

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ШАПЕРОН HSP70 ЗАЩИЩАЕТ КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ SK-N-SH ОТ ГИПОКСИЧЕСКОГО СТРЕССА

© Н. С. Тихонова, О. С. Москалева, Б. А. Маргулис, И. В. Гужова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: guzhova@mail.cytspb.rssi.ru

Клеточный ответ на гипоксический стресс основан на активации белкового фактора HIF-1 (hypoxia-inducible factor), состоящий из двух субъединиц — α и β . HIF-1 α экспрессируется постоянно, но в условиях нормоксии благодаря гидроксигированию определенных сайтов белка происходит его деградация. При гипоксии гидроксигирование заблокировано, HIF-1 α формирует димеры с HIF-1 β и выступает как транскрипционный фактор для генов, продукты которых обеспечивают различные клеточные процессы. Молекулярный шаперон Hsp70 защищает нейрональные клетки от гипоксического стресса, однако механизм его защитного действия оставался неизученным. Для того чтобы понять, как Hsp70 защищает клетки в условиях гипоксии, на основе клеток нейробластомы SK-N-SH мы создали клеточную линию, содержащую ген *hsp70* под индуцируемым промотором, SK-N-SH-hsp. Клетки этой линии оказались более устойчивыми к действию CoCl_2 , имитирующего в наших опытах действие гипоксии. Время жизни HIF-1 α было увеличено в этих клетках по сравнению с клетками родительской линии благодаря тому, что в течение долгого времени Hsp70 был связан с HIF-1 α . Согласно нашим данным, Hsp70 вмешивается в сигнальные пути ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-1 α .

Ключевые слова: гипоксия, HIF-1 α , шаперон, Hsp70.

При нарушении механизмов поступления кислорода в организм, его транспортировки и использования в тканях развивается кислородное голодание — гипоксия. Гипоксия (ишемия) вызывает гибель клеток (чаще всего по схеме апоптоза) и является важнейшим фактором, поражающим сердце и головной мозг.

Гипоксия активирует набор генов, которые обеспечивают адаптацию клеток и тканей к низкому содержанию кислорода. Клеточный ответ на гипоксический стресс основан на активации белка HIF-1 (hypoxia-inducible factor), постоянно экспрессирующегося гетеродимерного транскрипционного фактора, который в условиях гипоксии отвечает за экспрессию гена эритропоэтина и еще приблизительно 60 генов, продукты которых участвуют в таких процессах, как выживание клеток, пролиферация, апоптоз и ангиогенез (Semenza, 2003). HIF-1 состоит из двух субъединиц — HIF-1 α (120 кДа) и HIF-1 β (91—94 кДа) — и активен только тогда, когда находится в гетеродимерном состоянии. Оба белка достаточно консервативны, и сходство последовательности HIF-1 человека, мыши и крысы составляет приблизительно 90 % (Dery et al., 2005). Оба белка имеют сайт ядерной локализации (NLS) и мотив basic helix-loop-helix (bHLH), характерный для многих транскрипционных факторов и отвечающий за олигомеризацию. Еще одним общим мотивом для обоих HIF-1 является домен Per-ARNT-Sim (PAS). Кроме того, у HIF-1 α имеется дополнительная последовательность, которой нет у HIF-1 β , — oxygen-dependent degradation domain (ODD), благодаря которому в условиях нормоксии происходит быстрая деградация HIF-1 α (Hu-

ang et al., 1998). Следует отметить, что и транскрипция, и трансляция HIF-1 α идут одинаково в условиях гипоксии и нормоксии, однако в условиях нормоксии время полужизни фактора составляет менее 5 мин. Когда уровень кислорода находится в физиологических пределах, специфические сайты HIF-1 α подвергаются гидроксигированию, и в такой форме HIF-1 α узнается продуктом гена von Hippel Lindau (pVHL) и убиквитин-лигазой E3. Происходит убиквитинилирование HIF-1 α и его протеасомная деградация. При гипоксии гидроксигирование HIF-1 α блокировано, что позволяет белку сохраняться в стабильной форме и формировать димеры с HIF-1 β . Известно также, что HIF-1 α может активироваться не только под действием гипоксии, его активаторами могут быть CoCl_2 и вещества, образующие хелатные соединения с ионами железа (Dery et al., 2005).

В последнее время появились данные о роли белков теплового шока (Hsp) в стабилизации HIF-1 α . Hsp индуцируются в клетках всех живых организмов в ответ на действие многочисленных стрессовых факторов, таких как тепловой шок, гипоксия, ишемия, метаболические нарушения, вирусная инфекция и воздействия фармакологических агентов (Brown, 1990; Nowak et al., 1993). Гены этих белков активируются не только в условиях стресса, но и в ходе основных процессов клеточной жизнедеятельности, пролиферации, дифференцировки и апоптоза (Morimoto et al., 1997; Маргулис, Гужова, 2000). Hsp принимают участие во всех процессах жизнедеятельности тканей и органов. Hsp70 способен защищать клетки от огромного количества токсических и стрессовых факто-

ров; он также обладает свойством стабилизировать активный цитоскелет в условиях оксидативного стресса. По-видимому, большинство этих функций Hsp связано с шаперонной активностью, т. е. с их способностью узнавать поврежденные или вновь синтезированные полипептиды и выправлять их структуру АТФ-опосредованным образом или удалять не поддающиеся исправлению белки через протеасомный аппарат. Было установлено, что один из шаперонов, белок Hsp90, способен связываться с доменом PAS В-фактора и стабилизировать его (Katschinski et al., 2004). Другой клеточный шаперон, Hsp70, узнает иной структурный мотив молекулы HIF-1 α , так называемый домен кислородзависимой деградации (ODD) (Zhou et al., 2004). Следует отметить, что роль этих межбелковых взаимодействий неясна; предполагается, что они необходимы для стабилизации HIF-1 α в условиях нормоксии. В условиях гипоксии по крайней мере один из шаперонов (Hsp90) вытесняется из комплекса с HIF-1 α белком ARNT, который в течение 20—30 мин гипоксии предохраняет структуру фактора от прицельного протеолиза (Katschinski et al., 2004). Для ответа на вопрос о том, какова роль шаперона Hsp70 в процессе гипоксии, мы предприняли исследование, в котором использовали специально сконструированную клеточную линию с индуцибельной экспрессией шаперона. Полученный результат свидетельствует в пользу того, что Hsp70 способен увеличивать время жизни фактора HIF-1 α в условиях до и после гипоксии и, таким образом, необходим клеткам для надлежащей реакции на лишение кислорода.

Материал и методика

Клетки нейробластомы человека SK-N-SH, полученные от проф. М. Читама (Великобритания), культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ на питательной среде ДМЕМ (Биолот, Россия) с добавлением 50 мкг/мл гентамицина и 10 % сыворотки плодов крупного рогатого скота (ПанЭко, Москва). Постоянные логарифмический рост и плотность клеток ($2 \cdot 10^5$ — 310^5) поддерживались посредством их пересева через каждые 2—3 сут. Динамику клеточного роста оценивали путем подсчета клеток в камере Ньюбауэра. Клетки котрансфицировали двумя плазмидами (в соотношении 10 : 1), одна из которых, pZ-hsp70, содержала ген *hsp70*, а другая, pZem, — ген устойчивости к геницитину. Обе плазмиды были получены от д-ра Марьи Яаттела (Danish Cancer Society). Процедуру трансфекции осуществляли с помощью реагента Lipofectamin Plus (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Плазмиды pZ-hsp70 (900 нг) и pZem (100 нг) смешивали в 470 мкл ДМЕМ (Биолот, Россия) и инкубировали с 7.5 мкл реактива Plus 15 мин, после чего объединяли с 3.75 мкл реактива Lipofectamin, разведенного в 1020 мкл среды ДМЕМ, и тщательно перемешивали. Полученную смесь также инкубировали в течение 15 мин. Клетки SK-N-SH, посеянные накануне с плотностью $2 \cdot 10^4$ кл./мл в чашки Петри (35 мм), отмывали от сыворотки и антибиотиков и добавляли 1.5 мл смеси ДНК и реактивов Lipofectamin и Plus. Клетки инкубировали с плазмидами в течение 4 ч, после чего в чашку добавляли 1.5 мл среды ДМЕМ, содержащей 20 % фетальной сыворотки и гентамицину (100 мкг/мл). По прошествии 48 ч среду меняли на свежую и вносили геницитин (G418) в концентрации 800 мкг/мл. Через 2 нед клоны отбирали, пересевали в лунки 24-луночной платы и нара-

щивали в присутствии 100 мкг/мл G418. После индукции гена *hsp70* с помощью 100 мкМ ZnSO₄ продукцию белка в клонах анализировали с помощью иммуноблоттинга.

Индукция гипоксии. По литературным данным, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* действие гипоксии моделируется хлоридом кобальта (Salnikow et al., 2000; Dery et al., 2005). Гипоксический стресс моделировали добавлением в среду CoCl₂ в концентрации 0.75—3.00 мМ.

Жизнеспособность клеток оценивали двумя способами — с помощью окраски трипановым синим и с помощью реакции Мосманна (Mosmann, 1983). В первом случае клетки снимали с подложки смесью растворов Трипсина и Версена (1 : 1), собирали и смешивали с 0.4%-ным раствором трипанового синего в соотношении 1 : 1. Затем суспензию помещали в камеру Ньюбауэра и подсчитывали живые и мертвые клетки.

Для реакции Мосманна контрольные клетки SK-N-SH и клетки с индуцибельным *hsp70* (1C5) высеивали в лунки 96-луночной платы в концентрации 5 тыс. на 100 мкл в среде с сывороткой. Клетки индуцировали к экспрессии Hsp70 и добавляли в среду CoCl₂ на определенное время, после чего среду заменяли на бессывороточную. Затем в лунки добавляли 10 мкл раствора МТТ (50 мг/мл на PBS) и оставляли на 4 ч при 37 °С. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл смеси изопропанола и 0.04 н. HCl и тщательно перемешивали содержимое лунок до полного растворения кристаллов формазана. Жизнеспособность клеток рассчитывали в абсолютных величинах как разность между оптическими плотностями лунок при 570 и 630 нМ, измеренными на автоматическом спектрофотометре Пикон (Россия) для 96-луночных плат.

Иммунофлуоресценция. Для анализа клетки высеивали на покровные стекла в 24-луночной плате в концентрации $1.5 \cdot 10^4$ в 0.5 мл среды. После посадки клеток проводили индукцию экспрессии Hsp70 с помощью 75 мкМ ZnSO₄. Спустя 18 ч, когда достигался максимальный уровень содержания белка теплового шока, к клеткам добавляли 0.75 мМ CoCl₂ и инкубировали в течение указанного времени. Клетки фиксировали 4%-ным формалином в PBS в течение 30 мин. Затем к клеткам добавляли холодный метанол и оставляли на 5 мин при –20 °С. Затем стекла промывали в PBS и инкубировали в течение 15 мин в среде, содержащей 10 % сыворотки (для блокировки сайтов неспецифического связывания), после чего инкубировали их в течение 1 ч в растворе первичных антител. После этого клетки дважды промывали в PBS. Клетки инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой Cy2 или Cy3 (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., Великобритания), в течение 1 ч, после чего снова проводили отмывку PBS. Ядерный хроматин окрашивали с помощью красителя DAPI. После фиксации на предметных стеклах с помощью монтирующего раствора DAKO (DAKO, Дания) препараты исследовали во флуоресцентном микроскопе Axioskop при 40-кратном увеличении и фотографировали с помощью цифровой камеры Panasonic, прикрепленной к микроскопу. Для обработки фотографических изображений использовали компьютерную программу Adobe Photoshop 7.0.

Конфокальная микроскопия. Для анализа динамики накопления HIF-1 α , а также локализации Hsp70 и HIF-1 α фиксированные препараты исследовали с помощью конфокального микроскопа (Leica, Германия). Для регистрации изображения использовали два лазера, возбуждающих флуоресцентные красители Cy2 (HIF-1 α) и Cy3 (Hsp70), на длинах волн 488 (зеленый свет) и 543

(красный свет) нм соответственно. Изображение строили путем послойного сканирования, чередуя два лазера в каждом отдельном слое. Все полученные изображения сохраняли в памяти компьютера и по ним воссоздавали картину среза. Затем в интересующем нас слое проводили наложение изображений от двух лазеров. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы LCM Browser.

Электрофорез и иммуноблотинг. Для приготовления белковых проб клетки собирали, отделяя их от субстрата смесью растворов Трипсина и Версена (1 : 1), трижды промывали в 10 мл холодного PBS, центрифугируя при 200 g в течение 5 мин. К клеточному осадку добавляли 100 мкл лизирующего буфера, состоящего из 20 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 % Тритона X-100, 2 mM EDTA и 1 mM PMSF. Экстракты центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин, отбирали супернатант и измеряли в нем концентрацию общего белка по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэемли (Laemmli, 1970). После перенесения белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану ее инкубировали в течение 1 ч с моноклональными антителами к Hsp70, полученными в нашей лаборатории (клон 3B5, титр 1 : 2000), и с вторичными антителами против иммуноглобулина (IgG) мыши, меченными пероксидазой хрена (Sigma, США). Для визуализации пероксидазной реакции использовали методику усиленной хемилуминесценции (ECL).

Иммунопреципитация ядерных экстрактов с антителами к HIF-1 α . Для анализа содержания белка HIF-1 α в клетках, подвергнутых гипоксии, готовили ядерные экстракты по следующей схеме. Клетки, индуцированные к экспрессии Hsp70 75 мкМ ZnSO₄, подвергали действию 0.75 mM CoCl₂ в течение 8 или 12 ч, собирали и промывали холодным PBS 2 раза. К сухому клеточному осадку добавляли 400 мкл буфера, содержащего 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ЭДТА, 0.1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ и 1 mM ФМСФ, и инкубировали на льду в течение 20 мин. Добавляли Nonidet P-40 до конечной концентрации 0.6 % и центрифугировали 30 с при 14 000 об/мин. Супернатант (цитоплазматическую фракцию) отбирали, а осадок дважды промывали 10 mM HEPES. К осадку добавляли 50 мкл буфера, содержащего 20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1 mM ДТТ и 1 mM ФМСФ. Экстракцию ядерных белков проводили в течение 30 мин на льду при постоянном покачивании. Затем содержимое пробирок центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин и супернатант (ядерная фракция) отбирали в отдельные пробирки (Dignam et al., 1983). Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

Для теста иммунопреципитации использовали ядерные экстракты клеток с содержанием общего белка 1 мг. Объем исследуемых проб доводили до 500 мкл раствором ТСБ (20 mM Трис-HCl, pH 7.5, и 150 mM NaCl). К смеси добавляли 3 мкл белка G, иммобилизованного на геле сефарозы (Pharmacia, Швеция), а также 3 мкл моноклональных антител к белку HIF-1 α (Abscam, Великобритания). Инкубацию проводили в течение ночи при постоянном перемешивании. После 3-кратной отмывки геля с помощью ТСБ к осадку добавляли буфер для электрофореза и далее проводили анализ образовавшегося комплекса методом иммуноблотинга с кроличьими поликлональными антителами против Hsp70, ранее полученными в нашей лаборатории.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-теста Стьюдента ($P < 0.05$). Полученные значения представлены в виде среднего и его стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение

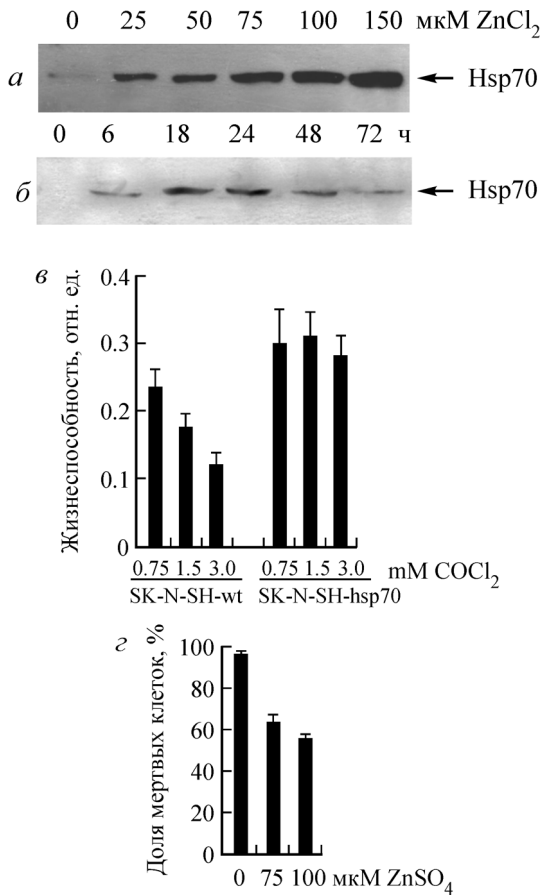
Создание клеточной линии нейробластомы человека SK-N-SH с индуцибельной экспрессией Hsp70. Для изучения роли Hsp70 в защите клеток нейронального происхождения нами была выбрана линия клеток нейробластомы человека SK-N-SH. Базальный уровень экспрессии Hsp70 в SK-N-SH крайне низок и практически не детектируется в иммуноблотинге, поэтому данная клеточная линия была идеальным кандидатом на создание клеток с индуцибельной экспрессией гена *hsp70*.

Клетки SK-N-SH трансфицировали, как описано в разделе «Материал и методика», и после получения стабильной линии индуцировали экспрессию Hsp70 с помощью соли цинка (ZnSO₄). На рис. 1, а показано, что экспрессия Hsp70 происходит зависимым от концентрации ZnSO₄ образом, уровень Hsp70 достигает максимума через 18 ч после индукции ZnSO₄, а затем плавно понижается, но остается значимым в течение 72 ч (рис. 1, б). Поскольку при концентрации ZnSO₄ 150 мкМ часть (до 50 %) клеточной популяции погибала, несмотря на значительное повышение уровня Hsp70, в дальнейших экспериментах были использованы более умеренные концентрации реагента (75 и 100 мкМ), не влиявшие на жизнеспособность клеток. Время, необходимое для накопления значительного количества Hsp70, было определено как 18 ч, и в дальнейших экспериментах ZnSO₄ добавляли клеткам за 18 ч до индукции гипоксии.

Клетки с индуцируемой экспрессией Hsp70 (в дальнейшем SK-N-SH-hsp70) оказались значительно более устойчивыми к действию гипоксии, вызываемой CoCl₂, в то время как исходные клетки SK-N-SH-wt дозозависимо реагировали на CoCl₂: чем выше концентрация агента тем меньшее количество живых клеток определялось по тесту Мосманна (рис. 1, в).

При использовании дробных концентраций ZnSO₄ (75 и 100 мкМ), при которых уровень экспрессии Hsp70 в клетках SK-N-SH-hsp70 различается примерно в 1.5 раза, при максимальной концентрации CoCl₂ (3 mM) доля мертвых клеток, оцениваемая по окрашиванию трипановым синим, понижалась с 95.4 ± 2.0 % в контроле до 62.8 ± 0.52 % при применении 75 мкМ ZnSO₄ и до 54.0 ± 0.1 % при 100 мкМ агента. Таким образом, повышение уровня Hsp70 приводило к защите клеток нейробластомы SK-N-SH от действия фактора, стимулирующего гипоксию.

Стабилизация HIF-1 α при гипоксии в клетках SK-N-SH с повышенной экспрессией Hsp70. В условиях гипоксии HIF-1 α образует активный димер с β -субъединицей HIF-1 и начинает играть роль транскрипционного фактора, запуская транскрипцию генов ответа на гипоксию. Используя метод иммунофлуоресценции, мы показали, что в условиях гипоксии, индуцируемой действием CoCl₂, в клетках SK-N-SH происходит стабилизация HIF-1 α и его накопление в ядре (рис. 2, а). Ранее ядерная локализация HIF-1 α была хорошо продемонстрирована с помощью трехмерного анализа (Berchner-Pfannschmidt, 2004). С помощью конфокальной



микроскопии мы оценили роль накопления Hsp70 в стабилизации HIF-1 α . Для более подробного анализа динамики накопления HIF-1 α и влияния Hsp70 на этот процесс мы исследовали разные временные точки после действия CoCl₂ (4, 6, 8, 10, 12 и 18 ч). На рис. 3, б видно, что в клетках с индуцированным Hsp70 белок HIF-1 α появляется раньше (спустя 4 ч), чем в родительской линии, и исчезает позже. В точке 18 ч HIF-1 α еще присутствует в ядрах

Рис. 1. Повышение уровня Hsp70 защищает клетки нейробластомы человека SK-N-SH от моделирующего гипоксию действия хлорида кобальта.

Клетки SK-N-SH трансфицировали геном *hsp70* под контролем металленинового промотора, как описано в разделе «Материал и методика». а — после получения стабильной линии SK-N-SH-hsp70 клетки обрабатывали сульфатом цинка в указанных концентрациях в течение 24 ч, после чего готовили электрофорезные пробы и использовали их для иммуноблотинга с антителами против Hsp70. б — клетки SK-N-SH-hsp70 инкубировали в присутствии 75 мкМ ZnSO₄ в течение указанного времени, после чего также исследовали их с помощью иммуноблотинга. в — клетки SK-N-SH-hsp70, обработанные 75 мкМ ZnSO₄ в течение 18 ч, и родительские клетки SK-N-SH-wt инкубировали с хлоридом кобальта в указанных концентрациях в течение 24 ч; жизнеспособность оценивали с помощью метода Мосманна. г — клетки SK-N-SH-hsp70 обрабатывали ZnSO₄ в указанных концентрациях, через 18 ч добавляли 3 мМ CoCl₂, через 24 ч подсчитывали число мертвых клеток по окраске трипановым синим.

клеток SK-N-SH-hsp70, тогда как в SK-N-SH-wt он уже практически исчезает. Таким образом, можно говорить о способности Hsp70 увеличивать продолжительность жизни стабильной формы HIF-1 α в клетках, подвергнутых гипоксии.

Взаимодействие между Hsp70 и HIF-1 α в клетках нейробластомы. Для выявления взаимодействия Hsp70 и HIF-1 α нами был проведен тест коиммунопреципитации с моноклональными антителами к HIF-1 α в ядерных экстрактах клеток SK-N-SH-wt и SK-N-SH-hsp70, подвергнутых действию 0.75 мМ CoCl₂ в течение 12 ч. Последующий анализ проводили с помощью электрофореза в 8.5%-ном ПААГ и иммуноблотинга с поликлональными антителами к Hsp70. Как показано на рис. 3, а, HIF-1 α коиммунопреципитируется с Hsp70. Прямое взаимодействие между Hsp70 и HIF-1 α наблюдалось в точке 12 ч в клетках SK-N-SH-hsp70, о чем свидетельствует появление Hsp70 в иммунопреципитате. Hsp70 присутствует также в не связанной с иммуноаффинным гелем фракции. Это свидетельствует об избыточном количестве Hsp70 в экстрактах клеток SK-N-SH-hsp70.

Для дальнейшего анализа взаимодействия двух изучаемых белков нами было проведено исследование с помощью конфокальной микроскопии. Установлено, что

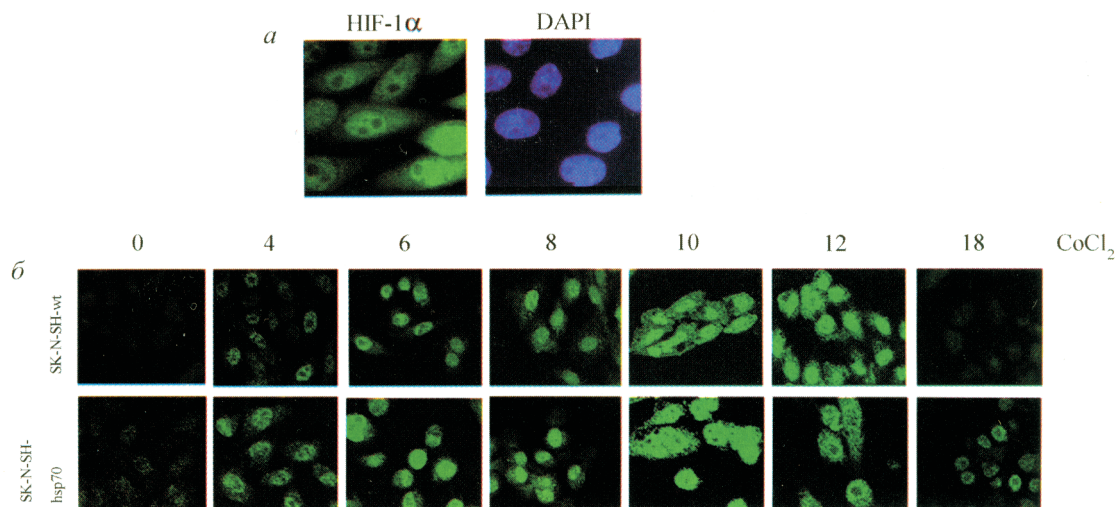


Рис. 2. Hsp70 стабилизирует HIF-1 α в условиях, моделирующих гипоксию.

а — клетки SK-N-SH-wt инкубировали с 3.0 мМ CoCl₂ в течение 6 ч, после чего их красили антителами против HIF-1 α и вторыми антителами, мечеными Cy2; ядра клеток визуализировали с помощью окраски DAPI. б — клетки SK-N-SH-hsp70 обрабатывали 75 мкМ ZnSO₄, через 18 ч добавляли 3 мМ CoCl₂. Через указанные промежутки времени клетки фиксировали и красили антителами к HIF-1 α ; *вверху* — время, ч.

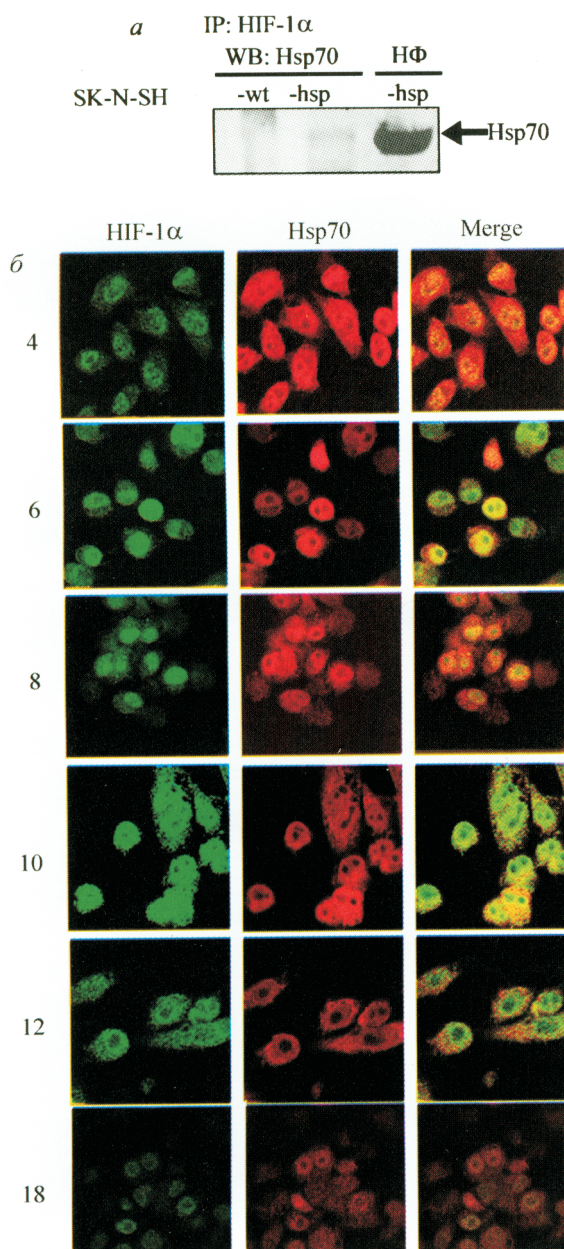


Рис. 3. Hsp70 с HIF-1α в условиях, моделирующих гипоксию.

a — клетки SK-N-SH-hsp70 стимулировали к экспрессии Hsp70 75 мкМ ZnSO₄, после чего моделировали условия гипоксии с помощью 0.75 мМ CoCl₂ в течение 12 ч, ядерный лизат и лизат ядер родительских клеток SK-N-SH-wt, также обработанных CoCl₂, иммунопреципитировали с антителами против HIF-1α, иммунопреципитат исследовали в тесте иммуноблоттинга с антителами против Hsp70; НФ — фракция белков, не связавшихся с антителами против HIF-1α. **б** — клетки SK-N-SH-hsp70 обрабатывали так же, как в **a**, и через указанные (цифры слева, ч) промежутки времени красили антителами к HIF-1α (зеленые) и к Hsp70 (красные); Merge — результат компьютерного наложения образов в программе LSM 5 Image Browser.

в клетках SK-N-SH-hsp70 Hsp70 и HIF-1α в ядре колокализуются в ядрах клеток, причем колокализация выражена наиболее ярко в 1-е ч после индукции гипоксии (через 4, 6 и 8 ч), затем становится менее заметной, однако, как было показано на рис. 2, **б**, HIF-1α продолжает находиться в ядрах и спустя 18 ч. По-видимому, даже незначительных количеств Hsp70, которые остаются в ядре спустя 10, 12 и 18 ч после гипоксического стресса, достаточно, чтобы поддерживать стабильность HIF-1α.

Таким образом, данные конфокальной микроскопии подтвердили результаты коиммунопреципитации и показали, что в условиях гипоксии между Hsp70 и HIF-1α в клетках нейробластомы человека происходит физическое взаимодействие.

К настоящему времени прямое взаимодействие Hsp70 и HIF-1α было продемонстрировано только одной группой исследователей, работавшей на клетках карциномы почек. Авторам удалось картировать сайт, по которому взаимодействуют эти два белка. Оказалось, что Hsp70 связывается с HIF-1α в ODD-домене (Zhou et al., 2004).

Мы показали, что Hsp70 способен защищать клетки нейронального происхождения от гибели в условиях гипоксии, вызванной действием химического агента — CoCl₂. Нейропротекторная роль Hsp70 в условиях гипоксии (ишемии) была показана в исследованиях на животных (Plumier et al., 1997; Yanari et al., 1999) и на клеточных моделях (Papadopoulos et al., 1996; Suzuki et al., 1998, 2000). Было показано, что повышенный уровень экспрессии Hsp70 в клетках мозга (в астроцитах) защищает их от гибели, вызванной кислородным голоданием (Papadopoulos et al., 1996).

В нашей более ранней работе на переживающих срезах мозга была продемонстрирована способность очищенного препарата Hsp70 защищать нейроны, участвующие в глутаматергической синаптической передаче в обонятельной коре мозга крыс, от разрушающего воздействия тяжелой аноксии (Мокрушин, 2004). Тем не менее до сих пор неясно, каков механизм защитного действия Hsp70. Принимая во внимание полученные нами данные о способности Hsp70 усиливать жизнеспособность клеток нейробластомы в условиях гипоксии и факт взаимодействия Hsp70 и HIF-1α, играющего первостепенную роль в клеточном ответе на гипоксию, можно предположить, что Hsp70 вмешивается в сигнальные пути ответа клетки на гипоксический стресс на уровне регуляции стабильности HIF-1α.

Данные, представленные в настоящей работе подтверждают значимость шаперона Hsp70 для стабилизации системы реакции клеток на ишемию; по-видимому, этот механизм лежит в основе защитной активности белка, так убедительно показанного в моделях *in vitro* и *in vivo* инфаркта миокарда и ишемического криза в тканях мозга (Plumier et al., 1997; Yenari et al., 1999).

Авторы выражают признательность д-ру Марье Ятелла (Danish Cancer Society, Дания) за предоставленные плазмиды pZ -hsp70 и pZem и д-ру Лоренцу Пелленгеру (Karolinska Institute, Швеция) за антитела к HIF-1α.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Министрства образования и науки (Государственный контракт № 02.512.11.2046, лот «Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных средств», шифр «2007-2-1.2-05-01-323»).

Список литературы

- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2000. Белки стресса в эукариотической клетке. Цитология. 42 (4) : 323—338.
 Мокрушин А. А., Павлинова Л. И., Гужова И. В. Маргулис Б. А. 2004. Белок теплового шока (Hsp70) протектирует активность глутаматергической синаптической передачи в обо-

нятельной коре мозга крыс *in vitro* от тяжелой аноксии. Докл. РАН. 394 (3) : 419—422.

Berchner-Pfannschmidt U., Wotzlaw C., Merten E., Acker H., Fandrey J. 2004. Visualization of the three-dimensional organization of hypoxia-inducible factor-1 alpha and interacting cofactors in subnuclear structures. *Biol. Chem.* 385 : 231—237.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.

Brown I. R. 1990. Induction of heat shock (stress) genes in the mammalian brain by hyperthermia and other traumatic events: a current perspective. *J. Neurosci. Res.* 27 : 247—255.

Dery M. A., Michaud M. D., Richard D. E. 2005. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 : 535—540.

Dignam J. D., Lebovitz R. M., Roeder R. G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11 : 1475—1489.

Huang L. E., Gu J., Schau M., Bunn H. F. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 7987—7996.

Katschinski D. M., Le L., Schindler S. G., Thomas T., Voss A. K., Wenger R. H. 2004. Interaction of the PAS B domain with HSP90 accelerates hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization. *Cell Physiol. Biochem.* 14 : 351—360.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.

Morimoto R. I., Kline M. P., Bimston D. N., Cotto J. J. 1997. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* 32 : 17—29.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65 : 55—63.

Nowak T. S., Jr., Osborne O. C., Suga S. 1993. Stress protein and proto-oncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. *Prog. Brain Res.* 96 : 195—208.

Papadopoulos M. C., Sun X. Y., Cao J., Mivechi N. F., Giffard R. G. 1996. Overexpression of Hsp-70 protects astrocytes from combined oxygen-glucose deprivation. *Neuroreport.* 7 : 429—432.

Plumier J. C., Krueger A. M., Currie R. W., Kontoyiannis D., Kollias G., Pagoulatos G. N. 1997. Transgenic mice expressing the human inducible Hsp70 have hippocampal neurons resistant to ischemic injury. *Cell Stress Chaperones.* 2 : 162—167.

Sabnikow K., Su W., Blagosklonny M. V., Costa M. 2000. Carcinogenic metals induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res.* 60 : 3375—3378.

Semenza G. L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Rev. Cancer.* 3 : 721—732.

Suzuki K., Sawa Y., Kagisaki K., Taketani S., Ichikawa H., Kaneda Y., Matsuda H. 2000. Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70. *Basic Res. Cardiol.* 95 : 397—403.

Suzuki K., Sawa Y., Kaneda Y., Ichikawa H., Shirakura R., Matsuda H. 1998. Overexpressed heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30 : 1129—1136.

Yenari M. A., Giffard R. G., Sapolsky R. M., Steinberg G. K. 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol. Med. Today.* 5 : 525—531.

Zhou J., Schmid T., Franc R., Bruno R. 2004. PI3K/AKT is required from heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor-1α from pVHL-independent degradation. *J. Biol. Chem.* 279 : 13 506—13 513.

Поступила 1 VI 2007

MOLECULAR CHAPERONE HSP70 PROTECTS NEUROBLASTOMA SK-N-SH CELLS FROM HYPOXIC STRESS

N. S. Tikhonova, O. S. Moskaleva, B. A. Margulis, I. V. Guzhova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: guzhova@mail.cytspb.rssi.ru

HIF-1α is synthesized constitutively, however under normoxia it is specifically degraded. Hypoxia blocks the factor degradation, and it activates the transcription of genes whose products control multiple cellular processes. Hsp70 molecular chaperone is known to protect neural cells from the deleterious effects of hypoxic stress, though the mechanism of this action remains elusive. To understand how Hsp70 protects cells affected by hard hypoxia the model cell line was constructed based on human neuroblastoma SK-N-SH cells and overexpressing the chaperone when treated by zinc salt. The cells were shown to be resistant to the treatment by CoCl₂ imitating in the experiments the reaction to hypoxia. Life span of HIF-1α was elevated in these cells as compared with parental line due to the fact that Hsp70 formed long-time complex with HIF-1α. The data show that Hsp70 interferes with signaling pathways of cellular response to hypoxic stress at the level of regulation of HIF-1α stability.

Key words: hypoxia, HIF-1α, chaperone, Hsp70.