов регуляторного влияния белков теплового шока на апоптоз опухолевых клеток» (Государственный контракт №16.120.11.480–МК), грантом Carl Zeiss «Программа поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых» «Роль белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat» (от 23.12.2009 г. № СибГМУ 1/11 КЦ) и «Модуляция апоптоза опухолевых и нормальных лимфоцитов ингибиторами белков теплового шока» (№ СибГМУ 1/11 КУ).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии (разделы «Опухолевый рост», «Патофизиология клетки»), фундаментальных основ клинической медицины (дисциплина «Клиническая лабораторная диагностика», раздел «Молекулярные маркеры в алгоритмах диагностики онкологических заболеваний») ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 23 работы, из которых - 3 в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 190 источников, из которых 28 отечественных и 162 иностранных. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 24 рисунками.

ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу настоящей работы положены результаты комплексного исследования опухолевых клеток линий Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека) и ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека). Клетки приобретены в институте цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

Опухолевые клетки линии Jurkat синтезируют интерлейкин-2, трансформирующий фактор роста и ростовой фактор Т-клеток. Кроме того, клетки линии Jurkat экспрессируют на поверхности цитоплазматической мембраны CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD6+, CD7+, TCRalpha/beta+, различные хемокиновые рецепторы (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR4) и FasR. Клетки ТНР-1 экспрессируют CD4+, CD13+, CD15+, CD68+, Fc и С3b рецепторы, при этом отсутствуют поверхностные и цитоплазматические иммуноглобулины. Кроме того, опухолевые клетки синтезируют TNF- α , IL-1 α и IL-1 β , обладают фагоцитарной активностью и способны дифференцироваться в макрофагоподобные клетки.

Наряду с этим материалом исследования явились культуры мононуклеарных лейкоцитов, полученных у 25 здоровых доноров (12 мужчин и 13 женщин в возрасте от 18 до 45 лет). Клинически и анамнестически у всех здоровых доноров были исключены инфекционные заболевания, обострение хронических патологических процессов, а также онкологические, психические, наследственные, аллергические заболевания, алкогольная и наркотическая зависимости. Материалом исследования являлась венозная кровь, обследованных лиц, взятая из

локтевой вены утром до приема пищи (кровь стабилизировали гепарином - 25 ЕД/мл). Для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени венозную кровь стабилизировали ЭДТА.

С целью изучения влияния белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на реализацию митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток исследование проводили в два этапа. На первом этапе осуществляли подбор апоптотической дозы селективных ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на опухолевых клетках линии Jurkat. Также была подобрана проапоптотическая концентрация противоопухолевого средства – этопозида – для оценки цитотоксического эффекта и совместного действия данного препарата с ингибиторами белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на опухолевые клетки. На втором этапе была проведена проверка гипотезы об участии белков Hsp27 и Hsp90 в дисрегуляции митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток *in vitro* в условиях инкубации с 17-ААG (конечная концентрация 5 мкМ), KRIBB3 (конечная концентрация 0,1 мкМ) и этопозидом (конечная концентрация 8 мкг/мл) и при их совместном действии.

Описание экспериментальных моделей в соответствии с использованными методами исследования и культурами клеток представлено в таблице 1.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Венозную гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) выдерживали при температуре 37°C в течение 40 мин для отделения плазмы и эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077\text{г/см}^3$) в соотношении 1:2 и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо из смеси мононуклеарных клеток собирали в стерильную центрифужную пробирку. Дважды отмывали средой RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 об/мин.

Выделенные мононуклеарные лейкоциты крови и опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 культивировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной при 56°C в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамина и 100 мкг/мл гентамицина («INS», США). Клетки инкубировали при температуре 37°C и в 5% атмосфере CO₂.

Количество клеток в состоянии апоптоза и некроза оценивали с помощью FITC-меченного аннексина V и пропидий йодида («Beckman Coulter», США) методом флуоресцентной микроскопии. Количество клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий регистрировали с помощью набора реагентов («BD MitoScreen», США) на проточном цитометре FacsCanto II («Becton Dickinson», США).

Для исследования внутриклеточного содержания белков теплового шока Hsp90 и Hsp27, а также белков семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bad) был использован метод вестерн блоттинга. Клетки сначала подвергали лизису, а затем белки разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в 5%-ном концентрирующем полиакриламидном геле (0,13 мМ Tris-HCl, pH=6,8 («Helikon», США)) и 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле (375 мМ Tris-HCl, pH=8,8 («Helikon», США)), содержащем 0,1% SDS, 0,1% ammonium persulfate

Экспериментальные модели исследования (мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров и опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1)

Методы исследования			Клеточные культуры		
			Мононуклеарные лейкоциты	Опухолевые клетки линии Jurkat	Опухолевые клетки линии ТНР-1
Определение количества апоптотически измененных клеток в аннексиновом тесте методом флуоресцентной микроскопии	Условия культивирования клеток	Интактные клетки	15	30	15
		С 0,1 мкМ KRIBB3	15	35	15
		С 5 мкМ 17-ААG	15	35	15
		С 8 мкг/мл этопозидом	15	30	15
		С 0,1 мкМ KRIBB3 и с 8 мкг/мл этопозидом	15	15	15
		С 5 мкМ 17-ААG и с 8 мкг/мл этопозидом	15	15	15
Определение числа клеток со сниженным уровнем трансмембранного потенциала митохондрий методом проточной цитофлуориметрии	Условия культивирования клеток	Интактные клетки	15	15	15
		С 0,1 мкМ KRIBB3	15	15	15
		С 5 мкМ 17-ААG	15	15	15
		С 8 мкг/мл этопозидом	15	15	15
		С 0,1 мкМ KRIBB3 и с 8 мкг/мл этопозидом	15	15	15
		С 5 мкМ 17-ААG и с 8 мкг/мл этопозидом	15	15	15
Исследование содержания белков-регуляторов апоптоза (Bad, Bax, Bcl-2) методом вестерн-блоттинга	Условия культивирования клеток	Интактные клетки	18	18	18
		С 0,1 мкМ KRIBB3	18	18	18
		С 5 мкМ 17-ААG	18	18	18
		С 8 мкг/мл этопозидом	18	18	18
		С 0,1 мкМ KRIBB3 и с 8 мкг/мл этопозидом	18	18	18
		С 5 мкМ 17-ААG и с 8 мкг/мл этопозидом	18	18	18
Определения содержания белков теплового шока Hsp27, Hsp90 и их фосфорилированных форм методом вестерн-блоттинга	Условия культивирования клеток	Интактные клетки	24	24	24
		С 8 мкг/мл этопозидом	12	12	12

Методы исследования			Клеточные культуры		
			Мононуклеарные лейкоциты	Опухолевые клетки линии Jurkat	Опухолевые клетки линии ТНР-1
Оценка экспрессии генов (уровня мРНК) белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 методом ПЦР в режиме реального времени	Условия культивирования клеток	Интактные клетки	20	20	20
		С 8 мкг/мл этопозидом	20	20	20

Примечание: 17-AAG - 17-(Allylamino)geldanamycin; KRIBB3 - 5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole

(PSA), 0,08% TEMED («Helikon», США) под действием электрического поля (10 В/см пути). Для последующего исследования белки электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США), при силе тока 45 мА. Затем нитроцеллюлозную мембрану блокировали 1% желатином с последующей инкубацией с первичными моноклональными антителами к белкам Вах (2 мкг/мл), Bcl-2 (1:1000), Bad (1 мкг/мл) («Sigma», США), Hsp27 (phospho S78, 1:2000), Hsp90 (1 мкг/мл), («Abcam», Великобритания) и поликлональными антителами к Hsp90 (phospho S226, 1:1000) и Hsp27 (0,5 мкг/мл), («Abcam», Великобритания). После мембрану инкубировали с вторичными моноклональными антителами с пероксидазной меткой («Biosource», США) в разведении 1:150000. Детекцию производили при добавлении хемилюминесцентного субстрата пероксидазы («Invitrogen», США). Вывод о содержании исследуемого белка в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала с фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа («Sigma», США), используя программное обеспечение TotalLab.

Для количественного определения экспрессии генов hsp27 и hsp90 использовали метод ПЦР в режиме реального времени. Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов крови и опухолевых клеток осуществляли с применением гуанидин изотиоционата с последующей фенол-хлороформной экстракцией с помощью набора «РИБО-золь-В» (Россия). ДНК синтезировали на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США). Для нормализации начального количества мРНК в образце и эффективности обратной транскрипции измерялось количество кДНК гена β -актин, относительно равной степени экспрессирующихся во всех клетках. Для определения относительного количества кДНК в образце использовался критерий ddCt. Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации гена «домашнего хозяйства»).

Оценку полученных данных проводили методами статистического описания

и проверки статистических гипотез. Для проверки нормальности распределения величин показателей использовали критерий Шапиро-Вилка. Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану (Me) и квартили (Q1-Q3). Для нормально распределенных выборок вычисляли среднее арифметическое (\bar{X}) и среднее квадратичное отклонение σ . При соответствии нормальному закону распределения признака в исследованных выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий Крускала-Уоллиса. Для попарного анализа независимых групп использовали критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проведенного нами исследования оценивали экспрессию генов hsp27 и hsp90, а также содержание белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 и их фосфорилированных форм в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1. В результате было зарегистрировано усиление экспрессии гена hsp27 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 по сравнению с количеством мРНК гена hsp27 в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров ($p < 0,05$; табл. 2). Активация белка теплового шока Hsp27 достигается за счет его фосфорилирования в различных фосфоакцепторных сайтах Ser15, Ser78 и Ser82 [Clevenger C.V., 2004; Song H. et al., 2004; Kostenko S., Moens U., 2009]. В нашем исследовании было зафиксировано увеличение внутриклеточного содержания белка теплового шока Hsp27 и его фосфорилированной формы в этих же клеточных линиях, относительно аналогичного показателя, обнаруженных при исследовании клеток, взятых у здоровых доноров ($p < 0,05$; рис. 1). По данным литературы, высокий уровень экспрессии Hsp27 обнаруживается при опухолевых процессах различной локализации: раке молочной железы, яичников, остеосаркоме, эндометриальном раке и лейкомиях [Parcellier A. et al., 2005]. Возможные причины, приводящие к повышению экспрессии белков теплового шока в опухолевых клетках, могут быть связаны с особенностями микроокружения опухоли (низкий уровень глюкозы, pH, недостаток кислорода и др.), появлением в ходе канцерогенеза онкобелков (например, мутированный p53) или с усилением экспрессии HSF1 [Tang D. et al., 2005].

Экспрессия гена hsp90 в опухолевых клетках линии Jurkat была снижена, а в культуре клеток линии ТНР-1 значимо не отличалась, по сравнению с аналогичным показателем в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Внутриклеточное содержание Hsp90, напротив, определялось на одном уровне во всех исследованных культурах клеток (рис. 1). Вероятно, это связано с тем, что, в отличие от Hsp27, белок теплового шока Hsp90 постоянно экспрессируется в клетках. В нетрансформированных клетках данный шаперон участвует в поддержании правильной конформации белков, вовлеченных в сигнальную трансдукцию (рецепторы, G-белки и транскрипционные факторы) [Козеко Л.Е., 2010]. В опухолевых клетках Hsp90 связывается с трансмембранными тирозиновыми киназами (HER-2/new, рецептор эпидермального фактора роста, Met и рецептор инсулиноподобного фактора роста

1), метастабильными сигнальными белками (p53, kit, Fit-3, v-Src), химерными сигнальными молекулами (NPM-ALK, BCR-ABL), стероидными рецепторами (андрогена, эстрогена и прогестерона) и регуляторами клеточного цикла (CdK4 и CdK6). В антистрессовых условиях данные белки образуют комплекс с Hsp90 для поддержания правильной стабильной и функционально активной конформации [Kamal A. et al., 2004; Kawakami H. et al., 2010].

Функциональная активность Hsp90 и Hsp27 регулируется посттрансляционными модификациями, к числу которых относятся фосфорилирование, ацетилирование и S-нитрозилирование [Козеко Л.Е., 2010]. Нами было исследовано содержание фосфорилированной формы Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1. Следует отметить, что содержание фосфорформы Hsp90 было ниже в опухолевых клетках, чем в мононуклеарных лейкоцитах (рис. 1). Фосфорилирование белка Hsp90 происходит по двум остатком аминокислот Ser226 и Ser225 и наиболее высокий уровень фосфорилирования достигается при физиологических условиях [Козеко Л.Е., 2010]. В лейкозных клетках низкая степень фосфорилирования белка Hsp90 может быть связана с мутацией в сайтах фосфорилирования или с гиперэкспрессией лейкемогенных тирозиновых киназ (Vcr-Abl, FLT3/D835Y, и Tel-PDGFR), которые способны подавлять фосфорилирование Hsp90 [Kurokawa M. et al., 2008].

Таблица 2

Экспрессия генов hsp27 и hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитах крови, полученных у здоровых доноров

Условия культивирования	Количество мРНК белка теплового шока Hsp90, усл. ед.			Количество мРНК белка теплового шока Hsp27, усл. ед.		
	Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров	Опухолевые клетки линии Jurkat	Опухолевые клетки линии ТНР-1	Мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров	Опухолевые клетки линии Jurkat	Опухолевые клетки линии ТНР-1
Интактные клетки	1,77 (1,31-2,13)	0,44 (0,12 – 0,57) p ₂ =0,009	0,76 (0,13–2,56) p ₂ >0,05 p ₃ >0,05	0,19 (0,15–0,31)	5,12 (4,79–5,84) p ₂ =0,009	2,61 (1,89–4,46) p ₂ =0,006 p ₃ >0,05
Добавление 8 мкг/мл этопозида	0,38 (0,19-0,47) p ₁ =0,003	5,04 (1,27–6,30) p ₁ =0,002 p ₂ =0,018	4,27 (2,06–4,86) p ₁ =0,01 p ₂ =0,027 p ₃ >0,05	4,93 (2,79–8,46) p ₁ =0,002	1,49 (1,26–2,19) p ₁ =0,006 p ₂ =0,021	4,22 (1,83–7,20) p ₁ >0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05

Примечание: p₁ - достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре; p₂ - в культуре мононуклеарных лейкоцитов; p₃ - в культуре опухолевых клеток линии Jurkat

На втором этапе проведенного исследования оценивали влияние белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на реализацию митохондриального пути апоптоза в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1. Для этого сначала определяли количество клеток, вступивших в апоптоз, в интактных культурах. Так, при

исследовании содержания апоптотически измененных клеток в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 отмечалось выраженное угнетение апоптоза, по сравнению с аналогичным показателем в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров ($p < 0,05$; рис. 2, 4). Другим важным показателем, характеризующим активацию запрограммированной клеточной гибели, является снижение трансмембранного потенциала митохондрий ($\Delta\psi$), что также может служить доказательством запуска митохондриального пути апоптоза. Результаты проведенного нами исследования показали, что количество клеток со сниженным $\Delta\psi$ было одинаковым во всех исследованных клеточных культурах (рис. 3). В опухолевых клетках резистентность внешней митохондриальной мембраны к индукторам апоптоза связана с увеличением количества антиоксидантов (глутатиона и тиореоксина) и сверхэкспрессией молекул, влияющих на формирование и открытие пор временной проницаемости (бензодиазепиновый рецептор, гексокиназа II циклофилин D и митохондриальные креатинкиназы) [Brenner C., Grimm S., 2006]. Кроме того, по данным литературы, механизмы дизрегуляции митохондриального пути апоптоза тесно сопряжены с повышенной экспрессией белков теплового шока в опухолевых клетках. В частности, белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 подавляют Akt-опосредованный апоптоз, приводят к диссоциации NF- κ B с его ингибитором, предотвращают выход апоптогенных факторов из митохондрий и образование апоптосомы, а также активацию каспаз [Sreedhar A.S. et al., 2004; Lanneau D. et al., 2008].

Для установления роли белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 в процессы модуляции митохондриального пути апоптоза в опухолевых клетках острого лимфобластного лейкоза (линия Jurkat) и моноцитарной лейкемии (линия ТНР-1) нами был проведен экспериментальный блок исследования *in vitro*. Так, при добавлении в культуру моноцитов и лимфоцитов, полученных у здоровых доноров, ингибитора белка теплового шока Hsp90 содержание клеток, вступивших в апоптоз, не изменялось по сравнению с его интактным уровнем, тогда как число клеток со сниженным $\Delta\psi$ существенно увеличивалось ($p < 0,05$). В то же время исследование апоптотической реакции опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 на присутствие в культуральной среде ингибитора 17-ААГ позволило выявить статистически значимое увеличение значений содержания апоптотически измененных клеток и клеток со сниженным $\Delta\psi$ относительно аналогичной величины показателя в интактных клетках ($p < 0,05$; рис. 3). Механизм активации апоптоза связан с деградацией белков-мишеней шаперона Hsp90. Например, при добавлении 17-ААГ инициация апоптотической смерти реализуется путем ингибирования NF- κ B [Kawakami H. et al., 2007], рецептора тирозиновой киназы c-kit и сигнальных молекул Akt и STAT3 [Fumo G. et al., 2004]. Кроме того, 17-ААГ-индуцированный апоптоз в опухолевых клетках приводит к уменьшению белка сурвивина и XIAP. Снижение количества XIAP, а также циклина D1 происходит из-за того, что при инактивации белка Hsp90 блокируется ИКК, что, в свою очередь, не вызывает связывания транскрипционного фактора NF- κ B с ДНК и наработку циклина D1 и XIAP [Kawakami H. et al., 2007]. Аналогичные результаты в изменении апоптотической активности и в содержании клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий нами были выявлены при добавлении в культуральную среду ингибитора Hsp27 (рис. 2, 3, 4). Известно, что KRIBB3 может блокировать протеинкиназа С -зависимое фосфорилирование

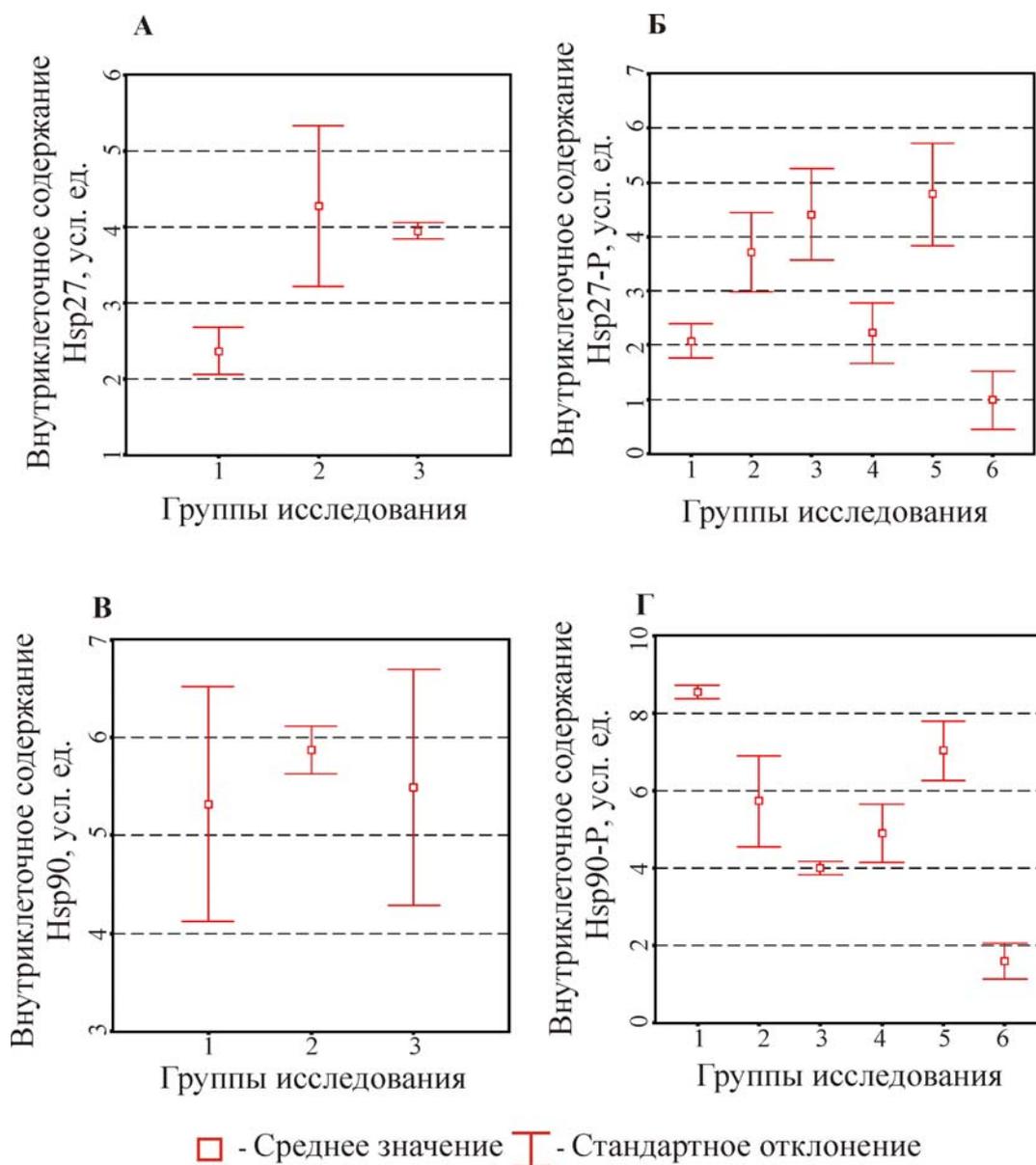


Рис. 1. Внутриклеточное содержание белков теплового шока Hsp27, Hsp90 и их фосфорилированных форм (по данным вестерн блоттинга)

А, В. Внутриклеточное содержание Hsp27 и Hsp90 в мононуклеарных лейкоцитах здоровых доноров (1), опухолевых клетках линий ТНР-1 (2) и Jurkat (3)

Б, Г. Внутриклеточное содержание фосфорилированной формы Hsp27 и Hsp90 в мононуклеарных лейкоцитах здоровых доноров, опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat, где 1, 2 - мононуклеарные лейкоциты здоровых доноров; 3, 4 - опухолевые клетки линии ТНР-1; 5, 6 - опухолевые клетки линии Jurkat; при этом 1, 3, 5 - интактные клетки; 2, 4, 6 - культура клеток, инкубированных с добавлением этопозида

белка Hsp27 [Shin K.D. et al., 2005]. Логично предположить, что, благодаря данному механизму действия ингибитора KRIBB3, антиапоптотическая функция шаперона Hsp27 не реализуется в опухолевых клетках.

Сигналами к модуляции митохондриального пути апоптоза могут быть изменения содержания белков семейства Bcl-2, регулирующих этот процесс как в норме, так и при патологических состояниях. В связи с этим для нас особый интерес представляло изучение влияния ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 на соотношение белков семейства Bcl-2. Так, в опухолевых клетках

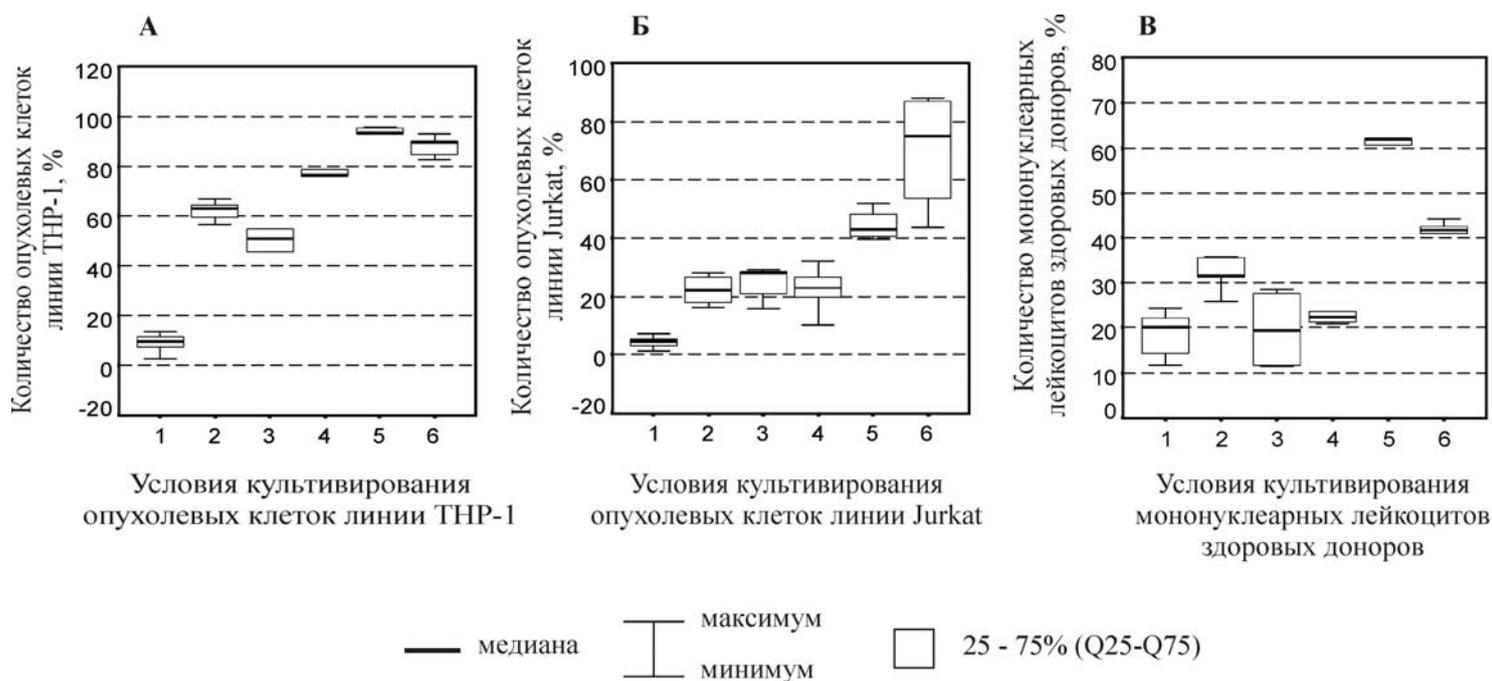


Рис. 2. Содержание апоптотически измененных опухолевых клеток линий THP-1(А), Jurkat (Б) и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров (В)
Примечание: 1 - интактные клетки; 2 - клетки, инкубированные с добавлением этопозида; 3 - клетки, инкубированные с добавлением KRIBB3; 4 - клетки, инкубированные с добавлением 17-AAG; 5 - клетки, инкубированные совместно с этопозидом и KRIBB3; 6 - клетки, инкубированные совместно с этопозидом и 17-AAG

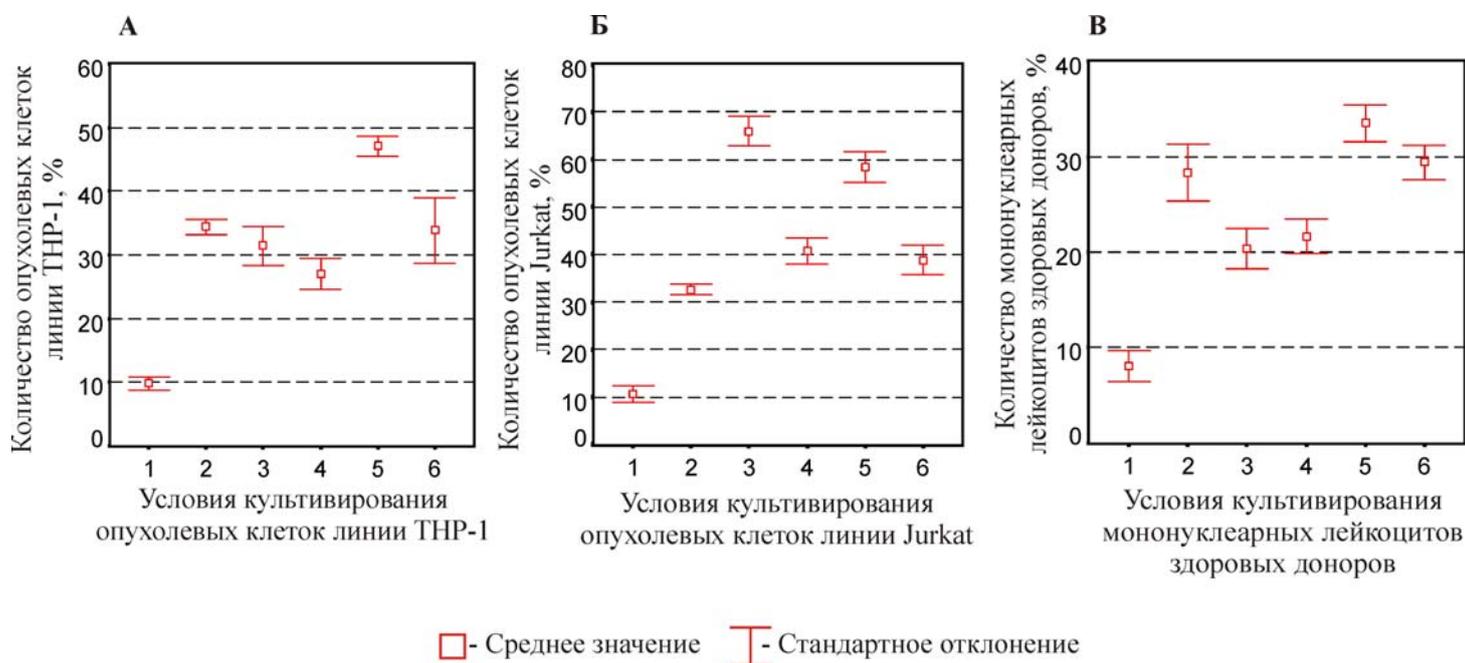


Рис. 3. Содержание опухолевых клеток линий THP-1(А), Jurkat (Б) и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров (В) со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий
Примечание: 1 - интактные клетки; 2 - клетки, инкубированные с добавлением этопозида; 3 - клетки, инкубированные с добавлением KRIBB3; 4 - клетки, инкубированные с добавлением 17-AAG; 5 - клетки, инкубированные совместно с этопозидом и KRIBB3; 6 - клетки, инкубированные совместно с этопозидом и 17-AAG

линии Jurkat при действии ингибитора белка теплового шока Hsp90 снижалось количество только белка Вах, по сравнению с величиной аналогичного показателя в интактных клетках ($p < 0,05$; рис. 5). Также было установлено, что добавление ингибитора белка теплового шока Hsp90 в культуральную среду опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 не влияет на синтез белка Bcl-2. Bcl-2 является антагонистом белка Вах, в связи с этим поддержание экспрессии данного белка на одном уровне в опухолевых клетках необходимо для инактивации Вах путем образования гетеродимеров Bcl-2/Вах. Кроме того, согласно данным литературы, в опухолевых клетках, сверхэкспрессирующих антиапоптотические белки Bcl-X_L и Bcl-2, 17-ААГ не способен вызвать конформационные изменения Вах, а значит, и провоцировать выход цитохрома *c* и Smac из митохондрий, а также индуцировать расщепление каспазы-3 [Nimmanapalli R. et al., 2003].

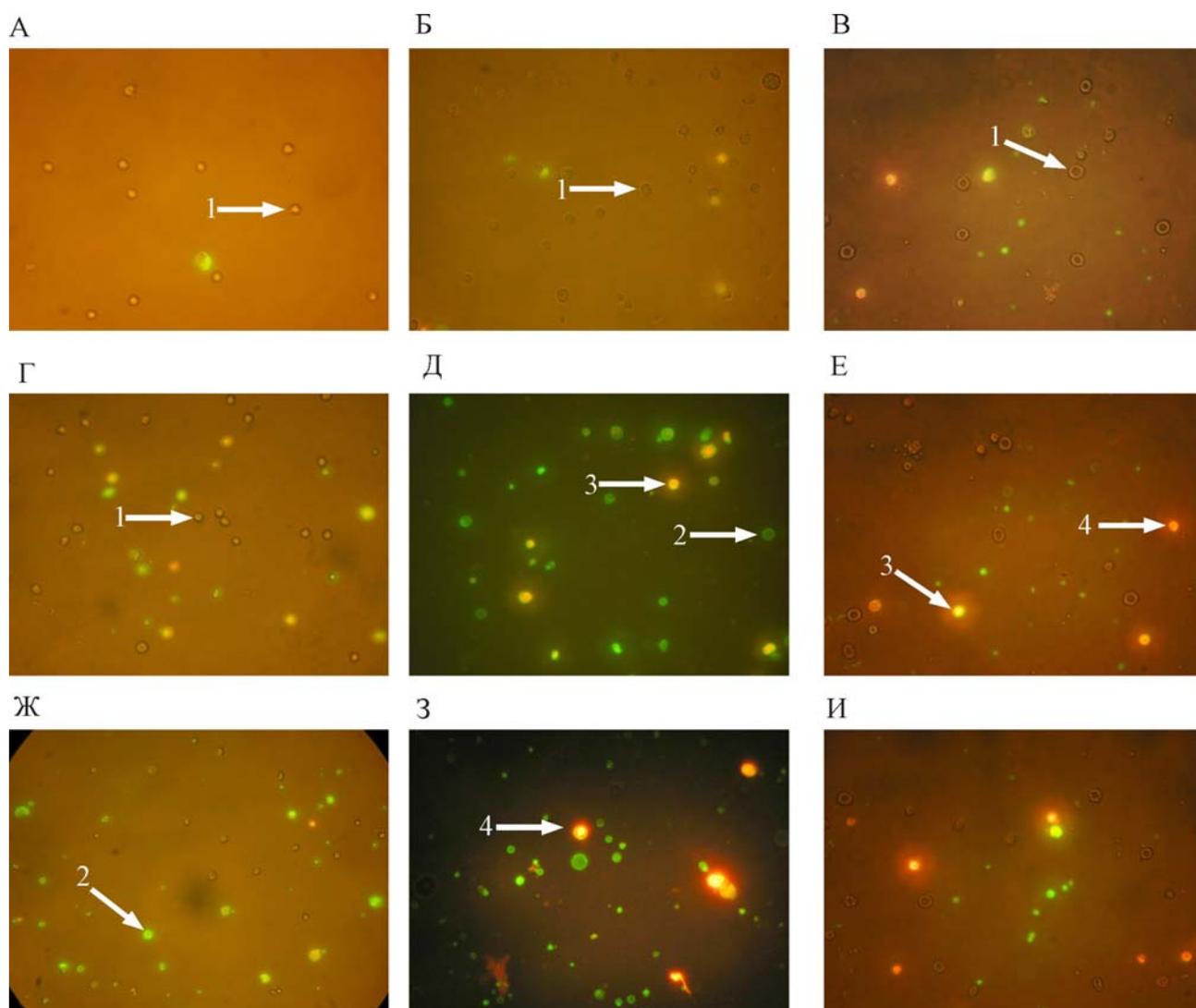


Рис. 4. Оценка апоптоза опухолевых клеток линий ТНР-1 (А, Г, Ж), Jurkat (Б, Д, З) и мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров (В, Е, И) с помощью флуоресцентной микроскопии (увеличение 400)

Примечание: А, Б, В – интактные клетки; Г, Д, Е – клетки, инкубированные с добавлением 17-ААГ; Ж, З, И – клетки, инкубированные с добавлением KRIBB3. 1 – живые клетки (FITC-/PI-); 2 – клетки, находящиеся на ранней стадии апоптоза (FITC+/PI-); 3 – клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза (FITC+/PI+); 4 – некротические клетки

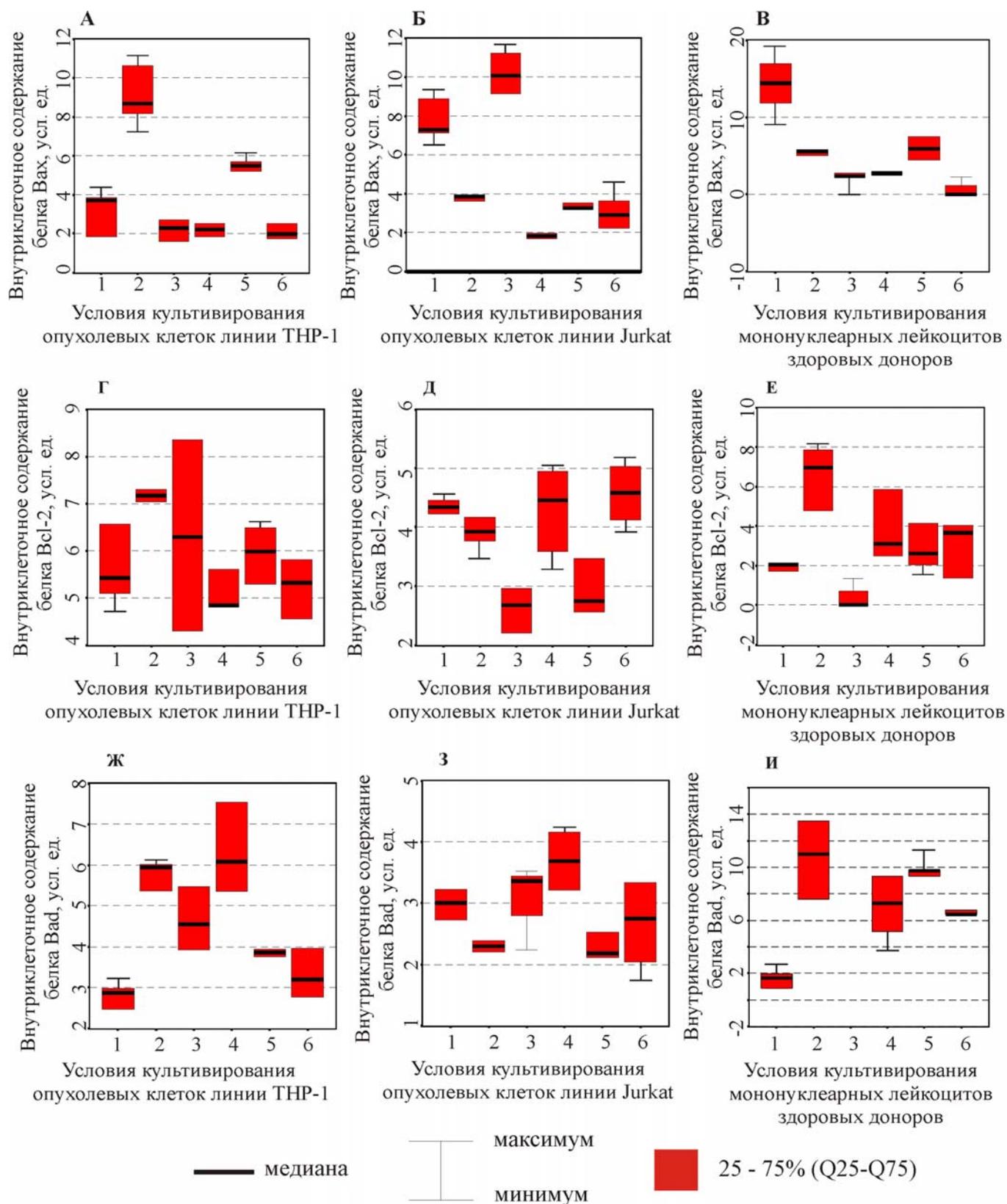


Рис. 5. Внутриклеточное содержание белков семейства Bcl-2 в опухолевых клетках линий ТНР-1 (А, Г, Ж), Jurkat (Б, Д, З) и мононуклеарных лейкоцитах здоровых доноров (В, Е, И) (по данным вестерн блоттинга)

Примечание: 1 - интактные клетки; 2 - клетки, инкубированные с добавлением этопозида; 3 - клетки, инкубированные с добавлением KRIBB3; 4 - клетки, инкубированные с добавлением 17-AAG; 5 - клетки, инкубированные совместно с этопозидом и KRIBB3; 6 - клетки, инкубированные совместно с этопозидом и 17-AAG

Инкубирование опухолевых клеток линии ТНР-1 в культуральной среде с добавлением ингибитора Hsp90, напротив, приводило к значительному внутриклеточному увеличению белка Bad, по сравнению с интактным уровнем данного белка ($p < 0,05$; рис. 5). Повышение количества белка Bad в опухолевых клетках линии ТНР-1 при добавлении 17-ААГ может быть связано с разрушением комплекса Hsp90-Akt и с последующей инактивацией данной протеинкиназы. Кроме того, дефосфорилированная форма белка Bad может взаимодействовать с транскрипционным фактором P53 и транслоцироваться к наружной мембране митохондрий. Данный комплекс способен активировать олигомеризацию белка Bax, что приводит к выходу апоптогенных факторов из межмембранного пространства митохондрий и индукции каспаз [Jiang P. et al., 2007]. Инкубирование опухолевых клеток линии Jurkat в культуральной среде с добавлением KRIBB3 приводило к значительному увеличению количества Bax на фоне низкого уровня белка Bcl-2, по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре ($p < 0,05$; рис. 5). Изменения содержания белка Bcl-2 в опухолевых клетках линии Jurkat связаны с тем, что Hsp27 способен инициировать убиквитилирование и протеасомальную деградацию ингибитора NF- κ B, который усиливает экспрессию генов антиапоптотических белков (например, Bcl-2) и подавляет синтез проапоптотических белков (например, Bax) [Fridman J.S., Lowe S.W., 2003]. Поэтому логично предположить, что ингибирование шаперона Hsp27 в клетках линии Jurkat не позволяет реализоваться данному механизму и приводит к дисбалансу в семействе белков Bcl-2 в сторону увеличения содержания Bax и снижения количества Bcl-2.

В опухолевых клетках линии ТНР-1 при добавлении KRIBB3, напротив, количество белка Bad увеличилось в 2 раза, по сравнению с аналогичным показателем в интактных клетках, а содержание белков Bax и Bcl-2 не изменилось (рис. 4). Известно, что фосфорилированная форма белка теплового шока Hsp27, также как и Hsp90, способна образовывать комплекс с Akt, которая участвует в регуляции активности белка Bad [Paul C. et al. 2002]. При ингибировании Hsp27, вероятно, происходит дестабилизация Akt, ведущая к усилению активности проапоптотического белка Bad.

Кроме того, нами были проведены экспериментальные исследования для сравнения эффектов, оказываемых на механизмы реализации митохондриального пути апоптоза ингибиторами белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 в опухолевых клетках, с противоопухолевым лекарственным препаратом - этопозидом. Выбор этопозида основывался на его способности активировать митохондриальный путь программированной клеточной гибели. Основным механизмом индукции апоптоза при действии этопозида связан с ингибированием топоизомеразы II, что способствует повреждению ДНК. Это приводит к инициации тирозинкиназы c-abl, которая усиливает активность белка p73. Данный белок участвует в активации белка Bid и транслокации его к мембране митохондрий с последующим взаимодействием с белком Bax. Активная форма Bax нарушает целостность митохондриальной мембраны и тем самым способствует выходу апоптогенных факторов, образованию апоптосомы и активации каспазы-9, а затем каспазы-3 [Liu J. et al., 2011]. В проведенном нами исследовании было установлено, что в отличие от ингибиторов белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 добавление этопозида в культуральную среду вызывает активацию митохондриального пути апоптоза не

только в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1, но и в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров (рис. 2, 3). Кроме того, этопозид приводит к нарушению баланса про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Так, инкубация мононуклеарных лейкоцитов и опухолевых клеток линии Jurkat с этопозидом вызывала такие же изменения в содержании белков Bcl-2, Bax и Bad, как и при действии ингибитора белка теплового шока Hsp90. В то же время при добавлении этопозида в культуру опухолевых клеток линии ТНР-1 происходило увеличение не только количества белка Bad, но и Bcl-2 и Bax, по сравнению с аналогичным показателем в интактных клетках (рис. 5).

Перед тем как оценить влияние совместного действия ингибиторов белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 с этопозидом, рассмотрим способность данного препарата влиять на экспрессию шаперонов Hsp90 и Hsp27. В опухолевых клетках линии Jurkat действие этопозида вызывало увеличение синтеза Hsp90 и снижение количества мРНК белка Hsp27 (табл. 2). При этом в опухолевых клетках линии Jurkat содержание фосфорилированных форм данных белков при добавлении этопозида уменьшалось, по сравнению с аналогичным показателем в интактных клетках ($p < 0,05$). Культивирование опухолевых клеток линии ТНР-1 в аналогичных условиях инкубации вызывало усиление экспрессии мРНК как белка Hsp90, так и Hsp27, по сравнению с аналогичными значениями показателей в интактных клетках (табл. 2). В свою очередь исследование внутриклеточного содержания фосфорилированных формы Hsp90-P и Hsp27-P в опухолевых клетках линии ТНР-1 позволило выявить снижение количества Hsp27-P по сравнению с уровнем в интактных клетках, тогда как содержание фосфоформы Hsp90 не изменялось (рис. 1). Как упоминалось ранее, усиленная экспрессия белков теплового шока имеет место при действии на клетку различных повреждающих факторов, к которым можно отнести и противоопухолевые препараты. Повышенный синтез белков теплового шока в опухолевых клетках препятствует развитию апоптотической гибели, а, следовательно - усиливает резистентность к химиотерапии.

Нами было установлено, что совместное добавление ингибитора 17-ААГ и этопозида в культуральную среду приводит к значительному усилению апоптотической гибели клеток и увеличению числа клеток со сниженным $\Delta\psi$ как в культуре мононуклеарных лейкоцитов, так и в культуре опухолевых клеток (линии Jurkat и ТНР-1), по сравнению с начальным уровнем гибели клеток (рис. 2, 3). Данное обстоятельство может быть связано с тем, что белок Hsp90 способен связывать топоизомеразу II, активируя ее и защищая от повреждающих факторов. Ингибирование шаперона Hsp90 приводит к снижению активности топоизомеразы II, но не к ее деградации. Совместное добавление ингибиторов Hsp90 и топоизомеразы II способствует нарушению взаимодействия Hsp90 с топоизомеразой II и, в конечном счете, приводит к повреждению ДНК и гибели клетки [Catherine R. et al., 2006].

В связи с этим представляет собой особый интерес оценка баланса белков семейства Bcl-2, регулирующих проницаемость митохондриальной мембраны, а, следовательно, и активацию митохондриального пути апоптоза. Нами было установлено, что добавление в культуральную среду опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 этопозида и 17-ААГ одновременно приводило к снижению содержания проапоптотического белка Bax, по сравнению с его интактным

уровнем, тогда как количество белков Bcl-2 и Bad не изменялось (рис. 5).

Полученные нами результаты подтверждаются другими исследованиями, свидетельствующими, что предварительная обработка опухолевых клеток ингибитором 17-ААГ подавляет апоптотический эффект этопозида. Так, разрушающее действие 17-ААГ на комплекс Hsp90/HSF-1 приводит к транслокации HSF-1 в ядро и связыванию его с HSE в промоторной области гена hsp70, инициируя транскрипцию белка Hsp70 [Morimoto R.I., 1998; Creagh E.M. et al., 2000]. Сверхэкспрессия шаперона Hsp70 инактивирует Вах-опосредованный апоптоз, вызванный ингибитором белка теплового шока Hsp90 [Guo F. et al., 2005]. Можно предположить, что повышенный синтез белка Hsp70 также подавляет индукцию митохондриального пути апоптоза при совместном добавлении 17-ААГ и этопозида. Таким образом, усиление апоптотической гибели опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 при сочетанном действии селективного ингибитора Hsp90 и этопозида, очевидно, связано с инициацией рецепторопосредованного пути апоптоза.

Оценка активации митохондриального пути запрограммированной клеточной гибели при совместном действии ингибитора белка теплового шока Hsp27 и этопозида показала, что в культуре моноцитов и лимфоцитов число клеток, вступивших в апоптоз, увеличивалось на 41,5%, по сравнению с величиной аналогичного показателя в интактных клетках. Инкубирование опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 в культуральной среде с добавлением KRIBB3 и этопозида приводило к значительному увеличению (на 38,5 и 70,6%, соответственно) числа апоптотически измененных клеток, по сравнению с интактным уровнем их гибели. При этом количество опухолевых клеток со сниженным $\Delta\psi$ было значительно выше, чем в интактных клетках и клетках, культивированных совместно с 17-ААГ и этопозидом (рис 2, 3). На сегодняшний день механизмы, вызывающие активацию митохондриального пути апоптоза при совместном действии KRIBB3 и этопозида в опухолевых клетках, остаются неизученными. Известно, что белок Hsp27 способен ингибировать этопозид-индуцированный апоптоз [Scheperers H. et al., 2005]. Логично предположить, что блокирование Hsp27 позволяет этопозиду активировать митохондриальный путь апоптоза. В то же время при сочетанном добавлении KRIBB3 и этопозида в культуральную среду опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat нарушения баланса про- и антиапоптотических белков в семействе Bcl-2 соответствовали изменениям, происходящим при действии этопозида (рис. 5). Таким образом, результаты настоящего исследования продемонстрировали, что ингибирование шаперонов Hsp27 и Hsp90 сопровождается индукцией танатогенной программы. При этом в ее осуществлении задействованы разные молекулярные мишени в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1. Основные изменения происходят в соотношении белков семейства Bcl-2, активность которых регулируется не только транскрипционными факторами или в результате взаимодействия друг с другом, но и с белками теплового шока Hsp27 и Hsp90. В клетках острой моноцитарной лейкемии линии ТНР-1 добавление селективных ингибиторов белков Hsp27 и Hsp90 вызывает активацию белка Bad (рис. 6). В опухолевых клетках линии Jurkat, напротив, действие ингибитора KRIBB3 приводит к усилению синтеза белка Вах и подавлению экспрессии Bcl-2. В свою очередь, проапоптотические белки Bad и Вах способствуют открытию пор временной проницаемости, снижению трансмембранного потенциала митохонд-

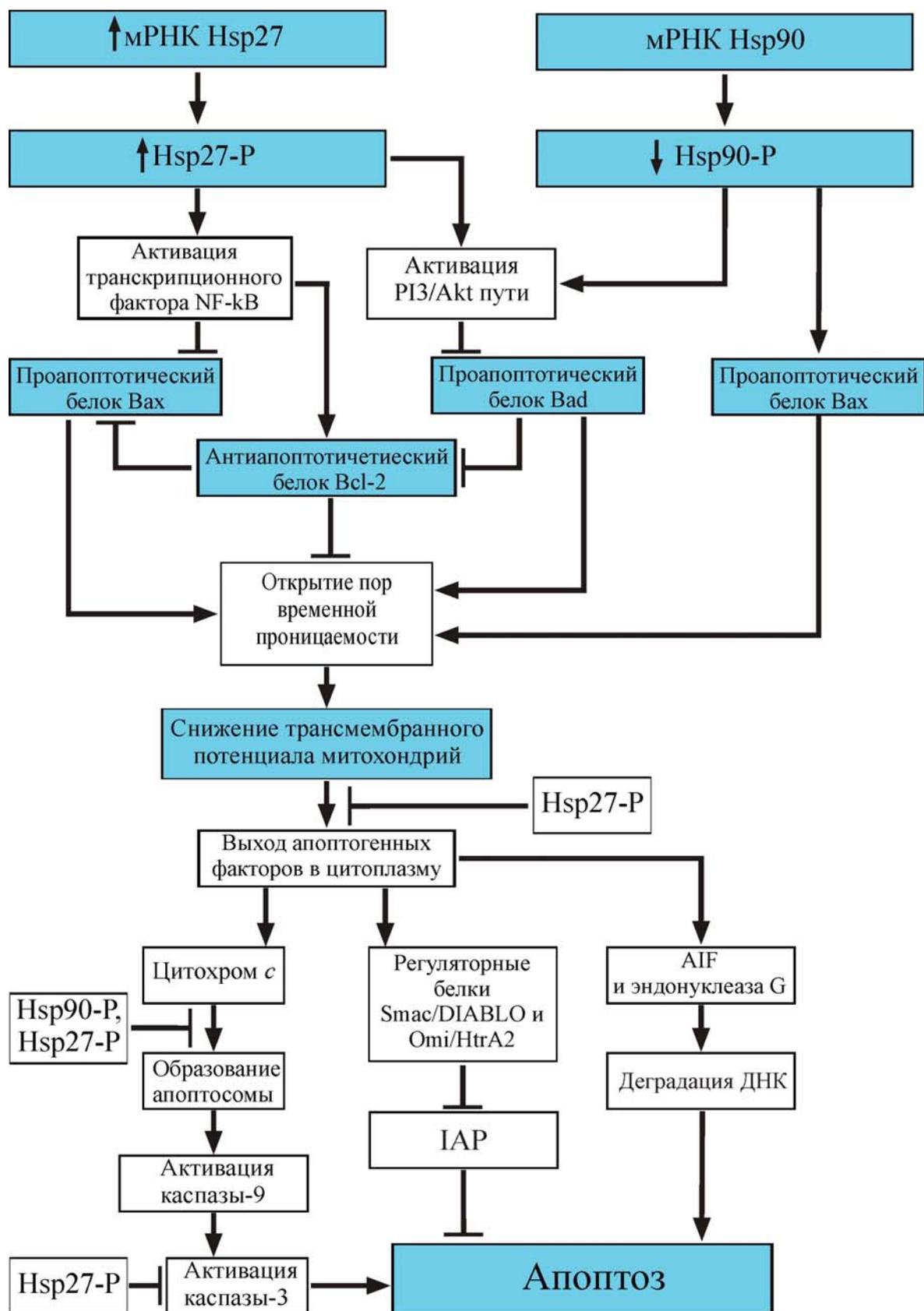


Рис. 6 Молекулярные мишени действия белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в реализации митохондриального пути апоптоза в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 [по результатам собственных исследований (выделено цветом) и данным R. Arya et al., 2007; D. Lanneau et al., 2008]

Примечание: ↑ – повышение, ↓ – снижение, —| – ингибирование, → усиление

рий и выходу апоптогенных факторов из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму с последующей активацией каспаз -9 и -3.

Изучение действия ингибиторов белков теплового шока на механизмы реализации апоптоза в опухолевых клетках остается перспективным направлением и требует дальнейшего исследования влияния белков теплового шока на активность сигнальных молекул, участвующих в танатогенной программе. Это, в свою очередь, позволит получить новые фундаментальные знания в области канцерогенеза и даст возможность разработать новые противоопухолевые лекарственные средства, механизм действия которых будет основываться на ингибировании белков теплового шока.

ВЫВОДЫ

1. В опухолевых клетках линий ТНР-1 и Jurkat повышена экспрессия гена hsp27. При действии этопозида, обладающего проапоптотическим действием, количество мРНК белка теплового шока Hsp27 снижается в опухолевых клетках линии Jurkat и не изменяется в опухолевых клетках линии ТНР-1.
2. Экспрессия гена hsp90 в опухолевых клетках линии Jurkat снижена, а в клетках линии ТНР-1 соответствует таковой в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров; при добавлении в культуральную среду этопозида экспрессия мРНК как в опухолевых клетках линии Jurkat, так в опухолевых клетках линии ТНР-1 усиливается.
3. В условиях селективного ингибирования белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 регистрируется увеличение как количества клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий, так и количества клеток, вступивших в апоптоз.
4. При действии специфического ингибитора белка теплового шока Hsp90 изменяется баланс проапоптотических белков семейства Bcl-2: в клетках линии ТНР-1 увеличивается количество белка Bad, в клетках линии Jurkat снижается содержание белка Bax.
5. При селективном ингибировании белка теплового шока Hsp27 с использованием KRIBB3 в опухолевых клетках линии Jurkat снижается внутриклеточный уровень антиапоптотического белка Bcl-2, увеличивается содержание белка Bax, а в опухолевых клетках линии ТНР-1 увеличивается количество Bad.
6. Дизрегуляция митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1, характеризующаяся дисбалансом про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, сопряжена с увеличением фосфорилированной формы Hsp27 и снижением фосфорилированной формы белка Hsp90.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль белка теплового шока 90 в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток Jurkat / Е.В. Кайгородова, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, А.П. Зима // Актуальные проблемы медицины: Материалы XII межрегиональной, научно-практической конференции, г. Абакан, 3-4 июня 2009. - Абакан, 2009 - С. 242 - 243.
2. Дисбаланс белков семейства BCL-2 в модуляции апоптоза лимфоцитов / А.Н. Марошкина, О.Е. Чечина, О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, Т.С. Прохоренко, А.К. Биктасова,

- М.В. Белкина, Е.В. Сазонова, А.П. Зима, Т.Т. Радзивил // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: Материалы международной конференции, г. Пущино, 2-4 июля 2009. – Пущино, 2009. – С. 457-461.
3. Механизмы нарушения митохондриального пути апоптоза / А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, Т.С. Прохоренко, Н.В. Рязанцева, А.П. Зима, Т.Т. Радзивил // Науки о человеке: Материалы X конгресса молодых ученых и специалистов, г. Томск, 28-29 мая 2009. – Томск, 2009. – С. 88-89.
 4. Молекулярные механизмы дисрегуляции апоптоза лимфоцитов / А.Н. Марошкина, О.Е. Чечина, О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, А.П. Зима // Симбиоз Россия 2009: Материалы II Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов - г. Пермь, 25-29 мая 2009. - Пермь, 2009. - С. 303-305.
 5. Эффект ингибитора белка теплового шока 90 17-AAG на TNF- α индуцированный апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat / В.Д. Якушина, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, Е.В. Коновалова, Е.В. Кайгородова // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы XVI межгородской конф. молодых ученых - г. Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2010. - Санкт-Петербург, 2010 - !97-198.
 6. Влияние ингибитора белка теплового шока Hsp27 и дексаметазона на апоптоз опухолевых клеток линии Jurkat / М.В. Белкина, Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, В.Д. Якушина, Е.В. Коновалова // Актуальные вопросы медицинской науки: Сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конф. с международным участием, посвященной 1000-летию г. Ярославля., 21-23 апреля 2010. – Ярославль, 2010. – С. 314.
 7. Реализация апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat при действии ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 / Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, В.Д. Якушина, Е.В. Коновалова // Актуальные проблемы медицины: Материалы XIII межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 4-5 мая 2010. - Абакан, 2010. - С. 256 - 258.
 8. Действие ингибитора белка теплового шока HSP90 на активность каспазы-3 в опухолевых клетках линии Jurkat / М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, В.Д. Якушина, Е.В. Коновалова // Материалы IV международной конф. молодых ученых-медиков, г. Курск, 25-26 февраля 2010. – Курск, 2010. – С. 80-81.
 9. Molecular mechanisms of the oxidative stress effect on BCL-2 family proteins / I.S. Losenkov, L.A. Kleptsova, E.G. Starikova, E.V. Kaygorodova, A.N. Maroshkina // Материалы V международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, г. Москва, 18 марта 2010. – Москва, 2010. – С. 437
 10. Apoptosis induction in tumor cells by inhibitors heat shock proteins and dexametasone / A.N. Maroshkina, E.V. Kaigorodova, M.V. Belkina, V.D. Yakushina, E.V. Konovalova // Материалы V международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конф. студентов и молодых ученых, г. Москва, 18 марта 2010. – Москва, 2010. – С. 438
 11. Особенности лекарственно-индуцированного апоптоза опухолевых клеток в условиях ингибирования белков теплового шока HSP27 и HSP90 / А. Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, М.В. Белкина, В.Д. Якушина, Л.А. Клепцова, А.П. Зима // Фундаментальные и прикладные исследования в медицине: Материалы III общероссийской научной конференции, г. Сочи, 22-25 сентября 2010. - Сочи, 2010. - С. 49 - 50.
 12. Особенности реализации апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови здоровых доноров в условиях ингибирования белка теплового шока 27 кДа in vitro / Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, Е.В. Коновалова, В.Д. Якушина, Л.А. Клепцова // Медицинский академический журнал: Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», посвященная 120-летию со дня основания НИИЭМ СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2010. – С. 15.
 13. Митохондриальный путь апоптоза: роль Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat / А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, Е.В. Кайгородова, А.П. Зима // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы первой международной научно-практической конференции, г. Санкт-Петербург, 23-26 ноября, 2010. - Санкт-Петербург, 2010. - С. 72-73.

14. Effects of inhibitors heat shock proteins 90 and 27 on etoposide-induced apoptosis of tumor cells / E. Kaygorodova, N. Ryazantseva, V. Novitsky, M. Belkina, A. Maroshkina // The 6th International Congress of Pathophysiology «Gene-environment interaction in health and disease», Montreal, 22-25 September, 2010. - Montreal, 2010. - P.69-70.
15. Роль белка теплового шока 90 в регуляции апоптоза опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, М.В.Белкина, А.Н. Марошкина // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2010. – Т. 150, № 10. – С. 424–427.
16. Действие ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 на дексаметазониндуцированный апоптоз опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, О.Е. Чечина, А.П. Зима // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2010. – №3. – С. 68-72.
17. Исследование механизмов модуляции апоптоза Т-лимфоцитов / В.Д. Якушина, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, О.А. Васильева // Актуальные проблемы медицины: материалы 14-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля, 2011. - Абакан, 2011. – С. 262-265
18. Влияние белков теплового шока на NF-κB-опосредованный сигнальный путь опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, М.В. Клименченко, Е.А. Черкасова // Актуальные проблемы медицины: материалы 14-ой межрегиональной научно-практической конференции с международным участием, г. Абакан, 27-28 апреля, 2011. - Абакан, 2011. – С. 250-253
19. Апоптозмодулирующие эффекты белка теплового шока 90 кДа в опухолевых клетках / Е.В. Кайгородова, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, Е.А. Черкасова, М.А. Клименченко // Проблемы и перспективы современной науки: материалы 4-ой международной телеконференции «Фундаментальные науки и практика», г. Томск, 2011. – Томск, 2011. - Т. 3, №1. - С. 63-64.
20. Роль Hsp90 в продукции TNF-α, экспрессии TNF-R1 при дексаметазон-индуцированном апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat / М.В. Клименченко, Е.А. Черкасова, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, Е.В. Кайгородова, А.П. Зима // Вестник РГМУ: материалы VI международной научной Пироговской медицинской конференции студентов и молодых ученых, г. Москва, 24 марта, 2011. – Москва, 2011. - №1. - С. 22-23.
21. Функциональные взаимоотношения шаперона Hsp27 и белков семейства Bcl-2 в опухолевых клетках ТНР-1 / Е.А. Черкасова, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, М.В. Клименченко, Е.В. Кайгородова // Материалы международной конф. «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», г. Пущино, 2011. - Пущино, 2011. - С. 630-635.
22. Белок теплового шока 90 кДа – молекулярная мишень для коррекции апоптоза опухолевых клеток / Е.В. Кайгородова, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, Е.А. Черкасова, М.В. Клименченко // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Приложение № 1. – С. 58-59.
23. Белки семейства Bcl-2 – молекулярные мишени проапоптотического действия ИЛ-2 и ИЛ-4 / О.Е. Чечина, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Е.В. Сазонова, А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, Е.В. Кайгородова, Т.С. Прохоренко // **Иммунология**. – 2011. – Т. 32, № 3. – С. 127-130.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 17-AAG** - 17-(Allylamino)geldanamycin (17- (аллиламин)гелданамицин)
- AIF** - apoptosis inducing factor (апоптоз-индуцирующий фактор)
- Bad** - Bcl-2 - associated death promoter (Bcl-2 - ассоциированный промотор смерти)
- Bak** - Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bcl-2 гомологичный антагонист/киллер)
- Bax** - Bcl-2- associated X protein (Bcl-2-ассоциированный X белок)
- Bcl-2** - B-cell lymphoma 2 (В-клеточная лимфома 2)
- Bid** - BH3 interacting-domain death agonist (агонист BH3 взаимодействующего домена смерти)
- Hsp** - heat shock proteins (белки теплового шока)
- IAP** - inhibitors of apoptosis proteins (белки, ингибирующие апоптоз)
- KRIBB3** - 5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole (5-(5-этил-2гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил) изоксазол)
- NF-κB** - nuclear factor kappa B (ядерный фактор κB)