

УДК 576.08

ПРОИЗВОДНЫЕ ИНДОЛИЛ- И ПИРРОЛИЛАЗИНОВ ВЫЗЫВАЮТ НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА Hsp70 В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SH-SY5Y

© 2020 г. В. Ф. Лазарев^{1,*}, Е. Р. Михайлова¹, М. А. Микеладзе¹, М. А. Тресцова²,
И. А. Утепова^{2,3}, академик РАН О. Н. Чупахин^{2,3}, Б. А. Маргулис¹, И. В. Гужова¹

Поступило 20.04.2020 г.

После доработки 23.04.2020 г.

Принято к публикации 23.04.2020 г.

Белок теплового шока Hsp70 участвует в защите клетки от различных видов стресса. В числе прочих – протеотоксический стресс, который возникает при развитии многих нейродегенеративных заболеваний. В настоящей работе представлены данные об обнаружении малых молекул – производных индолил- и пирролилазинов – способных активировать синтез Hsp70 и вызывать его накопление в клетке. В работе оценен уровень токсичности найденных индукторов синтеза Hsp70 и продемонстрирована безопасность этих соединений. Представленные в работе производные индолил- и пирролилазинов могут быть апробированы в качестве терапевтических агентов в моделях нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: шапероны, Hsp70, производные индолил- и пирролилазинов, HSE, нейродегенеративные заболевания, индукторы синтеза

DOI: 10.31857/S2686738920050157

Шаперонная система – один из основных защитных механизмов клетки от стрессирующих факторов. С возрастом у людей снижается активность и эффективность шаперонного аппарата. Этот процесс традиционно коррелирует с повышением вероятности развития нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с протеотоксическим стрессом [1]. К подобным патологиям следует отнести болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, амилоидозы, обширную группу полиглутаминовых заболеваний и многие другие.

Одним из ключевых элементов шаперонной системы является белок теплового шока Hsp70 (heat shock protein 70 kDa, HSPA1A). Hsp70 препятствует развитию апоптоза, участвует в протеасомной деградации белков с некорректной конформацией [2], способен связывать мутантные неправильно свернутые белки и препятствовать их агрегации при нейродегенеративных процессах [3].

В связи с этим исследователи возлагают большие надежды на применение химических индукторов белков теплового шока в качестве терапевтических агентов при лечении нейродегенеративных патологий. Соединения, способные вызывать накопление белка Hsp70 в клетках, продемонстрировали свою эффективность на моделях болезни Паркинсона [4], болезни Альцгеймера [5] и многих других. К сожалению, ни одно из известных соединений, индуцирующих синтез Hsp70, до сих пор не применяется в клинике. Одна из причин – побочные эффекты, в частности активация каспазы-3 в мотонейронах [6]. Поэтому поиск новых безопасных индукторов синтеза белков теплового шока остается актуальной проблемой современной нейробиологии.

Целью настоящей работы был поиск и верификация новых индукторов синтеза белка теплового шока Hsp70 среди доступной нам коллекции

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина”, г. Екатеринбург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

*e-mail: vl.lazarev@gmail.com

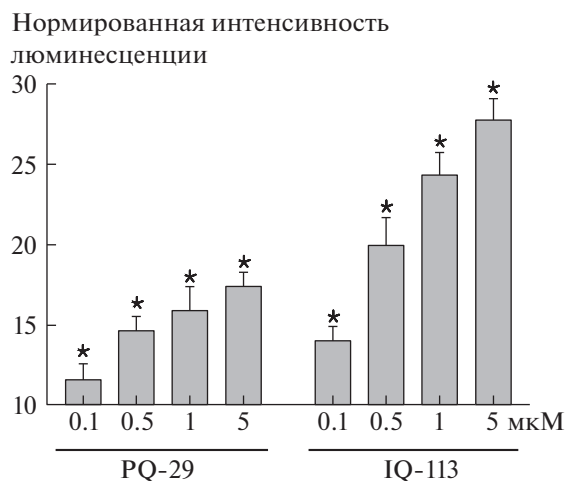


Рис. 1. Инкубация клеток HeLa-hsp70.lpr-luc с соединениями PQ-29 и IQ-113 приводит к повышению активности люциферазы. Различия с контролем достоверны (*) при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

производных индолил- и пирролилазинов (в общей сложности более 50 соединений).

Для поиска индукторов синтеза Hsp70 была использована репортерная система, основанная на клеточной линии HeLa-hsp70.lpr-luc, трансфицированной геном люциферазы под контролем промотора, содержащего участок heat shock element (HSE), который в норме регулирует экспрессию генов нескольких белков теплового шока, в частности, Hsp70. Активация промотора происходит в ответ на тримеризацию белка Hsf1 [7] и приводит к накоплению люциферазы в модельных клетках.

Клетки карциномы шейки матки HeLa были получены из Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, США), антибиотики пенициллин 100 ед./мл и стрептомицин 0.1 мг/мл (БиолоТ, Россия) при 37°C и 5% CO₂. Трансфекцию клеток осуществляли с помощью агента Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Для выведения клеток HeLa-hsp70.lpr-luc в устойчивую линию использовали селективный антибиотик G418 (Gibco, США).

Анализ активности люциферазы в клетках HeLa-hsp70.lpr-luc был проведен с помощью набора BrightGlo (Promega, Великобритания) по протоколу, рекомендованному производителем. Для проверки потенциальных индукторов синтеза Hsp70 к клеткам HeLa-hsp70.lpr-luc добавляли химические соединения в концентрации 1 мкМ и спустя 24 ч анализировали активность люциферазы. Соединения, продемонстрировавшие способность активировать HSE, были затем проверены в

том же тесте повторно, но с использованием нескольких концентраций (рис. 1). Анализ результатов и их статистическую обработку здесь и далее осуществляли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Было продемонстрировано, что производные пиррола PQ-29 и индола IQ-113 в концентрации 0.1 мкМ увеличивали активность люциферазы в 11.68 и 14.12 раза соответственно (по отношению к активности люциферазы в необработанных клетках). Увеличение концентраций PQ-29 и IQ-113 до 5 мкМ приводило к увеличению активности люциферазы до 17.47- и 27.82-кратного превосходства над необработанными клетками соответственно. Эти результаты показывают, что обнаружены соединения, вызывающие активацию HSE и синтез белков, транскрипция генов которых находится под контролем HSE-содержащего промотора.

Далее была проверена способность отобранных соединений вызывать накопление белка Hsp70 в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y (получены из Российской коллекции клеточных культур, условия культивирования были такими же, как для клеток HeLa).

За 24 ч до эксперимента клетки рассеивали в 6-луночную плату. Спустя сутки в ростовую среду добавляли PQ-29 либо IQ-113 в концентрациях 0.1, 0.5, либо 1 мкМ. В качестве положительного контроля индукции синтеза Hsp70 был использован тепловой шок при 43°C в течение 30 мин. Спустя еще 24 ч клетки лизировали, лизат подвергали электрофоретическому разделению и вестерн-блот анализу по описанному ранее протоколу [8]. Мембрану с перенесенными белками последовательно инкубировали с мышинными антителами против Hsp70 клон 3C5 [9], GAPDH (клон 6C5, Abcam, Великобритания) и затем с антителами против антител мыши, меченными пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания). Окраску блота антителами против GAPDH использовали в качестве контроля общей белковой нагрузки проб. Результат гибридизации блота с антителами приведен на рис. 2а. На основе трех независимых экспериментов с помощью программного обеспечения TotaLab Quant был произведен денситометрический анализ интенсивности окраски полученных полос. Результат оцифровки представлен на рис. 2б как нормированное отношение интенсивности зон Hsp70 к интенсивности референтного белка GAPDH. Мы продемонстрировали, что PQ-29 и IQ-113 в концентрации 1 мкМ вызывают увеличение количества белка Hsp70 в клетках нейробластомы человека в 2.38 и 2.63 раза соответственно. Важно отметить, что тепловой шок (43°C, 30 мин) приводил к повышению уровня Hsp70 в 2.35 раза, что сопоставимо с влиянием PQ-29 и IQ-113.

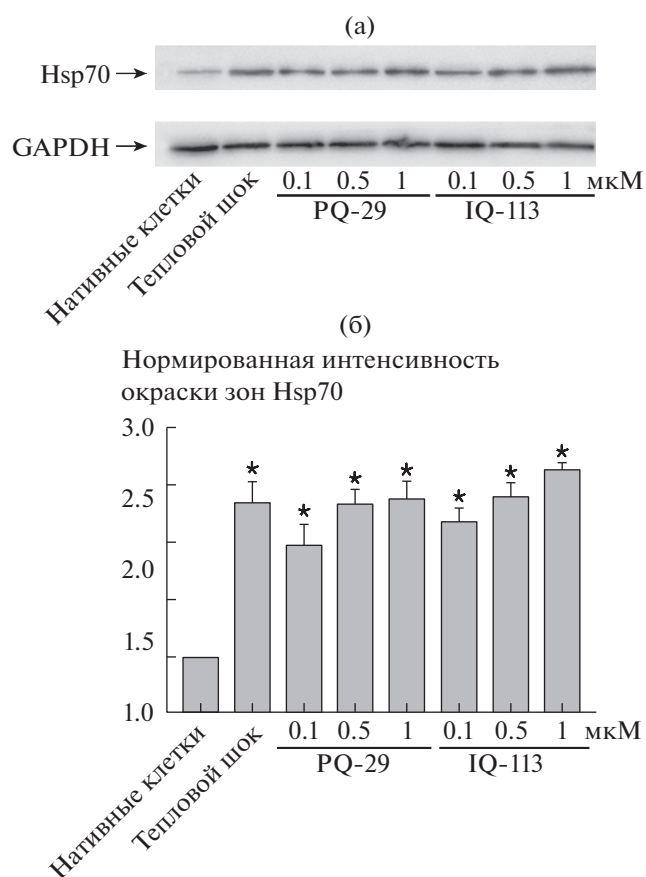


Рис. 2. Соединения PQ-29 и IQ-113 вызывают накопление белка Hsp70 в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y. (а) Результаты вестерн-блот анализа лизатов клеток SH-SY5Y, инкубированных с веществами в указанных концентрациях в течение 24 ч. (б) Результат оцифровки интенсивности зон блота, представленный как отношение интенсивности зон Hsp70 к интенсивности референтного белка GAPDH, нормированное на значение, полученное для необработанных клеток. Различия с контролем достоверны (*) при $p < 0.05$ (критерий Манна–Уитни).

Для изучения цитотоксических свойств PQ-29 и IQ-113 использовали тест определения активности внутриклеточных дегидрогеназ по Мосману (MTT-тест) согласно описанному ранее протоколу [10]. Вычисление концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) проводили на основании результатов следующего эксперимента. Клетки SH-SY5Y культивировали в присутствии различных концентраций PQ-29 либо IQ-113. Диапазон использованных концентраций составлял от 0.1 до 409.6 мкМ с двукратным шагом. Спустя 24 ч клетки анализировали с помощью MTT-теста. Для каждой экспериментальной точки было сделано по три повторности. Было установлено, что IC_{50} для соединения PQ-29 составляет 15.93 мкМ, а для IQ-113 – 32.04 мкМ (рис. 3).

Таким образом, новые индукторы синтеза Hsp70, особенно, TM-113 видятся гораздо более безопасными в сравнении с аналогами. В качестве примера можно привести найденное нами ранее вещество U-133 (производное эхинохрома), для которого параметр IC_{50} составлял немногим более 5 мкМ [11], что в 3 раза ниже, чем IC_{50} для PQ-29 и в 6 раз ниже в сравнении с IQ-113. Тем не менее, очевидно, что изучение возможных побочных эффектов найденных индукторов Hsp70 на клеточную физиологию должно стать предметом будущих исследований.

С помощью репортерной системы, основанной на клетках HeLa-hsp70.1pr-luc, были обнаружены производные индоллил- и пирролилазинов, которые вызывают накопление белка теплового шока Hsp70 в клетках. Была продемонстрирована безопасность соединений на культуре клеток нейробластомы человека при использовании их в концентрациях, вызывающих синтез Hsp70.

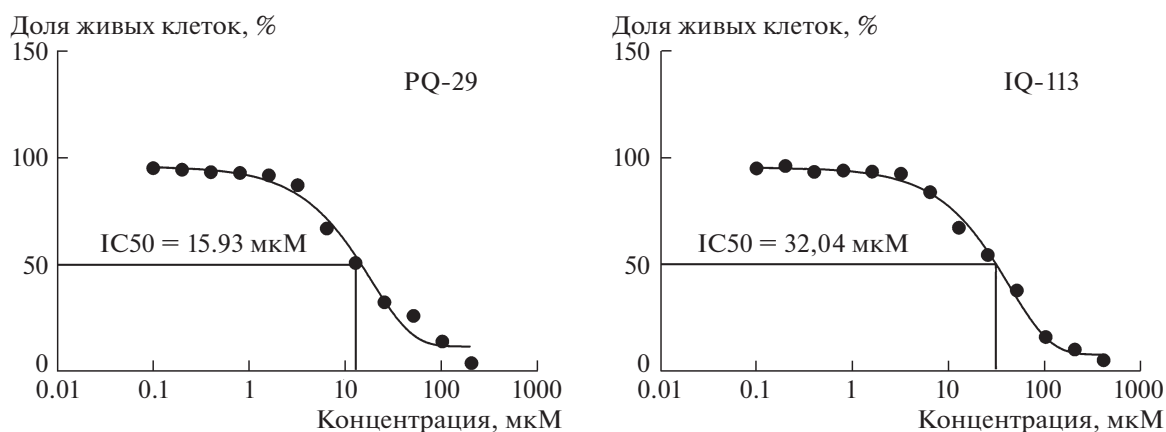


Рис. 3. Определение параметра IC_{50} для соединений PQ-29 и IQ-113 при воздействии на культуру клеток нейробластомы человека SH-SY5Y.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность профессору Р. Моримото (R. Morimoto, Северо-Западный Университет, США) за предоставленную плазмиду hsp70.lpr-luc и академику РАН В.Н. Чарушину за обсуждение и консультации по развитию исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 18-74-10087, синтез производных индолил- и пирролилазинов осуществлен при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-33-70102.

ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы В.Ф. Лазарев и Е.Р. Михайлова внесли равный вклад.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Magalhaes S., Goodfellow B.J., Nunes A. Aging and Proteins: What Does Proteostasis Have to Do with Age? // *Curr. Mol. Med.* 2018. V. 18. P. 178–189. <https://doi.org/10.2174/1566524018666180907162955>
2. Fernández-Fernández M.R., Gragera M., Ochoa-Ibarrola L., et al., Hsp70 – a master regulator in protein degradation // *FEBS Lett.* 2017. V. 591. P. 2648–2660. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12751>
3. Duncan E.J., Cheetham M.E., Chapple J.P., et al., The Role of HSP70 and Its Co-chaperones in Protein Misfolding, Aggregation and Disease // *Subcell. Biochem.* 2015. V. 78. P. 243–273. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11731-7_12
4. Ekimova I.V., Plaksina D.V., Pastukhov Y.F., et al., New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease // *Exp. Neurol.* 2018. V. 306. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.04.012>
5. Chow A.M., Tang D.W.F., Hanif A., et al., Induction of heat shock proteins in cerebral cortical cultures by celastrol // *Cell Stress Chaperones.* 2013. V. 18. P. 155–160. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0364-0>
6. Kalmar B., Greensmith L. Activation of the heat shock response in a primary cellular model of motoneuron neurodegeneration - Evidence for neuroprotective and neurotoxic effects // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2009. V. 14. P. 319–335. <https://doi.org/10.2478/s11658-009-0002-8>
7. Westerheide S.D., Bosman J.D., Mbadugha B.N.A., et al., Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 56053–56060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409267200>
8. Lazarev V.F., Sverchinskyi D.V., Ippolitova M.V., et al., Factors affecting aggregate formation in cell models of huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis // *Acta Naturae.* 2013. V. 5.
9. Lasunskaja E.B., Fridlianskaia I., Arnoldt A.V., et al., Sub-lethal heat shock induces plasma membrane translocation of 70-kDa heat shock protein in viable, but not in apoptotic // U-937 leukaemia cells, *APMIS.* 2010. V. 118. P. 179–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02576.x>
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> (accessed May 21, 2019).
11. Lazarev V.F., Onokhin K. V., Antimonova O.I., et al., Kinetics of chaperone activity of proteins Hsp70 and Hdj1 in human leukemia u-937 cells after preconditioning with thermal shock or compound u-133. // *Biochemistry. (Mosc).* 2011. V. 76. P. 590–5. <https://doi.org/10.1134/S0006297911050099>

INDOLYL- AND PYRROLILAZINE DERIVATIVES CAUSE THE ACCUMULATION OF HEAT SHOCK PROTEIN Hsp70 IN SH-SY5Y HUMAN NEUROBLASTOMA CELLS

V. F. Lazarev^{a,#}, E. R. Mikhaylova^a, M. A. Mikeladze^a, M. A. Trestsova^b, I. A. Utepova^{b,c}, Academician of the RAS O. N. Chupakhin^{b,c}, B. A. Margulis^a, and I. V. Guzhova^a

^a Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^b Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

^c Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

#e-mail: vl.lazarev@gmail.com

The heat shock protein Hsp70 is involved in protecting cells from various types of stress. Among others – proteotoxic stress, which occurs during the development of many neurodegenerative diseases. This work presents data on the detection of small molecules – derivatives of indolyl- and pyrrolilazines – capable of activating the synthesis of Hsp70 and causing its accumulation in the cell. The toxicity level of the new Hsp70 synthesis inducers was evaluated and the safety of these compounds was demonstrated in experiments on neuroblastoma SH-SY5Y cell line. Derivatives of indolyl- and pyrrolilazines presented in this work can be potential therapeutic agents in models of neurodegenerative diseases that should be studied in more detail.

Keywords: molecular Chaperones, Hsp70 heat shock proteins, indolyl- and pyrrolilazine derivatives, heat shock element, neurodegenerative diseases, synthesis inducers