

Взаємодія між ендogenousними Hsp60 та Вах у нормальному та ураженому дилатаційною кардіоміопатією міокардах людини

Л. М. Капустян, О. Т. Рожко, І. О. Тихонкова, Л. Л. Сидорик

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680
l.m.kapustian@imbg.org.ua

Hsp60 – молекулярний шаперон, основними компартментами функціонування якого є мітохондрії та цитоплазма. В кардіоміоцитах до 30 % цього білка знаходиться у цитоплазмі. Методом коїмунопреципітації виявлено взаємодію між молекулярним шапероном Hsp60 та проапоптичним білком Вах у цитоплазматичній фракції кардіоміоцитів, отриманій із нормальної тканини серця людини, на відміну від кардіоміоцитів, уражених дилатаційною кардіоміопатією, де такої взаємодії не спостерігається.

Ключові слова: Hsp60, Вах, міокард, дилатаційна кардіоміопатія.

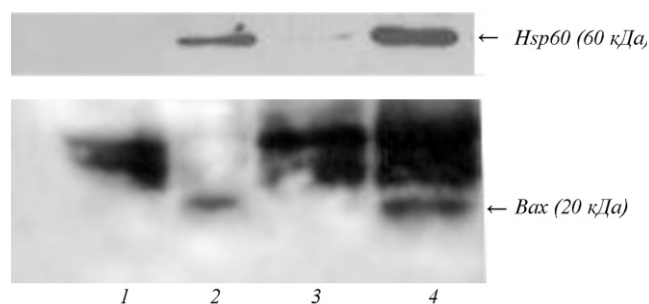
Вступ. Відомо, що молекулярні шаперони є кардіопротекторними білками та відіграють роль ключових регуляторів апоптозу кардіоміоцитів [1]. На особливу увагу заслуговує молекулярний шаперон Hsp60, основним компартментом функціонування якого є мітохондрії. Згідно з останніми даними, в кардіоміоцитах 10–30 % вмісту цього білка зосереджено в цитоплазмі [2].

Попередніми результатами наших експериментів показано зниження вмісту Hsp60 у цитоплазматичній фракції кардіоміоцитів при розвитку дилатаційної кардіоміопатії (ДКМП) – серцевої патології, за якої відбувається загибель кардіоміоцитів внаслідок апоптозу [3].

Як показано низкою досліджень на культурах неонатальних кардіоміоцитів щура [2, 4–6], молекулярний шаперон Hsp60 може формувати комплекси з проапоптичними білками Вах і Вак, блокуючи їхню здатність викликати апоптоз. Зниження рівня Hsp60 у кардіоміоцитах призводило до транслокації білка Вах до мітохондрій і запуску апоптозу.

Необхідно відмітити, що культури клітин кардіоміоцитів суттєво відрізняються від кардіоміоцитів нативної тканини серця за ультраструктурою та функціональними особливостями. На сьогоднішні дані щодо існування комплексів Hsp60 з проапоптичними білками родини Bcl-2 типу Вах в інтактному міокарді не існує.

Таким чином, мета нашого дослідження полягала у виявленні можливої взаємодії білка Hsp60 з проапоптичним білком Вах у цитоплазматичних фракціях кардіоміоцитів, отриманих з нормальної та ураженої ДКМП тканини серця людини.



Тест на неспецифічне зв'язування Bax і Hsp60 з білок-G-сефарозою (1); цитоплазматична фракція кардіоміоцитів, одержана з нормального міокарда (2); імунопреципітація цитоплазматичних фракцій, отриманих з міокарда, ураженого дилатативною кардіоміопатією (3), та з нормального міокарда людини (4), за допомогою анти-Bax (верхня панель) та анти-Hsp60 антитіл (нижня панель)

Матеріали і методи. У роботі використано антитіла проти Bax («Santa Cruz», США). Методи одержання, очищення та характеристику антитіл проти Hsp60 описано раніше [7].

Екстракт цитоплазматичної фракції кардіоміоцитів отримували з нормального та ураженого ДКМП міокардів за відомою методикою [3]. Імунопреципітацію здійснювали, як у роботі [8]. Цитоплазматичні фракції (1 мг/мл) преадсорбували з 20 мкл білок-G-сефарози («Sigma», США) за температури 4 °С протягом 30 хв, центрифугували (5 хв при 10000 g), супернатант інкубували з відповідними антитілами (5 мкг антитіл на 1 мг тотального білка) упродовж ночі за $t = 4$ °С. Потім додавали 20 мкл білок-G-сефарози та продовжували інкубацію протягом 1,5 год за $t = 4$ °С. Імунні комплекси осаджували центрифугуванням та відмивали 4 рази холодним буфером (137 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, рН 7,5, 1 %-й тритон X-100, 2 мМ ЕДТА, рН 8,0, 2 мМ ФМСФ). Зразки прогрівали у буфері для нанесення зразків для електрофорезу в ПААГ та аналізували методом гель-електрофорезу за денатурувальних умов і Вестерн-блот аналізом, як описано раніше [3].

Результати і обговорення. Імунопреципітацію ймовірного комплексу Hsp60/Bax з цитоплазматичних фракцій, отриманих з нормальної та ураженої ДКМП тканин серцець людей, проводили за допомогою анти-Hsp60 та анти-Bax антитіл. Комплекс

ідентифікували Вестерн-блот аналізом. Результати наведено на рисунку.

Як видно, молекулярний шаперон Hsp60 утворює комплекс з проапоптотичним білком Bax у нормальній тканині серця людини. У тканині серця, ураженого ДКМП, такого комплексу не виявлено, що свідчить про відсутність або зменшення кількості комплексу Hsp60/Bax у цитоплазмі кардіоміоцитів при даній патології, що знаходиться поза межами детекції антитілами. Останнє можна пояснити зниженням кількісного вмісту в цитоплазматичній фракції як одного з цих білків, так і обох разом. Як уже зазначалося, нами встановлено зменшення кількості цитоплазматичного Hsp60 при дилатативній кардіоміопатії [3].

Даних щодо кількісного вмісту білка Bax у цитоплазмі кардіоміоцитів при ДКМП немає, однак з літератури відомо, що при цьому захворюванні сумарний вміст білка Bax у тканині серця не зменшується. За даними одних авторів, він зростає [9], іншими ж дослідниками не знайдено суттєвої різниці порівняно з нормальним міокардом [10]. Отже, можна припустити, що зниження кількості цитоплазматичного Hsp60 при ДКМП є причиною зростання рівня «вільного» від Hsp60 Bax у цитоплазмі і має ті самі наслідки, які описані для культури клітин ембріональних кардіоміоцитів при стресі, тобто відбуваються транслокація Bax до мітохондріальної мембрани та запуск запрограмованої загибелі клітини.

Таким чином, у представленій роботі показано існування комплексу між ендogenous білками Hsp60 і Bax у нормальній тканині серця людини, подібного до раніше ідентифікованого в неонатальних кардіоміоцитах щура [6]. При дилатативній кардіоміопатії такої взаємодії не виявлено.

L. M. Kapustian, O. T. Rozhko, I. O. Tykhonkova, L. L. Sidorik

Interaction between Hsp60 and Bax in normal human myocardium and in myocardium affected by dilated cardiomyopathy

Summary

The main functional compartments of molecular chaperone Hsp60 are mitochondria and cytoplasm. Up to 30 % of Hsp60 are located in cytoplasm of cardiomyocytes. The interaction between molecular chaperone Hsp60 and proapoptotic Bax protein in the cytoplasmic fraction from normal human heart tissue has been revealed by

co-immunoprecipitation in contrast to myocardium affected by dilated cardiomyopathy, where this interaction has not been observed.

Keywords: Hsp60, Bax, myocardium, dilated cardiomyopathy.

Л. Н. Капустян, О. Т. Рожко, И. А. Тихонкова, Л. Л. Сидорик

Взаимодействие между эндогенными Hsp60 и Bax в нормальном и пораженном дилатационной кардиомиопатией миокардах человека

Резюме

Hsp60 – молекулярный шаперон, основными компартментами функционирования которого являются митохондрии и цитоплазма. В кардиомиоцитах до 30 % этого белка находится в цитоплазме. Методом коиммунопреципитации обнаружено взаимодействие между молекулярным шапероном Hsp60 и проапоптотическим белком Bax в цитоплазматической фракции кардиомиоцитов, полученной из нормальной ткани сердца человека, в отличие от кардиомиоцитов, пораженных дилатационной кардиомиопатией, где такого взаимодействия не наблюдалось.

Ключевые слова: Hsp60, Bax, миокард, дилатационная кардиомиопатия.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Reeve J. L. V., Duffy A. M., O'Brien T., Samali A. Don't loose heart – therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease // *J. Cell. Mol. Med.*–2005.–**9**, N 3.–P. 609–622.
2. Gupta S., Knowlton A. A. Hsp60, Bax, apoptosis and the heart // *J. Cell. Mol. Med.*–2005.–**9**, N 1.–P. 51–58.
3. Kapustian L. M., Rozhko O. T., Bobyk V. I., Kroupska I. V., Riabenko D. V., Khozhaenko Yu. S., Gurtovyy V. A., Usenko V. S., Sidorik L. L. Changes in the content of molecular

chaperone Hsp60 in heart tissue at dilated cardiomyopathy // *Biopolymers and cell.*–2008.–**24**, N 3 – P. 238–245.

4. Lin K. M., Lin B., Lian I. Y., Mestril R., Scheffler I. E., Dillmann W. H. Combined and individual mitochondrial Hsp60 and Hsp10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation // *Circulation.*–2001.–**103**.–P. 1787–1792.
5. Gupta S., Knowlton A. A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis // *Circulation.*–2002.–**106**.–P. 2727–2733.
6. Kirchhoff S. R., Gupta S., Knowlton A. A. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis, and myocardial injury // *Circulation.*–2002.–**105**.–P. 2899–2904.
7. Kapustian L. N., Kyamova R. G., Gryshkova V. S., Terentiev A. G., Filonenko V. V., Sidorik L. L. Obtaining recombinant chaperon CroEL and its immunological cross-reactivity with Hsp60 // *Biopolymers and cell.*–2006.–**22**, N 2.–C. 117–121.
8. Lai H. C., Liu T. J., Ting C. T., Yang J. Y., Huang L., Wallas D., Kaiser P., Wang P. H. Regulation of IGF-1 receptor signaling in diabetic cardiac muscle: dysregulation of cytosolic and mitochondria Hsp60 // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*–2007.–**292**, N 1.–E292–E297.
9. Buzas K., Megyeri K., Hogye M., Csanady M., Bogats G., Mandi Y. Comparative study of the roles of cytokines and apoptosis in dilated and hypertrophic cardiomyopathies // *Eur. Cytokine Netw.*–2004.–**15**, N 1.–P. 53–59.
10. Olivetti G., Abbi R., Quaini F., Kajstura J., Cheng W., Naitahara J. A., Quaini E., Di Loreto C., Beltrami C. A., Krajewski S., Reed J. C., Anversa P. Apoptosis in the failing human heart // *New Engl. J. Med.*–1997.–**336**, N 16.–P. 1131–1141.

УДК 577.2 + 577.112.2 + 616.1
Надійшла до редакції 01.12.08