

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА КАК ФАКТОР, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ УСТОЙЧИВОСТЬ ОРГАНИЗМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ К ДЕЙСТВИЮ СТРЕССОВЫХ АГЕНТОВ

© А. Л. Пухальский,¹ Г. В. Шмарина, И. В. Капустин,²
С. В. Стукалов,¹ Д. А. Пухальская,¹ В. А. Алешкин²

¹ Медико-генетический научный центр РАМН

и ² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва;

¹ электронный адрес: osugariver@yahoo.com

Исследовали связь между интенсивностью продукции белков теплового шока семейства 70 кДа (Hsp70) и чувствительностью лимфоцитов селезенки мышей к действию стрессовых факторов. Такими факторами были инкубация лимфоцитов в отсутствие митогенов в течение 18 ч и (или) воздействие алкилирующих агентов в нецитотоксических концентрациях. С помощью двух инбредных линий мышей, генетически контрастных по признаку чувствительности к действию алкилирующих соединений, было показано, что уровень синтеза Hsp70 зависит от генотипа животного. Количество мРНК для Hsp70, как и внутриклеточное содержание этих белков, оказалось существенно выше у мышей BALB/c, чем у мышей C57BL/6. Мыши, характеризующиеся более высоким содержанием Hsp, отличались более высокой резистентностью к действию алкилирующих агентов. Индукция синтеза Hsp в результате воздействия на клетки теплового шока повышала их резистентность к действию мелфалана. Лимфоциты мышей BALB/c, являющиеся высокими продуцентами Hsp, оказались более резистентными к апоптозу, индуцированному в результате относительно продолжительного культивирования клеток в среде, лишенной митогенных факторов.

Ключевые слова: белки теплового шока, Hsp70, лимфоциты, стресс, мыши инбредных линий, алкилирующие агенты.

Известно, что все живые организмы отвечают на стресс активацией небольшого количества специфических генов, так называемых генов теплового шока (*hsp*). Продукты этих генов, известные под общим названием белков теплового шока (Hsp), относятся к семейству высокомолекулярных белков-шаперонов, синтез которых происходит в ответ на действие стрессовых агентов (стрессоров). Важными функциями Hsp являются уменьшение последствий воздействия на клетку повреждающих факторов и облегчение процессов восстановления. Объектом регуляции со стороны Hsp могут быть разнообразные события, являющиеся ключевыми для реализации программы апоптоза. Известно, что Hsp и апоптотические белки выполняют важные и, по-видимому, оппозитные функции, касающиеся выживания клетки или ее смерти. Различные Hsp и участники апоптотических каскадов обнаруживают многоступенчатые сетевые взаимодействия, результатом которых является тонкая настройка механизмов, отвечающих за выживание клетки или ее гибель. Главная роль в защите клетки от апоптоза принадлежит двум семействам Hsp — Hsp90 и Hsp70.

Hsp90 выполняют функцию шаперонов для нестабильных сигнальных белков, сохраняя их равновесие с целью последующей активации (Pratt, 1998). Hsp90 способствуют выживанию клетки на разных этапах апоптотического каскада за счет стимуляции образования активного NF-κB. Hsp90 играют важную роль в стабилизации

RIP, который рекрутируется рецептором для TNF (TNFR-1), активированным в результате взаимодействия со своим лигандом (TNF), что в свою очередь поддерживает NF-κB в активном состоянии (Lewis et al., 2000; Chen et al., 2002). Помимо роли, связанной с непосредственной активацией сигнальных путей, включающих в себя механизмы защиты клетки от апоптоза, комплекс Hsp90-актин косвенно способствует выживанию клетки за счет торможения механизмов клеточной гибели, опосредованной JNK (Zhang et al., 2005).

Семейство Hsp70 отличается большей гетерогенностью и включает как конститутивные, так и стрессиндуцируемые белки с перекрывающимися или уникальными функциями, которые проявляются в различных компартментах клетки, а также в различных клеточных сообществах (Fink, 1999; Mayer, Bukau, 2005). Так же как и Hsp90, они обладают выраженным антиапоптотическим действием. Hsp70 вмешиваются в различные сигнальные пути на различных этапах апоптоза и защищают клетку от гибели с помощью шаперонзависимых и шапероннезависимых механизмов. Как представители антиапоптотических белков Hsp70 защищают клетки от цитотоксического действия TNF, моноцитов, оксидативного стресса, химиотерапевтических агентов, керамида и ионизирующего излучения (Jäättelä et al., 1992, 1998; Simon et al., 1995; Mosser et al., 1997). Апоптотический каскад, являющийся результатом воздействия на клетку теплового шока и свя-

занный с транслокацией Вах из цитоплазмы в митохондрии, может быть остановлен в результате повышенной экспрессии Hsp70 (Stankewicz et al., 2005).

Несмотря на то что Hsp обладают высокой степенью консервативности (от бактерий до высших эукариот), уровень их синтеза может существенно различаться у животных из разных температурных ниш (Ulmasov et al., 1992; Evgen'ev et al., 2007; Подлипаева и Гудков, 2009). Более того, сравнительное изучение двух этнических групп (русские и туркмены), проживающих в Центральной Азии, показало, что фибробласты, полученные от туркмен, сохраняли способность синтезировать полный набор Hsp в условиях интенсивного теплового шока, тогда как клетки представителей русской популяции при таком же температурном режиме практически полностью теряли способность к какому бы то ни было белковому синтезу. В условиях высоких температур выживаемость фибробластов у туркмен была выше, чем выживаемость фибробластов, выделенных у русских (Lyashko et al., 1994; Evgen'ev et al., 2007).

К факторам, способным запускать систему внутриклеточной защиты, относятся не только aberrантные температурные режимы (высокие или низкие температуры), но и многие токсические агенты, включая лекарственные препараты. Особый интерес представляет обширное семейство алкилирующих агентов, применяемых главным образом в качестве противораковых цитостатиков и иммунодепрессантов. К ним относятся такие широко известные лекарственные препараты, как циклофосфамид, хлорамбуцил и мелфалан.

Хотя эти препараты применяют в медицине уже давно, только исследования последних лет показали, что в различных диапазонах доз соединения этого класса проявляют различные свойства. Так, в высоких дозах алкилирующие агенты оказывают грубое цитостатическое действие, связанное с необратимыми повреждениями ДНК. При использовании средних доз клеточная гибель обусловлена индукцией в клетках процессов апоптоза. Низкие концентрации блокируют проведение сигнала поверхностными рецепторами, в результате чего препарат из цитостатика превращается в модификатор клеточного роста (Pukhalsky, Shmarina, 2001; Pukhalsky et al., 2006). Наши предыдущие эксперименты на мышах 4 инбредных линий показали, что существуют 2 типа чувствительности клеток к антипролиферативному действию алкилирующих агентов. Так, чувствительность клеток мышей DBA/2 и C57BL/6 была значимо выше, чем чувствительность клеток, полученных от BALB/c и CC57BR/Mv (Pukhalsky et al., 1993). Мы предположили, что такие различия в чувствительности могут быть связаны с различиями в синтезе Hsp.

Данная работа посвящена изучению роли генетически детерминированных различий уровня синтеза Hsp70 в определении чувствительности клеток к действию стрессовых агентов, включая различные дозы алкилирующих соединений.

Материал и методика

Лабораторные животные. Мыши линий BALB/c и C57BL/6 (самцы в возрасте 6—8 нед) были получены из Питомника лабораторных животных «Пушино» ФИБХ РАН. Животных содержали в индивидуальных клетках, они имели свободный доступ к воде и пище.

Алкилирующий агент. В качестве алкилирующего агента использовали мелфалан (Alkeran®, Великобритания).

Выделение и культивирование лимфоцитов. Лимфоциты выделяли из селезенки с помощью стеклянного гомогенизатора, дважды отмывали и ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % донорской лошадиной сыворотки, $2 \cdot 10^{-3}$ М NEPEP, $2,8 \cdot 10^{-6}$ 2-меркаптоэтанола и 20 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводили в 96-луночных планшетах (10^5 клеток на лунку). Для торможения пролиферативного ответа использовали спектр доз мелфалана (0.01—30 мкг/мл). Клетки инкубировали с препаратом в течение 1 ч при 37 °С, после чего надсадочную жидкость удаляли и лунки заливали свежей средой, содержащей конканавалин А (Sigma, США) в концентрации 40 мкг/мл.

В качестве контроля служили образцы, преинкубированные в культуральной среде. Дальнейшую инкубацию клеток контрольных групп производили как в присутствии митогена, так и без него. Клетки инкубировали в течение 72 ч; за 4 ч до окончания культивирования вносили [³H]-тимидин (Изотоп, Россия) в дозе 40 кБк на лунку. По окончании культивирования клетки собирали с помощью клеточного харвестера и переносили на фильтры, радиоактивность которых оценивали в жидкостном сцинтилляционном счетчике (Tracor Analytic, США).

Мечение клеток. Лимфоидные клетки, выделенные из селезенки мышей, подвергали воздействию теплового шока путем инкубации на водяной бане при 42.5 °С в течение 1 мин. Затем клетки инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и еще в течение 1 ч в присутствии гидролизата белков, меченных ¹⁴C. Контрольные клетки после инкубации при комнатной температуре в течение 1 мин, а затем при 37 °С в течение 1 ч метили так же, как и клетки, подвергшиеся тепловому шоку.

Электрофорез. Для сравнительного изучения белковых синтезов контрольных лимфоцитов и лимфоцитов, подвергшихся тепловому шоку, лизаты меченых клеток исследовали в двумерном электрофорезе. Белки, растворенные в лизирующем буфере, подвергали двумерному электрофорезу (O'Farrell et al., 1977). Белковые маркеры, меченные ¹⁴C (Amersham, Великобритания), были использованы в качестве стандартов молекулярной массы. Визуализацию белков проводили методом автордиографии, после чего двумерные автордиограммы подвергали денситометрическому сканированию. Содержание Hsp в клетках оценивали методом Вестерн-иммуоблотинга (Towbin et al., 1979) с использованием кроличьих поликлональных антител H7, конъюгированных с пероксидазой хрена (Институт вакцин и сывороток, Санкт-Петербург).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (RT-PCR). Общую РНК выделяли из мышечных лимфоцитов с помощью YELLOW SOLVE (Клоноген, Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для получения первой цепи кДНК были использованы случайные гексонуклеотидные праймеры (Клоноген, Санкт-Петербург). Амплификацию кДНК осуществляли методом TaqMan. В реакционную смесь добавляли специфические олигонуклеотидные праймеры для мышечных Hsp70 и β-актина (Hsp70, прямой — 5'TTCGTGGAGGAGTCAAGA3', обратный — 5'TCCTCTTGGCCCTCACA 3'; β-актин, прямой — 5'GTCACTACTATTGGCAACGAG3', обратный — 5'GG-ATGTCAACGTCACACTTC3'), а также ДНК-пробы, меченные на 5'-конце флуоресцентными красителями, а на

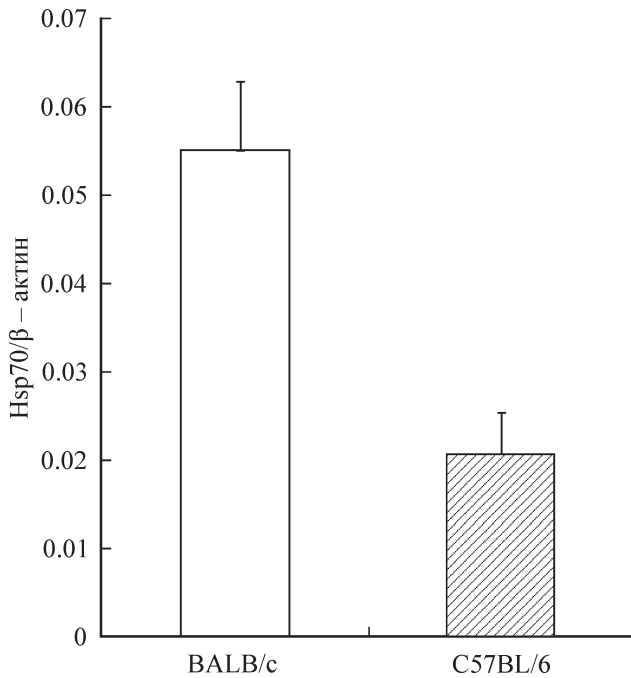


Рис. 1. Сравнительное содержание мРНК для Hsp70 в лимфоцитах, полученных из селезенки мышей линий BALB/c и C57BL/6.

3'-конце — фосфатной группой и гасителем флуоресценции (Hsp70, FAM-5'САСААГААГГАСАСАТСАГССАГА-АС3'-ВНQ1; β-актин, Cy5-ССТТССТТСТТGGGTATGG-ААТСС-ВНQ2). Полимеразную цепную реакцию проводили по схеме: 95 °С — 10 мин, 35 циклов (95 °С — 20 с, 56 °С — 20 с, 72 °С — 20 с).

Метод диффузии ДНК. Повреждения ДНК и признаки апоптоза исследовали методом диффузии ДНК (Singh et al., 2000), в который были внесены незначительные модификации. Для этого на предметные стекла наносили 50 мкл 0.5%-ной агарозы, содержащей 10^4 — $50 \cdot 10^4$ лимфоцитов. Стекла погружали на 1 ч в свежеприготовленный лизирующий раствор (2.5 М NaCl, 2 мМ EDTA, 10 мМ основного Трис-буфера с рН 10 и Тритон X-100 в конечной концентрации 1%). После 1-часового лизиса стекла помещали на специальный поднос и погружали на 10 мин при комнатной температуре в пластиковый контейнер, содержащий свежеприготовленный щелочной раствор (0.3 Н NaOH и 0.2% DMSO, рН > 13.5). Затем стекла помещали на 15 мин в 1 М спиртовой раствор уксуснокислого аммония (5 мл 10 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ и 45 мл абсолютного этанола), после этого — на 15 мин в 70%-ный этанол, содержащий 5 мМ спермина, и высушивали на воздухе. Препараты хранили при комнатной температуре, а затем окрашивали. Сначала проводили подготовку к окрашиванию, обрабатывая стекла раствором, содержащим сахарозу и однозамещенный фосфат натрия (50 мкл 5%-ной сахарозы в 10 мМ растворе NaH_2PO_4). Затем стекла окончательно окрашивали флуоресцентным красителем YOYO-1 (50 мкл 0.25 мкМ YOYO-1 в 5%-ном DMSO и 5%-ной сахарозе). Клеточные ядра исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа. Для регистрации свечения YOYO-1 использовали фильтр поглощения 470—490 нм и фильтр эмиссии 520 нм. Площадь и интенсивность свечения объекта оценивали с помощью компьютерной системы распознавания образов, вычисляя общую интенсивность свечения объекта (площадь ядра ×

средняя интенсивность флуоресценции). Для каждой экспериментальной точки исследовали два препарата, на каждом из которых учитывали не менее 200 ядер.

Статистическая обработка данных. Различия между средними оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для вычисления срединной активной концентрации (ED_{50}) использовали метод пробитов.

Результаты

Экспрессия мРНК для Hsp и синтез белков в лимфоцитах мышей BALB/c и C57BL/6. Методом RT-PCR исследовали уровень экспрессии мРНК для Hsp70 в лимфоцитах мышей генетически контрастных линий. Как видно на рис. 1, уровень такой мРНК в клетках мышей BALB/c существенно выше, чем у мышей C57BL/6.

Для характеристики особенностей синтеза Hsp у мышей разных линий был использован метод двумерного электрофореза меченых белков, выделенных из клеток селезенки мышей BALB/c и C57BL/6 до и после теплового шока (рис. 2). Более наглядно обнаруженные различия выявляются при компьютерном сканировании рентгенограмм (рис. 3). Полученные результаты показывают, что тепловой шок в течение 1 мин тормозит синтез всех клеточных белков, за исключением актина и Hsp. При этом можно обнаружить синтез как его конститутивной (Hsp-c), так и индуцибельной (Hsp-i) форм. Более того, отмечается заметная стимуляция синтеза Hsp-i. Уровень синтеза обеих форм Hsp у мышей линии BALB/c был выше, чем у мышей C57BL/6. Такие межлинейные различия можно было наблюдать как в интактных клетках, так и в клетках, подвергшихся воздействию теплового шока.

Для определения общего количества Hsp70 в клетках мышей разных линий были использованы антитела H7. Методом Вестерн-иммуоблотинга показано, что общее количество Hsp70 в клетках мышей BALB/c (как интактных, так и подвергшихся тепловому шоку) выше, чем в клетках C57BL/6 (рис. 4).

Чувствительность клеток селезенки к антипролиферативному действию алкилирующих агентов. Обработка клеток селезенки мышей двух линий спектром доз мелфалана показала (рис. 5), что лимфоциты линии C57BL/6, являющиеся низкими продуцентами Hsp, обнаруживают более высокую чувствительность к антипролиферативному действию алкилирующих агентов (ED_{50} составила 2.7 мкг/мл). Для достижения 50%-ного подавления пролиферативного ответа клеток мышей BALB/c (высокие продуценты Hsp) была необходима в 2 раза более высокая доза мелфалана ($\text{ED}_{50} = 5.4$ мкг/мл). В то же время в результате индукции дополнительного количества Hsp в клетках мышей C57BL/6 за счет теплового шока резистентность этих клеток существенно повышалась ($\text{ED}_{50} = 3.8$ мкг/мл). Аналогичная тепловая обработка клеток мышей BALB/c также несколько повышала их резистентность ($\text{ED}_{50} = 6.1$ мкг/мл), однако это повышение было менее выраженным (данные на рисунке не представлены). Необходимо отметить, что в выбранных нами экспериментальных условиях гипертермия сама по себе не снижала пролиферативного ответа лимфоцитов, стимулированных конканавалином А.

Повреждения ДНК и апоптоз. С целью более глубокого понимания значения синтеза Hsp для выживания клеток оценивали интенсивность повреждений ДНК в

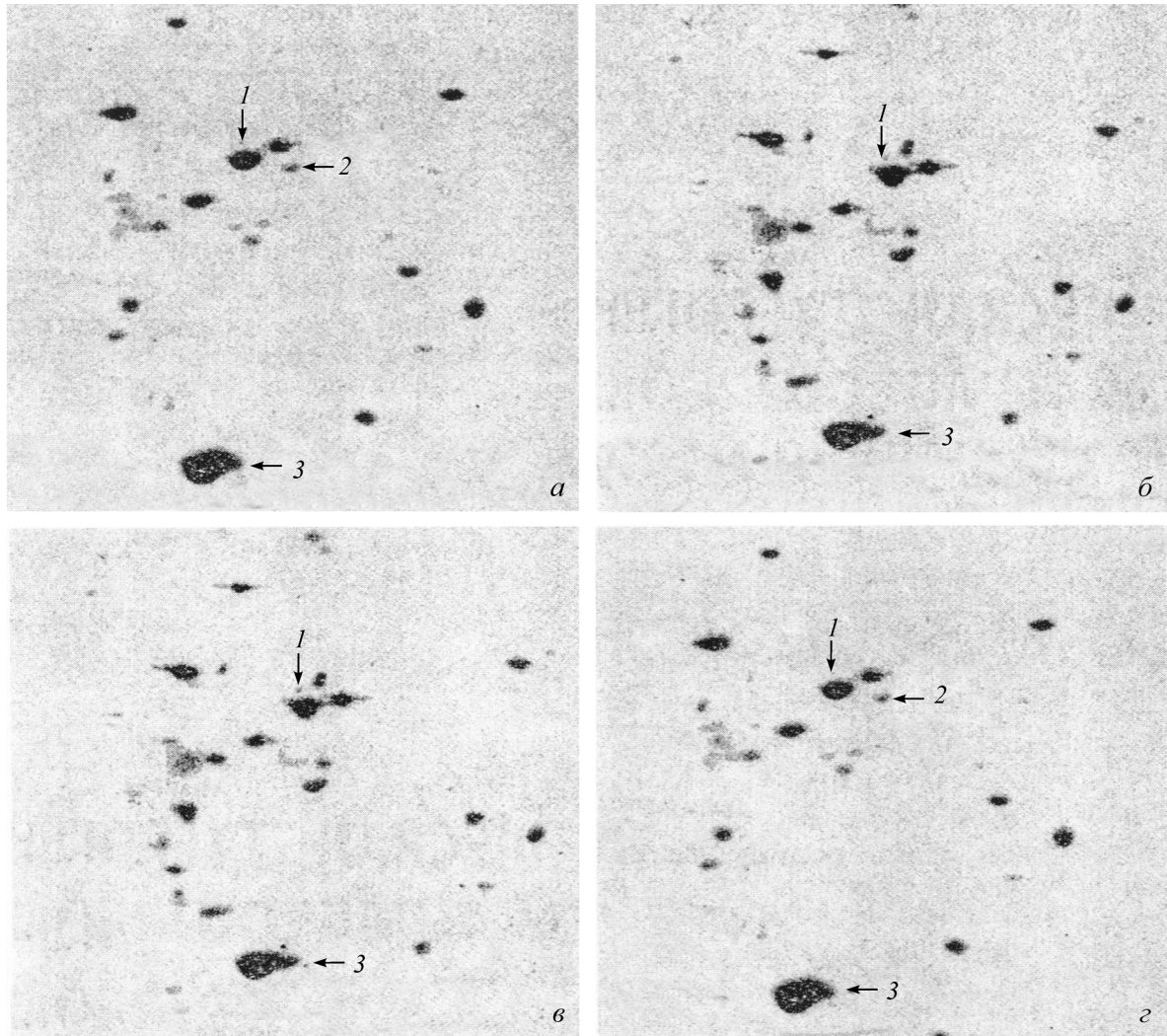


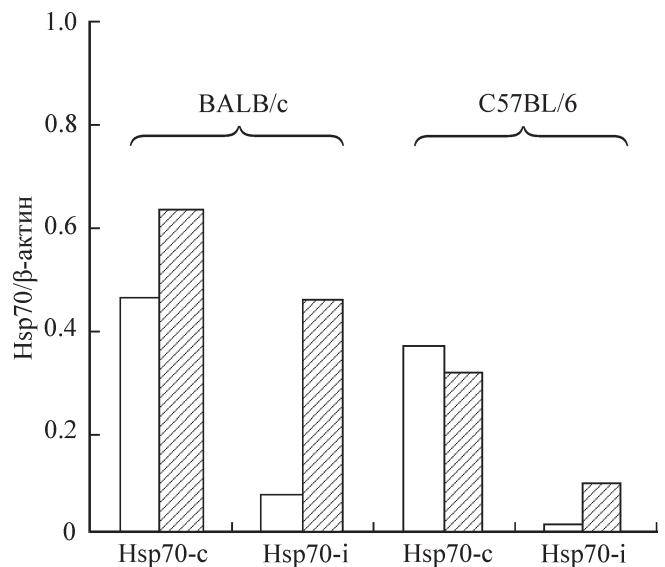
Рис. 2. Радиоавтографы двумерного электрофореза, демонстрирующие синтез белков клетками селезенки мышей линии BALB/c (а, б) и мышей линии C57BL/6 (в, г).

Белки были помечены ¹⁴C-аминокислотами после инкубации клеток при 37 °C (а, в) и 42.5 °C (б, г) в течение 1 мин, а затем в течение 1 ч при 37 °C с целью восстановления белковых синтезов. 1 — Hsp-c, 2 — Hsp-i, 3 — актин.

лимфоцитах после 18-часовой инкубации в среде, не содержащей митогенов. Исследовали интактные клетки, клетки, подвергшиеся воздействию теплового шока, и клетки, подвергшиеся воздействию теплового шока, с последующей 1-часовой инкубацией в присутствии мелфалана (в дозе 30 или 100 мкг/мл). На рис. 6 и 7 представлены результаты исследования апоптоза в лимфоцитах мышей линий BALB/c и C57BL/6. Интактные клетки мышей обеих линий не обнаружили существенных различий. После 18-часовой инкубации интенсивность свечения объектов и их площадь у мышей линии BALB/c практически не отличались от таковых в интактных клетках, тогда как у мышей линии C57BL/6 наблюдались существенные раз-

Рис. 3. Результаты компьютерного сканирования радиоавтографов.

Светлые столбики — лимфоциты селезенки после инкубации в течение 1 ч при 37 °C; заштрихованные столбики — лимфоциты селезенки, подвергнутые тепловому шоку (42.5 °C в течение 1 мин) с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37 °C. Результаты представлены в относительных единицах: плотность × площадь (для Hsp) : плотность × площадь (для β-актина).



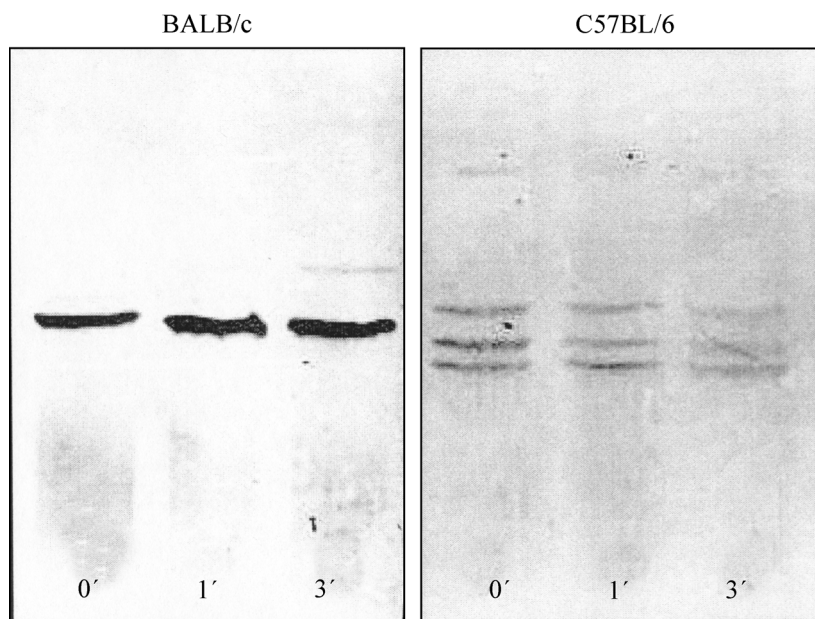


Рис. 4. Абсолютные количества белков теплового шока, определяемые методом Вестерн-иммуноблоттинга с антителами против Hsp68.

Клетки селезенки мышей BALB/c и C57BL/6 исследовали до или после 1- и 3-минутного теплового шока.

личия в величине обеих характеристик в зависимости от того, были ли клетки подвергнуты 18-часовому культивированию в среде, не содержащей митогенных факторов.

Дополнительная обработка относительно большими дозами алкилирующих агентов (30 и 100 мкг/мл) стимулировала процессы апоптоза и повреждение ДНК в клетках обеих исследованных линий. Эта стимуляция была более выраженной у низких продуцентов Hsp (мыши линии C57BL/6), причем при использовании более высокой дозы (100 мкг/мл) наблюдали полное исчезновение ядер, тогда как у мышей BALB/c свечение ДНК было еще впол-

не отчетливым. Тепловой шок у низких продуцентов Hsp, так же как и в экспериментах с антипролиферативным действием алкилирующих агентов, обнаруживал защитный эффект. Так, общая интенсивность свечения объектов при обработке клеток мелфаланом в дозе 30 мкг/мл после теплового шока была значительно выше, чем в клетках, преинкубированных при комнатной температуре ($P = 0.004$).

Обсуждение

Наши результаты подтверждают ранее опубликованные сообщения об адаптивной роли Hsp у различных животных, включая данные, касающиеся гомотермных и пойкилотермных видов, обитающих в районах с контрастными температурными условиями (Ulmasov et al., 1992; Evgen'ev et al., 2007; Подлипаева, Гудков, 2009). Эти исследования ответа на стресс, проведенные на немодельных животных, показали, что гены *Hsp* присутствуют во всех живых организмах не только в качестве SOS-системы, необходимой для того, чтобы справиться с неблагоприятными воздействиями окружающей среды, но и в целом оказывают влияние на функционирование и эволюцию этой системы (Evgen'ev et al., 2007).

В настоящем исследовании с помощью двух инбредных линий мышей, генетически контрастных по признаку чувствительности к действию алкилирующих соединений, нам удалось показать, что уровень синтеза белков теплового шока, принадлежащих к семейству Hsp70, зависит от генотипа животного. Количество мРНК для Hsp70, равно как и внутриклеточное содержание этих белков, оказалось существенно выше в лимфоцитах мышей линии BALB/c, чем в клетках мышей C57BL/6.

Важно отметить, что мыши, характеризующиеся более высоким содержанием Hsp, отличаются и более высокой степенью резистентности к действию алкилирующих агентов как на уровне пролиферации клеток-мишеней, так и в отношении чувствительности животных к имму-

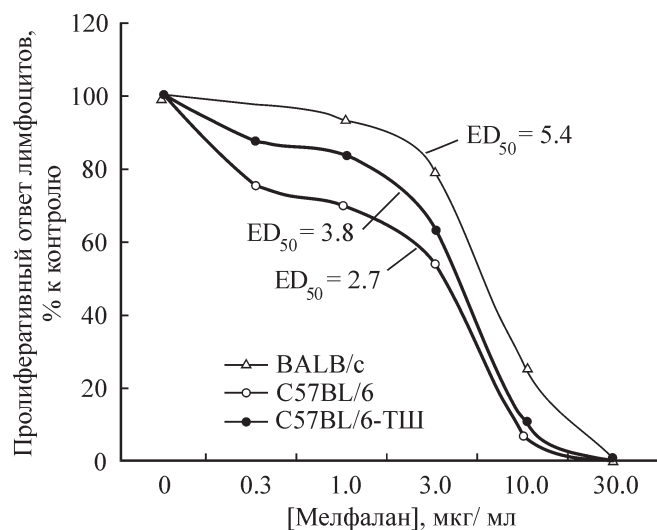


Рис. 5. Чувствительность лимфоцитов селезенки мышей разных линий к антипролиферативному действию мелфалана.

Серая кривая — клетки мышей линии BALB/c; черные кривые — клетки мышей линии C57BL/6; белые кружки — интактные клетки; черные кружки — клетки, подвергшиеся тепловому шоку (ТШ). ED₅₀ — расчетная доза мелфалана в мкг/мл, оказывающая 50%-ный ингибирующий эффект.

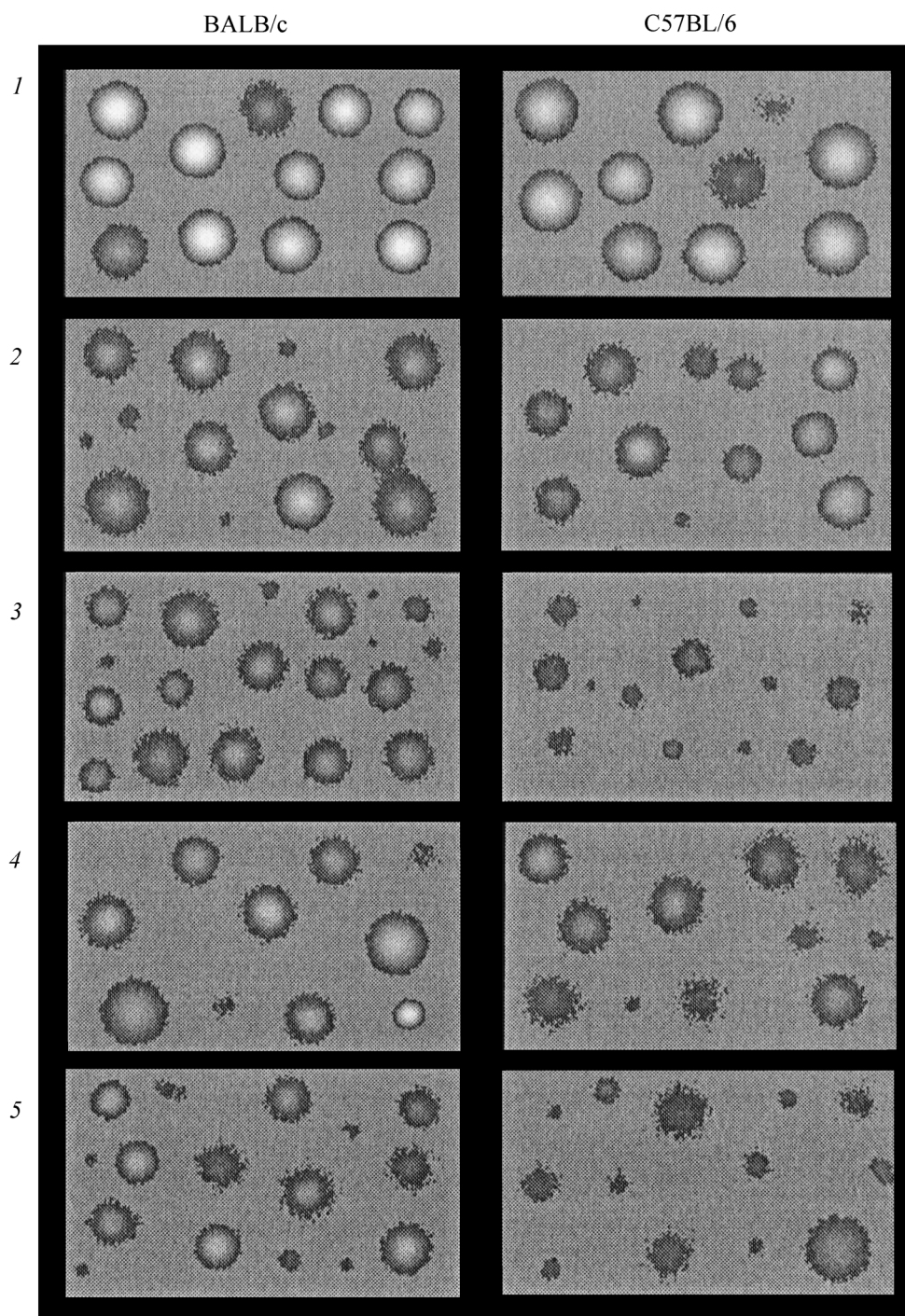


Рис. 6. Оценка состояния ядер лимфоцитов методом диффузии ДНК.

1 — свежесыведенные интактные клетки, 2 — инкубация 18 ч, 3 — обработка клеток мелфаланом в дозе 30 мкг/мл, 4 — тепловой шок (42,5 °С, 1 мин), 5 — тепловой шок + обработка мелфаланом. Окраска YOYO; увеличение 400×.

нодепрессивному действию этих препаратов (Pukhalsky et al., 1993). Корреляция между уровнем Hsp и чувствительностью клеток к антипролиферативному действию алкилирующих агентов не случайна, так как индукция синтеза Hsp в результате воздействия на клетки теплового шока повышала их резистентность к действию мелфалана (рис. 4, 6). Кроме того, лимфоциты мышей BALB/c, являющиеся высокими продуцентами Hsp, оказались более резистентными к апоптозу, индуцированному в результате относительно продолжительного культивирования кле-

ток в среде, лишенной митогенных факторов. Известно, что в культуре лимфоидных клеток, не подвергшихся опухолевой трансформации, если они не получают митогенного и (или) антигенного стимула, включаются механизмы апоптоза.

В то же время клетки мышей с низкой продукцией Hsp (C57BL/6), подвергшиеся тепловому шоку, обнаружили более высокий уровень выживаемости, чем клетки мышей той же линии, культивирование которых в течение 18 ч происходило без предварительного нагревания.

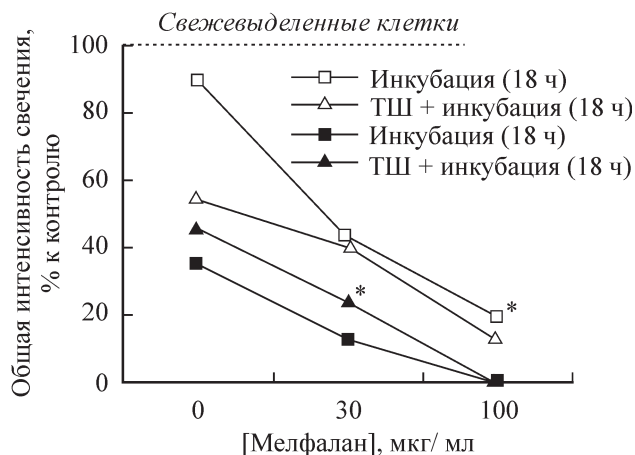


Рис. 7. Количественная оценка состояния ДНК в ядрах интактных лимфоцитов и лимфоцитов, обработанных мелфаланом, после 18-часовой инкубации в среде, не содержащей митогенных факторов.

Общая интенсивность свечения объекта — яркость свечения × площадь объекта. Белые маркеры — клетки мышей линии BALB/c, черные маркеры — клетки мышей линии C57BL/6, квадраты — инкубация при 37 °C в течение 18 ч, треугольники — инкубация при 37 °C в течение 18 ч после воздействия теплового шока (ТШ); звездочки — $P < 0.05$.

Такой на первый взгляд парадоксальный эффект связан, по нашему мнению, с активным синтезом *de novo* индуцибельных белков теплового шока (Hsp-*i*), имевшим место в результате кратковременного теплового воздействия. Полученные нами результаты показывают также, что гены *Hsp* могут вносить вклад в индивидуальную чувствительность к любым ксенобиотикам, включая химиотерапевтические препараты, что может представлять интерес для специалистов, работающих в области фармакогенетики.

Следует иметь в виду, что в сложной иерархии механизмов защиты организма высших позвоночных от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды белки теплового шока занимают нижнюю ступень. Однако филогенетически более молодые адаптационные механизмы, такие как иммунная, нервная и эндокринная системы, не только не отменяют действие Hsp, но органически включают эту древнюю систему защиты в сложные сетевые взаимодействия, обеспечивающие наше выживание в условиях постоянно меняющегося мира.

Список литературы

- Подлипаева Ю. И., Гудков А. В. 2009. Белки теплового шока семейства 70 кДа в клетках свободноживущих и амфизойных амебидных организмов. Цитология. 51 (12): 1019—1024.
- Chen G., Cao P., Goeddel D. V. 2002. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. Mol. Cell. 9: 401—410.
- Evgen'ev M. B., Garbuz D. G., Shilova V. Y., Zatsepina O. G. 2007. Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. J. Biosci. 32: 489—499.

Fink A. L. 1999. Chaperon-mediated protein folding. Physiol. Rev. 79: 425—449.

Jäättelä M., Wissing D., Bauer P. A., Li G. C. 1992. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. EMBO J. 11: 3507—3512.

Jäättelä M., Wissing D., Kokholm K., Kallunki T., Egeblad M. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like protease. EMBO J. 17: 6124—6134.

Lewis J., Devin A., Miller A., Lin Y., Rodriguez Y., Neckers L., Liu Z. G. 2000. 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. 275: 10 519—10 526.

Lyashko V. N., Vikulova V. K., Chernicov V. G., Ivanov V. I., Ulmasov K. A., Zatsepina O. G., Evgen'ev M. B. 1994. Comparison of the heat shock response in ethnically and ecologically different human populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91: 12 492—12 495.

Mayer A. B., Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular function and molecular mechanism. Cell. Mol. Life Sci. 62: 670—684.

Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol. Cell. Biol. 17: 5317—5327.

O'Farrell R. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell. 12: 1133—1141.

Pratt W. B. 1998. The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. Proc. Soc. Exp. Biol. 217: 420—434.

Pukhalsky A., Shmarina G. 2001. Stimulatory and protective effects of alkylating agents applied in ultra-low concentrations. Pharmacology. 62: 129—132.

Pukhalsky A., Shmarina G., Alioshkin V., Sabelnikov A. 2006. Alkylating drugs applied in non-cytotoxic doses as a novel compounds targeting inflammatory signal pathway. Biochem. Pharmacol. 72: 1432—1438.

Pukhalsky A. L., Toptygina A. P., Viktorov V. V. 1993. Immunosuppressive action of cyclophosphamide in mice: contribution of some factors to determination of strain differences. Int. J. Immunopharmacol. 15: 509—514.

Simon M. M., Reikerstorfer A., Schwarz A., Krone C., Luger T. A., Jäättelä M., Schwarz T. 1995. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence of increased cell viability and suppression of cytoline release. J. Clin. Invest. 95: 926—933.

Singh N. P. 2000. A simple method for accurate estimation of apoptosis. Exp. Cell Res. 256: 328—337.

Stankiewicz A. R., Lachapelle G., Foo C. P., Radicioni S. M., Mosser D. D. 2005. Ysp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 84: 5034—5037.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76: 4350—4354.

Ulmasov K. A., Shammako S., Karavaev K., Evgen'ev M. B. 1992. Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89: 1666—1670.

Zhang R., Luo D., Miao R., Bai L., Ge Q., Sessa W. C., Min W. 2005. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1-mediated apoptosis. Oncogene. 24: 3954—3963.

Поступила 12 III 2010

GENETIC HETEROGENEITY OF HEAT SHOCK PROTEIN SYNTHESIS
AS A FACTOR DETERMINING THE RESISTANCE OF MAMMALIA TO STRESSORS

A. L. Pukhalsky,¹ G. V. Shmarina,¹ I. V. Kapustin,² S. V. Stukalov,¹ D. A. Pukhalskaya,¹ V. A. Alioshkin²

¹ Research Centre for Medical Genetics RAMS
and ² G. N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow;
¹ e-mail: osugativer@yahoo.com

The relationship between the levels of 70 kDa family heat shock protein (Hsp) synthesis and lymphocyte sensitivity to stressors was investigated. Lymphocyte cultivation in mitogen deprived culture medium and (or) the cell treatment with alkylating agents have been used as a stress challenge. On the model of two inbred murine strains genetically contrasting by the sensitivity to alkylating agents we succeeded in demonstration that the basic level of Hsp synthesis depends on genotype. The quantity Hsp mRNA, as well as the intracellular level of the proteins were significantly higher in BALB/c than in C57BL/6 mice. The mice characterized by higher Hsp levels demonstrated higher resistance to alkylating agent action. The induction of surplus amount of Hsp by heat shock increased the cell resistance to the alkylating agent melphalan. Lymphocyte isolated from high Hsp producers, BALB/c mice, were more resistant to apoptotic signals induced by mitogen deprivation.

Key words: heat shock proteins, Hsp70, lymphocytes, stress, inbred mice, alkylating agents.

—————