

Молекулярный шаперон Hsp60 образует комплекс с p70S6K в кардиомиоцитах человека

И. В. Крупская, Л. М. Капустян, И. А. Тихонкова, Л. Л. Сидорик

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

i.v.kroupska@imbg.org.ua

Молекулярный шаперон Hsp60 и киназа p70S6 (p70S6K) выполняют важную функциональную роль в регуляции нормальной жизнедеятельности и апоптоза кардиомиоцитов. Цель. Исследовать возможность взаимодействия молекулярного шаперона Hsp60 с p70S6K в кардиомиоцитах нормального и пораженного дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) сердца человека. Методы. Коиммунопреципитация, вестерн-блот анализ. Результаты. Впервые показано взаимодействие молекулярного шаперона и двух форм p70S6K (α и β) в кардиомиоцитах нормальной и пораженной ДКМП тканях. Выводы. Полученные данные позволяют предположить участие молекулярного шаперона Hsp60 в регуляции активности p70S6K при стресс-индуцированном апоптозе кардиомиоцитов.

Ключевые слова: Hsp60, p70S6K, коиммунопреципитация, кардиомиоцит, ДКМП, апоптоз.

Введение. Апоптоз кардиомиоцитов является важным фактором инициации и развития сердечной недостаточности. Одними из основных регуляторных молекул в механизмах индукции апоптоза кардиомиоцитов являются молекулярные шапероны – белки теплового шока (heat shock proteins, HSPs). Молекулярные шапероны вследствие связывания и стабилизации различных сигнальных молекул, в том числе и протеинкиназ, играют важную роль в сигнальных механизмах клетки. Установлено, что HSPs синтезируются в ответ на стрессовые сигналы. Их экспрессия сопровождается увеличением резистентности к последующему поражению ткани миокарда в результате как некроза, так и апоптоза. Показано, что до 70 % внутриклеточного содержания Hsp60 кардиомиоцитов сконцентрировано в митохондриях и около 30 % – в цитоплазме [1].

Ранее на модели культивируемых кардиомиоцитов выявлена важная функциональная роль ци-

топлазматического пула Hsp60 в регуляции нормальной жизнедеятельности и апоптоза кардиомиоцитов в зависимости от уровня экспрессии указанного шаперона [2]. Обработка кардиомиоцитов антисенс-РНК к Hsp60 приводит к апоптозу кардиомиоцитов, что может быть связано с освобождением проапоптотических белков Bax и Bad [3]. Однако механизмы участия Hsp60 в регуляции сигнальных каскадов в миокарде при прогрессии сердечной недостаточности, типичным проявлением которой является дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), практически не известны.

Недавно нами установлено существенное повышение количественного уровня Hsp60 в лизатах как ткани сердца человека, пораженного ДКМП, так и ткани сердца мыши с экспериментальным аутоиммунным заболеванием, подобным ДКМП человека [4]. Впервые обнаружено снижение количественного уровня Hsp60 в цитоплазматической фракции с последующей транслокацией на мембрану, что

может быть одной из причин апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности, вызванной действием хронического стресса.

При развитии ДКМП уменьшаются эффективность и уровень биосинтеза белка в кардиомиоцитах, что связывают с нарушениями функционирования сигнальных путей, непосредственно регулирующих биосинтез белка. Киназа p70S6 (p70S6K) фосфорилирует белок S6 малой субъединицы рибосомы и активирует трансляцию субкласса мРНК, имеющих на 5'-UTR специфичную полипиримидиновую последовательность, присущую большинству компонентов аппарата трансляции [5, 6]. Активность p70S6K критична при физиологической адаптации к стрессу.

Изменение активности p70S6K характерно для гипертрофических изменений в миокарде – при физических нагрузках или гипертрофической кардиомиопатии без экспрессии эмбриональных генов (как при ДКМП), а также связано с активацией сигнального пути, зависящего от фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K).

Показано, что одной из мишеней p70S6K является проапоптотный белок Bad (принадлежащий к семейству белков Bcl-2), который фосфорилируется по остаткам Ser¹¹² и Ser¹³⁶ [6, 7] и находится в нормальной клетке в неактивном состоянии, если он связан через pSer¹³⁶ с белком 14-3-3. Нефосфорилированный Bad образует гетеродимерный комплекс с Bcl-2/Bcl-X1 в мембране митохондрии, формируя пору, через которую цитохром C выходит в цитозоль и запускает сигнальный каскад, ведущий к апоптозу. Основываясь на полученных ранее данных о количественных изменениях уровней Hsp60 и p70S6K в миокарде при прогрессии ДКМП [4, 12], сделано предположение о возможном взаимодействии этих белков и его роли в регуляции апоптотного сигнального каскада, который, в свою очередь, приводит к массовой гибели кардиомиоцитов при ДКМП.

Материалы и методы. Секционный материал получен с соблюдением всех международных норм биоэтики в рамках сотрудничества и согласно договору о сотрудничестве с Национальным научным центром «Институт кардиологии имени академика Н. Д. Стражеско» НАМН Украины.

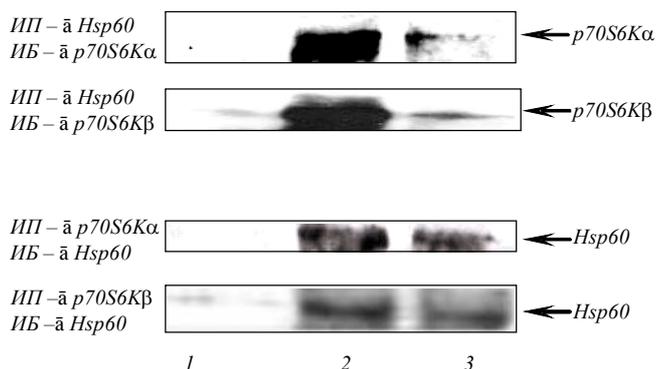
Для получения тотального тканевого лизата ткань миокарда гомогенизировали в буфере: 20 mM трис-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM ЭДТА, 0,1 % NP-40, 0,1 % смесь ингибиторов протеаз («Sigma», США). Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин, надосадочную жидкость использовали как суммарный тканевый лизат. Белок определяли по методу Бредфорд [8].

Методы получения, очистки и характеристика антител к Hsp60 и p70S6K описаны в [9] и [10] соответственно.

Иммунопреципитацию белков [11] из суммарных тканевых лизатов миокарда (левый желудочек) проводили с помощью поликлональных анти-Hsp60 и моноклональных анти-p70S6K α - и анти-p70S6K β -антител (2 мкг антител на 3 мг тотального белка, полученного из ткани миокарда) в течение 2 ч при температуре 4 °C и постоянном перемешивании. После этого к каждому образцу добавляли 20 мкл 50 %-й суспензии белок G-сефарозы для связывания иммунных комплексов и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Иммунные комплексы осаждали центрифугированием (2500 об/мин) и промывали холодным буфером 4 раза, как описано в [12]. Иммунопреципитаты исследовали методом вестерн-блот анализа [13].

Результаты и обсуждение. Для анализа коиммунопреципитатов из суммарных тканевых лизатов миокарда человека использовали образцы секционного патоморфологического материала левого желудочка миокарда больных, умерших от ДКМП, а также нормальных сердец практически здоровых людей, погибших в результате несчастного случая.

Как видно из данных рисунка, молекулярный шаперон Hsp60 формирует комплекс с p70S6K как в нормальной ткани сердца человека, так и в ткани сердца, пораженного ДКМП. Возможно, связующим звеном функционирования этих двух белков в апоптотном сигнальном каскаде является проапоптотный белок Bad. Фосфорилированный по Ser¹³⁶ киназой p70S6 Bad образует комплекс с белком 14-3-3, принадлежащим к семейству высококонсервативных регуляторных белков [14], играющих важную роль во многих процессах жизнедеятельности эукариотической клетки, включая контроль кле-



Образование комплекса между белками Hsp60 и p70S6K в кардиомиоцитах человека, изученное методом ко-иммунопреципитации (ИП) с идентификацией методом иммуноблоттинга (ИБ): 1 – негативный контроль; 2, 3 – экстракты, полученные из нормальной ткани сердца человека и ткани сердца человека, пораженного ДКМП соответственно, α – анти

точного цикла и клеточную смерть. Белки, способные связывать функционально разные молекулы, в том числе киназы, фосфатазы и трансмембранные рецепторы, и выполнять функцию молекулярных шаперонов, называют moon-lighting proteins [15, 16].

Показано, что более 100 сигнальных белков могут функционировать как лиганды 14-3-3, среди них и молекулярные шапероны, а именно – Hsp60 [16]. Известно, что избыточный синтез белка Hsp60 ингибирует активацию каспазы-3 и PARP [3]. Можно предположить, что взаимодействие Hsp60 с p70S6K поддерживает активную конформацию последней, которая, в свою очередь, фосфорилирует Ser¹³⁶ белка Bad, вследствие чего он и связывается с белком 14-3-3. В таком состоянии белок Bad не образует комплекса с Bcl-2/Bcl-X1, что приводит к блокированию апоптозного сигнального каскада. В случае же прогрессирования ДКМП наблюдаются снижение количественного уровня Hsp60 и p70S6K в цитоплазме, увеличение содержания нефосфорилированного Bad и, как следствие, – запуск апоптозного сигнального каскада.

Таким образом, в представленной работе впервые приведены данные, свидетельствующие об образовании комплекса *in vivo* между эндогенными белками Hsp60 и p70S6K как в нормальной ткани сердца человека, так и в ткани, пораженной ДКМП.

Авторы выражают благодарность Л. А. Савинской за предоставленные анти-p70S6K-антитела.

I. V. Kroupskaya, L. N. Kapustian, I. O. Tykhonkova, L. L. Sidorik
Hsp60 and p70S6K form a complex in human cardiomyocytes

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

Molecular chaperone Hsp60 and protein kinase p70S6K play an important functional role in the regulation of cardiomyocytes vital function or apoptosis. Aim. To study a possibility of in vivo complex formation between Hsp60 and p70S6K in cardiomyocytes. Methods. Co-immunoprecipitation, Western-blot analysis. Results. We have identified in vivo interaction between molecular chaperone Hsp60 and two isoforms of proteinkinase p70S6K in human myocardium, normal and affected by cardiomyopathy. Conclusions. The results obtained suggest a possible participation of molecular chaperone Hsp60 in regulation of p70S6K activity in stress-induced apoptotic signaling pathway in cardiomyocytes.

Keywords: Hsp60, p70S6K, cardiomyocyte, DCM, apoptosis, co-immunoprecipitation.

I. В. Крупська, Л. М. Капустян, І. О. Тихонкова, Л. Л. Сидорик

Молекулярний шаперон Hsp60 утворює комплекс з p70S6K у кардіоміоцитах людини

Резюме

Молекулярний шаперон Hsp60 і кінза p70S (p70S6K) виконують важливу функціональну роль у регуляції нормальної життєдіяльності та апоптозу кардіоміоцитів. Мета. Дослідити можливість взаємодії молекулярного шаперону Hsp60 і p70S6K у кардіоміоцитах нормального та ураженого ділятаційною кардіоміопатією (ДКМП) серця людини. Методи. Коімунопреципітація, вестерн-блот-аналіз. Результати. Вперше показано взаємодію молекулярного шаперону та двох форм p70S6K (α і β) в кардіоміоцитах нормальної і ураженої ДКМП тканин. Висновки. Отримані дані дозволяють припустити участь молекулярного шаперону Hsp60 у регуляції активності p70S6K за стрес-індукованого апоптозу кардіоміоцитів.

Ключові слова: Hsp60, p70S6K, кардіоміоцит, ДКМП, апоптоз, коімунопреципітація.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reed J. C., Paternosto G. Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–1999.–**96**, N 14.–P. 7614–7616.
2. Kirchhoff B. A., Gupta S., Knowlton A. A. Cytosolic heat shock protein 60, apoptosis and myocardial injury // Circulation.–2002.–**105**, N 24.–P. 2899–2904.
3. Shan Y.-X., Liu T.-J., Su H.-F., Samsamshariat A., Mestrlil R., Wang P. H. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signalling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells // J. Mol. and Cell. Cardiol.–2003.–**35**, N 9.–P. 1135–1143.
4. Kapustian L. M., Rozhko O. T., Bobyk V. I., Kroupska I. V., Riabenko D. V., Khozhaenko Yu. S., Gurtovyu V. A., Usenko V. S., Sidorik L. L. Changes in the content of molecular chaperone Hsp60 in heart tissue at di lated cardiomyopathy // Biopolym. Cell.–2008.–**24**, N 3.–P. 238–245.

5. Dufner A., Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation // *Exp. Cell Res.*—1999.—**253**, N 1.—P. 100–109.
6. Harada H., Andersen J. S., Mann M., Terada N., Korsmeyer S. J. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2001.—**98**, N 17.—P. 9666–9670.
7. Jonassen A. K., Sack M. N., Mjos O. D., Yellon D. M. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via akt and p70s6 kinase cell-survival signaling // *Circ. Res.*—2001.—**89**, N 12.—P. 1191–1198.
8. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Ann. Biochem.*—1976.—**46**.—P. 193–200.
9. Kapustian L. N., Kyyamova R. G., Gryshkova V. S., Terentiev A. G., Sidorik L. L. Obtaining recombinant chaperon CroEL and its immunological cross-reactivity with Hsp60 // *Biopolym. Cell.*—2006.—**22**, N 2.—P. 117–120.
10. Pogrebnoy P. V., Kukhareno A. P., Tykhonkova I. A., Pal'chevskiy S. S., Savinskaya L. A., Pogrebnaya A. P., Valevka T. I., Markeeva N. V., Soldatkina M. A., Matsuka G. Kh., Gout I. T., Filonenko V. V. Generation and characterization of monoclonal antibodies to p70S6kinase α // *Exp. Oncol.*—1999.—**21**, N 4.—P. 232–238.
11. Ransone L. J. Detection of protein-protein interactions by co-immunoprecipitation and dimerization // *Meth. Enzymol.*—1995.—**254**.—P. 491–497.
12. Kapustian L. M., Rozhko O. T., Tykhonkova I. O., Sidorik L. L. Interaction between Hsp60 and Bax in normal human myocardium and in myocardium affected by dilated cardiomyopathy // *Biopolym. Cell.*—2009.—**25**, N 2.—P. 142–144.
13. Avrameas S., Ternynck T. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies // *Mol. Immunol.*—1993.—**30**, N 2.—P. 119–127.
14. Masters S. C., Fu H. 14-3-3 Proteins mediate an essential anti-apoptotic signal // *J. Biol. Chem.*—2001.—**276**, N 48.—P. 45193–45200.
15. Yano M., Nakamura S., Wu X., Okumura Y., Kido H. A novel function of 14-3-3 protein: 14-3-3 ζ is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves thermal-aggregated proteins // *Mol. Biol. Cell.*—2006.—**17**, N 11.—P. 4769–4779.
16. Satoh J., Onoue H., Arima K., Yamamura T. The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein // *J. Neuropathol. and Exp. Neurol.*—2005.—**64**, N 10.—P. 858–868.

UDC 577.21
Received 17.03.10