

МОНООКСИД УГЛЕРОДА: РОЛЬ В МИТОХОНДРИАЛЬНОМ ПУТИ ЗАПУСКА АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT

Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Бельдягина Е.В.,
Васильева О.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В.

НОЦ молекулярной медицины ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Томск

Резюме. Настоящая работа демонстрирует способность монооксида углерода запускать апоптоз клеток линии Jurkat по митохондриальному пути. Нами было показано, что проапоптотическое действие СО сопряжено с пермеабиллизацией митохондриальных мембран клеток. Одной из причин возникновения пор в мембранах митохондрий является дисбаланс белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2. В нашей работе продемонстрировано снижение экспрессии мРНК и содержания антиапоптотических протеинов Bcl-2 и Bcl-xl, а также снижение экспрессии мРНК и повышение содержания проапоптотического белка Bad в клетках линии Jurkat после инкубирования с 50 мкМ донором монооксида углерода CORM-2.

Ключевые слова: монооксид углерода, апоптоз, митохондрии.

Starikova E.G., Tashireva L.A., Beldiagina E.V., Vasileva O.A., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V.

CARBON MONOXIDE: ITS ROLE IN MITOCHONDRIAL PATHWAY OF APOPTOSIS INDUCTION IN JURKAT CANCER CELLS

Abstract. This study demonstrates ability of carbon monoxide to trigger mitochondrial pathway of apoptosis induction of Jurkat cells. We have shown that proapoptotic action of carbon monoxide is coupled to permeabilization of cellular mitochondrial membranes. Imbalance in Bcl-2 family of regulatory proteins may be considered among possible reasons of the membrane pore formation. We have shown downregulated Bcl-2 and Bcl-xl mRNA expression and decreased levels of antiapoptotic proteins, along with decreased mRNA expression and increase of Bad proapoptotic protein level in Jurkat cells following incubation with 50 μ M of CORM-2, a carbon monoxide donor. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 353-358)

Keywords: carbon monoxide, apoptosis, mitochondria.

Введение

Монооксид углерода, более известный как токсичный газ без цвета и запаха, был признан научной общественностью в качестве первичного мессенджера спустя четыре года после открытия сигнальных свойств оксида азота [15]. Монооксид углерода является эндогенным продуктом деградации гема с участием фермента гемоксигеназы. В низких микромолярных

концентрациях монооксид углерода участвует в регуляции таких физиологических процессов, как расслабление гладкой мускулатуры [11], агрегация тромбоцитов и активация моноцитов [17], участие в передаче нервного импульса и восприятии болевого сигнала [10], а также в регуляции секреции желез желудочно-кишечного тракта [9]. Изменение концентрации монооксида углерода было зафиксировано при ряде патологических процессов, таких как нейродегенеративные заболевания [10], гипертония [11], воспаление [7], а также канцерогенез [16]. Развитие вышеуказанных патологических состояний отчасти (воспаление) или полностью (канцерогенез, нейродегенеративные заболевания) обусловле-

Адрес для переписки:

Старикова Елена Григорьевна,
ГБОУ ВПО СибГМУ, НОЦ молекулярной медицины
634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
E-mail: to-elen@yandex.ru

но дизрегуляцией апоптоза. Последний представляет собой механизм удаления избыточных или поврежденных клеток. Известно, что смерть-индуцирующие и жизнеоберегающие сигналы суммируются на уровне митохондриальных мембран. Когда летальные стимулы становятся преобладающими, через поры пермеабиллизации из митохондрий в цитозоль выделяются различные проапоптотические факторы (цитохром *c*, Smac/DIABLO, AIF, эндонуклеаза G). В регуляции формирования митохондриальных пор принимают участие про- и антиапоптотические члены семейства белков Bcl-2 [2].

Монооксид углерода обладает дуалистическим эффектом в отношении апоптотической реакции клеток. Показано как стимулирующее, так и ингибирующее действие CO на апоптоз гладкомышечных [8], эндотелиальных [4] и эпителиальных клеток [6], а также фибробластов [12] и гепатоцитов [19]. Механизмы, за счет которых монооксид углерода оказывает описанные эффекты, изучены не полностью. Однако известно, что антиапоптотический эффект CO, показанный на культуре фибробластов, опосредован активацией гуанилатциклазы [12]. Проапоптотический эффект данного газа может быть связан с активацией белка FADD и каспаз-8, -9 и -3 [14]. Известно, что монооксид углерода в концентрациях, превышающих физиологические, приводит к образованию активных форм кислорода, блокированию транспорта электронов в митохондриях и последующему энергетическому коллапсу клетки [9]. Данные, касающиеся влияния физиологических концентраций монооксида углерода на функциональное состояние митохондрий, а также на соотношение про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, отсутствуют. Определение CO-зависимых мишеней в системе регуляции данного семейства позволит утверждать о наличии специфических механизмов участия монооксида углерода в реализации апоптоза.

В данной работе будет предпринята попытка оценить влияние проапоптотической концентрации донора монооксида углерода на экспрессию генов и содержание соответствующих белков-регуляторов апоптоза семейства Bcl-2.

Материал и методы

В работе были использованы клетки линии Jurkat, представляющие собой иммортализованные Т-лимфоциты (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °С в полной питательной среде с добавлением донора монооксида углерода

(CORM-2 (Ru(CO)₃Cl₂ димер)) («Sigma», USA) в проапоптотической концентрации 50 мкМ.

Количество апоптотических клеток и клеток со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран ($\Delta\psi$) определяли с помощью проточной цитофлуориметрии (Facs CantoII [«Beckman Dickenson», США]) с использованием наборов «ANNEXIN V FITC» («Abcam», США) и «MitoScreen» («BD Pharmingen», США) соответственно. Полученные результаты выражали в процентах (отношение числа клеток, связавших аннексин V на поверхности мембраны, или клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом к общему числу клеток).

Уровень экспрессии генов bcl-2, bcl-xl и bad определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR). Суммарную РНК выделяли из клеток с использованием набора реагентов «QIAmp RNeasy mini Kit» (QIAGEN, Германия). Процедуру обратной транскрипции проводили с использованием случайных гексапраймеров и MMuLV-обратной транскриптазы («Promega», США). Амплификацию кДНК исследуемых генов, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени проводили на приборе Mini Opticon («BioRad», США) с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Molecular Probe», США). В качестве референсного гена использовали ген b-actine. Результаты выражали в условных единицах (отношение числа циклов амплификации исследуемого гена к количеству циклов амплификации референсного гена).

Содержание белков bcl-2, bcl-xl и bad определяли методом вестерн-блот. Равное количество цельноклеточных лизатов подвергали электрофорезу в 10% SDS полиакриламидном геле, затем осуществляли перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану. Далее мембрану блокировали 1% желатином, трижды промывали TTBS (20 мМ/л Tris HCl, pH 7,6, 137 мМ/л NaCl, и 0,05% Tween 20). Затем мембрану инкубировали с первичными антителами (anti-Bcl-X_L [«Sigma», США], anti-Bad [«Biosource», США], anti-Bcl-2 [«Biosource», США]) в течение часа. Трижды промывали TTBS и добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой («Biosource», США). Для визуализации результатов исследования использовали хемилюминесцентный метод («NOVEX ECL Chemiluminescent Substrate Reagent kit», Invitrogen, США). Количественное содержание белков определяли путем подсчета интенсивности бенда на рентгеновской пленке с помощью программы TotalLab v. 2.01. В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы

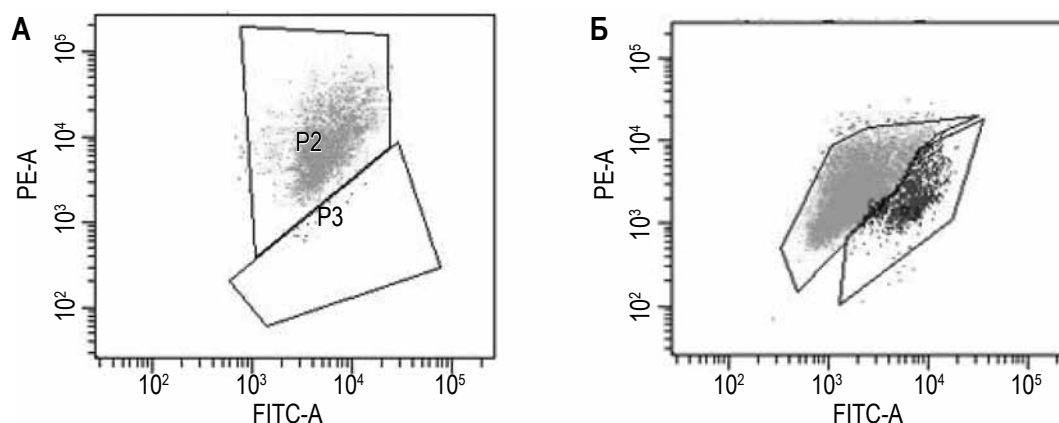


Рисунок 1. Количество клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом (P3 область)

Примечание. а – intactные клетки линии Jurkat; б – клетки линии Jurkat, инкубированные с 50 мкМ CORM-2 (24 ч).

(«Chemicon», США), выражая содержание исследуемых протеинов как отношение сигнала определяемого белка к сигналу белка глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы в исследуемых образцах.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS v.11.0 (SPSS, Chicago, USA). Для каждой выборки вычисляли средневыворочные характеристики. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Вилка. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми выборками применяли непараметрический критерий Вилкоксона. Для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Оценка числа клеток с апоптотическими признаками и со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом

Нами было показано, что воздействие 50 мкМ донора монооксида углерода в течение 24 ч на клетки линии Jurkat приводит к достоверному повышению числа апоптотически-измененных

клеток до 9,6 (8,9-10,1)% по сравнению с аналогичными показателями в intactной культуре 3,5 (2,7-4,2)% ($p < 0,05$). Оценка числа клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом в культуре клеток линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2 установила, что значения исследуемого показателя достоверно превышали соответствующие параметры в intactной культуре [16,4 (15,9-18,5)% и 1,1 (0,7-1,2)% соответственно] ($p < 0,05$) (рис. 1, табл. 1).

Экспрессия мРНК генов белков-регуляторов апоптоза и содержание, кодируемых ими протеинов семейства Bcl-2

В нашем исследовании показано, что добавление в intactную культуру клеточной линии Jurkat 50 мкМ CORM-2 приводило к достоверному снижению как уровня мРНК гена Bcl-2, так и содержания кодируемого им белка (рис. 2, табл. 2).

При добавлении в intactную культуру Т-лимфобластной лейкемии 50 мкМ CORM-2 уровень мРНК гена bcl-xl достоверно снижался, что сопровождалось статистически значимым снижением уровня соответствующего протеина по сравнению с intactной культурой (рис. 2, табл. 2).

Воздействие 50 мкМ CORM-2 на клетки линии Jurkat приводило к достоверному снижению уровня мРНК гена bad по сравнению с intactной

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО АПОПТОТИЧЕСКИ-ИЗМЕНЕННЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT И КЛЕТОК СО СНИЖЕННЫМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ТРАНСМЕМБРАННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ 50 МКМ ДОНОРА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА, Me (Q₁-Q₃)

Показатель	Intактные клетки линии Jurkat	Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2
Число апоптотически-измененных клеток, %	3,5 (2,7-4,2)	9,6 (8,9-10,1)*
Число клеток со сниженным митохондриальным трансмембранным потенциалом, %	1,1 (0,7-1,2)	16,4 (15,9-18,5)*

Примечание. Здесь и далее: * – $p < 0,05$ по сравнению с intactной культурой.

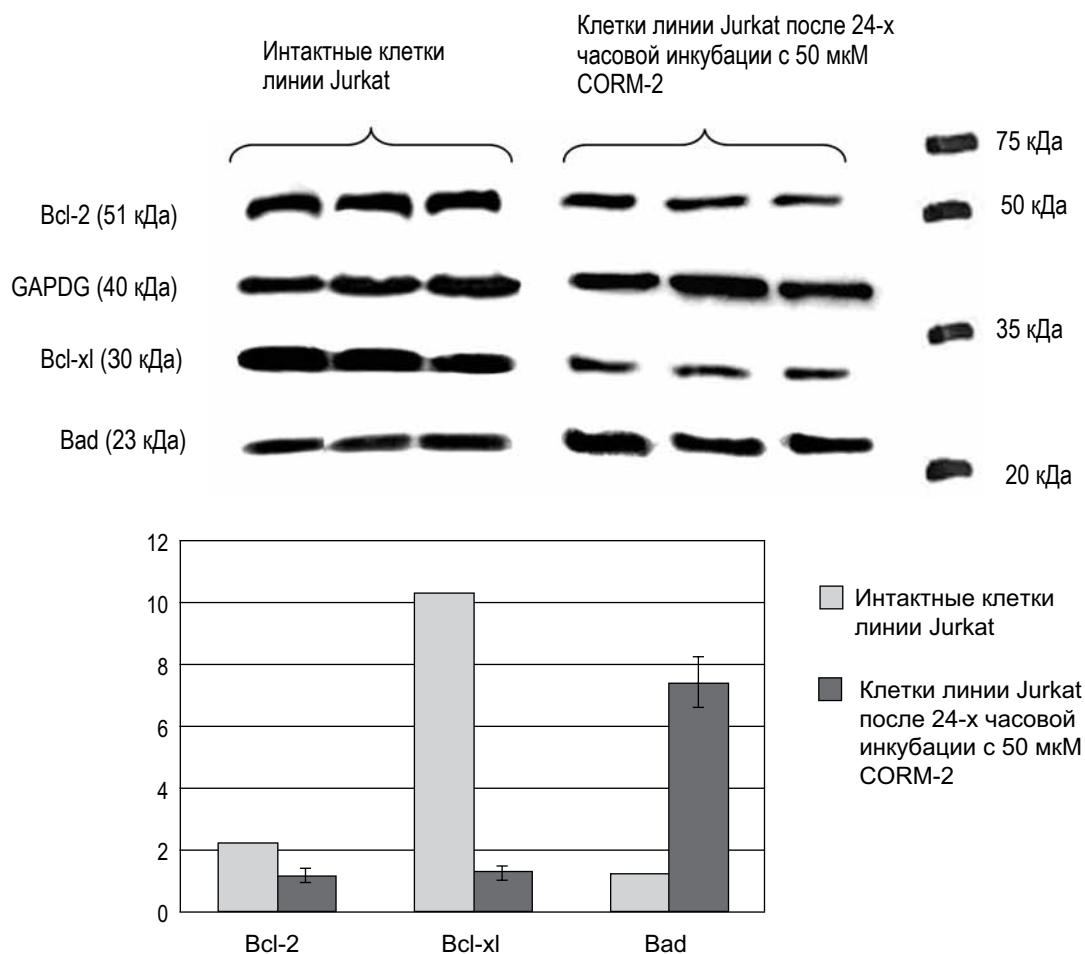


Рисунок 2. Содержание белков Bcl-2, Bcl-xl, Bad в клетках линии Jurkat до и после воздействия донора монооксида углерода

культурой, однако уровень соответствующего протеина был достоверно выше такового в интактных клетках (рис. 2, табл. 2).

Обсуждение

Пермеабилзация наружной митохондриальной мембраны, сопровождающаяся падением потенциала и приводящая к высвобождению множества проапоптотических белков (цитохром c, Smac/DIABLO, AIF, эндонуклеаза G) в цитозоль, является центральным событием во внутрен-

нем пути апоптоза. Ведущая роль в последующих проапоптотических изменениях принадлежит цитохрому c, который связываясь с Araf-1 и формируя комплекс (апоптосому), рекрутирует и активирует прокаспазу-9. AIF является митохондриальным эффектором программированной клеточной гибели, действующим независимо от каспаз [1].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что донор монооксида углерода в концентрации 50 мкМ вызывает падение митохондри-

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МРНК ГЕНОВ BCL-2, BCL-XL И BAD В КЛЕТКАХ ЛИНИИ JURKAT ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ 50 МКМ ДОНОРА МОНООКСИДА УГЛЕРОДА Me (Q₁-Q₃)

Показатель	Экспрессия мРНК гена bcl-2, усл. ед.	Экспрессия мРНК гена bcl-xl, усл. ед.	Экспрессия мРНК гена bad, усл. ед.
Интakтные клетки линии Jurkat	5,84 (5,35-6,12)	9,92 (9,76-13,33)	3,1 (2,47-3,19)
Клетки линии Jurkat после воздействия 50 мкМ CORM-2	2,9 (1,51-4,78)*	3,36 (2,92-3,99)*	1,24 (0,75-1,64)*

ального трансмембранного потенциала и интенсификацию апоптоза клеток линии Jurkat. Причиной снижения $\Delta\psi$ является образование пор в результате взаимодействия белков, секвестрированных в наружной и внутренней митохондриальных мембранах (ANT, VDAC, белки семейства Bcl-2) [5]. При этом роль связывающего звена между функциональным состоянием митохондрий и развитием апоптотической реакции принадлежит протеинам семейства Bcl-2. Антиапоптотические члены данного семейства (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1) локализованы в наружной митохондриальной мембране, где они предотвращают образование пор за счет связывания и нейтрализации проапоптотических протеинов (Bax, Bak), напротив, индуцирующих пермеабиллизацию митохондриальных мембран. Также существует подкласс проапоптотических членов данного семейства (Bim, Puma, Bid, Bad, Bik, Bmf, Hrk, Noxa), которые не могут самостоятельно влиять на проницаемость митохондриальных мембран, но способствуют гибели клеток за счет связывания антиапоптотических белков. Баланс соотношения про- и антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 регулируется как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровнях [2].

Антиапоптотическая активность белка Bcl-2 основана на его способности непосредственно связывать цитохром *c* и вытеснять его из апоптосомы, предотвращая тем самым активацию каспаз. Кроме того, Bcl-2 ингибирует пороформирующую активность проапоптотического белка Bax [5]. Возможно, супрессия транскрипции гена антиапоптотического белка bcl-2, и как следствие снижение содержания соответствующего протеина является механизмом индукции апоптоза за счет монооксида углерода.

Имеются данные, что другой антиапоптотический белок Bcl-X_L способен ингибировать апоптоз за счет образования неактивного тройного комплекса Bcl-X_L, Araf-1 и каспаза-9, вместо апоптосомы (комплекс цитохром *c*, Araf-1 и каспаза-9) [3]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что проапоптотическая концентрация монооксида углерода приводит к снижению содержания белков Bcl-xl и Bcl-2, действующих в синергизме.

Важным участником в регуляции митохондриального пути апоптоза является белок Bad. Известно, что указанный протеин способен гетеродимеризоваться с Bcl-xl или Bcl-2, нейтрализуя их протективный эффект и промотируя смерть клетки [18]. Возможно, донор монооксида углерода способен отменять механизмы, препятствующие адекватной трансляции гена bad в опухолевых клетках линии Jurkat, вызывая их апоп-

тоз. Увеличение содержания белка Bad на фоне уменьшения экспрессии кодирующего его гена наводит на мысль о существовании данного протеина в клетках в неактивной форме. При этом его высвобождение происходит при воздействии на клетку проапоптотического стимула (монооксида углерода).

Таким образом, проапоптотический эффект донора внутриклеточного газового транмиттера монооксида углерода опосредован дисбалансом в системе белков семейства Bcl-2 (повышением содержания проапоптотического белка Bad и снижением содержания антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xl).

Благодарности

Работа выполнена в рамках Федеральных целевых программ «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (ГК № 16.512.11.2087) и «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» (ГК № П1311 и ГК 14.740.11.0932).

Список литературы

1. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программируемая клеточная смерть // Биохимия. — 2000. — Т. 65. — Вып. 8. — С. 1029-1045.
2. Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Филиппенко М.Л., Боярских У.А., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В., Стариков Ю.В., Соколов Е.Г. Белки семейства Bcl-2 участвуют в редокс-зависимой регуляции апоптоза мононуклеаров лейкоцитов крови при воспалении // Иммунология. — 2009. — № 2. — С. 98-101.
3. Bertini I., Chevance S., Del Conte R., Lalli D., Turano P. The anti-apoptotic Bcl-x(L) protein, a new piece in the puzzle of cytochrome c interactome // PLoS One — 2011. — Vol. 6. — P. 18329-18331.
4. Brouard S., Berberat P.O., Tobiasch E., Seldon M.P., Bach F.H., and Soares M.P. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factoralpha-mediated apoptosis // J. Biol Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 17950-17961.
5. García-Sáez A.J., Fuertes G., Suckale J., Salgado J. Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins // Adv. Exp. Med. Biol. — 2010. — Vol. 677. — P. 91-105.
6. Inguaggiato P., Gonzalez-Michaca L., Croatt A.J., Haggard J.J., Alam J., and Nath K.A. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis // Kidney Int. — 2001. — Vol. 60. — P. 2181-2191.

7. Kawashima A., Oda Y., Yachie A., Koizumi S., and Nakanishi I. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case // *Hum. Pathol.* – 2002. – Vol. 33. – P. 125-130.
8. Liu X.M., Chapman G.B., Peyton K.J., Schafer A.I., and Durante W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – 55: 396-405.
9. Lundquist I., Alm P., Salehi A., Henningsson R., Grapengiesser E., and Hellman B. Carbon monoxide stimulates insulin release and propagates Ca²⁺ signals between pancreatic β -cells // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 285. – P. 1055-1063.
10. Nascimento C.G.O., Branco L.G.S. Antinociception synergy between the peripheral and spinal sites of the hemeoxygenase-carbon monoxide pathway // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* – 2009. – Vol. 42. – P. 141-147.
11. Ndisang J.F., Tabien H.E.N., Wang R. Carbon monoxide and hypertension // *J. Hypertension.* – 2004. – Vol. 22. – P. 1057-1074.
12. Petrache I., Otterbein L.E., Alam J., Wiegand G.W., Choi A.M. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2000. – Vol. 278. – P. 312-319.
13. Pompeia C., Hodge D.R., Plass C., Wu Y.Z., Marquez V.E., Kelley J.A. et al. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 3465-3473.
14. Thom S.R., Fisher D., Xu Y.A., Notarfrancesco K., Ischiropoulos H. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2000. – Vol. 97. – P. 1305-1310.
15. Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1792-1798.
16. Wang R., Wu L. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications // *Pharmacological reviews.* – 2005. – Vol. 57, N 4. – P. 585-630.
17. Yachie A., Toma T., Mizuno K., Okamoto H., Shimura S., Ohta K., Kasahara Y., Koizumi S. Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children // *Exp. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 228. – P. 550-556.
18. Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death // *Cell.* – 1995. – Vol. 80. – P. 285-291.
19. Zuckerbraun B.S., Billiar T.R., Otterbein S.L., Kim P.K., Liu F., Choi A.M., Bach F.H., Otterbein L.E. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1 // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 198. – P. 1707-1716.

поступила в редакцию 15.01.2012

отправлена на доработку 29.01.2012

принята к печати 05.02.2012