**Кайгородова, Евгения Викторовна. Молекулярные механизмы регуляторного влияния белков теплового шока на апоптоз опухолевых клеток : диссертация ... доктора медицинских наук : 14.03.03 / Кайгородова Евгения Викторовна; [Место защиты: ГОУВПО "Сибирский государственный медицинский университет"].- Томск, 2012.- 256 с.: ил.**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЛСЛЛ4^СЛЛЛб

у І *ґ* І *і* і *Г J* /■ *-yj* у м

Кайгородова Евгения Викторовна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯТОРНОГО ВЛИЯНИЯ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА НА АПОПТОЗ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

14.03.03 - патологическая физиология 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,

профессор

Н.В. Рязанцева

академик РАМН,

Заслуженный деятель науки РФ,

профессор

В.В. Новицкий

Томск-2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ 4

[ВВЕДЕНИЕ 8](#bookmark0)

ГЛАВА 1. Современные представления о молекулярных механизмах регуляции апоптоза: роль белков теплового шока (обзор литературы)

1. Сигналпередающие пути апоптоза в клетке 17
2. [Белки теплового шока: классификация и функции 29](#bookmark5)
3. [Семейство белков теплового шока 90 кДа 34](#bookmark6)
4. [Семейство белков теплового шока 70 кДа 39](#bookmark8)
5. [Семейство белков теплового шока 60 кДа 40](#bookmark7)
6. [Семейство низкомолекулярных белков теплового шока 41](#bookmark9)

1.3. Белки теплового шока и апоптоз: молекулярные механизмы

взаимоотношения 44

1. [4. Белки теплового шока и опухолевые заболевания 49](#bookmark10)

[ГЛАВА 2. Материал и методы исследования 56](#bookmark12)

1. [Общая характеристика исследуемого материала 56](#bookmark13)
2. [Характеристика опухолевых клеток линии Jurkat 56](#bookmark14)
3. [Характеристика опухолевых клеток линии ТНР-1 57](#bookmark15)
   1. [Методы исследования 58](#bookmark16)
      1. [Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови 62](#bookmark17)
      2. [Культивирование опухолевых клеток линий ТНР-1, Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови 62](#bookmark18)
      3. Культивирование опухолевых клеток с ингибиторами белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 63
      4. [Культивирование клеток с индукторами апоптоза 65](#bookmark19)
      5. Оценка реализации апоптоза опухолевых клеток линий ТНР-1, Jurkat и мононуклеарных лейкоцитов крови в аннексиновом тесте методом флуоресцентной микроскопии 66
      6. Оценка активности каспазы 8 и 3 в опухолевых клетках 66

2.2.7.0пределене активных форм каспаз-8 и -3 методом

иммуноферментного анализа 67 2.2.8. Оценка изменения трансмембранного потенциала митохондрий

методом проточной лазерной цитометрии 69

[2.2.9.Определение содержания белков семейства Bcl-2, Р53, NF-kB, белков теплового шока (Hsp90, Нэр27)и их фосфорилированных форм методом вестерн-бл оттинга 70](#bookmark22)

1. [Оценка экспрессии генов (уровня мРНК) белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и мононуклеарных лейкоцитах крови 72](#bookmark23)
2. [Определение количества TNF-Rl-презентирующих клеток методом проточной цитометрии 79](#bookmark24)
3. [Оценка продукции TNFa в супернатантах клеток методом иммуноферментного анализа 79](#bookmark25)
4. Определение уровня sTNF-Rl (растворимая форма TNF-R1) в супернатантах клеток методом иммуноферментного анализа 80
5. [Оценка экспрессии FasR и FasL на поверхности клеток методом проточной цитометрии 81](#bookmark26)
6. [Статистическая обработка результатов 81](#bookmark27)

ГЛАВА 3. Особенности экспрессии генов и фосфорилированного статуса белков теплового шока (Hsp90 и Hsp 27) в опухолевых клетках 83

[ГЛАВА 4. Роль белков теплового шока (Hsp90 и Hsp 27) в регуляции рецепторного пути апоптоза опухолевых клеток 98](#bookmark28)

ГЛАВА 5. Роль белков теплового шока (Hsp90 и Hsp 27) в регуляции митохондриального пути апоптоза 127

[ГЛАВА 6. Шапероны (Hsp90, Hsp 27) и белок Р53: молекулярные основы взаимоотношения 144](#bookmark29)

[ГЛАВА 7. Роль белков теплового шока в регуляции NF-kB сигнального пути 153](#bookmark30)

ГЛАВА 8. Молекулярные механизмы дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток в условиях селективного ингибирования Hsp90 и Hsp 27 in vitro 162

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 193](#bookmark11)

[ВЫВОДЫ 197](#bookmark37)

[СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 199](#bookmark38)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

ПКГ - программированная клеточная гибель

MHJI - мононуклеарные лейкоциты

ФС - фосфатидилсерин

17-AAG - 17-аллиламино-17-гельданамицин

ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) - семейство белковых металлопротеиназ

AIF (apoptosis inducing factor) - апоптозиндуцирующий фактора Akt - серин-треониновая киназа

Akt/PKB - серин-треониновая киназа/протеинкиназа В

ANT (adenine nucleotide translocator) - адениннуклеотид- транслоказа

API (activator protein-1 transcription factor) - активатор транскрипционного

фактора

Apaf-1 (apoptosis protease activating factor) - фактор активации протеаз ASK-1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1) - апоптотическая сигнал - регулирующая киназа

Bcl-2 (В-cell leukaemia-2) - белки-регуляторы апоптоза

CAD (caspase-activated DNAase) - ДНКаза, активируемая каспазой

CARD (caspase activation and recruitment domain) - домен активации и

мобилизации каспазы

Cdc37 - ко-шаперон Hsp90

с-ІАР - ингибитор (специфических протеиназ) апоптоза

CRD (cystein rich domain) - богатый цистеином домен

CsA (Cyclosporine А) - циклоспорин А

Cyp-D (cyclophilin D) - циклофилин D

DD (death domain) - домен смерти

DED (death-effector domain) - домен эффектора смерти

FADD (Fas-associated protein with death domain) - Fas-ассоциированный белок

FasL - Fas-лиганд

FasR - Fas-рецептор

FITC - флуоресцин-изотиоционат

FLIP - FLICE-ингибирующий белок

GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GSK-3b (glycogen synthase kinase-3b) - киназа гликогенсинтазы-ЗЬ

HLA (human leukocyte antigens) - главный комплекс гистосовместимости

HSF (heat shock factor) - фактор теплового шока

Hsp (heat shock proteins) - белки теплового шока

IAP (inhibitor of apoptosis proteins) - ингибитор апоптоз-специфических протеаз

IkB - ингибитор NF-kB

IKK - киназный комплекс NF-kB

IL — интерлейкин

INFy (interferon у) - интерферон у

I-кВ - ингибитор кВ

JNK (c-Jun N-terminal kinase) - С-Jun N-терминальная киназа

JNK (c-Jun N-terminal kinase) или SAPK (stress-activated protein kinase) -

Янус-киназы

Jurkat - опухолевые клетки Т-лимфобластного лейкоза человека KRIBB3-5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl) isoxazole MAP-kinase/ERK-kinase (mitogen-activated protein kinase /extracellular signal - regulated kinase) - митогенактивируемая протеинкиназа

mPTP (mitochondrial permeability transition pores) - митохондриальные поры временной проницаемости

NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated В cells; nuclear

factor-кВ) - ядерный фактор

NGF (nerve growth factor) - фактора роста нервов

NGF-R - рецептора фактора роста нервов NK (natural killer) - натуральные киллеры NOS (NO-synthasa) - синтаза окиси азота PARP - poly(-ADP-ribose)polymerase

PBR/TSPO (mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein) - периферический бензодиазепиновый рецептор PI (propidium iodide) - пропидий йодида

PI(3)K (phosphotidylinositol-3-kinase) - фосфотидилинозитол-3-киназа

РКА (protein-serine kinase A) - протеинсериновая киназа A

PKD (protein-serine kinase D) - протеинсериновая киназа D

Raf (proto-oncogene serine/threonine-protein kinase) - серин-треониновая

протеинкиназа

Rb - ретинобластома

RIP (receptor interacting proteins) - адаптерный белок r-TNFa - рекомбинантный TNF альфа sFasL - растворимый Fas-лиганд

sHsp (small heat shock proteins) - малые белки теплового шока sTNF-R - растворимая форма рецептора фактора некроза опухоли ТНР-1 - опухолевые клетки острой моноцитарной лейкемии человека TG2 (transglutaminase) - трансглутаминаза 2

TNF-R (tumor necrosis factor receptor) - рецептор фактора некроз опухоли TNFRSF (tumor necrosis factor receptor superfamily) - суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли

TNFa (tumor necrosis factor a) - фактор некроза опухоли альфа

TNFp (tumor necrosis factor P) - лимфотоксин

TRADD (TNF-R-associated death domain) - адаптерный белок

TRAF (TNF receptor-associated factor) - фактор, ассоциированный с TNF-R

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand

VDAC (voltage dependent anion channe) - потенциал-зависимый анионный канал

VEGF (vascular endothelial growth factor) - сосудистый эндотелиальный фактора роста

МАРКАР-киназа ((MAPK)-activated protein kinase (MK)) протеинкиназа,

активируемая митоген-активируемой протеинкмназой

МЕК (MARK/ERK kinase) - киназа JNK

MEKK1(MARK/ERK kinase kinases) - киназа МЕК

р38 MAP-киназа-активируемая стрессом протеинкиназа

Cdk - циклин-зависимые киназы

c-FLIP - FLICE-ингибирующий белок

Л\|/т - трансмембранный потенциал митохондрии

ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы**

Значимость программированной клеточной гибели определяется ее участием во многих процессах, лежащих в основе жизнедеятельности макроорганизма. Эндогенная регуляция апоптоза или его регуляция внешними воздействиями является актуальным аспектом теоретических и практических исследований. Срыв механизмов индукции апоптоза может приводить к его ингибированию или, напротив, к неадекватному активированию и лежать в основе патогенеза различных заболеваний [Feitelson М.А. et al., 1998; Ярилин *А.А.,* 2001; Freeman A.J. et al., 2001; Фильченков A.A., 2003; Kroemer G., Galluzzi L. et al., 2009; Рязанцева H.B. и соавт., 2009, 2011]. Ингибированием апоптоза сопровождаются опухолевый процесс, аутоиммунные заболевания, вирусные инфекции, а при нейродегенеративных, сердечно-сосудистых, некоторых заболеваниях печени и почек, лучевой болезни происходит, напротив, активация программированной гибели клеток [Elsasser A. et al., 2000; Швембергер И.Н., Гинкул А.Б., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2006; Рязанцева Н.В. и соавт., 2006, 2009, 2011]. С позиции дизрегуляции апоптоза можно объяснить патогенез многих заболеваний человека, так как нарушение баланса между пролиферацией и программированной клеточной гибелью приводит к патологическим процессам в органах и тканях [Meldrum D.R., 1998; Ярилин

А.А. и соавт., 2000; Kalkeri G. et al., 2001; Гончарова И.А. и соавт., 2006; Новицкий В.В. и соавт., 2010].

Механизмы, оказывающие влияние на запуск и регуляцию процессов апоптоза, весьма многочисленны и разнообразны. Известно, что после индукции апоптоза дальнейшая судьба клетки - гибель или выживание - зависит от наличия или активации многочисленных факторов и процессов, модулирующих программированную клеточную гибель. К ним можно отнести как постоянно существующие в клетке белки, такие как семейство Вс1-2 и IAP, так и индуцируемые стрессом молекулы: факторы регуляции транскрипции NF-kB и р53, церамид, стрессиндуцируемые киназы JNK, р38 и ERK [Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006; Рязанцева Н.В и соавт., 2009].

Наиболее важное значение среди стрессиндуцируемых молекул имеют белки теплового шока (Heat shock proteins - Hsps). Эти протеины участвуют в формировании правильной трехмерной конформации вновь синтезированных полипептидов, поддерживают функциональную активность внутриклеточных белков и элиминацию поврежденных белковых форм, а также обеспечивают транспорт протеинов через клеточные мембраны, процессы ассоциации- диссоциации внутриклеточных надмолекулярных комплексов, защиту белков от агрегации. Кроме этого, белки теплового шока обладают анти- и проапоптотической функцией [Arya R. et ah, 2007; Lanneau D. et ah, 2008; Sherman М., Multhoff G., 2008; Foster C.S. et ah, 2009; Richardson P.G. et ah, 2011]. Наиболее изучены свойства белка теплового шока Hsp70; шаперонам Hsp90 и Hsp27, к сожалению, в настоящее время уделено гораздо меньшее внимание.

В последнее время именно белкам теплового шока отводят существенную роль в дизрегуляции апоптоза опухолевых клеток. В отличие от нормальных (нетрансформированных клеток), где экспрессия стресс- индуцибельных Hsps на ходится на довольно низком или несущественном уровне, в большинстве опухолевых клеток, включая лимфатические болезни, хронические или острые миелойдные лейкемии, Hsps экспрессируются особенно активно. Повышенная экспрессия генов Hsp27 и Hsp90 коррелирует с плохим прогнозом острой миелоидной лейкемии и миелоидными дисплазийными синдромами [Thomas X. et ah, 2005; Duval A. et ah, 2006]. В клетках острой миелоидной лейкемии Hsp27 предотвращает лекарственно- индуцированный апоптоз [Schepers Н. et ah, 2005]. В многочисленных клетках миеломы угнетение активности или снижение содержания Hsp27 может восстановить апоптотический ответ на дексаметазон через активацию каспазозависимого пути [Chauhan D. et ah, 2003].

Постгрансляционные модификации белков теплового шока и/или присутствие их в каком-либо клеточном компартменте играют важную роль в направленном взаимодействии Hsp с определенным участником апоптоза [Lanneau D. et al., 2008]. Функции Hsp27 зависят от четвертичной структуры олигомера, изменения которого регулируются фосфорилированием белка. J.M. Bruey et al. [2000] в своих исследованиях in vitro и in vivo показали, что НБр27-опосредованное ингибирование каспазозависимого апоптоза включает в себя большое количество нефосфорилированных олигомеров Hsp27. Напротив, фосфорилированная форма белка теплового шока 27 непосредственно взаимодействует с DAXX (Death-Domain Associated protein) [Charette S. et al., 2000]. Данные результаты говорят о том, что олигомеризация/фосфорилирование протеинов изменяет конформацию Hsps и, следовательно, определяет их способность к взаимодействию с различными апоптотическими белками [Khan I.U. et al., 1998; Negroni L. et al., 2007].

Важную роль в регуляции апоптотической программы играют также особенности локализации белков теплового шока в клетке [Tsuchiya A. et al., 2005; Schmitt Е. et al., 2007; Lanneau D. et al., 2008]. Показано, что основное антиапоптотическое действие Hsps осуществляют в цитоплазме, но появление данных шаперонов в ядре, митохондриях или плазматической мембране может усилить программированную клеточную смерть, повлиять на процесс пролиферации или облегчить контакт с дендритными клетками (повысить иммуногенность клетки) [Bruey J.M. et al., 2000; Tsuchiya A. et al., 2005; Свешников П.Г. и соавт., 2007; Lin L. et al., 2007; Ribeil J.A. et al., 2007; Sashchenko L.P. et al., 2007; Richardson P.G. et al., 2011].

Судя по накопленному к настоящему времени фактическому материалу, про- и антиапоптогенные функции белков теплового шока зависят от их посттрансляционной модификации, внутриклеточной локализации и типа клеток. Регулирование апоптоза с помощью Hsps является защитным механизмом, который уменьшает клеточную чувствительность к неблагоприятным факторам и позволяет клеткам выжить, в том числе и

опухолевым. Изучение системы Hsps и ее регуляторных механизмов является актуальной задачей медицины, поскольку позволит установить пути ускользания конкретных опухолевых клеток от апоптоза при помощи Hsps и может быть положено в основу таргетной терапии злокачественных заболеваний.

**Цель исследования:** установить роль белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в механизмах нарушения программированной гибели опухолевых клеток линий Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека) и ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека).

**Задачи исследования:**

1. Дать комплексную сравнительную характеристику экспрессии генов и особенностей содержания фосфорилированных форм Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat, ТНР-1 и в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров; установить взаимосвязь изменения содержания белков теплового шока (27 и 90 кДа) и апоптотической гибели клеток.
2. Идентифицировать молекулярные мишени модификации рецепторопосредованного пути дизрегуляции апоптоза с участием белков теплового шока на уровне TNF- и Fas-рецепторов, их лигандов и каспаз -3, -
3. Применяя технологию селективного ингибирования Hsp27 и Hsp90 с использованием 17-AAG (17-(Allylamino)geldanamycin) и KRIBB-3 (5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl) isoxazole) in vitro, оценить роль белков теплового шока в дизрегуляции митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий ТНР-1 и Jurkat.
4. Установить характер влияния Hsp27 и Hsp90 на факторы транскрипции р53 и NF-kB в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1.

5. Выявить общие закономерности и особенности участия белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 в дизрегуляции программированной гибели опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 при модуляции апоптоза in vitro с использованием рекомбинантного TNFa, этопозида и дексаметазона.

**Научная новизна**

Получены принципиально новые данные фундаментального характера о роли белков теплового шока (Hsp27 и Hsp90) в дизрегуляции митохондриального, рецепторного и ядерного путей апоптоза, об уровне экспрессии мРНК и особенностях содержания фосфорилированных форм Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии, а также в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Впервые показано, что опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 характеризуются повышенным уровнем экспрессии генов и высоким содержанием фосфорилированных форм Hsp27, низким уровнем фосфорилированных форм Hsp90, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров. Выявлено, что белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 играют антиапоптотическую роль в опухолевых клетках Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии. Молекулярные механизмы антиапоптотического действия Hsp27 и Hsp90 включают в себя снижение активности каспаз-8 и -3, уменьшение количества TNF- и Fas-рецепторов, изменение уровня факторов транскрипции р53 и NF- kB, а также нарушение баланса про- и антиапоптотических белков семейства Вс1-2 в пользу последних, и как следствие, препятствие снижению уровня трансмембранного потенциала митохондрий.

Впервые показано, что действие этопозида в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 приводит к увеличению уровня мРНК Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1, снижению уровня мРНК Hsp27 (в опухолевых клетках линии Jurkat) и уменьшению количества фосфорилированных форм Hsp90 и Hsp27 в клетках обеих линий.

Получены приоритетные данные о проапоптотическом действии специфических ингибиторов белков теплового шока Hsp27 и Hsp90 (KRIBB- 3 и 17-AAG, соответственно) в интактных опухолевых клетках Т- лимфобластного лейкоза, моноцитарной лейкемии и отсутствии данного эффекта в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров. Впервые показано, что селективные ингибиторы Hsp27 и Hsp90 потенцируют проапоптотическое действие цитостатика (этопозид), глюкокортикоида (дексаметазон) и рекомбинантного TNFa человека в опухолевых клетках Т- лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии, а также в мононуклеарных лейкоцитах in vitro.

**Теоретическая и практическая значимость**

Результаты проведенного исследования расширяют существующие представления о фундаментальных механизмах нарушения апоптоза опухолевых клеток. Получены новые данные о роли белков теплового шока (Hsp27 и Hsp90), экспрессии их мРНК и фосфорилированного статуса в дизрегуляции митохондриального, рецепторного и ядерного пути апоптоза опухолевых клеток Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии. В результате выполненной работы разработаны принципиально новые подходы к решению проблемы, связанной с созданием молекулярной технологии коррекции нарушения апоптоза опухолевых клеток, на основе использования белков теплового шока в качестве молекулярных мишеней. Оф ормлено 1 ноу-хау «Способ управлением программированной гибелью опухолевых клеток с помощью ингибиторов белков теплового шока» (№185 от 24.06.2011).

Полученные знания в дальнейшем могут способствовать созданию новых технологий таргетной терапии опухолевых заболеваний, в частности Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Реализация антиапоптотической функции белков теплового шока

Hsp27 и Hsp90 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 зависят от их посттрансляционной модификации (фосфорилирования).

Программированная гибель опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1 угнетается на фоне высокого содержания фосфорилированных форм Hsp27 и низкого уровня фосфорилированных форм Hsp90, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров.

1. Белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 участвуют в блокировании запуска рецепторопосредованного, ядерного и митохондриального путей реализации апоптоза, опосредуя свое действие через снижение активности каспаз-3 и -8, угнетение презентации TNFR1- и Fas-рецепторов, изменение содержания факторов транскрипции р53 и NF-kB, баланса белков семейства Вс1-2 и трансмембранного потенциала митохондрий в опухолевых клетках линий Jurkat и TFIP-1.
2. Белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 являются молекулярными мишенями для таргетного воздействия на программированную гибель опухолевых клеток Т-лимфобластного лейкоза и моноцитарной лейкемии.

**Апробация и реализация работы**

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на VI Международном конгрессе патофизиологов (г. Монреаль, Канада, 2010); Первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (г. Санкт-Петербург, Россия, 2010); на 12, 13 и 14

Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы медицины» (г. Абакан, 2009, 2010, 2011 гг); IV Международной научной конференции молодых ученых-медиков (г. Курск, Россия, 2010); XVI Межгородской конференции «Актуальные проблемы патофизиологии» (г. Санкт-Петербург, 2010); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (г. Ярославль, 2010); конференции «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (г. Санкт-Петербург, 2010); III Общероссийской научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (г. Сочи, 2010); V, VI Международой Пироговской научной медицинской конференции (г. Москва, 2010, 2011гг.); XII Конгрессе молодых учёных и специалистов с международным участием «Науки о человеке» (г. Томск, 2011); на Международной телеконференции «Проблемы и перспективы современной науки» (г. Томск, 2011); на VI региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященную памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (г. Томск, 2011); на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пущино, 2011).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в лекциях по патологической физиологии (разделы, «Патофизиология иммунной системы», «Патофизиология клетки») для студентов 2-3 курсов лечебного и педиатрического факультетов, внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальных основ клинической медицины в разделы дисциплин «Молекулярные основы патологии», «Современные проблемы медико-биологической науки» для студентов медико-биологического факультета Сибирского государственного медицинского университета.

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки молодых кандидатов наук по проблеме «Исследование молекулярных механизмов регуляторного влияния белков теплового шока на апоптоз опухолевых клеток» (ГК№16.120.11.480 - МК), гранта Carl Zeiss "Программа поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых" № СибГМУ 1/11 КУ ("Модуляция апоптоза опухолевых и нормальных лимфоцитов ингибиторами белков теплового шока"), гранта РФФИ «Разработка способов направленной коррекции дизрегуляции пролиферации и апоптоза нормальных и патологически измененных клеток с помощью регуляторных молекул» (РФФИ 09-04-99025), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» («Идентификация молекулярных мишеней коррекций нарушений регуляции апоптоза опухолевых клеток» - ГК № П1203 от 27.08.09; «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально-значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» - ГК 02.740.11.0311).

**Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 35 работ, в том числе 1 монография и 16 - в центральных рецензируемых журналах,

рекомендованные ВАК РФ.

**Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 256 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы (глава 1), материала и методов исследования (глава 2), результатов исследований и их обсуждения (главы 3-8), заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 42 рисунками, список литературы включает 496 источников, из которых 76 отечественных и 420 иностранных.

**Выводы**

1. Опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 характеризуются повышенным уровнем экспрессии мРНК и высоким содержанием фосфорилированных форм Hsp27, низким уровнем фосфорилированных форм Hsp90, по сравнению с мононуклеарными лейкоцитами, полученными у здоровых доноров, на фоне угнетения их-программированной гибели.
2. Действие специфических ингибиторов белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 (17-аллиламино-17-гельданамицин и 5-(5-Ethyl-2-hydroxy-4- methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl) isoxazole) in vitro приводит к повышению числа апоптотически измененных клеток в культурах опухолевых линий Jurkat и ТНР-1, не вызывает данного эффекта в культуре мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, и свидетельствует об антиапоптотической роли Hsp90 и Hsp27 в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1.
3. Белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 ингибируют рецепторопосредованный путь реализации апоптоза опухолевых клеток (Jurkat и ТНР-1), снижая активацию каспаз.-8 и -3.
4. Белки теплового шока Hsp27 и Hsp90 дифференцированно влияют на TNFR1, FasR и их лиганды в зависимости от типа клеток. Шаперон Hsp27 способствует продукции TNFa и FasL как в клетках линии Jurkat, так и ТНР- 1; снижению презентации TNFR1 и FasR на мембране опухолевых клеток линии ТНР-1 и увеличению презентации FasR на мембране опухолевых клеток линии Jurkat. Действие белка теплового шока Hsp90 сопряжено с увеличением продукции TNFa и снижением презентации TNFR1 на мембране опухолевых клеток линии ТНР-1; увеличением продукции TNFa, FasL и мембранносвязанных форм Fas R, а также снижением презентации TNFR1 опухолевыми клетками линии Jurkat.
5. Белки теплового шока Hsp90 и Hsp27 препятствуют снижению трансмембранного потенциала митохондрий, что приводит к блокированию запуска митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток линий Jurkat и ТНР-1.
6. Шапероны Hsp90 и Hsp27 оказывают влияние на баланс белков семейства Bcl-2. Hsp27 участвует в механизмах снижения содержания проапоптотического белка Вах в опухолевых клетках линии Jurkat; белка Bad с проапоптотической функцией в опухолевых клетках линии ТНР-1; способствует увеличению внутриклеточного уровня антиапоптотического белка Вс1-2 как в клетках линии Jurkat, так и ТНР-1. С действием шаперона Hsp90 связано снижение содержания белка Bad в опухолевых клетках линии ТНР-1 и увеличение содержания проапоптотического белка Вах в опухолевых клетках линии Jurkat.
7. В условиях селективного ингибирования белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 in vitro при использовании 17-AAG и KRIBB-3, соответственно, в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 повышается уровень фактора транскрипции NF-kB.
8. Hsp90 и Hsp27 разнонаправленно влияют на содержание р53 в опухолевых клетках линий Jurkat и TFIP-1. В условиях селективного ингибирования Hsp27 in vitro в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1 увеличивается уровень белка р53 (мутантного и дикого типа); при селективном ингибировании Hsp90 - содержание р53 в опухолевых клетках уменьшается.
9. В условиях ингибирования белков теплового шока Hsp90 и Hsp27 in vitro происходит потенцирование апоптотического действия индукторов программированной гибели клеток (rTNFa, этопозида и дексаметазона) в культуре опухолевых линий Jurkat и ТНР-1, а также в мононуклеарных лейкоцитах, полученных у здоровых доноров.
10. Одним из механизмов апоптоз-индуцирующего действия этопозида на опухолевые клетки линий Jurkat и ТНР-1 является изменение экспрессии генов и фосфорилирования белков теплового шока (увеличение уровня мРНК Hsp90 (в опухолевых клетках линий Jurkat и ТНР-1); снижение уровня мРНК

Hsp27 (в опухолевых клетках линии Jurkat) и уменьшение количества фосфорилированных форм Hsp90 и Hsp27 в клетках обеих линий).

**Список литературы**

1. Агол, В.И. Генетически запрограммированная смерть клетки / В.И. Агол // Соросовский Образовательный Журнал. - 1996. - №6. - С.20-

24.

1. Азбука рака : учеб. пособие / А.И. Рукавишников ; Федер. агентство по здравоохранению и соц. развитию, Волгогр. гос. мед. ун-т, Каф. хирург, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. - Волгоград : Бланк, 2007. - 359 с. : ил.; 21 см. - Библиогр.: с. 343-356.
2. Андреев, А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е Кушнарева, А.А Старков // Биохимия. - 2005. - том 70, вып.2. — С.246-264.
3. Барышников, А.Ю., Шишкин, Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза - М.:Эдиториал УРСС, 2002. - 320 с.
4. Белецкий, И. П. Генная терапия на основе системы Fas-aHrareH-Fas- лиганд / И. П. Белецкий, О. В. Сорокина, JI. В. Никонова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 1999. - *№*
5. - С. 40-46.
6. Белецкий, И.П. Пути передачи цитотоксического сигнала рецепторами семейства TNF-Rs (обзор) / И.П. Белецкий, А.Б. Мошникова, О.В. Прусакова // Биохимия,- 2002. -Т. 67,-Вып. 3. - С. 343- 353.
7. Белушкина, Н. Н., Северин, С. Е. Молекулярные основы патологии апоптоза / Н. Н. Белушкина, С. Е. Северин // Архив патологии. - 2001. -.№ 1.-С. 51-59.
8. Белушкина, Н.Н. Апоптоз в патогенезе заболеваний // Биохимические основы патологических процессов / Под ред. Е.С. Северин,- М.: Медицина, 2000. - С. 31-49.
9. Болдырев, А.А. Дискриминация между апоптозом и некрозом под влиянием окислительного стресса // Биохимия. 2000. Т.5. №7. С.981- 991.
10. Бра, М. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели / М.Бра, Б.Квинан, С. А. Сузин // Биохимия. - 2005. - Том 70, № 2. - С. 284-293.