

ВЛИЯНИЕ ГЕЛДАНАМИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ И БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА В НОРМАЛЬНЫХ ЛИМФОЦИТАХ МЫШЕЙ

© Т. В. Новоселова, Д. А. Черенков, М. О. Хренов, О. В. Глушкова, С. М. Лунин,
Е. Г. Новоселова,¹ Е. Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пущино, Московская обл.;

¹ электронный адрес: elenanov_06@mail.ru

Влияние антибиотика гелданамицина (ГА), известного ингибитора активности белка теплового шока 90 (Hsp90), на экспрессию некоторых сигнальных белков и разных Hsp изучали в культивируемых лимфоцитах селезенки мышей-самцов NMRI с использованием Вестерн-блот-анализа. Установлено, что при культивировании лимфоцитов в присутствии ГА наблюдается значительное уменьшение количества фактора транскрипции NF-кБ, его фосфорилированной формы pNF-кБ и белка, подавляющего его активность, IкB- α . Кроме того, присутствие ГА в среде культивирования клеток вызывало заметное снижение количества протеинкиназы SAPK(JNK). Такая модификация системы сигнальных белков, вызванная ГА, дала основание предполагать его участие в развитии стрессового ответа животных клеток на повреждающее воздействие. Это было проверено на модели клеточного стресса, вызванного воздействием на клетки слабого лазерного излучения. Доказано, что Hsp90-связывающий препарат ГА *in vitro* в значительной степени снижает уровень стрессового ответа, вызванного лазерным излучением, уменьшая продукцию белков Hsp70 и Hsp25 в облученных изолированных лимфоцитах и в их внутриклеточных структурах. Это открывает перспективу использования ГА при применении разных способов терапии, которые сопровождаются нежелательными побочными эффектами, связанными с повышенным уровнем стрессового ответа клеток иммунной системы.

Ключевые слова: лимфоциты мыши, Вестерн-блот-анализ, гелданамицин, белки теплового шока, сигнальные белки, NF-кБ, pNF-кБ, IкB- α , SAPK(JNK).

Принятые сокращения. ГА — гелданамицин, Hsp — белки теплового шока, TNF — фактор некроза опухолей.

Роль белков теплового шока (Hsp) для поддержания структуры и функционирования белков в условиях клеточного стресса, определяемая их шаперонной активностью, хорошо известна (Beere, 2005). Молекулярные взаимодействия между Hsp и сигнальными белками являются чрезвычайно важными для нормального функционирования системы сигнальной трансдукции в клетке. Известно, что для белка Hsp90 субстратами являются некоторые сигнальные белки, такие как тирозинкиназы, рецепторы стероидных гормонов, киназа Raf1 и др. (Craig et al., 1994). Кроме того, было установлено, что один из мажорных белков теплового шока — Hsp70 — подавляет активность фактора транскрипции NF-кБ (Guzhova et al., 1997; Ran et al., 2004), осуществляя таким образом свою защитную функцию при апоптозе. Другим проявлением антиапоптозной активности Hsp70, является, очевидно, его способность подавлять активность стресс-киназы JNK (Gabai et al., 1998). С другой стороны, тепловой шок способен активировать JNK-киназу, что может приводить к интенсификации программы клеточной гибели (Gabai, Sherman, 2002).

Необходимо подчеркнуть, что все вышеописанные эффекты были продемонстрированы на трансформированных клетках в условиях теплового шока, который являлся индуктором апоптоза. Между тем очень мало изве-

стно о взаимной регуляции семейства белков Hsp и сигнальных белков в нормальных клетках, причем как в обычных условиях, так и в условиях стресса, не обязательно связанного с повышением температуры. Понятно, что такие сведения могли бы быть очень полезными для разработки стратегии лечения различных заболеваний, при которых наблюдается массовое поражение клеток и клеточных систем, и терапия должна быть направлена прежде всего на снижение уровня апоптоза.

В последние годы многие исследователи стали проявлять интерес к гелданамицину (ГА), принадлежащему к классу антибиотиков, обладающих антираковой активностью (Supko et al., 1995), который впервые был описан как ингибитор тирозинкиназы (Marczin et al., 1993). В дальнейшем было обнаружено, что ГА, связываясь с высокой аффинностью с АТФ-связывающим сайтом белка Hsp90, подавляет его активность (Chavany et al., 1996). Между тем Hsp90 является молекулярным шапероном, который принимает участие в сложных путях сигнальной трансдукции. Так, было показано, что субстратами Hsp90, которые непосредственно зависят от его активности, являются мутантный p53 (Whitesell et al., 1997), киназа Raf-1 (Schulte et al., 1997), обратная транскриптаза (Hu, Seeger, 1996) и некоторые другие белки. Подавление активности Hsp90 приводит к тому, что сигнальные белки переходят

в неактивное конформационное состояние, что вызывает их протеолиз и быструю деградацию (Takimoto, Diggikar, 2002). Очевидно, что в результате деградации сигнальных белков клетки теряют способность отвечать на внешний сигнал.

До сих пор ничего не было известно о влиянии ГА на фактор транскрипции NF-кВ в нормальных клетках, а также на другие белки, метаболически связанные с NF-кВ. Известно, что в клетках линии L929sA подавление активности Hsp90 при обработке их ГА предотвращает активацию NF-кВ (Vanden Berghe et al., 2003). В нормальных условиях NF-кВ состоит из нескольких ДНК-связывающих димеров, включающих в себя субъединицы Rel A (p65) и p50, в комплексе с белком-супрессором IкВ- α , препятствующим переносу этого фактора в клеточное ядро (Luo et al., 2005). Активация NF-кВ может быть вызвана многими факторами: провоспалительными цитокинами, вирусами, бактериальными токсинами, активными формами кислорода и др. В результате серии внутриклеточных взаимодействий специфические киназы (IKK) фосфорилируют IкВ- α , что ведет к его быстрому разрушению в протеосомах (DiDonato et al., 1996). Освобожденный димер Rel A—p50 также подвергается фосфорилированию протеинкиназами, а затем проникает в ядро, где обеспечивает активацию широкого спектра генов, ответственных за продукцию цитокинов, хемокинов, адгезивных молекул и других факторов, определяющих нормальное функционирование врожденного и приобретенного иммунитета, клеточной пролиферации и апоптоза (Zhang, Ghosh, 2000).

В последние годы была установлена физиологическая роль стрессактивируемой протеинкиназы SAPK(JNK), которая активируется многими типами экстраклеточных сигналов. Было показано, что SAPK(JNK) участвует в различных внеклеточных процессах, которые контролируют пролиферацию, дифференцировку, трансформацию и апоптоз (Nishina et al., 2004).

В условиях ингибирования активности Hsp90 при обработке клеток ГА можно было ожидать изменения роли некоторых белков сигнального каскада, участвующих в регуляции клеточного метаболизма. Действительно, недавно было показано, что обработка ГА клеток линии L929sA приводила к изменению их ответа на цитотокическое действие TNF- α . Предварительная обработка этих клеток ГА помимо ингибирования NF-кВ снижает уровень JNK, MAP-киназы p38, что защищает клетки L929 от апоптоза, вызванного TNF- α (Vanden Berghe et al., 2003).

Поскольку известна роль Hsp90, субстратами которого являются сигнальные белки в механизме развития клеточного стресса, проблема влияния ГА на ключевые белки системы сигнальной трансдукции, а также на уровень продукции белков Hsp из других семейств является весьма актуальной. Однако почти нет сведений об эффектах ГА, связывающего Hsp90, на регуляцию системы сигнальной трансдукции в нормальных клетках животных. Между тем с учетом фармакологической активности этого антибиотика необходимо выяснение механизмов его влияния на метаболизм клетки, включая эффекты ГА на ключевые сигнальные молекулы.

Целью данной работы было выяснение влияния ГА на продукцию сигнальных белков, включая NF-кВ, phNF-кВ, IкВ- α , JNK, а также на экспрессию некоторых Hsp в нормальных лимфоцитах мышей. Кроме того, изучали развитие стрессового ответа клетки в условиях, ког-

да активность Hsp90 была подавлена ГА. Стресс индуцировали действием низкоинтенсивного лазерного излучения (Novoselova et al., 2006).

Материал и методика

Использовали: среды DMEM и RPMI 1640, β -меркаптоэтанол, эмбриональную телячью сыворотку, гелданамицин, раствор Бредфорд (Sigma, США); систему ECL (Amersham, Швеция); антитела к сигнальным белкам фосфо-NF-кВ-антитела (phospho-NF-кВ p65 (Ser 536), 3031), NF-кВ-антитела (NF-кВ p65, 3034) и IкВ- α -антитела (IкВ- α , 9242), а также поликлональные кроличьи антитела к синтетическому фосфопептиду SAPK(JNK), фосфорилированному по Thr83/Tyr185 (Cell Signaling Technology, США); антитела к белкам теплового шока Hsp70 (Hsp72, клон SPA-812, индуциальная форма), Hsp25 (Hsp25, клон SPA-801), Hsp90 (Hsp90a, клон SPA-828), а также козы поликлональные антикроличьи антитела IgG с биотином (StressGen Biotechnologies, Канада); поликлональные антитела к тубулину (USBiological, США) и комплекс, содержащий стрептавидин и пероксидазу хрена (Sigma, США). Для выделения субклеточных органелл были использованы Qproteome Cell Compartments Kits (Qiagen, Канада).

Выделение и культивирование клеток. Клетки выделяли из половозрелых мышей-самцов аутбредного стока NMRI массой 25–30 г (линия была подана Филиалу ИБХ РАН фирмой Charles River Laboratories). Животных забивали с помощью цервикальной дислокации шейных позвонков. Все дальнейшие процедуры проводили в стерильных условиях. Селезенку осторожно гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, клетки осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 мин. После избирательного гемолиза эритроцитов с использованием изотонического раствора 0.85%-ного хлористого аммония лимфоциты трижды отмывали большими объемами среды DMEM. Подсчет клеток проводили с использованием камеры Горяева после окрашивания клеток смесью 0.1%-ного трипанового синего и 0.1%-ного эозина (1 : 1). Клетки ($2.5 \cdot 10^6$ кл./мл) суспендировали в среде RPMI 1640, содержащей 0.02 % гентамицина, 1 % L-глутамина, $5 \cdot 10^{-5}$ М β -меркаптоэтанолаи 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. ГА (1 мкг/мл) добавляли в питательную среду и культивировали клетки в течение 6 ч. Облучение клеток лазерным светом проводили сразу после окончания их преникубации с ГА. Условия облучения клеток с использованием гелий-неонового лазера ЛГН-111 (длина волны 632.8 нм, плотность мощности 0.2 мВт/см 2) описаны ранее. Использовали четыре дозы облучения клеток лазерным светом: 10^{-3} , $6 \cdot 10^{-3}$, $12 \cdot 10^{-3}$ и $36 \cdot 10^{-2}$ Дж/см 2 . Клетки облучали в течение 5, 30, 60 и 180 с соответственно. Эти дозы в тысячи раз ниже рекомендуемых терапевтических доз и не способны вызвать сколько-нибудь заметное повышение температуры в среде культивирования клеток. После культивирования клетки осаждали, промывали средой RPMI 1640 и суспендировали в этой среде в количестве $20 \cdot 10^6$ кл./мл для определения белков.

Выделение сыворотки. Кровь собирали в пробирки во время декапитации животных. Образцы крови выдерживали в течение 3–5 ч при 4 °C, центрифugировали при 2000 об/мин и отбирали супернатанты.

Ds-Na-PAAГ-электрофорез и иммуноблотинг проводили по описанной методике (Laemmli, 1970). Для приготовления образцов $20 \cdot 10^6$ лимфоцитов лизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора на льду при постоянном помешивании в течение 2 мин. Мембранны клеток осаждали и концентрацию общего белка цитозоля определяли по методике Брэдфорд (Bradford, 1976) с использованием раствора Бредфорд. Белок осаждали в ацетоне, солюбилизировали, образцы кипятили в течение 5 мин и хранили при -20°C . Конечная концентрация белка в образцах составляла 1 мг/мл, образцы наносили по 10 мкл в каждую лунку.

Белки определяли с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ при напряжении ~ 60 В в концентрирующем геле и ~ 100 В — в разрешающем. Для электрофореза использовали Tris-глициновый буфер (25 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS и 250 mM Gly, pH 8.3). Специфичность анализа проверяли с помощью иммуноблотинга. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в камере для трансблота, заполненной Tris-глициновым буфером для переноса (47.9 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS, 38.6 mM Gly и 20 % метанола, pH 7.4), в течение 1 ч при 150 mA. Затем фильтр с перенесенными белками помещали на ночь в блокирующий буфер (10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7.4, содержащий 5 % сухого молока и 0.05 % Tween 20) при 4°C . После блокировки наносили антитела к каждому из исследуемых белков мыши: NF-кВ, Phospho-NF-кВ, IкВ-α и SAPK(JNK). Определение белков Hsp также проводили методом иммуноблотинга с использованием кроличьих моноклональных антител к каждому из исследуемых белков: Hsp70, Hsp25 и Hsp90. Для выделения субклеточных органелл использовали стандартные наборы (Qproteome Cell Compartment Kits). Принцип выделения отдельных фракций основан на использовании четырех экстрагирующих буферов, которые позволяли последовательно выделить четыре фракции — цитозоль, мембранны, ядерные белки и белки цитоскелета. Мембранный фракция включала в себя все мембранны, кроме ядерных, — плазматические, митохондриальные, эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи и др.

Мембранны после переноса инкубировали в растворе антител 1 ч при 37°C при постоянном перемешивании и помещали на 1 ч при тех же условиях в раствор антивидовых антител IgG, конъюгированных с биотином (козы поликлональные антикроличьи антитела с биотином, 1 : 5000 в фосфатном буфере) и затем с комплексом, содержащим стрептавидин и пероксидазу хрена, 1 : 3000 в Na-фосфатном буфере, 10 mM. Каждый этап сопровождался многократным промыванием пластины Na-фосфатным буфером, содержащим 0.05 % Tween 20.

Для проявления белковых полос использовали систему ECL. Сравнивая интенсивность окрашивания полос соответствующих исследуемых белков, оценивали относительное содержание белков в образцах. Контроль загрузки белка (loading control) проводили с использованием поликлональных антител к тубулину. Количественную оценку белковых полос проводили с использованием компьютерной программы Qara.

Статистический анализ проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Цитотоксичность ГА. Поскольку в предыдущих работах было исследовано влияние ГА только на трансформированные клетки, нет сведений о его токсичности в отношении нормальных лимфоцитов мыши. Для выяснения токсичности этого антибиотика в суспензии культивированных в течение 6 ч лимфоцитов подсчитывали количество живых и погибших клеток. Результаты подсчета клеток в 10 образцах для каждого случая показали, что после 6-часового культивирования лимфоцитов в присутствии 1 мкг/мл ГА доля погибших клеток составляла $9.6 \pm 0.8\%$, тогда как культивирование лимфоцитов в тех же условиях без добавления ГА вызывало гибель $6.8 \pm 0.5\%$ клеток. Таким образом, присутствие ГА в среде культивирования не приводит к массовой гибели клеток в первичной культуре лимфоцитов.

Влияние ГА на продукцию сигнальных белков в изолированных лимфоцитах. Исследовали NF-кВ, phNF-кВ, IкВ-α и SAPK(JNK). На рис. 1 приведены результаты измерения содержания фактора транскрипции NF-кВ и его субъединиц в изолированных лимфоцитах мыши, культивированных в присутствии ГА. В наших экспериментах использование иммуноблотинга с антителами к NF-кВ показало, что после добавления к клеткам ГА уровень NF-кВ по сравнению с контролем значительно снижается. Это указывает на то, что ГА ингибирует экспрессию NF-кВ в нормальных животных клетках. Интересно, что в других работах, в которых объектами исследования служили разные линии трансформированных клеток, были получены аналогичные результаты. Так, в одной из работ показано, что *in vitro* ГА подавлял активацию NF-кВ в клетках легочного эпителия человека (Vanden Berghe et al., 2003). Кроме того, в этой же работе было показано, что под влиянием ГА в трансформированных клетках линии L929 также снижался уровень этого сигнального белка.

Далее мы обнаружили, что количество белка phNF-кВ, который является фосфорилированной формой NF-кВ, также значительно снижается при добавлении ГА к лимфоцитам *in vitro* (рис. 1). Снижение количества белка, способного индуцировать экспрессию генов, вызывающих повреждение или гибель клеток, указывает на антиапоптозную активность ГА. Добавление ГА к клеткам также приводит к резкому уменьшению количества IкВ-α в лимфоцитах селезенки мыши, как это было показано для целого комплекса NF-кВ и для его активированной формы, phNF-кВ (рис. 1). Известно, что отсоединяясь от phNF-кВ, белок IкВ-α разрушается в протеосомах, что способствует быстрому перемещению phNF-кВ в ядро, после чего происходит транскрипция определенных генов в ответ на повреждающие сигналы.

На рис. 1 показано, что добавление ГА к лимфоцитам *in vitro* резко снижает количество SAPK(JNK) в клетках. Эти результаты согласуются с данными, обнаруженными на клетках линии L929. Авторы также показали, что обработка клеток L929 ГА приводит к угнетению уровня протеинкиназы SAPK(JNK) (Malhotra et al., 2001).

Таким образом, в настоящей работе было обнаружено ингибирующее влияние ГА на продукцию белка NF-кВ и связанных с ним белков, а также на продукцию SAPK(JNK) в нормальных лимфоцитах мыши и получены доказательства того, что ГА подавляет активность мультимерного протеасомного комплекса.

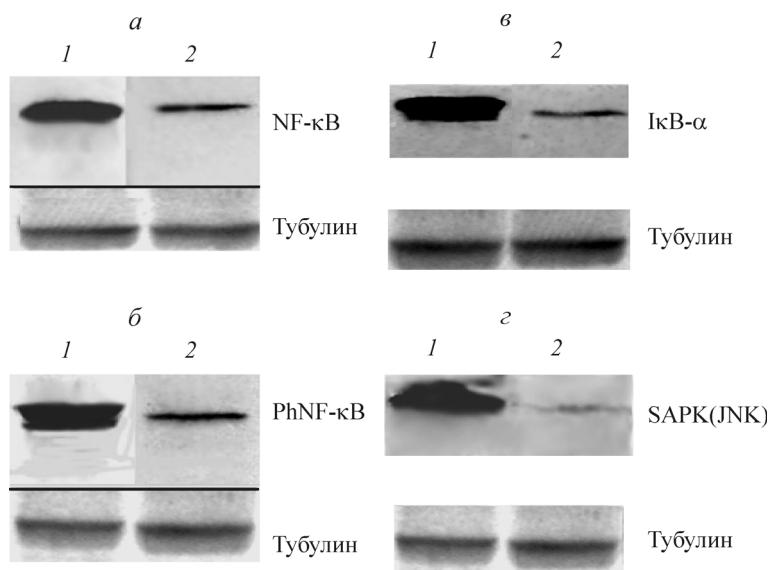


Рис. 1. Влияние гелданамицина (ГА) на количество белков NF-κB (*a*) pHNF-κB (*δ*), IκB-α (*ε*) и протеинкиназы SAPK(JNK) (*ζ*) в лимфоцитах селезенки мышей.

Показаны фотографии мембран после иммуноблотинга. Дорожку для каждого белка: 1 — контроль, 2 — лимфоциты, культивированные в присутствии 1 мкг/мл ГА. Контроль загрузки белков (loading control) представлен на каждой из четырех панелей (*a*)—(*ζ*) внизу.

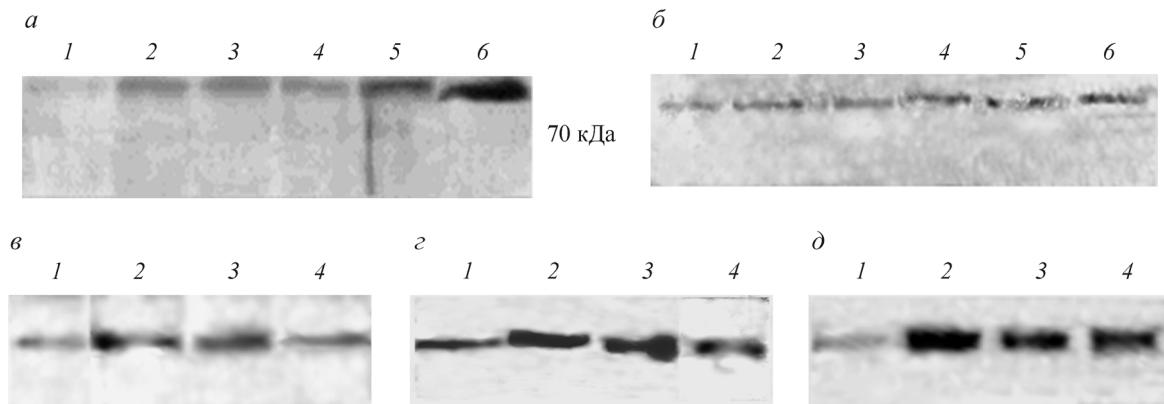


Рис. 2. Продукция Hsp70 в лимфоцитах селезенки мышей.

a, *δ* — целые клетки; *ε*—*ζ* — соответственно цитозоль, мембранны и цитоскелет. *a*: 1 — контроль; 2—5 — экспозиция лазерным светом в течение 5, 30, 60 или 180 соответственно; 6 — рекомбинантный Hsp70. *δ*: 1 — контроль, 2 — ГА, 3—6 — совместно ГА и лазерное излучение в течение 5, 30, 60 или 180 с соответственно. *ε*—*ζ*: 1 — контроль, 2 — ГА, 3 — ГА и лазер (60 с), 4 — лазер (60 с). Иммуноблоты с антителами к Hsp70.

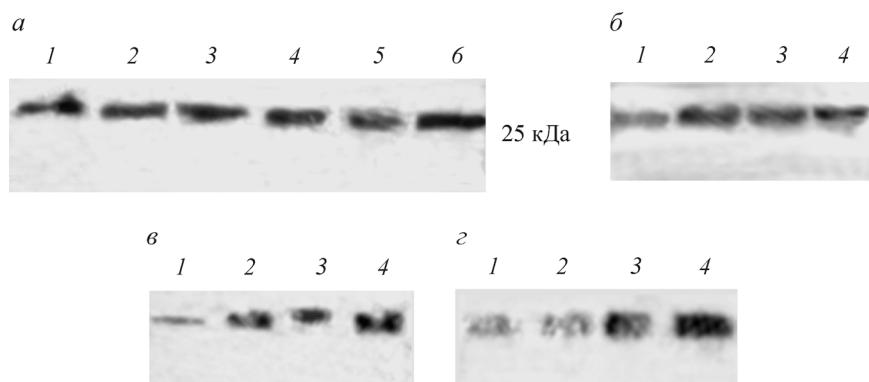


Рис. 3. Продукция Hsp25 в лимфоцитах селезенки мышей.

a — целые клетки, *δ*—*ζ* — соответственно цитозоль, мембранны и цитоскелет. *a*: 1 — контроль, 2 — ГА, 3—5 — экспозиция лазерным светом в течение 5, 30 или 60 с соответственно, 6 — рекомбинантный Hsp25. *δ*—*ζ*: 1 — контроль, 2 — ГА, 3 — ГА совместно с лазерным облучением (60 с), 4 — лазер (60 с). Иммуноблоты с антителами к Hsp25.

Поскольку в клетке имеется такая мощная система защиты клетки от повреждающих воздействий, как семейство белков Hsp, было целесообразно выяснить влияние этого антибиотика на продукцию некоторых Hsp, включая и Hsp90, активность которого подавляется ГА. Эта работа была проведена с использованием той же биологической модели (лимфоциты селезенки мыши), причем в экспериментах использовали как покоящиеся клетки, так и лимфоциты, подвергнутые воздействию низкоинтенсивного лазерного света.

Влияние ГА на продукцию Hsp в изолированных лимфоцитах мышей. Исследовали влияние ГА на продукцию Hsp из разных семейств — Hsp70, Hsp25 и Hsp90 — в норме и при воздействии на клетки разных доз низкоинтенсивного лазерного света. При этом измеряли количество этих белков в целых клетках и в отдельных внутриклеточных структурах лимфоцитов (для Hsp70 и Hsp25). Важно отметить, что все использованные в работе дозы лазерного излучения относятся к диапазону сверхслабых доз, которые не могли вызвать сколько-нибудь заметное повышение температуры среды, в которой культивировали клетки. Фотографии мембран после иммуноблоттинга помещены на рис. 2—4, результаты измерения относительного количества Hsp приведены в таблице.

Производство Hsp70. Несмотря на отсутствие тепловых эффектов лазерного излучения, в облученных клетках наблюдали повышение продукции Hsp70, особенно значительное после экспозиции клеток в течение 180 с, примерно до 350 % от контроля (рис. 2, а; см. таблицу). Это несомненно свидетельствует о стрессовом ответе клеток при их облучении *in vitro* слабым лазерным светом. Интересно, что инкубация контрольных клеток с ГА в течение 6 ч также вызывала повышенную экспрессию Hsp70 (рис. 2, б). Это совпадает с имеющимися сведениями о том, что ГА индуцирует производство Hsp70 (Conde et al., 2007). В том случае, когда клетки перед облучением были предварительно обработаны ГА, эффекты лазерного облучения были в значительной степени модифицированы, особенно при экспозиции клеток в течение 5 или 60 с.

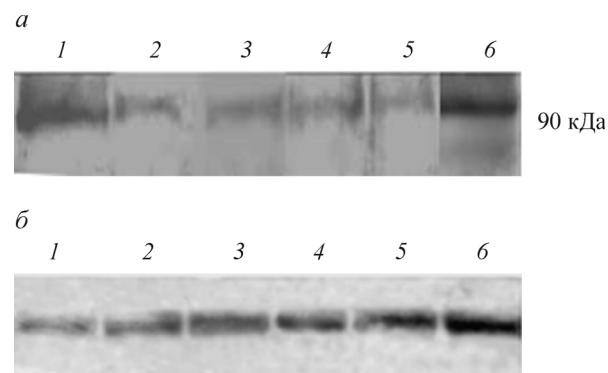


Рис. 4. Продукция Hsp90 в лимфоцитах селезенки мышей.

а: 1 — контроль, 2—5 — экспозиция лазерным светом в течение 5, 30, 60 или 180 с соответственно, 6 — рекомбинантный Hsp90-α. б: 1 — контроль, 2 — ГА, 3—6 — ГА совместно с лазерным излучением в течение 5, 30, 60 или 180 с соответственно.

При этом если обработка необлученных клеток ГА усиливалась производство Hsp70, то в облученных клетках антибиотик снижал уровень экспрессии Hsp70 практически до нормального уровня (рис. 2, б; см. таблицу). Важно отметить, что такая закономерность изменения экспрессии Hsp70 при обработке клеток ГА была характерна для белка цитоплазмы и цитоскелета, как показано на рис. 2, в, д, а также в таблице. Действительно, ГА повышал количество Hsp в цитозоле и в цитоскелете контрольных лимфоцитов в 3—4 раза, но предварительная обработка ГА облученных клеток приводила, напротив, к снижению уровня Hsp70 в этих клеточных структурах. Стоит подчеркнуть, что ранее не было известно о присутствии белков теплового шока в цитоскелете лимфоцитов.

Следует отметить, что эффекты лазерного облучения на целых клетках и на внутриклеточных структурах не были полностью симметричными. Так, из всех исследованных структур облучение в течение 60 с вызывало увеличение количества Hsp70 только в структурах цитоскелета (рис. 2, д; см. таблицу).

Количество белков теплового шока в лимфоцитах при их облучении лазерным светом, обработке гелданамицином (ГА), а также при совместном действии этих факторов

Hsp и его локализация	Время облучения, с					ГА + облучение					
	контроль	5	30	60	180	контроль	ГА	ГА + 5 с	ГА + 30 с	ГА + 60 с	ГА + 180 с
Hsp70:											
целые клетки	100 ± 18	251 ± 30 ^a	224 ± 29 ^a	221 ± 30 ^a	348 ± 39 ^a	63 ± 7	100 ± 11 ^a	75 ± 9 ^b	116 ± 23	65 ± 11 ^b	112 ± 17
цитоплазма	27 ± 3			25 ± 4			100 ± 17 ^a			68 ± 8	
мембрана	41 ± 5			47 ± 7			100 ± 23 ^a			110 ± 14	
цитоскелет	22 ± 4			48 ± 8 ^a			100 ± 15 ^a			74 ± 9 ^b	
Hsp25:											
целые клетки	100 ± 11			195 ± 28 ^a		120 ± 16	100 ± 13	70 ± 9 ^b	108 ± 16	65 ± 7 ^b	
цитоплазма	51 ± 6			100 ± 15 ^a			100 ± 16 ^a			74 ± 8 ^b	
мембрана	17 ± 3			126 ± 17 ^a			100 ± 14 ^a			74 ± 5 ^b	
цитоскелет	93 ± 13			381 ± 58 ^a			100 ± 18 ^a			302 ± 61 ^b	
Hsp90:											
целые клетки	100 ± 12	83 ± 12	62 ± 8 ^a	108 ± 14	54 ± 7 ^a	73 ± 11	100 ± 9	99 ± 15	105 ± 13	130 ± 12 ^b	165 ± 18 ^b

Примечание. Приведены средние значения данных денситометрии из 3—4 независимых экспериментов, рассчитанные в % от значений в контроле или образцов, обработанных ГА. Контроль — интактные клетки; длительность облучения выражена в с. Для всех белков, определяемых в целых клетках, в правой и левой колонках показаны результаты разных серий экспериментов со своими контрольными значениями. Для Hsp70 и Hsp25 во внутриклеточных структурах все измерения проводили одновременно. ^a Достоверное отличие от контроля при $p < 0.05$. ^b Достоверное отличие от клеток, обработанных ГА, при $p < 0.05$.

Продукция Hsp25. Измерение продукции Hsp25, относящегося к семейству малых Hsp, показало, что экспозиция в течение 60 с вызывает увеличение количества белка как в целых клетках, так и во всех субклеточных структурах (рис. 3, а; см. таблицу). Обработка ГА не вызывала значительного изменения количества Hsp25 в целой клетке, но в мемbrane и цитоплазме клеток количество этого белка было достоверно увеличено после инкубации необлученных клеток в присутствии ГА. В том случае, когда после обработки ГА клетки подвергались воздействию низкоинтенсивного лазерного света, присутствие ГА предотвращало активацию синтеза Hsp25, в результате чего количество Hsp25 уменьшалось во всех структурах лимфоцитов, за исключением цитоскелета (рис. 3, г; см. таблицу).

Продукция Hsp90. Результаты измерения показаны на рис. 4. Оценка количества белка Hsp90 в клетках, облученных лазерным светом, показала, что в отличие от Hsp70 лазерный свет не индуцирует синтеза этого белка. Более того, отмечена тенденция к снижению продукции Hsp90 при лазерном облучении (рис. 4, а; см. таблицу). Обработка необлученных клеток ГА приводит, как ни парадоксально, к увеличению его продукции в лимфоцитах (рис. 4, б). По-видимому, ГА ингибитирует активность Hsp90, но не угнетает новообразования этого белка, что, возможно, указывает на компенсаторный механизм синтеза Hsp90 в этих условиях.

Влияние ГА на продукцию Hsp90 в облученных клетках носит более сложный характер. Так, не изменяя уровня продукции Hsp в клетках, облученных сравнительно небольшими дозами (экспозиции в течение 5 и 30 с), ГА увеличивает продукцию этого белка в лимфоцитах после их экспозиции в течение 60 и особенно 180 с (рис. 4, б).

Таким образом, среди исследованных белков Hsp при воздействии низкоинтенсивного лазерного света индуцируется экспрессия Hsp70 и Hsp25, но не Hsp90. На первый взгляд это может означать, что Hsp90 не участвует в ответе клетки на слабое лазерное излучение. Однако при подавлении активности Hsp90 ГА синтез этого белка в клетке увеличивается после облучения клеток лазерным светом, причем этот эффект проявляется при использовании сравнительно более высоких доз низкоинтенсивного излучения ($12 \cdot 10^{-3}$ и $3.6 \cdot 10^{-2}$ Дж/см²).

Таким образом, в работе впервые показано, что в нормальных лимфоцитах мышей, культивируемых в присутствии ГА, происходит значительное уменьшение количества NF-κB, его фосфорилированной формы pNF-κB и белка, подавляющего его активность, IκB-α. Кроме того, присутствие ГА в среде культивирования клеток вызывало заметное снижение количества протеинкиназы SAPK(JNK). Получены доказательства влияния ГА на развитие стрессового ответа животных клеток в ответ на воздействие низкоинтенсивного лазерного света, которое осуществляется путем регуляции уровня продукции белков Hsp70, Hsp25 и Hsp90 в изолированных лимфоцитах и в их внутриклеточных структурах. Это указывает на возможность использования ГА и его нетоксичных производных при терапии ряда заболеваний, сопряженных с высоким уровнем апоптоза в клеточных системах, причем мишенью этих препаратов могут служить короткоживущие регуляторные белки протеосомного каскада.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента РФ НШ-2092.2006.4 и программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине».

Список литературы

- Beere H. M. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.* 115 : 2633—2639.
- Bradford M. A. 1976. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.
- Chavany C., Mimnaugh E., Miller P., Bitton R., Nguyen P., Trepel J., Whitesell L., Schnur R., Moyer J. D., Neckers L. 1996. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. *J. Biol. Chem.* 271 : 4974—4977.
- Conde A. G., Lau S. S., Dillmann W. H., Mestril R. 1997. Induction of heat shock proteins by tyrosine kinase inhibitors in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against simulated ischemia. *Mol. Cell. Cardiol.* 29 : 1927—1938.
- Craig E. A., Weissman J. S., Horwicht A. L. 1994. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell.* 78 : 365—372.
- DiDonato J., Mercurio F., Rosette C., Wu L. J., Suyang H., Ghost S., Karin M. 1996. Mapping of the inducible IκB-α phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16 : 1295—1304.
- Gabai V. L., Merriin A. B., Yaglom J. A., Volloch V. Z., Sherman M. Y. 1998. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett.* 438 : 1—4.
- Gabai V. L., Sherman M. Y. 2002. Invited review: interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J. Appl. Physiol.* 92 : 1743—1748.
- Guzhova I. V., Darieva Z. A., Rocha Melo A., Margulis B. A. 1997. Major stress protein Hsp70 interacts with NF-κB regulatory complex in human T-lymphoma cells. *Cell Stress Chap.* 2 : 132—139.
- Hu J., Seeger C. 1996. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 : 1060—1064.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Luo J.-L., Kamata H., Karin M. 2005. IKK/NF-κB signaling: balancing life and death — a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 115 : 2625—2632.
- Malhotra V., Shanley T. P., Jean-Francois P., Welch W. J., Wong H. R. 2001. Geldanamycin inhibits NF-κB activation and interleukin-8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *Cell. Mol. Biol.* 25 : 92—97.
- Marczin N. A., Papapetropoulos P., Catravas J. D. 1993. Tyrosine kinase inhibitors suppress endotoxin- and IL-1 beta-induced NO synthesis in aortic smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol.* 265 : 1014—1018.
- Nishina H., Wada T., Katada T. 2004. Physiological roles of SAPK(JNK) signaling pathway. *Jap. Biolchem. Soc.* 136 : 123—126.
- Novoselova E. G., Glushkova O. V., Cherenkov D. A., Chudnovsky V. M., Fesenko E. E. 2006. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photoderm. Photoimmun. Photother.* 22 : 33—38.
- Ran R., Lu A., Zhang L., Tang Y., Zhu H., Xu H., Feng Y., Han C., Zhou G., Rigby A. C., Sharp F. R. 2004. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-κB survival signaling. *Genes Develop.* 18 : 1466—1481.
- Schulte T. W., An W. G., Neckers L. M. 1997. Geldanamycin-induced destabilization of Raf-1 involves the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 : 655—659.
- Supko J. G., Hickman R. L., Grever M. B., Malspeis L. 1995. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36 : 303—315.
- Takimoto C. H., Diggikar S. 2002. Heat shock protein and proteasome targeting agents. *Hematol. Oncol. Clin.* 16 : 1269—1285.
- Vanden Berghe T., Kalai M., Geert van Loo, Declerq W., Vandenebeel P. 2003. Disruption of Hsp90 function reverts tumor ne-

crossis factor-induced necrosis to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278 : 5622—5629.

Whitesell L. P., Suthphi W. G., Blagoskionny M., Schute T., Neckers L. 1997. Geldanamycin-stimulated destabilization of mutated p53 is mediated by the proteasome *in vivo*. *Oncogene.* 14 : 2809—2816.

Zhang G., Ghosh S. 2000. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 6 : 453—457.

Поступила 25 VII 2007

EFFECT OF GELDANAMYCIN ON THE EXPRESSION OF SIGNAL PROTEINS AND HEAT SHOCK PROTEINS IN NORMAL MICE LYMPHOCYTES

T. V. Novoselova, D. A. Cherenkov, M. O. Khrenov, O. V. Glushkova, S. M. Lunin, E. G. Novoselova,¹ E. E. Fesenko

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino 142290, Moscow Region;

¹ e-mail: elenanov_06@mail.ru

The effects of geldanamycin, which is known as inhibitor of heat shock protein 90 activities, on expression of several signal and heat shock proteins were studied by Western blot analysis in cultivated spleen lymphocytes isolated from male NMRI mice. It has been revealed that cultivating the cells with geldanamycin resulted in decrease in transcription factor NF- κ B amount, as well as decrease in its phosphorylated form, pNF- κ B, and lowering in its suppressor, I κ B- α . Besides, cells cultivated with geldanamycin demonstrated significant decrease in the amount of protein kinase SAPK(JNK). The modifications in signal pathways, which had been induced by geldanamycin, pointed to direct influence of the antibiotics on cellular stress response to damaging impact. This assumption was examined with the model of cellular stress response induced by low-level laser radiation. It was proved that Hsp90-binding drug, geldanamycin, significantly decreased *in vitro* stress response to laser light via lowering the production of heat shock proteins, Hsp70 and Hsp25, both in irradiated lymphocytes and in theirs intracellular structures. These findings show the prospect for using of geldanamycin in various therapies that are compromised with objectionable side effects manifested as heightened stress response in immune cells.

Key words: mice lymphocytes, Western blot analysis, geldanamycin, heat shock proteins, signal proteins, NF- κ B, pNF- κ B, I κ B- α , SAPK(JNK).