

УДК 577.112.2:615.832.8:616-006.4
©Коллектив авторов

ТЕРМОСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ИНГИБИТОРАМИ АКТИВНОСТИ И ЭКСПРЕССИИ ШАПЕРОНОВ

*В.А. Кудрявцев, Ю.М. Макарова, А.Е. Кабаков**

Учреждение РАМН Медицинский радиологический научный центр,
ул. Королёва, 4, Обнинск, 249036; тел.: (48439) 97188; факс: (495) 956-1440;
эл. почта: aekabakov@hotmail.com

Исследовали влияние ингибиторов шаперонной активности белка теплового шока 90 (БТШ90), а также ингибиторов индукции белков теплового шока (БТШ) на чувствительность опухолевых клеток HeLa к гипертермии. Обнаружено, что наномолярные концентрации ингибиторов активности БТШ90 (17AAG или радицикол) замедляли шаперон-зависимую реактивацию термолabile репортера (люциферазы) в прогретых клетках HeLa и в небольшой степени усиливали их гибель после часовой инкубации при 43°C. При этом, ингибиторы активности БТШ90 стимулировали *de novo* индукцию дополнительных шаперонов (БТШ70 и БТШ27), что существенно увеличивало внутриклеточное содержание БТШ. Обработка клеток 17AAG или радициколом вместе с ингибитором индукции БТШ (кверцетин, триптолид, или NZ28) полностью предотвращала повышение внутриклеточного уровня шаперонов, вызываемое ингибированием активности БТШ90 и последующим прогревом. При сочетании всех трёх воздействий (ингибитор активности БТШ90 + ингибитор индукции БТШ + 43°C, 60 мин) происходило более сильное торможение реактивации репортера и резко (в 2-3 раза) усиливалась клеточная гибель. Такое усиление цитотоксичности происходит, по-видимому, из-за “шаперонного дефицита”, когда перед тепловым стрессом в клетках одновременно блокируются и функциональная активность конститутивного БТШ90 и экспрессия дополнительных (индуцибельных) шаперонов.

Ключевые слова: белки теплового шока, HSF1, терморезистентность, гипертермия.

ВВЕДЕНИЕ. Гипертермию применяют в клинике как один из способов элиминации злокачественных клеток и для усиления противоопухолевых эффектов облучения или химиотерапии [1-3]. Некоторые опухоли устойчивы к гипертермии, поэтому их термосенсибилизация является актуальной и клинически важной задачей.

* - адресат для переписки

При гипертермии в клетках активируется транскрипционный фактор HSF1, который инициирует экспрессию генов, кодирующих “белки теплового шока” (БТШ). Большинство БТШ являются “шаперонами”, которые осуществляют рефолдинг или деградацию денатурированных белковых молекул [4, 5]. Кроме того, БТШ90, БТШ70 и БТШ27 известны как супрессоры апоптоза [6, 7]. Клетка с повышенным содержанием БТШ способна пережить более сильный стресс, чем клетка с нормальным (конститутивным) уровнем БТШ [7-9].

БТШ и HSF1 часто рассматриваются как молекулярные мишени для сенсibilизации опухолей [8-10]. Особенно большое внимание уделяется БТШ90: этот конститутивно экспрессируемый шаперон необходим для созревания и активации рецепторов факторов роста и компонентов сигнальных каскадов, обеспечивающих неограниченное размножение раковых клеток и их устойчивость к терапии [11-14]. Следовательно, ингибиторы БТШ90 могли бы применяться для угнетения опухолей и усиления действия химиопрепаратов или радиотерапии. Несколько ингибиторов шаперонной активности БТШ90 уже проходят I-III фазы клинических испытаний как моно-агенты, так и в сочетании с химиотерапией или облучением [12]. При сравнении эффективности ингибирования БТШ90 в нормальных и опухолевых клетках оказалось, что некоторые ингибиторы (в частности, 17AAG [15]) образуют гораздо более прочные комплексы с “опухолевым” БТШ90, что позволяет ожидать селективности цитотоксического и сенсibilизирующего действия.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что ингибиторы активности БТШ90 способствуют химио- и радиосенсibilизации раковых клеток (обобщено в обзорах [11-14]). Это предполагает использование таких ингибиторов в комбинации с химио- или радиотерапией. Однако, аналогичные модели с гипертермией и термосенсibilизацией остаются малоизученными. Вероятно, это связано с тем, что ингибиторы шаперонной функции БТШ90 параллельно действуют как активаторы HSF1 [16], вызывая HSF1-опосредованную индукцию БТШ и, соответственно, повышая терморезистентность клеток-мишеней. Такая индукция шаперонов (БТШ70, БТШ27 и др.) должна сильно ослаблять термосенсibilизирующий эффект, ожидаемый от функционального ингибирования БТШ90.

В данной работе мы показали, что одновременное ингибирование шаперонной активности БТШ90 и *de novo* индукции БТШ позволяет значительно повысить чувствительность терморезистентных опухолевых клеток к гипертермии. В перспективе, предлагаемый способ может найти применение в клинической практике.

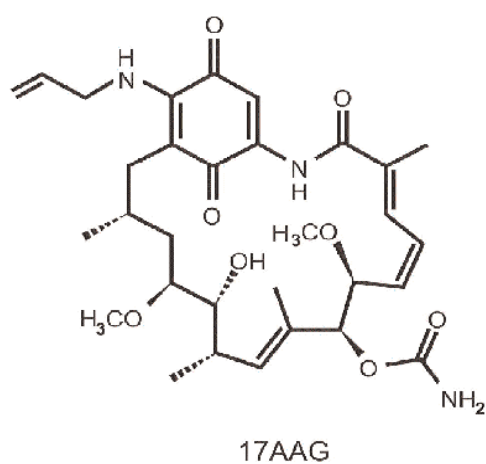
МЕТОДИКА.

Культивирование клеток. Опухолевые клетки HeLa, а также мышинные фибробласты с нормальной экспрессией HSF1 (HSF1 +/+ клетки) или с делецией *HSF1*-гена (HSF1 -/- клетки) [17] выращивали в среде DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамином, пенициллином (50000 Ед/л) и стрептомицином (50 мг/л) при 37°C и 5% CO₂.

Обработка клеток ингибиторами. В работе использовали два ингибитора шаперонной активности БТШ90: слабо токсичное производное антибиотика гелданамицина – 17AAG и натуральный антибиотик радицикол (оба – “Sigma”, США) (рис. 1А) [11-13].

В качестве ингибиторов индукции БТШ применяли кверцетин (“Serva”, ФРГ) и триптолид (“Calbiochem”, США), известные как супрессоры HSF1 [18, 19], а также NZ28 - синтетический ингибитор трансляции *БТШ70* и *БТШ27* мРНК [20] (рис. 1Б). NZ28 был любезно предоставлен проф. Gabai (Бостон, США). 300-400-кратные растворы ингибиторов в диметил сульфоксиде (ДМСО) разводили в среде роста и добавляли к клеткам за 2-3 часа до начала гипертермии. Аликвоты ДМСО служили контролем.

А Ингибиторы активности БТШ90:



Б Ингибиторы индукции БТШ:

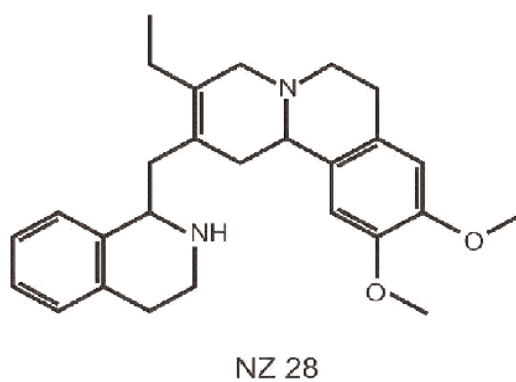
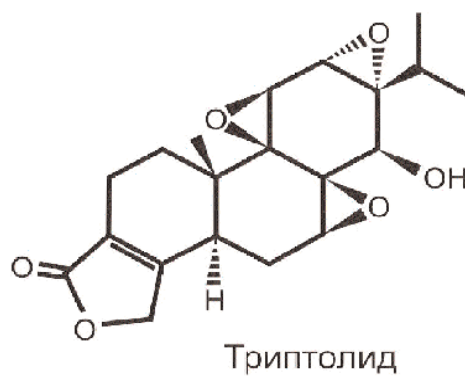
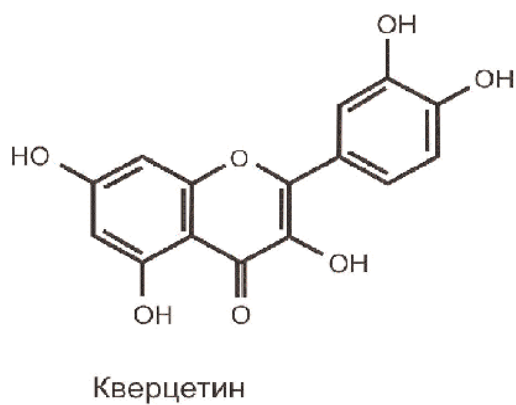


Рисунок 1.

Структурные формулы примененных в данном исследовании ингибиторов шаперонной активности БТШ90 (А) и ингибиторов *de novo* индукции БТШ (Б).

Гипертермия. Герметизированные чашки Петри с культурами распластанных клеток погружали в термостатированную водяную баню с температурой $43 \pm 0,1^\circ\text{C}$. При исследовании цитотоксических эффектов клетки HeLa выдерживали в такой бане в течение часа, что соответствует условиям описанной ранее модели [10]. Для анализа реактивации репортера чашки с клетками, экспрессирующими люциферазу, выдерживали при 43°C в течение 10 мин, чтобы вызвать обратимую термо-денатурацию люциферазы [21-23].

Трансфекция и измерение активности люциферазы. Пре-конфлуентные культуры HeLa или HSF1 -/- и HSF1 +/+ клеток трансфицировали плазмидным вектором с использованием среды opti-MEM и липофектамина. Вектор pRSVLL/V для экспрессии термолабильного репортера - люциферазы светлячка [21] был получен от проф. Kampinga (Гронинген, Нидерланды).

Известно, что в восстанавливающихся после теплового стресса трансфектантах происходит БТШ-зависимая реактивация термо-денатурированной люциферазы [21]; по динамике этой реактивации можно судить об эффективности работы “шаперонной машины” или об эффективности её ингибирования [22-24]. Именно так оценивали подавление шаперонной активности БТШ90 в клетках, обработанных 17AAG или радициолом. Каталитическую активность люциферазы в клеточных лизатах определяли на люминометре с помощью люциферина и АТР [21].

Определение клеточной гибели. Через 24 ч после воздействий к клеткам добавляли два флуоресцентных красителя Hoechst 33342 (1 мкг/мл) и йодистый пропиций (10 мкг/мл); затем после 40-минутной инкубации при 37°C нефиксированные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе. Подсчитывали количество некротических (красных) клеток и апоптотических клеток с характерными изменениями в окрашенных Hoechst 33342 ядрах (конденсация или фрагментация хроматина, пикноз и пр.).

При подсчёте выбирали 7-8 зон, содержащих 200-300 клеток в окулярном поле обзора; все эффекты воздействий и контроль были представлены в 3-х параллелях. Для интегрального показателя клеточной гибели процентные доли некроза и апоптоза суммировались. Достоверность различий между группами данных оценивали, используя *t*-критерий Стьюдента и программу ANOVA.

Электрофорез в ПААГ и иммуноблоттинг. Клетки лизировали в “буфере образца” с ингибиторами протеаз. Лизаты фракционировали электрофорезом в системе Лэммли с разделяющим 10% ПААГ, при силе тока 30 мА в течение 3 ч.

Для иммуноблоттинга использовали моноклональные антитела к индуцибельной форме БТШ70 и кроличьи антитела к БТШ27 (“StressGen”, Канада). Обработка пероксидазными конъюгатами “вторых” антител и проявление полос осуществлялись с помощью набора ECL Western Blotting Analysis System (“Amersham”, Англия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Основной формой гибели прогретых клеток HeLa был апоптоз с типичными изменениями в морфологии ядра; однако, многие апоптотические клетки со временем становились проницаемыми для йодистого пропиция, образуя фракцию “вторичного” некроза. Для упрощения интерпретации и демонстрации результатов мы использовали интегральный показатель клеточной гибели, суммирующий процентные доли апоптоза и некроза в каждом проанализированном образце (рис. 2).

Гипертермия сама по себе не приводила к массовой гибели клеток HeLa, вызывая лишь 15-16% превышение над уровнем их спонтанной гибели в контроле (рис. 2), что согласуется с данными о высокой терморезистентности этой культуры [10]. Чтобы усилить цитотоксичность, мы обрабатывали клетки ингибиторами шаперонной активности БТШ90 – 17AAG или радициолом (см. рис. 1А). Об ингибировании внутриклеточного БТШ90 свидетельствовали два независимых биомаркера: в обработанных ингибиторами клетках происходило замедление реактивации термо-денатурированной люциферазы (рис. 3А) и индукция БТШ *de novo* (рис. 4). Наномолярные концентрации 17AAG и радициола были слабо токсичны для клеток HeLa и почти не увеличивали их гибель после гипертермии (рис. 2).

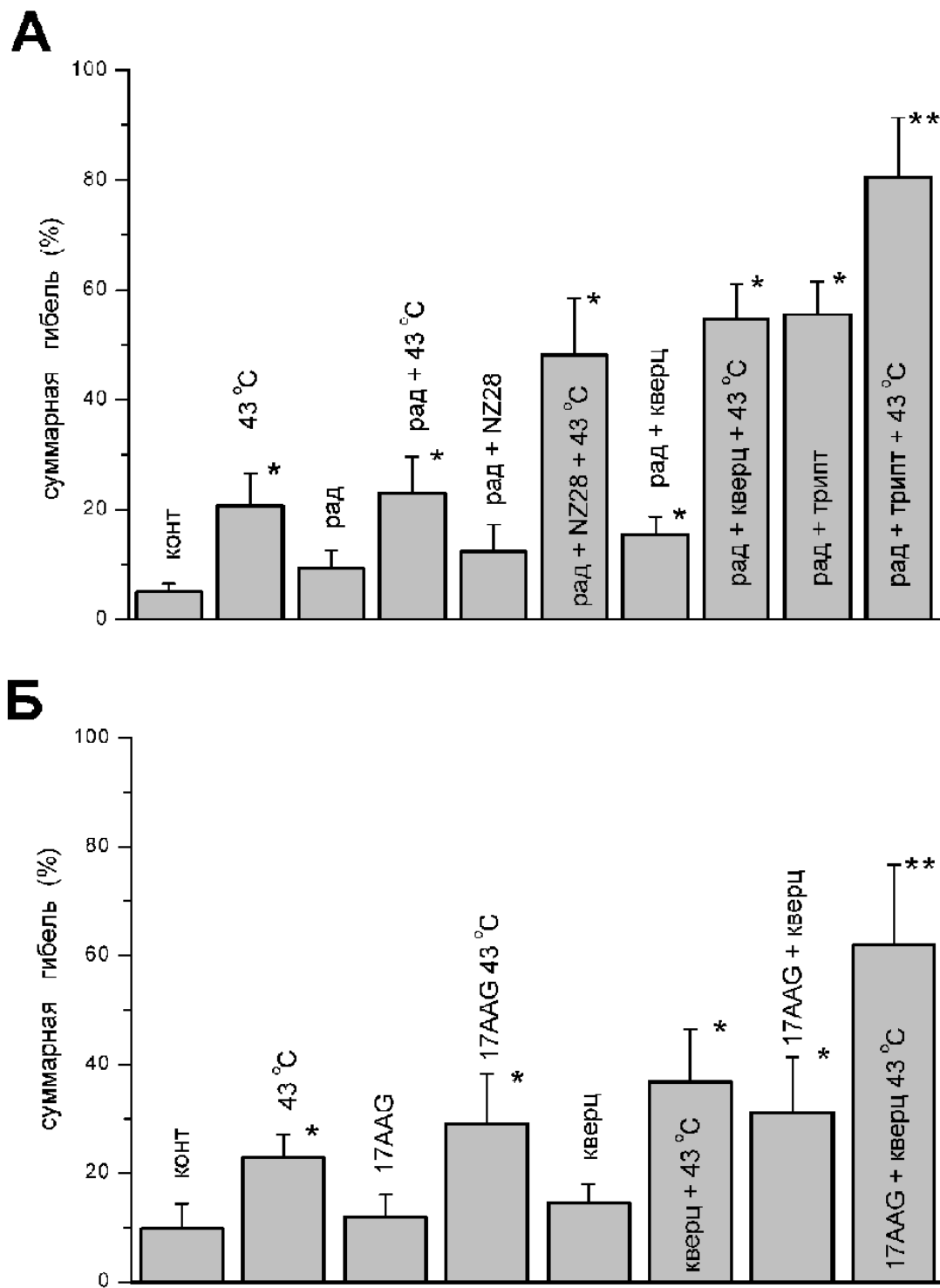


Рисунок 2.

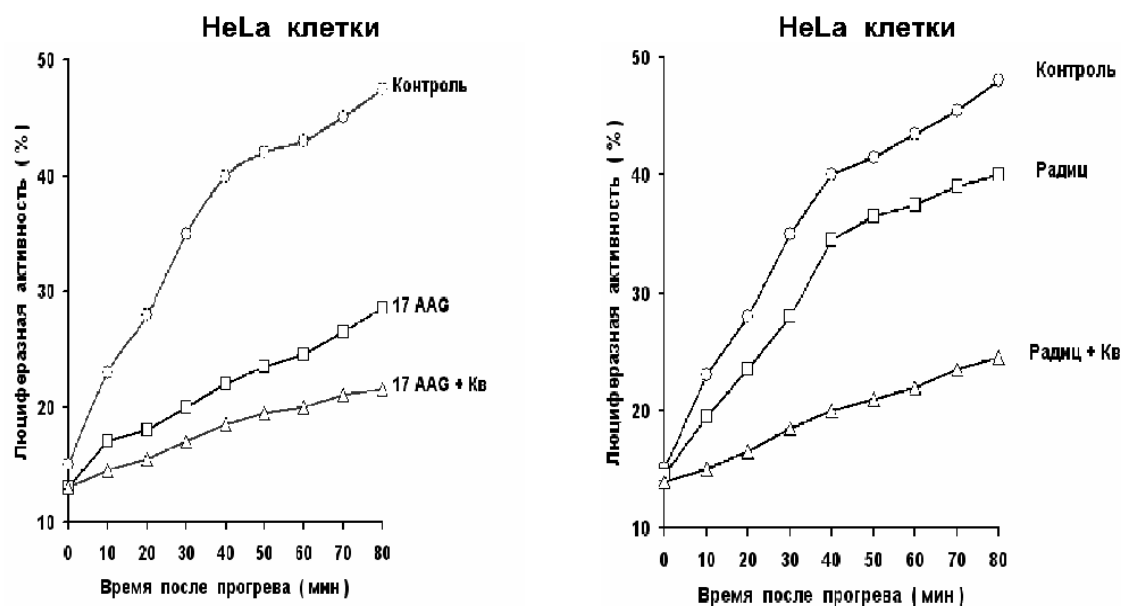
Усиление гибели клеток HeLa после гипертермии в результате ингибирования шаперонной активности БТШ90 в сочетании с ингибированием de novo индукции БТШ.

За 2 ч перед гипертермией (43°C, 60 мин) клетки обрабатывали ингибиторами активности БТШ90: 500 нМ 17AAG (А) или 500 нМ радициолом (рад) (Б). В некоторые образцы были добавлены ингибиторы индукции БТШ: 30 мкМ кварцетин (кварц) или 60 нМ триптолид (трипт), или 2 мкМ NZ28. Ничем не обработанные клетки служили контролем (конт). Через 24 часа после гипертермии клетки окрашивали Hoechst 33342 и йодистым пропидием.

* - достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$;

** - достоверное отличие от контроля и от данных, помеченных *, $p < 0,05$.

А



Б

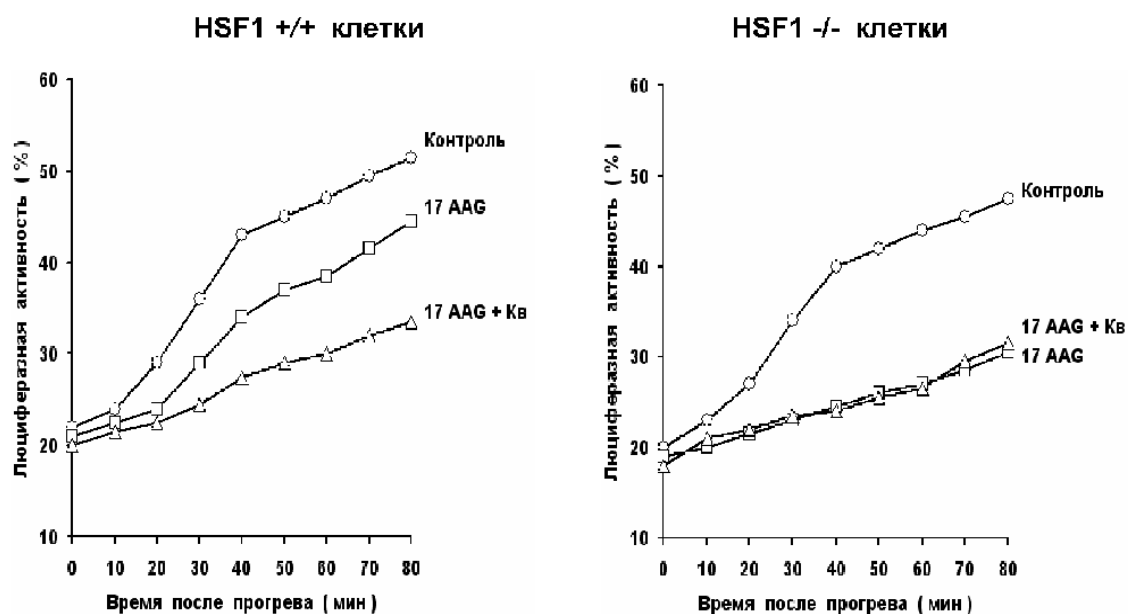


Рисунок 3.

Замедление реактивации люциферазы в прогретых клетках, обработанных ингибиторами активности БТШ90 (17AAG или радициолом) и ингибитором индукции БТШ (кверцетином).

Экспрессирующие люциферазу клетки HeLa (А) или HSF1 +/+ и HSF1 -/- клетки (Б) были подвергнуты мягкой гипертермии (43°C, 10 мин), после чего активность обратимо денатурированной люциферазы определяли в сериях клеточных лизатов.

Для ингибиторной обработки прогретых клеток использовали 500 нМ 17AAG, 500 нМ радициол (Радиц) и 30 мкМ кверцетин (Кв).

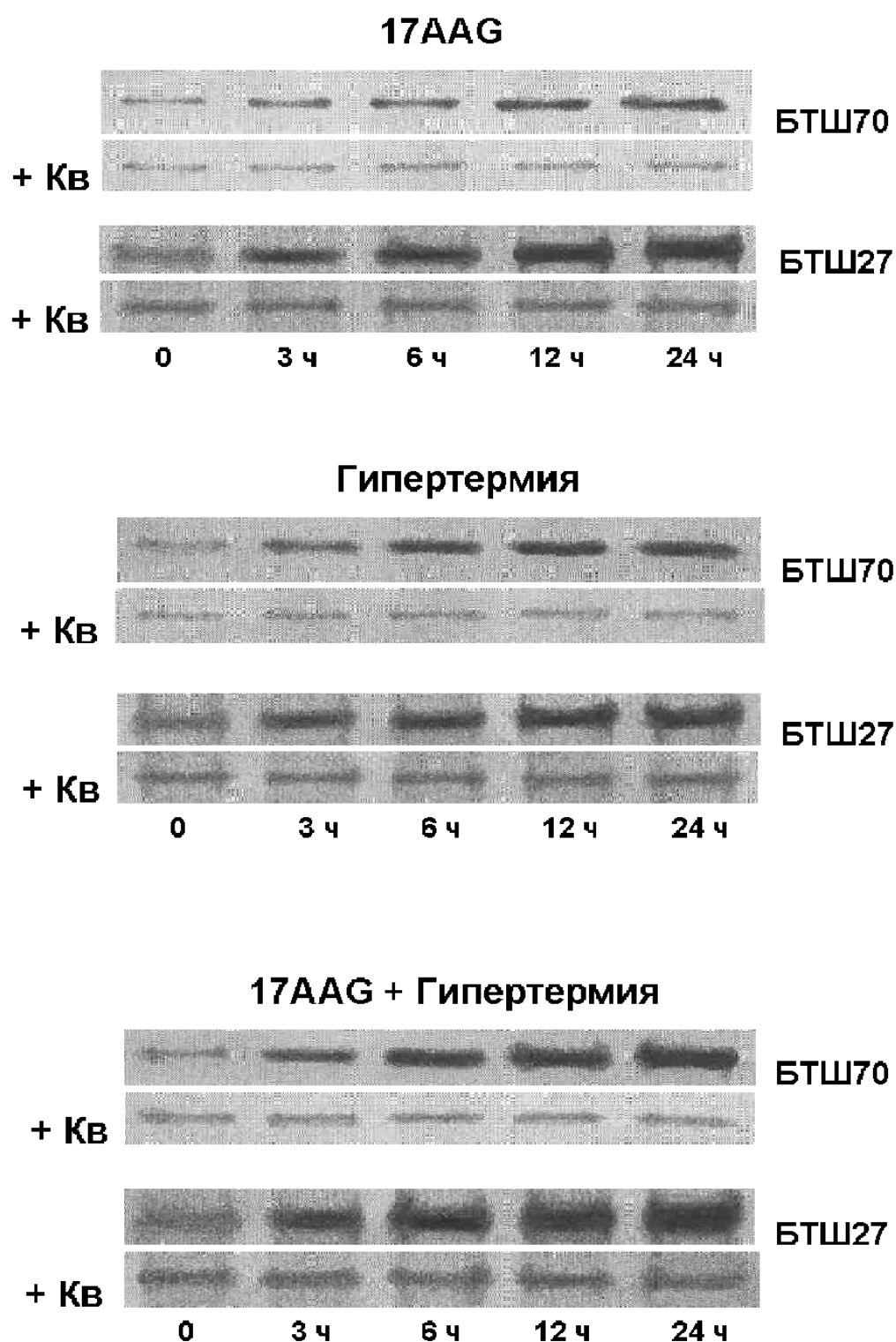


Рисунок 4.

Ингибирование индукции БТШ70 и БТШ27 в клетках HeLa, обработанных ингибиторами активности БТШ90 и/или испытывавших гипертермию. Клетки инкубировали с ингибитором активности БТШ90 - 500 нМ 17AAG и ингибитором индукции БТШ - 30 мкМ кверцетином (+ Кв). Через 2-3 часа после добавления ингибиторов некоторые образцы клеток прогревали при 43°C в течение 60 мин. Уровень экспрессии БТШ70 и БТШ27 оценивали иммуноблоттингом клеточных лизатов, приготовленных на разных сроках после начала воздействий (количество часов отмечено по нижнему краю блотов).

Подобно многим другим линиям опухолевых клеток, клетки HeLa конститутивно экспрессируют БТШ27 и индуцибельную форму БТШ70 (рис. 4, точка 0). Однако, обработка 500 нМ 17AAG усиливала экспрессию БТШ70 и БТШ27 еще до начала гипертермии, а также увеличивала накопление этих шаперонов после прогрева (рис. 4). Таким же образом действовал и 500 нМ радицикол (не показано). Спровоцированная сверхэкспрессия шаперонов, скорее всего, и являлась причиной слабого термосенсибилизирующего действия 17AAG и радицикола, поскольку известно, что БТШ70 и БТШ27 помогают клетке пережить тепловой стресс [4, 7]. Исходя из этого, мы пытались предотвратить повышение внутриклеточного уровня шаперонов с помощью трёх ингибиторов индукции БТШ: кверцетина, триптолида и NZ28 (см. рис. 1Б). Результаты иммуноблоттинга на рисунке 4 демонстрируют полное подавление индукции БТШ70 и БТШ27 в клетках HeLa, обработанных 17AAG в присутствии 30 мкМ кверцетина. Аналогичные результаты были получены с 60 нМ триптолидом и 2 мкМ NZ28 (данные не приводятся). Индукция БТШ в ответ на гипертермию также полностью подавлялась кверцетином, триптолидом и NZ28, так что при сочетании ингибитор активности БТШ90 + ингибитор индукции БТШ + 43°C, 60 мин в опухолевых клетках не происходило накопления шаперонов (рис. 4).

Использованные в данной работе ингибиторы индукции БТШ сами по себе не оказывали сильного цитотоксического эффекта, но когда их действие сочеталось с гипертермией, гибель обработанных клеток заметно усиливалась (рис. 2). Еще большее усиление цитотоксичности достигалось при тройной комбинации воздействий (ингибитор активности БТШ90 + ингибитор индукции БТШ + гипертермия). Две группы данных, полученных с 17AAG и радициколом (рис. 2А,Б), демонстрируют значительную термосенсибилизацию клеток HeLa в случае одновременного ингибирования активности и индукции шаперонов. Так, присутствие в инкубационной среде наномолярных концентраций радицикола (ингибитор шаперонной функции БТШ90) и триптолида (ингибитор индукции БТШ) увеличивало гибель прогретых клеток до 90-92% (рис. 2Б). Максимальная цитотоксичность наблюдалась именно с теми концентрациями ингибиторов индукции БТШ, которые полностью предотвращали внутриклеточное накопление БТШ70 и БТШ27 (см. рис. 4).

Следует подчеркнуть, что мощный термосенсибилизирующий эффект проявлялся уже при наномолярных концентрациях ингибиторов активности БТШ90 и триптолида (ингибитор индукции БТШ). Такие (60-500 нМ) концентрации считаются “клинически достижимыми”: поскольку их возможно создавать и поддерживать в тканях пациента, предлагаемый нами подход кажется достаточно реалистичным в отношении практического применения. То, что в нашей модели обработка ингибиторами начиналась еще до гипертермии, тоже вполне оправдано с точки зрения возможного клинического применения. Аффинность связывания 17AAG (и некоторых его аналогов) с БТШ90 раковых клеток в 100 раз выше, чем с БТШ90 нормальных клеток [15], это позволяет предположить, что после введения ингибитора в организм пациента следует ожидать его преимущественной локализации в опухоли - это может повысить селективность цитотоксических эффектов последующей гипертермии.

Важно отметить, что усиленная гибель клеток HeLa, прогретых в присутствии ингибиторов активности БТШ90 и ингибиторов индукции БТШ (рис. 2А), коррелирует с более сильным торможением реактивации люциферазы (рис. 3А). Это может быть связано с вовлечением *de novo* индуцированных шаперонов в процесс рефолдинга термо-денатурированных белков, что, по-видимому, необходимо для выживания клетки. Для доказательства участия HSF1-опосредованного механизма индукции БТШ мы сравнивали динамику реактивации люциферазы в HSF1 +/+ клетках и HSF1 -/- клетках. Рисунок 3Б показывает, что 17AAG (ингибитор шаперонной функции БТШ90) гораздо сильнее замедлял реактивацию люциферазы в прогретых HSF1 -/- клетках по сравнению с HSF1 +/+ клетками, обработанными точно таким же образом. При этом

комбинирование 17AAG с кверцетином (ингибитор индукции БТШ) значительно усиливало торможение ренатурации люциферазы в прогретых HSF1 +/+ клетках; напротив, в HSF1 -/- клетках эффект такой комбинации двух ингибиторов не отличался от эффекта 17AAG (рис. 3Б). В совокупности эти данные подтверждают вклад конститутивного БТШ90, HSF1 и *de novo* индуцированных БТШ в клеточную машинерию рефолдинга термоллабильных белков.

Ингибирование БТШ90 приводит к инактивации и деградации ряда белков-клиентов, ответственных за устойчивость раковых клеток к апоптозу после химио- и радиотерапии [11-14]. По той же причине обработанные ингибиторами БТШ90 опухолевые клетки могут становиться более подвержены апоптозу, вызываемому гипертермией. Так, Akimoto с соавторами [25] показали, что обработка радициолом прогретых клеток опухоли пищевода подавляет БТШ90-зависимую активацию Raf-1, p42/p44 Erk и Akt; прерывание этих антиапоптотических сигнальных каскадов может усилить клеточную гибель. Здесь важно, что повышение внутриклеточного содержания БТШ70 и БТШ27 тоже защищает от апоптоза [6, 8, 9]; следовательно, искусственная блокада индукции этих шаперонов в опухолевых клетках еще сильнее повысит вероятность их апоптотической гибели после гипертермии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Мы показали, что ингибирование индукции БТШ в сочетании с гипертермией не давало резкого усиления цитотоксичности, вероятно, из-за достаточно эффективной работы конститутивных шаперонов (прежде всего, БТШ90). Обработка клеток перед прогревом только ингибиторами активности БТШ90 также не давала желаемой термосенсибилизации, очевидно, вследствие сверхэкспрессии индуцибельных шаперонов. Поэтому именно использование сразу обоих типов ингибиторов в сочетании с гипертермией выглядит эффективным приемом, позволяющим уничтожить более 90% опухолевых клеток (см. рис. 2).

На молекулярном уровне термосенсибилизация, вызываемая ингибиторами активности и индукции шаперонов, по-видимому, обусловлена подавлением БТШ-зависимого рефолдинга термо-денатурированных белков. Этот вывод поддерживается корреляцией между степенью цитотоксичности воздействий и замедлением реактивации люциферазы (см. рис. 2 и 3А). Принято считать, что хотя люцифераза не влияет на жизнеспособность трансфектантов, динамика ренатурации этого репортера должна отражать процесс рефолдинга термоллабильных клеточных белков, среди которых есть необходимые для выживания [26-28]. Следует также отметить, что замедление рефолдинга термо-денатурированных белков будет способствовать образованию белковых агрегатов – такая агрегация считается одной из главных причин гибели клеток после теплового стресса [4, 5, 7]. Поскольку и БТШ90, и БТШ70, и БТШ27 осуществляют рефолдинг денатурированных белков и препятствуют их агрегации [5, 6, 26-29], ингибирование активности и экспрессии этих шаперонов должно оказывать термосенсибилизирующий эффект.

Таким образом, терморезистентность опухолевых клеток можно преодолеть, если одновременно ингибировать в них и шаперонную активность конститутивного БТШ90, и *de novo* индукцию других шаперонов (БТШ70, БТШ27). Предлагаемое нами комбинирование ингибиторов активности БТШ90 с ингибиторами индукции БТШ представляется вполне рациональным способом стимулировать апоптоз в опухолях-мишенях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wust P., Hildebrandt B., Sreenivasa G., Rau B., Gellermann J., Riess H., Felix R., Schlag P.M. (2002) *Lancet Oncol.*, **3**, 487-497.
2. Takahashi I., Emi Y., Hasuda S., Kakeji Y., Naehara Y., Sugimachi K. (2002) *Surgery*, **131**, S78-S84.

3. Westermann A.M., Jones E.L., Schem B.C., van der Steen-Banasik E.M., Koper P., Mella O., Uitterhoeve O.L., de Wit R., van der Velden J., Burger C., van der Wilt C.L., Dahl O., Prosnitz L.R., van der Zee J. (2005) *Cancer*, **104**, 763-770.
4. Georgopoulos C., Welch W.J. (1993) *Ann. Rev. Cell Biol.*, **9**, 601-634.
5. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. (2002) *Science*, **295**, 1852-1858.
6. Beer H.M. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 2633-2639.
7. Kampinga H.H. (1993) *J. Cell Sci.*, **104**, 11-17.
8. Calderwood S.K., Asea A. (2002) *Int. J. Hyperthermia*, **18**, 597-608.
9. Calderwood S.K., Khaleque M.A., Sawyer D.B., Ciocca D.R. (2006) *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 164-172.
10. Rossi A., Ciafre S., Balsamo M., Pierimarchi P., Santoro M.G. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 7678-7685.
11. Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Voutsinas G.E. (2007) *Curr. Med. Chem.*, **14**, 3122-3138.
12. Hwang M., Moretti L., Lu B. (2009) *Curr. Med. Chem.*, **16**, 3081-3092.
13. Kabakov A.E. (2009) in: *Anticancer Drugs: Design, Delivery and Pharmacology* (Spencer P., Holt W., eds.), Nova Science Publishers, New York, pp. 87-113.
14. Kabakov A.E., Kudryavtsev V.A., Gabai V.L. (2010) *J. Mol. Med.*, **88**, 241-247.
15. Kamal A., Thao L., Sensintaffar J., Zhang L., Boehm M.F., Fritz L.C., Burrows F.J. (2003) *Nature*, **425**, 407-410.
16. Bagatell R., Paine-Murrieta G.D., Taylor C.W., Pulcini E.J., Akinaga S., Benjamin I.J., Whitesell L. (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**, 3312-3318.
17. McMillan D.R., Xiao X., Shao L., Graves K., Benjamin I.J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 7523-7528.
18. Hosokawa N., Hirayoshi K., Kudo H., Takeshi H., Aoike A., Kawai K., Nagata K. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3490-3498.
19. Westerheide S.D., Kawahara T.L.A., Orton K., Morimoto R.I. (2007) *J. Biol. Chem.*, **281**, 9616-9622.
20. Zaarur N., Gabai V.L., Porco J.A., Calderwood S., Sherman M.Y. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 1783-1791.
21. Michels A.A., Nguyen V.T., Konings A.W.T., Kampinga H.H., Bensaude O. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **234**, 382-389.
22. Kampinga H.H., Kanon B., Salomons F.A., Kabakov A.E., Patterson C. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 4948-4958.
23. Bryantsev A.L., Kurchashova S.Y., Golyshev S.A., Polyakov V.Y., Wunderink H.F., Kanon B., Budagova K.R., Kabakov A.E., Kampinga H.H. (2007) *Biochem. J.*, **407**, 407-417.
24. Kabakov A.E., Makarova Y.M., Malyutina Y.V. (2008) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **71**, 858-865.
25. Akimoto T., Nonaka T., Harashima K., Sakurai H., Ishikawa H., Mitsuhashi N. (2004) *Int. J. Radiat. Biol.*, **80**, 483-492.

Поступила: 16. 11. 2010.

THERMOSENSITIZATION OF TUMOR CELLS WITH INHIBITORS OF CHAPERONE ACTIVITY AND EXPRESSION

V.A. Kudryavtsev, Y.M. Makarova, A.E. Kabakov

Medical Radiology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Koroleva, 4, Obninsk, 249036 Russia; tel.: (48439) 97188; fax: (495) 9561440; e-mail: aekabakov@hotmail.com

Effects of inhibitors of the heat shock protein 90 (HSP90) chaperone activity and inhibitors of the heat shock protein (HSP) expression on sensitivity of HeLa tumor cells to hyperthermia were studied. It was found that nanomolar concentrations of inhibitors of the HSP90 activity (17AAG or radicicol) slowed down chaperone-dependent reactivation of a thermo-labile reporter (luciferase) in heat-stressed HeLa cells and slightly enhanced their death following incubation for 60 min at 43°C. Herein, the inhibitors of HSP90 activity stimulated *de novo* induction of additional chaperones (HSP70 and HSP27) that significantly increased the intracellular HSP levels. If the cells were treated with 17AAG or radicicol along with an inhibitor of the HSP induction (e.g. quercetin or triptolid, or NZ28), this fully prevented the increase in intracellular chaperone levels resulting from the inhibition of HSP90 activity and subsequent heating. Importantly, in the case of conjunction of all the three treatments (an inhibitor of the HSP90 activity + an inhibitor of the HSP induction + 43°C for 60 min), the reporter reactivation was retarded yet stronger while the cell death was sharply (2-3-fold) enhanced. Such an enhancement of the cytotoxicity appears to occur owing to the “chaperone deficiency” when prior to heat stress both the functional activity of constitutive HSP90 and the expression of additional (inducible) chaperones are blocked in the cells.

Key words: heat shock proteins, HSF1, thermoresistance, hyperthermia.