

## НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, ПОВЫШАЮЩИЕ ЭКСПРЕССИЮ ШАПЕРОНА HSP70, И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© *Е. М. Еременко,<sup>1</sup> О. И. Антимонова,<sup>1</sup> О. Г. Шекалова,<sup>1</sup>  
С. Г. Полоник,<sup>2</sup> Б. А. Маргулис,<sup>1</sup> И. В. Гужова<sup>1,\*</sup>*

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,*  
<sup>и</sup> <sup>2</sup> *Тихоокеанский институт биоорганической химии РАН, Владивосток;*  
*\*электронный адрес: guzhova@mail.cytspb.rssi.ru*

Белок Hsp70 обладает шаперонной активностью, и это свойство связано с защитной функцией, которая продемонстрирована в опытах с использованием клеточных линий и животных. Поэтому особое значение приобретает поиск веществ, способных безвредным образом повысить содержание шаперона в тканях и клетках организма. В своей работе мы провели скрининг более 60 соединений и выявили два вещества, производные шиконина и эхинохрома, которые в микромолярных концентрациях способны увеличивать содержание шаперона в различных клетках человека. Под действием этих двух веществ в клетках эритролейкемии человека K562 также наблюдается значительное увеличение абсолютной шаперонной активности Hsp70, что может указывать на мобилизацию всего шаперонного механизма клетки. Оценка биологической активности соединений показала, что обработка ими приводит к увеличению доли выживших клеток K562 при обработке жестким тепловым шоком, перекисью водорода и стауроспорином на 20—50 % в зависимости от цитотоксического фактора. Результаты показывают, что при условии несложных химических модификаций на основе выбранных веществ можно получить фармакогенные препараты широкого профиля действия.

**Ключевые слова:** шапероны, индукторы шаперонов, шиконин, эхинохром.

Белки теплового шока, в частности шаперон Hsp70, составляют молекулярные системы, необходимые всем живым клеткам для нормального функционирования и для защиты от неблагоприятных воздействий. Молекулярные шапероны играют ключевую роль в клеточном гомеостазе, обеспечивая правильную конформацию белков, они защищают вновь синтезированные полипептиды от формирования неправильной структуры, помогают собирать и разбирать надмолекулярные комплексы, собранные из поврежденных белков (Hartl, Hayer-Hartl, 2002; Deuerling, Bukau, 2004; Bukau et al., 2006).

Нарушение конформации белков и их агрегация являются причиной целого ряда заболеваний (Perutz, 1999; Chiti, Dobson, 2006). Список конформационных болезней включает в себя такие патологии, как болезнь Гентингтона, болезнь Кеннеди, спиноцеребральные атаксии, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, амиотрофический латеральный склероз и прионные патологии. При повышении концентрации мутантных или поврежденных белков в клетке их олигомеры становятся токсичными или образуют агрегаты, которые, находясь внутри или в непосредственной близости к клетке, могут повреждать ее или тормозить внутриклеточный транспорт, метаболизм и другие процессы. Дезорганизация клеточных процессов приводит к гибели целых популяций клеток и (или) их дисфункции.

Каждая из указанных патологий поражает определенный класс нейронов и проявляется, как правило, в пожилом возрасте. Кроме того, в постмитотических клетках

здоровых пожилых людей, не страдающих указанными патологиями, также накапливаются белковые агрегаты, которые приводят к нарушению клеточной физиологии (Morimoto, Guervo, 2009).

В распоряжении клетки есть несколько защитных систем, призванных ликвидировать агрегаты через протеолиз соответствующих белков или не допускать их образования (Wyttenbach, 2004). Наиболее мощной из таких систем является шаперонный механизм, основанный на белках класса Hsp70, включая кошапероны Hdj1, Bag-1 и др. (Маргулис, Гужова, 2009). В огромном количестве работ показано, что увеличение экспрессии Hsp70 и Hdj1 в клетках приводит к снижению числа агрегатов и их размеров, подавлению процесса апоптоза и повышению жизнеспособности (Zhou et al., 2001; Wyttenbach et al., 2001; Sakahira et al., 2002).

Однако в клетках людей пожилого возраста в период, когда происходит нарушение клеточного гомеостаза и появляются белковые агрегаты, синтез шаперонов снижен и их исходное количество в клетке невысоко (Soti, Csermely, 2002). Поэтому поиск веществ, способных повысить уровень экспрессии шаперонов и, возможно, эффективность работы шаперонного механизма, представляется очень важным как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Задачи настоящего исследования — скрининг и анализ веществ, способных индуцировать экспрессию Hsp70, не вызывая при этом клеточной гибели. Мы использовали библиотеку низкомолекулярных веществ Тихоокеанского

института биоорганической химии ДВО РАН, в которую вошли следующие группы веществ: тритерпены даммаранового ряда и их О-гликозиды; гетероциклические природные алкалоиды из морских организмов и их производные и природные и синтетические 1, 4-нафтохиноны и их О- и S-гликозиды. Всего было проанализировано 60 соединений и выявлены 2 вещества, способные вызывать повышение уровня Hsp70 в клетках человека. Выбранные вещества относятся к группе нафтохинонов, точнее, к производным шиконина и эхинохрома.

### Материал и методика

**Клеточные культуры.** Клетки хронической миелогенной лейкемии человека K562 культивировали на среде RPMI-1640, клетки глиобластомы человека T98G — на среде DMEM, содержащих 10 % эмбриональной сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина, при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония). Клетки T98G высевали в концентрации 5×10<sup>4</sup> кл/мл за 1 сут до эксперимента, клетки K562 — непосредственно перед экспериментом в концентрации 0.5×10<sup>6</sup> кл/мл. Для опытов использовали культуры, доля мертвых клеток в которых не превышала 5 %. Концентрацию клеток определяли с помощью камеры Ньюбауэра. Исследуемые препараты растворяли в ДМСО и в определенных концентрациях вносили в культуры. В контрольные пробы вносили ДМСО (1 мкл/мл). По прошествии указанного времени клетки лизировали в буферном растворе RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA и 0.5 % Triton X-100), определяли концентрацию белка в экстрактах (Bradford, 1976) и по 30 мкг белка из каждой пробы использовали для приготовления электрофорезных проб, а остальное — для измерения шаперонной активности Hsp70 с помощью специальной иммуоферментной тест-системы (см. ниже).

**Иммуоблотинг.** Белки разделяли методом SDS-электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Перенос электрофоретически разделенных белков на нитроцеллюлозную мембрану Whatman (Sigma-Aldrich, США) производили при помощи аппарата Trans-Blot (Bio-Rad, США). Зону белка Hsp70 выявляли с помощью специфичных моноклональных антител (клон 3B5, произведены в лаборатории) в разведении 1 : 1000 и вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 10 000 (Sigma, США). Для визуализации пероксидазной реакции использовали методику усиленной хемилуминесценции согласно инструкции фирмы-производителя (Amersham, Великобритания).

**Определение субстратсвязывающей (шаперонной) активности Hsp70** проводили с помощью ИФА по модифицированному Новоселовым с соавторами (2004) методу (Wawrzynow, Zylicz, 1995). Субстратный белок-мишень, карбоксиметилированный лактальбумин (КМЛА), получали путем денатурации лактальбумина в 8 М мочеvine, после чего в раствор белка добавляли дитиотреитол до конечной концентрации 10 mM. Далее реакцию алкилирования запускали внесением в раствор белка 0.5 М иодоацетамида и останавливали ее через 24 ч добавлением 10 mM дитиотреитола. Готовый КМЛА разносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета для ИФА в концентрации 10 мкг/мл в фосфатно-солевом растворе (ФСР). Сайты неспецифического связывания блокировали 0.3%-ным раствором бычьего сыворо-

точного альбумина (Sigma, США) в ФСР. Далее в лунки вносили клеточные экстракты в концентрациях (титрах) 5—50 мкг/мл по 200 мкл. Белок Hsp70, входящий в состав клеточных экстрактов, связывался с денатурированным белком-мишенью. Выявление шаперона осуществляли с помощью специфических аффинноочищенных поликлональных антител RAF против Hsp70, полученных в лаборатории, в разведении 1 : 1000 и вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 10 000 (Sigma, США). Ферментативную реакцию проводили путем внесения в лунки раствора, содержащего перекись водорода и хромоген ТМБ. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 450 нм с помощью анализатора иммунохимических реакций «Флюорофот» (ООО СКБ Пробанаучприбор, Россия). Все этапы ИФА чередовали трехкратной промывкой лунок; в качестве рабочего и промывающего использовали буферный раствор А (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 0.05%-ный Triton X-100).

**Определение жизнеспособности клеток** осуществляли методом МТТ в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Molecular Probes, США). В лунки 96-луночного планшета вносили одновременно по 100 мкл клеточной суспензии с концентрацией клеток 0.2·10<sup>6</sup> кл./мл и растворы с различными концентрациями исследуемых соединений, с которыми клетки инкубировали в течение 6 ч. В те же лунки по прошествии указанного времени вносили индукторы клеточной гибели стауропорин в концентрации 1 мкМ или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрации 500 мкМ на 18 ч или подвергали клетки «жесткому» тепловому шоку (45 °С, 30 мин). В контрольные пробы вносили 1 мкл/мл ДМСО. В лунки добавляли по 10 мкл триазолилтетразолийброимида синего (МТТ), растворенного в ФСР (0.005 г/мл), и инкубировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> 4 ч. Затем в лунки вносили по 100 мкл изопропилового спирта с 0.005 М HCl, содержимое лунок перемешивали до растворения образовавшегося осадка формазана и измеряли интенсивность окраски с помощью анализатора иммунохимических реакций «Флюорофот» при длинах волн 570 и 630 нм.

### Результаты

На первом этапе с помощью иммуоблотинга был произведен скрининг соединений с целью найти вещества, способные вызывать повышение экспрессии шаперона Hsp70, нетоксичные в высоких концентрациях для клеток. Первичный скрининг проводили с использованием клеток глиобластомы человека T98G. Было проанализировано более 60 соединений, каждое из которых использовали в рабочей концентрации 10 мкМ. Одновременно с помощью МТТ оценивали цитотоксический эффект веществ, взятых в концентрациях 1, 10 и 100 мкМ (рис. 1, б). На рис. 1, а представлен результат иммуоблотинга лизатов клеток T98G, инкубированных с некоторыми из исследуемых препаратов соединений. В результате первичного скрининга были отобраны два препарата — U-133, нетоксичный для клеток и вызывающий умеренную экспрессию Hsp70 в концентрации 10 мкМ, и U-103, более токсичный при высоких концентрациях (рис. 1, б), но вызывающий выраженное повышение синтеза шаперона.

В основе препарата U-103 лежит природный нафтазарин — красный пигмент шиконин, выделенный из корней



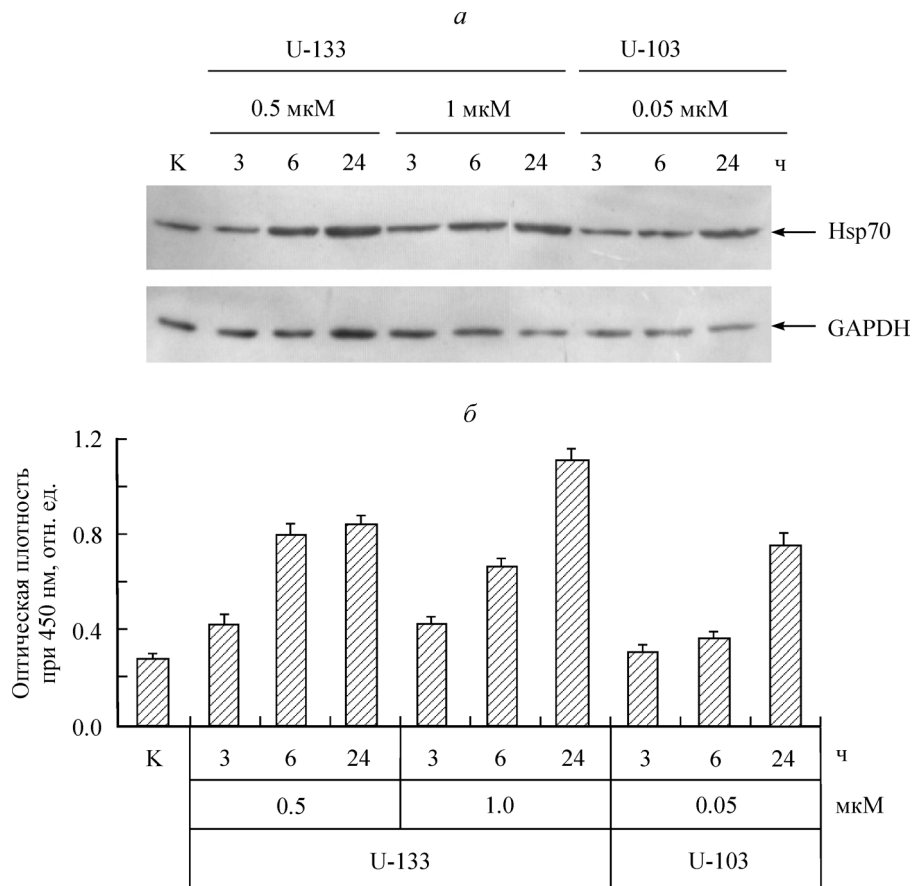


Рис. 2. Низкомолекулярные препараты шиконин U-103 и эхинохром U-133 вызывают в низких концентрациях синтез активного Hsp70.

*a* — клетки эритробласты человека K562 инкубировали с веществами U-103 и U-133 в указанных концентрациях в течение 3, 6 и 24 ч, после чего клеточные лизаты подвергали анализу с помощью иммуноблоттинга с антителами против Hsp70; *b* — анализ шаперонной активности методом ИФА. К — контроль.

перон выявляли с помощью специфических поликлональных антител и вторых антител с ферментативной меткой. На рис. 2, *b* представлен профиль активности шаперона Hsp70 в клетках K562, инкубированных с препаратами в течение указанного времени. Шаперонная активность возрастает прямо пропорционально с количеством белка Hsp70, выявляемого методом иммуноблоттинга в тех же клетках (рис. 2, *a*). Оба препарата вызвали увеличение количества активного, т. е. способного связывать денатурированный белок-субстрат КМЛА, причем степень этого увеличения зависела от времени воздействия, а максимум величины абсолютной шаперонной активности наблюдался через 24 ч после начала инкубации с препаратами (рис. 2, *b*).

Защитное действие шаперона в клетках K562 после воздействия препаратами изучали с помощью МТТ в формате 96-луночных плат. Препараты вносили в лунки 96-луночной платы за 6 ч до внесения индукторов клеточной гибели или до того, как клетки подвергали «жесткому» тепловому шоку (45 °С, 30 мин). Данные, представленные на рис. 3, демонстрируют, что предварительная индукция синтеза шаперона в клетках K562 с помощью препаратов U-133 и U-103 увеличивала количество живых клеток после воздействия индуктором апоптоза стауропорином (1 мкМ) с  $65 \pm 2.6$  до  $84.5 \pm 4.8$  и  $77.2 \pm 3.1$  % соответственно (рис. 3, *a*). Препарат U-133 повышал количество жизнеспособных клеток после воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(500 мкМ) с  $75 \pm 3.2$  до  $90 \pm 4.1$  % (рис. 3, *b*), а препарат U-103 — при жестком тепловом шоке (45 °С, 30 мин) повышал жизнеспособность клеточной популяции с  $38 \pm 3.7$  до  $69 \pm 2.6$  % (рис. 3, *в*).

## Обсуждение

Поиск факторов, способных повышать уровень экспрессии шаперона Hsp70, ведется уже более 20 лет. То значение, которое ему придается, связано в первую очередь с уникальными свойствами шаперона. Изменение уровня Hsp70 в клетках, содержащих мутантные белки с нарушенной конформацией, которые являются причиной целого ряда конформационных заболеваний, приводит к снижению количества образующихся агрегатов и, таким образом, спасает нервные клетки от гибели. Сохранение клеточного гомеостаза и правильного белкового фолдинга — необходимое условие существования любой клетки, даже не содержащей мутантных белков. В клетках пожилых людей происходит накопление белковых агрегатов, а количество синтезируемого шаперона понижается, в результате чего снижается контроль за качеством клеточных белков (Morimoto, 2008). Повышение активности общего для большинства генов шаперонов транскрипционного фактора HSF1 при ограничении диеты у нематод *C. elegans* значительно повышает продолжительность жизни

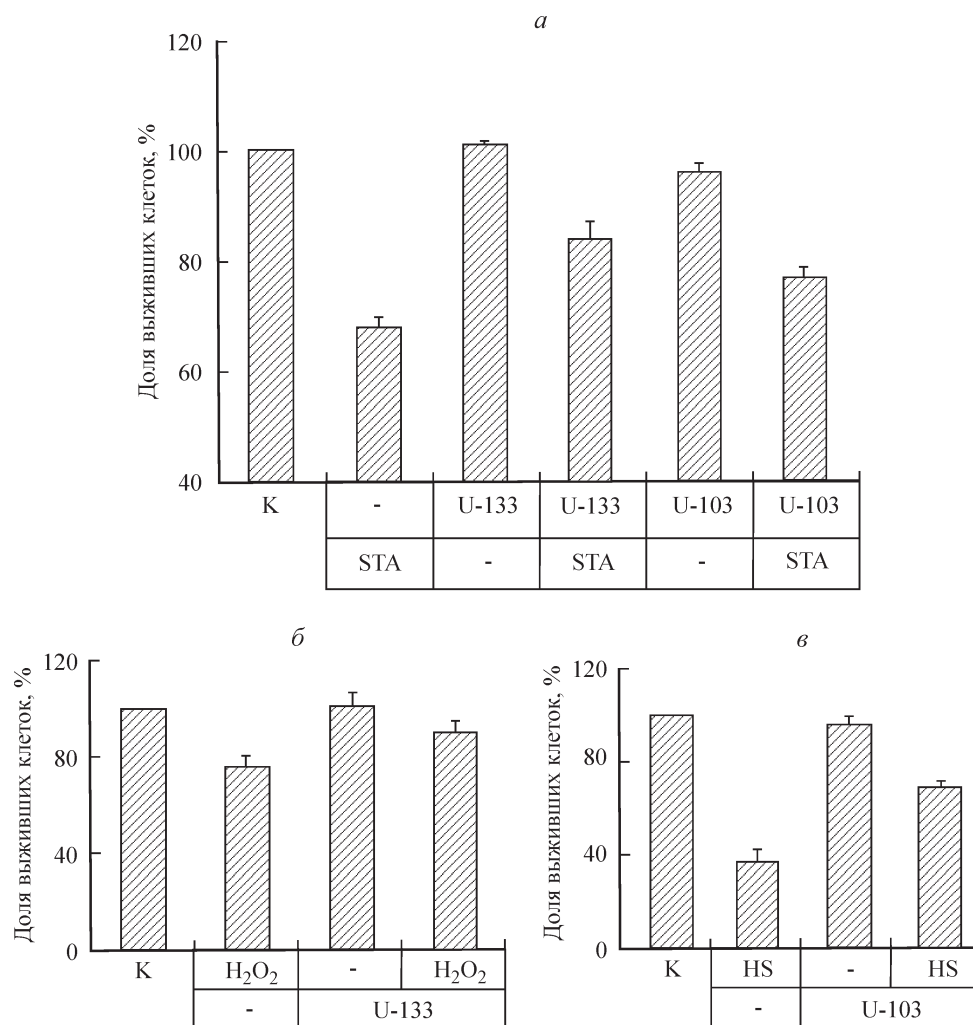


Рис. 3. Предобработка клеток K562 препаратами шиконина U-103 и эхинохрома U-133 приводит к повышению устойчивости клеток K562 к действию стауроспорина (а), перекиси водорода (б) и жесткого теплового шока (в).

STA — стауроспорин, HS — тепловой шок. Для каждого случая представлены данные 1 из 3 независимых экспериментов в виде среднего и ошибки среднего. К — контроль.

ни, а подавление его функции, напротив, укорачивает (Hsu et al., 2003). В процессе старения высших организмов экспрессия HSF1 со временем деградирует, делая клетки менее резистентными к клеточным оксидантам (Calderwood et al., 2009). Способность к синтезу Hsp70 с возрастом ослабевает и в мышечной ткани. В норме энергичные сокращения мышц приводят к синтезу белков теплового шока, но в мышечной ткани старых животных и пожилых людей этот процесс подавлен. Падение мышечной массы и утрату мышечной силы связывают с ослаблением способности к синтезу Hsp70. Действительно, постоянная экспрессия Hsp70 у трансгенных мышей частично отменяет эти эффекты (Kayani et al., 2008; Calderwood et al., 2009). Исходя из перечисленных данных медицинские стратегии, направленные на увеличение уровня шаперона в клетках, представляются весьма перспективными.

В настоящее время существует несколько подходов к применению шаперонов в терапии конформационных патологий. Разрабатываются так называемые химические шапероны, т. е. малые молекулы, чаще всего представляющие собой полисахариды или осмолиты, например эктоин или бетаин (Furusho et al., 2005). Такими молекулами

предлагается усилить шаперонные механизмы в клетках, и два последних вещества показали свою, пусть небольшую, антиагрегатную активность в клетках, моделирующих болезнь Джозеф—Мачадо, одну из так называемых полиглутаминовых патологий (Furusho et al., 2005).

Кроме того, выяснилось, что ингибитор АТФ-зависимой активности клеточного шаперона Hsp90 гелданамицин, производные которого являются на сегодняшний день наиболее перспективными противоопухолевыми препаратами, индуцирует экспрессию Hsp70 и защищает клетки мозга от стимулятора симптомов болезни Паркинсона, фактора MPTP (Shen et al., 2005).

В 2004—2005 гг. был опубликован ряд работ, демонстрирующих эффективность препаратов, полученных из некоторых растений, с адаптогенной активностью в модуляции экспрессии Hsp70. К таким препаратам относится селастрол, обработка которым приводит к синтезу Hsp70 и увеличению устойчивости клеток к цитотоксическим факторам (Westerheide et al., 2004). Эти препараты, выделяемые из растений, которые используются в традиционной китайской медицине, отличаются способностью к активации транскрипционного фактора теплового шока HSF1, регулятора почти всех индуцибельных генов (Wes-

terheide, Morimoto, 2005). Что существенно, селастрол и подобные ему вещества, обнаруженные в различных лекарственных травах, уже используются в терапии многих патологий, в том числе связанных с агрегированием мутантных белков в нейронах.

Следует сказать, что все описанные выше индукторы шаперонов обладают своими достоинствами и недостатками. Например, селастрол, на который возлагается много надежд, показал довольно скромную способность к индукции Hsp70 и увеличению жизнеспособности моторных нейронов в культуре. Более того, сам по себе препарат обладал выраженной нейротоксичностью (Kalmar, Greensmeeth, 2009). Авторы последней работы отдают предпочтение другому индуктору Hsp70 — аримокломолу, который демонстрирует терапевтический эффект в мышинной модели амиотрофического латерального склероза (ALM). Аримокломол не только увеличивал экспрессию Hsp70 в нервной ткани трансгенных мышей SOD G93A, но и повышал жизнеспособность моторных нейронов, общую продолжительность жизни мышей и приводил к увеличению мышечной силы (Kalmar et al., 2008). Однако и у аримокломолы, показавшего замечательный эффект в биологических экспериментах, на второй стадии клинических испытаний, по устным сообщениям специалистов, были обнаружены побочные эффекты. Из этого следует, что поиск индукторов шаперонов, которые можно было бы использовать в клинике, не закончен. В связи с этим мы начали анализ библиотеки веществ, созданной в ТИБОХ ДВО РАН, которая содержала тритерпены даммаранового ряда, гетероциклические природные алкалоиды из морских организмов, а также природные и синтетические 1, 4-нафтохиноны и их О- и S-гликозиды. Нам удалось обнаружить два вещества, шиконин U-103 и эхинохром U-133, которые в фармакологических концентрациях активировали синтез Hsp70 в клетках всех изученных клеточных линий. Уровень накопленного в течение 12 ч белка Hsp70 превышал контрольный в разы, причем повышение было зарегистрировано в опытах с клетками различного происхождения. По аналогии с селастролом представляется вполне вероятным, что указанные вещества будут иметь Hsp70-индуцирующую активность в организме. Характерной особенностью Hsp70 является шаперонная активность, с которой связывают биологические функции этого белка, и было существенно определить ее в клетках, обработанных обоими соединениями. Для ее измерения мы использовали модифицированную тест-систему, и с ее помощью удалось выяснить, что соединения U-103 и U-133 увеличивают шаперонную активность также в разы. Как ранее нами было установлено, такое увеличение шаперонной активности Hsp70 в клетках, обработанных тепловым шоком, происходит благодаря не только росту его количества, но и повышению уровня кошаперона Hdj1/Hsp40 (Новоселов и др., 2005). Поэтому мы предполагаем, что рассматриваемые здесь вещества повышают синтез обоих шаперонов, которые работают в связке и защищают клетки мозга от огромного числа патогенов, в частности от белков с полиглутаминовыми повторами, образующих агрегаты (Zhou et al., 2001). Определение цитопротекторной активности выбранных нами веществ показало, что обработка ими клеток приводит к снижению уровня смертности от трех факторов — летального теплового шока, перекиси водорода и стауриспорина. Это снижение было особенно ощутимым для вещества U-103, обработка которым приводила к повышению жизнеспособности клеток K562 при

тепловом шоке при 45 °С практически в 2 раза. Таким образом, мы показали, что два выбранных нами соединения стимулируют синтез Hsp70, увеличивают его шаперонную активность и соответственно повышают защитный потенциал клетки. Иными словами, оба препарата демонстрируют фармакологический потенциал и, несмотря на недостатки — ограниченную растворимость в водной среде и умеренную токсичность, могут быть доработаны. Именно такая коррекция химической структуры веществ проводится в настоящее время.

Авторы благодарят за содействие в самом начале работ сотрудников Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН и директора института В. А. Стоника.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01392) и Федерального центра научно-технических программ (ГК № 02.512.11.2949).

### Список литературы

- Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2009. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс. Цитология. 51 (3) : 219—228.
- Новоселов С. С., Новоселова Т. В., Москалева О. С., Маргулис Б. А., Гужова И. В. 2004. Динамика шаперонных комплексов Hsp70 с белками-помощниками Hdj1 и Bag1 в реакции клеток эритролейкемии человека K562 на тепловой стресс. Цитология. 46 (7) : 620—627.
- 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.
- Bukau B., Weissman J., Horwich A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. Cell. 125 : 443—451.
- Calderwood S. K., Murshid A., Prince T. 2009. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging — a mini-review. Gerontology. 55 : 550—558.
- Chiti F., Dobson C. M. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu. Rev. Biochem. 75 : 333—366.
- Deuerling E., Bukau B. 2004. Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 39 : 261—277.
- Fewell S. W., Smith C. M., Lyon M. A., Dumitrescu T. P., Wipf P., Day B. W., Brodsky J. L. 2004. Small molecule modulators of endogenous and co-chaperone-stimulated Hsp70 ATPase activity. J. Biol. Chem. 279 : 51 131—51 140.
- Furusho K., Yoshizawa T., Shoji S. 2005. Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado—Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. Neurobiol. Dis. 20 : 170—178.
- Hartl F. U., Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science. 295 : 1852—1858.
- Hsu A. L., Murphy C. T., Kenyon C. 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. Science. 300 : 1142—1145.
- Kalmar B., Greensmith L. 2009. Activation of the heat shock response in a primary cellular model of motoneuron neurodegeneration—evidence for neuroprotective and neurotoxic effects. Cell Mol. Biol. Lett. 14 : 319—335.
- Kalmar B., Novoselov S., Gray A., Cheetham M. E., Margulis B., Greensmith L. 2008. Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1 mouse model of ALS. J. Neurochem. 107 : 339—350.
- Kayani A. C., Close G. L., Broome C. S., Jackson M. J., McArdle A. 2008. Enhanced recovery from contraction-induced damage

in skeletal muscles of old mice following treatment with the heat shock protein inducer 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin. *Rejuvenation Res.* 11 : 1021—1030.

Morimoto R. I. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Develop.* 22 : 1427—1438.

Morimoto R. I., Cuervo A. M. 2009. Protein homeostasis and aging: taking care of proteins from the cradle to the grave. *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* 64 : 167—170.

Perutz M. F. 1999. Glutamine repeats and neurodegenerative diseases. *Molecular aspects. Trend Biochem. Sci.* 24 : 58—63.

Sakahira H., Breuer P., Hayer-Hartl M. K., Hartl F. U. 2002. Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 16 412—16 418.

Shen H. Y., He J. C., Wang Y., Huang Q. Y., Chen J. F. 2005. Geldanamycin induces heat shock protein 70 and protects against MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *J. Biol. Chem.* 280 : 39 962—39 969.

Soti C., Csermely P. 2002. Chaperones come of age. *Cell Stress Chaperones.* 7 : 186—190.

Wawrzynow A., Zyllicz M. 1995. Divergent effects of ATP on the binding of the DnaK and DnaJ chaperones to each other, or to

their various native and denatured protein substrates. *J. Biol. Chem.* 270 : 19 300—19 306.

Westerheide S. D., Bosman J. D., Mbadugha B. N., Kawahara T. L., Matsumoto G., Kim S., Gu W., Devlin J. P., Silverman R. B., Morimoto R. I. 2004. Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection. *J. Biol. Chem.* 279 : 56 053—56 060.

Westerheide S. D., Morimoto R. I. 2005. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J. Biol. Chem.* 280 : 33 097—33 100.

Wytenbach A. 2004. Role of heat shock proteins during polyglutamine neurodegeneration: mechanisms and hypothesis. *J. Mol. Neurosci.* 23 : 69—96.

Wytenbach A., Swartz J., Kita H., Thykjaer T., Carmichael J., Bradley J., Brown R., Maxwell M., Schapira A., Orntoft T. F., Kato K., Rubinsztein D. C. 2001. Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10 : 1829—1845.

Zhou H., Li S. H., Li X. J. 2001. Chaperone suppression of cellular toxicity of huntingtin is independent of polyglutamine aggregation. *J. Biol. Chem.* 276 : 48 417—48 424.

Поступила 9 XI 2009

#### NOVEL COMPOUNDS INCREASING CHAPERONE HSP70 EXPRESSION AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

E. M. Eremenko,<sup>1</sup> O. I. Antimonova,<sup>1</sup> O. G. Shekalova,<sup>1</sup> S. G. Polonik,<sup>2</sup> B. A. Margulis,<sup>1</sup> I. V. Guzhova<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg and <sup>2</sup> Pacific Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Vladivostok;

\* e-mail: guzhova@mail.cytspb.rssi.ru

Hsp70 possesses chaperonic activity, the property associated with the protective function that was demonstrated in experiments on a great number of cell and animal models. Therefore, it seems important to search for the substances able to innocuously elevate the chaperone concentration in an organism cells and tissues. In our work, we screened of more than 60 compounds and found two chemicals, derivatives of shikonin and echinochrome that able to increase the chaperone level in a variety of human cells. It was shown that in human erythroleukemia K562 cells treated with the both substances concomitantly with elevation of Hsp70 level the absolute chaperonic activity was also increased; this can indicate mobilization of the whole cellular chaperonic machinery by above mentioned compounds. Estimating biological activity of the two substances, we demonstrated that treatments of cells by them prior to hard heat stress, hydrogen peroxide or staurosporine reduced cell mortality by 20—50 % depending on a cytotoxic factor. The results show that after simple chemical modifications these compounds might be taken as a basis of pharmaceuticals for therapy of wide range of disorders.

Key words: chaperone, chaperone inducer, shikonin, echinochrome.