

# 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% CO<sub>2</sub> 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 пропилий йодида (Catlag,

США) согласно инструкции фирмы-производителя. Метод основан на способности FITC-меченного аннексина V специфически связываться с фосфатидилсерином, пропилия 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*<sub>1</sub>—*Q*<sub>3</sub>.

## 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*<sub>1</sub>—*Q*<sub>3</sub>))

| 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)<br>$p_1 < 0,001$ | 16,69 (12,38—18,3)<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,05$ | 9,98 (8,22—18,45)<br>$p_1 < 0,001; p_2 < 0,05$<br>$p_3 < 0,05$ | 3,25 (3,05—3,78)<br>$p_1 < 0,001; p_2 < 0,05$<br>$p_3 < 0,05; p_4 < 0,05$ |

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).

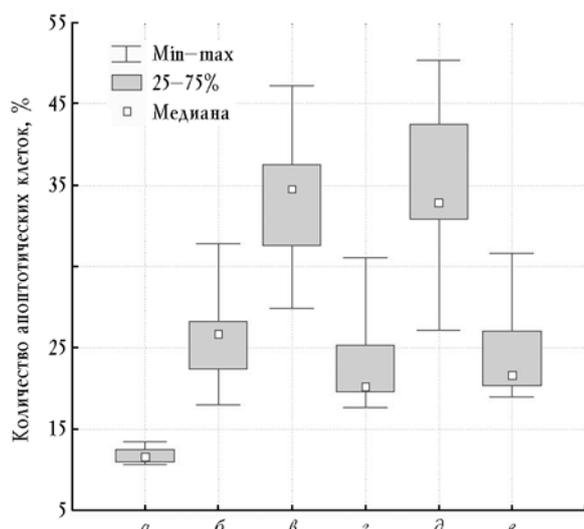
дексаметазоном в концентрации  $10^{-5}$  моль и ингибитором KRIBB3;  $e$  — опухолевые клетки, инкубированные с ингибитором KRIBB3

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» на 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., Lakhotia 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—34.
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