

УДК 616-006.441

©Коллектив авторов

## УЧАСТИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА 27 И 70 В РЕДОКС-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT

*О.Л. Носарева\*, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степанова, Е.В. Шахристова, Е.А. Степанова, В.С. Гулая*

Сибирский государственный медицинский университет,  
634050, Томск, Московский тракт, 2; тел.: (3822)53-04-23; эл. почта: [olnosareva@yandex.ru](mailto:olnosareva@yandex.ru)

Рассмотрены возможности управления апоптотической гибелью опухолевых клеток линии Jurkat с помощью регулирования рефолдинга белков. Белки теплового шока играют роль молекулярных шаперонов, защищая ферменты и другие белки от воздействия активных форм кислорода, кроме этого являются анти- и проапоптогенными факторами. Целью данного исследования было установить роль Hsp27 в поддержании состояния системы глутатиона, содержания Hsp70 и реализации апоптоза опухолевых клетках линии Jurkat. При добавлении в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat ингибитора Hsp27 KRIBB3 (5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол) установлены снижение концентрации Hsp70, дисбаланс системы глутатиона (увеличение концентрации окисленного глутатиона и активности глутатионредуктазы), происходящие на фоне активации апоптотической гибели клеток по сравнению с интактной культурой этих клеток. Предложенное селективное управление активностью шаперонов представляет собой перспективное направление регуляции апоптоза на клеточном уровне.

**Ключевые слова:** редокс-статус клетки, белки теплового шока 27 и 70, апоптоз, система глутатиона, опухолевые клетки линии Jurkat

DOI 10.18097/PBMC20166206670

### ВВЕДЕНИЕ

Механизмы, оказывающие влияние на запуск и регуляцию апоптоза, многочисленны и разнообразны. В основе патогенеза ряда патологических процессов, в том числе опухолевого роста, лежит формирование окислительного стресса и нарушение механизмов регуляции апоптоза, приводящее к “ускользанию” клеток от запрограммированной гибели [1-3]. Развивающийся окислительный стресс, сопровождающий опухолевую трансформацию, неизбежно влечет повреждение белков клетки, нуждающихся в своевременном рефолдинге. Среди индуцируемых стрессом молекул под пристальным вниманием исследователей находятся белки теплового шока (Heat shock proteins – Hsp). Эти белковые молекулы обладают полифункциональностью и в плане реализации запрограммированной гибели могут выступать либо как анти- или проапоптогенные факторы, либо в качестве регуляторов активности этих факторов; кроме этого, они тесно взаимодействуют с антиоксидантной системой и системой генерации оксида азота [4-6]. Согласно современным представлениям, белки семейства Hsp70, проявляют свойства ферментов, исправляющих конформационные изменения протеинов за счет энергии АТФ, способствуют трансмембранной транслокации белков и одними из первых реагируют на окислительный стресс. Процесс рефолдинга с помощью Hsp70 протекает более эффективно после ассоциации протеиновых агрегатов с белками теплового шока малой молекулярной массы, в частности с Hsp27 [7]. Кооперативное взаимодействие шаперонов разных семейств определяет дальнейшую судьбу белков

различной молекулярной массы – рефолдинг и восстановление функциональной активности, либо деградация белковых молекул.

Цель работы – установить роль Hsp27 в поддержании состояния системы глутатиона, содержания Hsp70 и реализации апоптоза опухолевых клетках линии Jurkat.

### МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии Jurkat (острый Т-лимфобластный лейкоз человека), полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Для дальнейшего анализа клетки были поделены на две группы: интактная культура клеток и культура клеток с добавлением ингибитора Hsp27 (5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол) (KRIBB3) (“Sigma-Aldrich”, США) в конечной концентрации 0,1 мкМ в течение 18 ч [8]. Опухолевые клетки культивировали в стерильных условиях в полной питательной среде (90% RPMI-1640 (“Вектор-Бест”, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Invitrogen”, США), инактивированной в течение 30 мин при температуре +56°C, 2 мМ Hepes (“Flow”, Великобритания), гентамицин (100 мкг/мл) (“KRKA”, Словения) и L-глутамин (0,3 мг/мл) (“Вектор-Бест”, Россия)) в полуоткрытой системе при температуре +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. В опыте использовали культуры клеток, содержащие не более 5% погибших клеток. Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с помощью 0,1% раствора трипанового синего (“Serva”, США).

Определение содержания изучаемых белков теплового шока проводили с помощью вестерн-блоттинга согласно протоколу производителя с использованием первичных моноклональных антител к фосфорилированным формам Hsp27 (“Abcam”, США) и Hsp70 (“R&D Systems”, США). Вывод о содержании исследуемого белка в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала белка цитоскелета β-актина (“Sigma-Aldrich”) [9], используя программное обеспечение ImageJ версия 1.45S (США).

Содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) определяли спектрофотометрическим методом [10]. Для расчёта концентрации глутатиона строили калибровочный график, используя растворы GSH и GSSG (“Sigma-Aldrich”) с концентрациями от 3 мкМ до 100 мкМ.

Активность глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) определяли спектрофотометрически в реакции NADPH-зависимого восстановления GSSG до 2 GSH и последующего взаимодействия GSH с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой с образованием тио-2-нитробензойной кислоты, водный раствор которой имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм [11]. Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) определяли с помощью спектрофотометрического метода, основанного на способности фермента катализировать реакцию взаимодействия GSH с гидроперекисью *трет*-бутила [12]. Концентрацию белка в клетках определяли спектрофотометрическим методом Bradford [13].

Детекцию апоптоза проводили при помощи набора Annexin V FITC (“TREVIGEN”, США) с помощью проточной цитофлуориметрии, согласно протоколу производителя.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы “Statistica 6.0” for Windows. Нормальность распределения признаков проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости  $p < 0,05$  вычисляли средневыворочные характеристики: медиана (Me), первый ( $Q_1$ ) и третий ( $Q_3$ ) квартили. Достоверность различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

*Таблица.* Показатели системы глутатиона, содержания белков теплового шока 27 и 70, количества аннексин-положительных интактных опухолевых клеток линии Jurkat и при добавлении KRIBB3

Исследуемый показатель \ Условия культивирования	Jurkat	Jurkat+KRIBB3
Восстановленный глутатион, нмоль/мг белка	2,05 (1,93-2,31)	2,54 (1,97-3,64)
Окисленный глутатион, нмоль/мг белка	0,16 (0,15-0,19)	0,65* (0,62-0,72)
Глутатионредуктаза нмоль/мин·мг белка	119,45 (96,3-162,74)	422,90* (389,21-435,23)
Глутатионпероксидаза мкмоль/мин·мг белка	10,54 (8,18-12,20)	12,50 (7,59-13,90)
Hsp27 у.е.	3,89 (3,53-4,17)	1,12* (1,00-2,44)
Hsp70 у.е.	2,31 (2,12-3,55)	1,29* (1,11-2,70)
Количество аннексин-положительных клеток	5,20 (4,00-5,60)	61,80* (39,30-63,60)

Примечание: \* -  $p < 0,05$  уровень значимости различий по сравнению с интактными опухолевыми клетками линии Jurkat.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Hsp27 – белок-шаперон из группы малых белков теплового шока (sHsp), общими функциями которых являются: обеспечение фолдинга, увеличение термотолерантности, ингибирование апоптоза, регулирование развития и дифференцировки клеток, участие в передаче сигнала [8, 9, 14]. Hsp70 – семейство шаперонов участвующих в процессах фолдинга в присутствии АТФ и кошаперона Hdj-1, стабилизации и транспорта белковых молекул через мембраны митохондрий и ядерную оболочку [4, 5, 15]. Шаперонная активность реализуется посредством идентификации повреждённых конформаций белков, связывания с ними и поддержания их в состоянии, способном к последующему восстановлению, предотвращая при этом случайные ассоциации белков и формирование нефункциональных агрегатов.

При добавлении в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat KRIBB3 нами был получен клеточный ответ в виде достоверно значимого снижения содержания Hsp27 в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках. Несмотря на то, что KRIBB3 является ингибитором Hsp27, его добавление в культуру опухолевых клеток линии Jurkat также вызывает значимое снижение содержания Hsp70 в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (таблица).

Система глутатиона вносит существенный вклад в поддержание баланса между про- и антиоксидантными системами клетки. Важнейшим её компонентом является восстановленный глутатион GSH, который способен снижать деструктивное и цитотоксическое действие активных форм кислорода (АФК), выступая в качестве акцептора гидроксильного радикала и синглетного кислорода. Глутатион участвует в передаче внутриклеточных сигналов, редокс-регуляции транскрипционных факторов, экспрессии генов и активности процессов, приводящих к апоптозу [16]. Одна из важных функций глутатиона в редокс-регуляции клетки связана с образованием смешанных дисульфидов с тиоловыми группами белков, что обеспечивает защиту функциональных SH-групп белков от дальнейшего необратимого окисления [17].

При добавлении ингибитора Hsp27 KRIBB3 к клеткам линии Jurkat зафиксировано возрастание концентрации GSSG в 4,1 раза ( $p < 0,05$ ), активности глутатионредуктазы в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ). Поскольку содержание восстановленной формы тиола и активность глутатионпероксидазы незначительно отличались в интактных и обработанных ингибитором опухолевых клетках (таблица), это свидетельствует о том, что активность белковых компонентов системы глутатиона не зависит от функциональной способности Hsp27, а повышение концентрации GSSG, по-видимому, обусловлено увеличением содержания АФК при опухолевой прогрессии.

Несмотря на наличие большого количества экспериментальных исследований, посвященных изучению роли белков теплового шока в регуляции апоптоза, до сих пор является актуальным выяснение особенностей модулирующего действия шаперонов при опухолевой трансформации клеток [15, 18, 19].

sHsp предотвращает гибель клеток, индуцированную TNF $\alpha$  или пероксидом водорода. Кроме этого, в ряде работ показана полифункциональность Hsp70 и Hsp27 в плане реализации запрограммированной гибели. Установлено, что Hsp70 и Hsp27 обладают свойством ингибировать каспазо-зависимый апоптоз, направленно взаимодействуя с цитохромом *c* и Араф-1, способствуя их связыванию, тем самым ингибируя образование апоптосомы [20-22].

При добавлении к культуре опухолевых клеток KRIBB3 происходило резкое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 11,9 раза ( $p < 0,05$ ) относительно значения показателя в интактной культуре, что свидетельствовало об эффективной активации механизмов реализации апоптоза в исследуемых клетках (таблица). Полученные результаты можно объяснить тем, что при снижении содержания Hsp27 и Hsp70, выполняющих в опухолевых клетках линии Jurkat функции шаперонов, происходил рост концентрации АФК и окислительное повреждение внутриклеточных ферментов. Вероятнее всего, при утрате защитных функций шаперонов опухолевые клетки оказывались не в состоянии поддерживать свою жизнедеятельность, что приводило к индукции апоптоза. Таким образом, защитный эффект Hsp27 и Hsp70 связан с их участием в фолдинге (и рефолдинге поврежденных) белков, с ингибированием апоптотического сигнала на различном молекулярном уровне, что позволяло опухолевым клеткам линии Jurkat эффективно “ускользнуть” от апоптоза [5, 6, 23-25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ингибирование Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat сопровождалось снижением концентрации Hsp70, приводящим к развитию окислительного стресса. Одновременно в изучаемых клетках был зафиксирован дисбаланс системы глутатиона (увеличение концентрации окисленного глутатиона и активности глутатионредуктазы) на фоне снижения содержания шаперонов

(Hsp27 и Hsp70), участвующих в рефолдинге белков и активации апоптотической гибели клеток. Вероятнее всего, ингибирование белка теплового шока 27 с помощью KRIBB3 резко снижало активность Hsp70 и его антиапоптотический эффект.

Таким образом, Hsp27 и Hsp70, действуя на белки, в том числе входящие в систему глутатиона, представляют собой молекулярные мишени для фармакологической коррекции метаболизма и дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Конформационные изменения протеинов при участии шаперонов, в своей совокупности не только определяют функциональные возможности отдельной клетки, но и позволяют обосновать подходы к таргетной терапии опухолевых процессов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Negroni L., Samson M., Guignonis J.M., Rossi B., Pierrefite-Carle V., Baudoin C. (2007) *Mol. Cancer Ther.*, **6**(10), 2747-2756.
2. Boland M.L., Chourasia A.H., Macleod K.F. (2013) *Front Oncol.*, **3**, 292.
3. Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. (2014) *Science.*, **345**(6203), 1250256.
4. Padmini E., Tharani J. (2014) *Fish Physiol. Biochem.*, **40**(5), 1573-1585.
5. Wang X., Chen M., Zhou J., Zhang X. (2014) *Int. J. Oncol.*, **45**(1), 18-30.
6. Lianos G.D., Alexiou G.A., Mangano A., Mangano A., Rausei S., Boni L., Dionigi G., Roukos D.H. (2015) *Cancer Lett.*, **360**(2), 114-118.
7. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **10**, 842-846.
8. Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. (2012) Апоптоз и белки теплового шока, Томск, Печатная мануфактура, 180 с.
9. Носарева О.Л., Степовая Е.А., Рязанцева Н.В., Закирова Е.В., Мазунин И.О., Литвинова Л.С., Сохоневич Н.А., Веснина О.Н., Шахристова Е.В. (2015) *Бюллетень сибирской медицины*, **14**(1), 66-72.
10. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. (2004) *J. Radiat. Res.*, **45**(1), 33-39.
11. Worthington D.J., Rosemeyer M.A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**(1), 231-238.
12. Карпищенко А.И. (1998) *Медицинские лабораторные технологии*, СПб., Интермедика, **Т.2**, 656 с.
13. Bradford M.M. (1976) *Analyt. Biochem.*, **7**(1, 2), 248-254.
14. Thériault J.R., Lambert H., Châvez-Zobel A.T., Charest G., Lavigne P., Landry J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**(22), 23463-23471.
15. McConnell J.R., McAlpine S.R. (2013) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**(7), 1923-1928.
16. Aslan M., Canatan D. (2008) *Experimental Hematology*, **36**(11), 1535-1544.
17. Степовая Е.А., Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Закирова Е.В., Наумова А.И., Веснина О.Н., Орлов Д.С., Шахристова Е.В., Иванов В.В., Новицкий В.В. (2015) *Молекулярная медицина*, **4**, 60-64.
18. Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M., Garrido C. (2008) *J. Cell. Mol. Med.*, **12**(3), 743-761.

## HSP27, HSP70 И СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА В ДИЗРЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

19. Joly A.L., Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. (2010) *J. Innate Immun.*, **2**(3), 238-247.
20. Csermely P, Söti C, Blatch G.L. (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **594**, 55-63.
21. Söti C., Csermely P. (2007) *Exp. Gerontol.*, **42**(1-2), 113-119.
22. Маргулис Б.А., Гужова И.В. (2009) *Цитология*, **51**(3), 219-228.
23. Sedlackova L., Spacek M., Holler E., Imryskova Z., Hromadnikova I. (2011) *Tumour Biol.*, **32**(1), 33-44.
24. Murphy M.E. (2013) *Carcinogenesis*, **34**(6), 1181-1188.
25. Kennedy D., Jäger R., Mosser D.D., Samali A. (2014) *IUBMB Life*, **66**(5), 327-338.

Поступила: 25. 05. 2015.  
Принята к печати: 17. 03. 2016.

### THE ROLE OF HEAT SHOCK PROTEINS 27 AND 70 IN REDOX-DEPENDENT REGULATION OF APOPTOSIS IN JURKAT TUMOR CELLS

*O.L. Nosareva, N.V. Ryazantseva, E.A. Stepovaya, E.V. Shakhristova, E.A. Stepanova, V.S. Gulaya*

Siberian State Medical University,  
2 Moskovskii tract, Tomsk, 634050 Russia; tel.: (3822)53-04-23; e-mail: olnosareva@yandex.ru

Heat shock proteins Hsp) act as molecular chaperones, protecting enzymes and other proteins against reactive oxygen species. The objective of the study was to investigate the role of Hsp27 in maintaining the balance of the glutathione system and Hsp70 concentrations as well as in implementing Jurkat tumor cell apoptosis. Addition of the Hsp27 inhibitor KRIBB3 (5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazol) to Jurkat cells resulted in glutathione redox imbalance (increased GSSG and increased glutathione reductase activity), a decrease in Hsp70 concentrations, and also increased cell apoptosis as compared with to the intact cell culture. The proposed selective regulation of chaperone activity is a promising direction in regulating apoptosis at the cellular level.

**Key words:** cell redox status, heat shock proteins 27 and 70, apoptosis, glutathione system, Jurkat tumor cells