

СУПЕРСЕМЕЙСТВО РЕЦЕПТОРА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ α И БЕЛОК ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP90: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ

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

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», НОЦ молекулярной медицины, кафедра фундаментальных основ клинической медицины, кафедра патофизиологии, г. Томск

Резюме. Проведено исследование взаимодействия суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли α и белка теплового шока Hsp90 в опухолевых клетках линии Jurkat. В условиях культивирования опухолевых клеток с ингибитором белка теплового шока Hsp90 (17-AAG) увеличивается число клеток, презентующих на поверхности TNFR1 и FasR, что облегчает запуск запрограммированной гибели клеток. Также было выявлено, что блокирование белка теплового шока Hsp90 в условиях *in vitro* вызывает снижение FasL и не влияет на продукцию TNF α , sTNFR1 в опухолевых клетках.

Ключевые слова: апоптоз, Hsp90, TNF, Fas.

Ryazantseva N.V., Kaygorodova E.V., Belkina M.V., Maroshkina A.N., Chechina O.E., Zima A.P., Novitskii V.V.

RECEPTOR SUPERFAMILY OF TUMOR NECROSIS FACTOR α , AND HSP90 HEAT SHOCK PROTEIN: A MOLECULAR BASIS FOR INTERACTIONS

Abstract. A study was performed aiming to investigate interactions between TNF α receptor (TNFR1) superfamily and heat shock protein Hsp90, using a Jurkat tumor cell line. The tumor cells cultured in presence of Hsp90 inhibitor (17-AAG) showed increased numbers of cells, presenting surface TNFR1 and FasR, which facilitate triggering of programmed cell death. It was also revealed that Hsp90 blockage under the *in vitro* conditions causes a decrease in FasL, while not affecting TNF α and sTNFR1 production by the tumor cells. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 247-252)

Keywords: apoptosis, Hsp90, TNF, Fas.

Введение

Актуальным направлением молекулярной медицины является исследование модуляции апоптоза как важного патогенетического звена многочисленных заболеваний. Согласно современным

Адрес для переписки:

Кайгородова Евгения Викторовна,
ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, НОЦ молекулярной
медицины
634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел./факс: (3822) 53-33-09.
E-mail: zlobinae@mail.ru

представлениям, формирование злокачественных опухолей также имеет в своей основе нарушение запрограммированной гибели клетки [1]. Выделяют три пути запуска запрограммированной клеточной гибели — рецепторный, митохондриальный и ядерный (p53-опосредованный); эти пути, как правило, не протекают изолированно, а дополняют и усиливают друг друга [1, 2, 7].

Рецептор-опосредованный путь апоптоза запускается при связывании специфических лигандов с рецепторами семейства фактора некроза опухоли (TNF), расположенными на плазматической мембране. Наиболее изученными рецеп-

торами данного семейства являются FasR (CD95/Apo1) и TNFR1 (p60/p55), относящиеся к трансмембранным гликопротеинам I типа [5, 29].

Презентация рецепторов на плазматической мембране осуществляется при помощи молекулярных шаперонов. К группе молекулярных шаперонов относятся белки теплового шока, которые в нормальных клетках обеспечивают правильное сворачивание, сборку мультимолекулярных белковых комплексов, перемещение, деградацию и предотвращение агрегации белков, а также осуществляют рефолдинг денатурированных пептидов [17]. Роль белков теплового шока в апоптозе неоднозначна: в одних случаях они обеспечивают выживание клетки, а в других — способствуют ее гибели [11, 13]. Одним из представителей семейства белков теплового шока является Hsp90, который относится к конститутивным белкам и выполняет преимущественно антиапоптотическую роль [11]. Доказательством тому является обнаруженный факт повышенной экспрессии Hsp90 при немелкоклеточной карциноме легкого, раке пищевода, саркоме поджелудочной железы, меланоме и др. [12, 16, 25].

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния белка теплового шока Hsp90 на суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли клеток линии Jurkat.

Материалы и методы

Материалом исследования явились клетки опухолевой линии Jurkat (Т-лимфобластного лейкоза человека), полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Культивирование клеток проводили суспензионным методом в полной питательной среде, содержащей 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Invitrogen», США), инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамина («Вектор-Бест», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина («INS», США) при температуре 37 °С и в 5% атмосфере CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста и пересаживали через 3 суток.

Влияние белка теплового шока Hsp90 на суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли оценивали при помощи селективного ингибитора Hsp90 17-аллиламино-17-деметоксигелданамицин (17-AAG) («Sigma Aldrich», США) в концентрации 0,5; 2,0; 5,0 и 20 мкМ.

Оценку апоптоза проводили методом флуоресцентной микроскопии на микроскопе AxioStar

plus («Carl Zeiss», Германия) при помощи набора Annexin V Fitc («Beckman Coulter», США). Клетки, находящиеся в раннем апоптозе, связывали FITC метку, в позднем — FITC и пропидий иодид, а в некрозе — только пропидий иодид. Подсчет осуществляли на 200–300 клеток. Количество клеток в состоянии апоптоза считали как сумму FITC⁺/PI⁻ и FITC⁺/PI⁺ и выражали в процентах от общего числа клеток.

Определение опухолевых клеток, несущих FasR и TNFR1, проводили с использованием наборов моноклональных антител к человеческому антигену CD95 (Fas/APO-1) и CD120a (TNFR1) («Beckman Coulter», США) на проточном цитофлуориметре FACSCanto II («Becton Dickinson», США). Количество CD95- и TNFR1-презентирующих клеток выражали в % от общего числа клеток.

Уровень sFasL, TNF α , sTNFR в супернатантах опухолевых клетках Jurkat оценивали методом иммуноферментного анализа по протоколу фирм-производителей («Bender MedSystem», Австрия; «Протеиновый контур», Россия) на микропланшетном фотометре Multiscan EX («Thermo LabSystem», Финляндия). Содержание sFasL, sTNFR, TNF α определяли по калибровочной кривой и выражали в нг/мл.

Полученные данные обрабатывали методами статистического анализа. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Для каждого анализируемого показателя вычисляли медиану (Me) и квартили (Q₁-Q₃). Достоверность различий между независимыми группами для выборок, подчиняющихся нормальному закону распределения, проводили при помощи двухвыборочного критерия Стьюдента. Для определения достоверности различий между независимыми группами выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Культивирование клеток линии Jurkat *in vitro* с селективным ингибитором Hsp90 17-AAG показало, что при достижении концентрации ингибитора в среде уровня 5 мкМ значительно (24,94 (18,62-30,78) %, ($p < 0,05$)) по сравнению с интактными условиями (4,12 (2,87-5,18) %), возросло количество апоптотически измененных клеток (рис. 1.)

Исследование культуры опухолевых клеток линии Jurkat выявило (табл. 1), что количество

клеток, несущих FasR, в интактной культуре составило 22,60 (19,75-28,75) %. Содержание FasL в интактной опухолевой культуре отмечалось на уровне 0,14 (0,10-0,25) нг/мл. Культивирование опухолевых клеток с селективным ингибитором Hsp90 17-AAG в концентрации 5 мкМ вызвало достоверное увеличение числа клеток, несущих на своей поверхности FasR, по сравнению с интактными опухолевыми клетками; при этом концентрация FasL в культуральной среде оставалась неизменной.

Кроме того, добавление в среду культивирования селективного ингибитора 17-AAG в концентрации 5 мкМ увеличивало в 7 раз количество клеток, презентующих на своей поверхности TNFR1, по сравнению с интактной культурой. Однако содержание TNF α и sTNFR в культуральной среде не изменялось.

Обсуждение

В исследовании было показано, что в условиях культивирования клеток линии Jurkat со специфическим ингибитором Hsp90 17-AAG в концентрации 5 мкМ достоверно увеличивается число апоптотически измененных клеток по сравнению с их числом в интактной культуре. По данным литературы известно, что повышение экспрессии белка теплового шока Hsp90 подавляет программированную клеточную гибель, так как данный шаперон регулирует активность многих транскрипционных факторов, способствующих выживанию клеток [20]. Действие ингибитора Hsp90 приводит к облегчению проведения смертельных сигналов внутрь клетки и к повышению активности эффекторных каспаз [3, 4], что неизбежно сопровождается увеличением числа клеток, вступивших в апоптоз. В связи с этим в последнее время различными исследовательскими

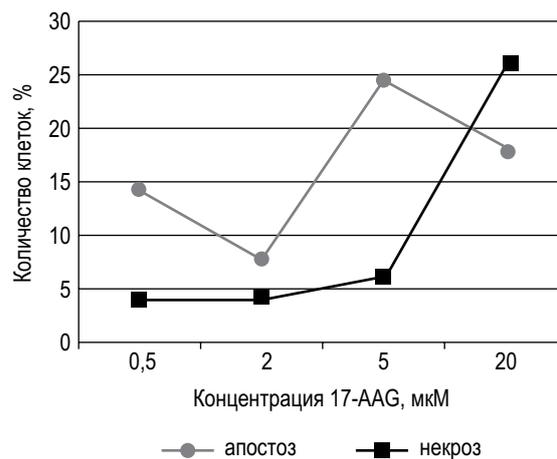


Рисунок 1. Количество опухолевых клеток линии Jurkat в состоянии апоптоза и некроза при действии различных концентраций ингибитора Hsp90 17-AAG

группами проводится работа по созданию противоопухолевых вакцин на основе белков теплового шока и лекарств на основе их ингибиторов [6, 10].

Запуск рецептор-опосредованного апоптоза происходит при взаимодействии презентированных на поверхности клетки рецепторов (FasR или TNFR1) с их физиологическими лигандами, что приводит к активации инициаторной каспазы-8 через адапторные молекулы FADD и TRADD [23, 26]. Каспаза-8, в свою очередь, активирует каспазу-3, которая, расщепляя внутриклеточные субстраты, вызывает функциональные и морфологические изменения типичные для апоптоза [19].

Так, реализация TNF α -опосредованного апоптоза запускается при связывании провоспалительного цитокина TNF α с одним из двух рецепторов TNFR1 или TNFR2 [20, 26]. Активация TNFR1-пути обычно приводит к развитию

ТАБЛИЦА 1. ЧЛЕНЫ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ JURKAT ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ HSP90 *IN VITRO*

Показатель	Интактная культура опухолевых клеток линии Jurkat	Ингибирование Hsp90 (культивирование Jurkat с 5 мкМ 17-AAG)
FasR (%)	22,60 (19,75-28,75)	59,00 (57,85-61,85) p < 0,05
sFasL (нг/мл)	0,14 (0,09-0,20)	0,07 (0,05-0,08) p < 0,05
TNF-R1 (%)	3,30 (1,80-7,20)	21,40 (20,30-27,25) p < 0,05
sTNF-R (нг/мл)	1,72 (1,66-1,88)	1,68 (1,67-1,74) p > 0,05
TNF α (нг/мл)	0,05 (0,02-0,07)	0,04 (0,03-0,05) p > 0,05

Примечание. p – достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре.

воспаления или запрограммированной гибели клеток [14].

Ингибирование белка теплового шока Hsp90 в культуре опухолевых клеток линии Jurkat показало значительное увеличение числа клеток, несущих TNFR1, и количества клеток, вступивших в апоптоз, по сравнению с интактной культурой. При связывании TNF α и TNFR1 происходит активация NF- κ B в результате стабилизации RIP-1, а также формирования активных ИКК или Akt комплексов, участвующих в фосфорилировании I κ B, что вызывает диссоциацию NF- κ B от его ингибитора [15]. Блокирование этого механизма устраняет активацию NF- κ B и повышает чувствительность клеток к апоптозу [22].

Система TNF α имеет неоднозначный эффект на онкогенез. Так, с одной стороны, у данного цитокина впервые были обнаружены противоопухолевые свойства, и в настоящее время рекомбинантный TNF применяется в лечении ряда злокачественных новообразований [21]. С другой стороны, TNF α обладает туморогенным действием, обеспечивая прораствание кровеносных сосудов в опухоли, инвазию опухолевых клеток и метастазирование [28]. Растворимые формы рецептора TNF могут действовать как ингибиторы TNF α , препятствуя взаимодействию с мембранными рецепторами. Вместе с тем обнаружена способность sTNFR пролонгировать эффект TNF α посредством стабилизации его биологически активной гомотримерной структуры [9]. В нашем исследовании, проведенном *in vitro*, мы обнаружили, что белок теплового шока Hsp90 не оказывает влияния на продукцию TNF α и растворимой формы TNFR1, увеличивая, однако, презентацию TNFR1 на поверхности опухолевых клеток. Полученный результат дает основания предположить, что использование ингибитора белка теплового шока 90 в терапии онкологических заболеваний в условиях *in vivo* позволит селективно уничтожить опухолевые клетки, посредством цитотоксического действия иммуноцитов, и повысить спонтанный апоптоз опухолевых клеток.

Для оценки влияния белка теплового шока Hsp90 на систему Fas-рецептора в опухолевых клетках линии Jurkat была изучена продукция FasL и экспрессия FasR. Известно, что развитие опухоли обычно связано с уменьшением или даже полным исчезновением FasR на поверхности опухолевых клеток, однако, при этом обычно увеличивается экспрессия FasL [27]. В то же время опухолевые клетки, в которых отмечается высокая экспрессия FasR и низкая – FasL, становятся уязвимыми для клеток лимфоидного ряда. При этом гибель опухолевых клеток достигается

двумя путями, один из которых осуществляется за счет высвобождения перфоринов и гранзимов натуральными киллерами, активируя сигнальные пути апоптоза как с участием, так и без участия каспаз. Второй путь заключается в захвате рецепторов смерти на клетках-мишенях соответствующими лигандами и активацией каспаза-зависимого апоптоза [27].

Культивирование опухолевых клеток с селективным ингибитором Hsp90 17-AAG в концентрации 5 мкМ вызывало достоверное увеличение числа клеток, несущих на поверхности FasR, по сравнению с интактными опухолевыми клетками, и снижение продукции FasL. Из данных литературы известно, что действие противоопухолевых препаратов приводит к увеличению содержания FasR на плазматической мембране клетки и сопровождается образованием сигнального комплекса, индуцирующего гибель клетки даже в отсутствии FasL [24]. Культивирование опухолевых клеток с ингибитором белка теплового шока Hsp90 вызывало рост числа клеток, несущих на своей поверхности FasR, это позволяет предположить, что индукция апоптоза в условиях ингибирования белка теплового шока Hsp90 не требует высокой экспрессии FasL.

Таким образом, в условиях селективного ингибирования белка теплового шока Hsp90 опухолевые клетки линии Jurkat презентуют большее число TNFR1 и FasR, что сопровождается увеличением числа клеток, вступивших в апоптоз. Однако блокирование белка теплового шока Hsp90 не влияет на продукцию TNF α , sTNFR1 и снижает содержание FasL в супернатантах культуры опухолевых клеток. Молекулярные механизмы запуска запрограммированной гибели опухолевых клеток при ингибировании Hsp90, кроме систем TNFR1 и FasR, вероятно, включают в себя активацию других рецепторов суперсемейства фактора некроза опухоли и других путей апоптоза.

Благодарности

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК П1203; ГК 02.740.11.0311), гранта Carl Zeiss, РФФИ (грант 09-04-99025) и совета по грантам при Президенте РФ (ГК № 02.120.11.3842-МД).

Список литературы

1. Жижина Г.П. Роль апоптоза в нормальном онтогенезе, патогенезе и старении // Клиническая геронтология. – 2002. – Т. 8, № 4. – С. 3-10.

2. Жукова О.Б., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и вирусная инфекция. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. – 142 с.
3. Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Марошкина А.Н., Белкина М.В., Чечина О.Е., Зима А.П. Действие ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 на дексаметазониндуцированный апоптоз опухолевых клеток // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – № 3. – С. 68-72.
4. Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Белкина М.В., Марошкина А.Н. Роль белка теплового шока 90 в регуляции апоптоза опухолевых клеток // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 10. – С. 424-427.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – СПб: Фолиант, 2008. – 552 с.
6. Косенков Д.А., Ляшенко А.А., Кешелова В.В., Северин Е.С. Основные виды противоопухолевых вакцин // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – № 3. – С. 3-9.
7. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б. Роль NF- κ B, p53 и p21 в регуляции ФНО α -опосредованного апоптоза лимфоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 1. – С. 56-59.
8. Фильченков А.А. Апоптомодуляторы // Биомедицинская химия. – 2003. – Т. 49, № 4. – С. 333-359.
9. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors // Cytokine Growth Factor Rev. – 1996. – Vol. 7, N 3. – P. 231-240.
10. Amolins M.W., Blagg B.S. Natural product inhibitors of Hsp90: potential leads for drug discovery // Mini Rev. Med. Chem. – 2009. – Vol. 9, N 2. – P. 140-52.
11. Arya R., Mallik M., Lakhota S.C. Heat shock genes – integrating cell survival and death // J. Biosci. – 2007. – Vol. 32, N 3. – P. 595-610.
12. Becker B., Multhoff G., Farkas B., Wild P.J., Landthaler M., Stolz W., Vogt T. Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases // Exp. Dermatol. – 2004. – Vol. 13, N 1. – P. 27-32.
13. Beere H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 115, N 10. – P. 2633-2639.
14. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease // J. Pathol. – 2008. – Vol. 214, N 2. – P. 149-160.
15. Chen G., Cao P., Goeddel D.V. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90 // Mol. Cell. – 2002. – Vol. 9, N 2. – P. 401-410.
16. Gallegos Ruiz M.I., Floor K., Roepman P., Rodriguez J.A., Meijer G.A., Mooi W.J., Jassem E., Niklinski J., Muley T., van Zandwijk N., Smit E.F., Beebe K., Neckers L., Ylstra B., Giaccone G. Integration of gene dosage and gene expression in non-small cell lung cancer, identification of HSP90 as potential target // PLoS One. – 2008. – Vol. 3, Issue 3. – P. 1-8.
17. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // Science. – 2002. – Vol. 295, N 5561. – P. 1852-1858.
18. Hehlhans T., Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games // Immunology. – 2005. – Vol. 115, N 1. – P. 1-20.
19. Hirata H., Takahashi A., Kobayashi S., Yonehara S., Sawai H., Okazaki T., Yamamoto K., Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis // J. Exp. Med. – 1998. – Vol. 187, N 4. – P. 587-600.
20. Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M., Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation // J. Cell. Mol. Med. – 2008. – Vol. 12, N 3. – P. 743-761.
21. Lejeune F. J., Liénard D., Matter M., Rüegg C. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy // Cancer Immunity. – 2006. – Vol. 6. – P. 6-22.
22. Lewis J., Devin A., Miller A., Lin Y., Rodriguez Y., Neckers L., Liu Z.-G. Disruption of Hsp90 Function Results in Degradation of the Death Domain Kinase, Receptor-interacting Protein (RIP), and Blockage of Tumor Necrosis Factor-induced Nuclear Factor- κ B Activation // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, N 14. – P. 10519-10526.
23. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology // Cell. – 2001. – Vol. 104, N 4. – P. 487-501.
24. Micheau O., Solary E., Hammann A., Dimanche-Boitrel M.T. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway

by anticancer drugs // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 12. – P. 7987-7992.

25. Ogata M., Naito Z., Tanaka S., Moriyama Y., Asano G. Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma // J. Nippon Med. Sch. – 2000. – Vol. 67, N 3. – P. 177-185.

26. Screaton G., Xu X.N. T cell life and death signaling via TNF-receptor family members // Curr. Opin. Immunol. – 2000. – Vol. 12, N 3. – P. 316-322.

27. Smyth M.J., Cretney E., Kelly J.M., Westwood J.A., Street S.E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S.L., Degli-Esposti M.A., Hayakawa Y.

Activation of NK cell cytotoxicity // Mol. Immunol. – 2005. – Vol. 42, N 4. – P. 501-510.

28. Wang X., Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? // Acta Pharmacol Sin. – 2008. – Vol. 29, N 11. – P. 1275-1288.

29. Zhang G. Tumor necrosis factor family ligand-receptor binding // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2004. – Vol. 14, N 2. – P. 154-160.

поступила в редакцию 08.02.2011

принята к печати 12.02.2011