

УДК 577.156; 577.151.64

ИОНЫ МЕТАЛЛОВ – АКТИВАТОРЫ ФАКТОРА, ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ

А.И. Осипьянц^{1*}, Н.А. Смирнова¹, А.Ю. Христиненко¹, С.В. Никулин¹,
А.А. Захарянц³, В.И. Тишков^{2,3*}, И.Г. Газарян^{1,2}, А.А. Полозников¹

(¹ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; ²химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; ³ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; *e-mail: osssip@gmail.com; vitishkov@gmail.com)

Исследована активация антигипоксической программы под действием ряда переходных и тяжелых металлов с помощью клеточных репортеров HIF1 ODD-luc и HRE-luc. Показано, что Au³⁺, Pb²⁺, Sn²⁺ и Hg²⁺ проявили себя как исключительно слабые активаторы репортера HIF1 ODD-luc, что, вероятно, отражает их слабую конкуренцию за сайт связывания железа в активном центре HIF-пролилгидроксилазы. Активация под действием металлов, способных замещать железо (Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ и Ni²⁺), наступает при очень высоких, субмиллимолярных концентрациях, что свидетельствует о плохой проницаемости клеточной мембраны для данных переходных металлов. Наибольшая активация наблюдается для Co²⁺ и Cd²⁺, но Cd²⁺ высокотоксичен даже при концентрациях выше 10 мкМ, в отличие от Co²⁺, активирующего в течение 24 ч оба репортера без признаков токсичности вплоть до концентрации 25 мкМ. Значительная активация Co²⁺ наблюдается уже в микромолярном диапазоне концентраций, которые можно рекомендовать для имитации гипоксии.

Ключевые слова: люцифераза, репортерный анализ, переходные металлы, тяжелые металлы, кобальт.

Список использованных в статье сокращений: HIF (hypoxia inducible factor) – фактор, индуцируемый гипоксией, HRE (hypoxia response element) – «элемент» гипоксического отклика, PHD – prolyl hydroxylase, pVHL (von Hippel-Lindau protein) – белок фон Хиппеля–Линдау.

Генетически запрограммированный отклик на гипоксию регулируется кислородзависимыми ферментами, к которым относятся и α -кетоглутаратзависимые негеминовые диоксигеназы. В качестве субстратов этих ферментов выступают как белки (транскрипционные факторы и гистоны), так и ДНК [1]. К одним из наиболее популярных субстратов этой группы ферментов относится HIF, открытый в 1992 г. [2, 3]. HIF включает транскрипцию более 100 генов, действие которых направлено на выживание клетки в условиях нехватки кислорода. HIF состоит из двух субъединиц – α - и β -. Стабильность первой из них регулируется гидроксигированием остатка пролина 564, катализируемым HIF-пролилгидроксилазой (PHD) – ферментом, открытым в 2002 г., т.е. значительно позже, чем сам HIF [4]. Последовательность, содержащая гидроксигированный пролин, распознается белком фон Хиппеля–Линдау (pVHL), входящим в убиквитинлигазный комплекс, обеспечивающий убиквитинирование α -субъединицы, приводящее к ее последующей протеасомной деградации. Именно гидроксигирование пролина под действием HIF PHD можно считать основным механизмом

регуляции белковой стабильности HIF, причем эта ферментативная стадия лимитирует скорость всего многоступенчатого процесса деградации HIF α .

HIF PHD – металлозависимый фермент; атом железа координируется тремя аминокислотными остатками в активном центре HIF PHD, молекулой субстрата (α -кетоглутарата) и молекулой воды, как показано на рис. 1. Металлы, которые так же, как и железо, могут использовать в качестве координационных лигандов остатки гистидина и карбоксильные группы, должны проявлять себя как ингибиторы фермента HIF PHD. В ряде случаев именно с помощью координации других металлов, например марганца (5L9B.pdb или 4BQW.pdb) и никеля (4JZR.pdb), в активном центре рекомбинантной HIF PHD были получены ее кристаллы и установлена кристаллическая структура.

Для ингибирования активности в физиологических условиях внутри клетки имеет значение не только способность иона металла замещать железо в активном центре фермента, но и его способность проникать через клеточную мембрану. В этой связи представляет интерес исследование ряда переходных и тяжелых металлов на способ-

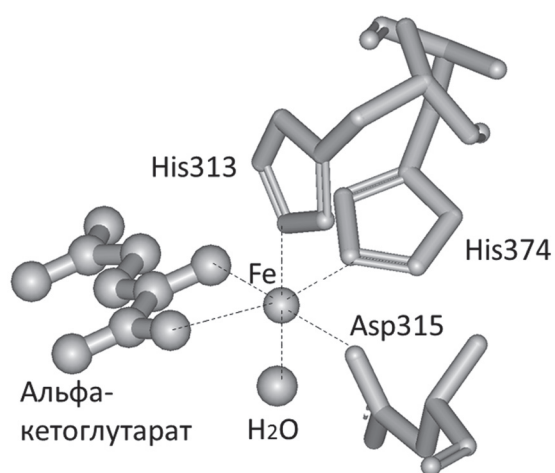


Рис. 1. Каталитический центр HIF-пролилгидроксилазы

ность стабилизировать и активировать HIF, используя клеточные репортеры на основе люциферазы светляков.

В настоящее время существуют два типа репортеров.

1. Наиболее популярны и коммерчески доступны «промоторные» репортеры, которые представляют собой ген люциферазы под контролем промотора, активируемого определенным транскрипционным фактором за счет распознавания и взаимодействия со специфической последовательностью, в нашем случае с так называемым «элементом» гипоксического отклика (HRE). Такой репортер (HRE-luc) [5] отличает интегральный отклик, чувствительный ко всем стадиям активации транскрипционного фактора, начиная от его стабилизации, дополнительной посттрансляцион-

ной модификации под действием ацетилаз и киназ, транслокации в ядро, образования комплекса с белками-активаторами транскрипции, и наконец, собственно синтеза люциферазы, активность которой и детектируют. Отклик репортеров такого типа наступает со значительным запаздыванием (индукционный период около 3 ч) и невелик по абсолютной величине сигнала люминесценции по сравнению с репортерами второго типа, как показано на примере репортеров антиоксидантного отклика [6].

2. Ко второму типу относятся так называемые «фьюжен»-репортеры, позволяющие следить за интересующим белком в виде его гибрида с белком-маркером. Они специфичны исключительно к стадии стабилизации интересующего белка. Репортеры такого типа пригодны для визуализации транскрипционного фактора в клетке и для высокопродуктивного скрининга потенциальных лекарственных препаратов – активаторов транскрипционного фактора, действующих по принципу стабилизации белка.

В нашем случае предполагалось использование клеточного репортера, регистрирующего стабилизацию кислородчувствительного домена HIF α (HIF ODD – oxygen dependent degradation domain) в виде его гибридного белка с люциферазой светляков (HIF ODD-luc) [7]. Принцип действия репортера HIF ODD-luc представлен на рис. 2. Гибридный ген клонирован под контролем сильного конститутивного промотора (pCMV), который обеспечивает постоянный синтез гибридного белка, состоящего из HIF ODD домена с гидроксильруемым Pro564

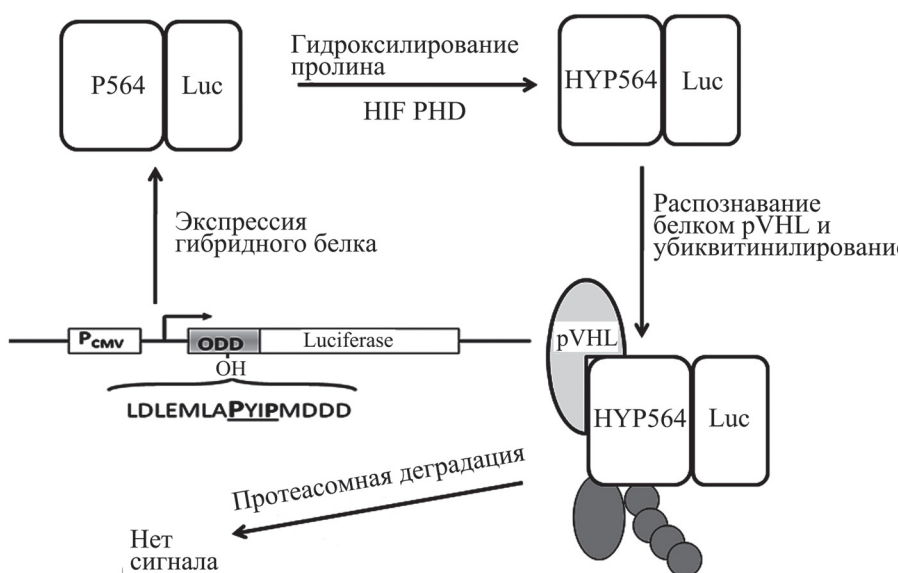


Рис. 2. Принцип действия репортера HIF1 ODD-luc

(N-концевой домен гибридного белка), и фермента люциферазы (C-концевой домен) [7]. HIF ODD домен, имеющий в своем составе Pro564, является субстратом HIF PHD: Pro564 подвергается гидроксигированию, и весь гибридный белок распознается белком pVHL, убиквитинируется и подвергается протеасомной деградации, которая разрушает и белок люциферазы. Таким образом, в стационарном состоянии, люминесцентный сигнал репортера минимален и соответствует равновесной концентрации гибридного белка. При проведении валидации и оптимизации клеточного репортера в целях скрининга активаторов HIF было показано, что скорость-лимитирующей стадией действия клеточного репортера служит стадия, катализируемая HIF PHD. Была также проведена оценка равновесной концентрации гибридного белка (4 нМ [7]), которая оказалась намного ниже константы Михаэлиса. Таким образом, репортер функционирует в условиях ненасыщения по субстрату. Ингибиторы фермента приводят к немедленной стабилизации гибридного белка, что выражается в увеличении люминесцентного сигнала на порядки, а это позволяет сразу регистрировать накопление гибридного белка под действием ингибиторов фермента (активаторов HIF). Как было нами показано на примере изучения антигипоксических свойств флавоноидов [8], стабилизация HIF α обязательно ведет к его активации – активаторы репортера HIF ODD-luc всегда проявляют себя как активаторы HRE-luc, но не наоборот. Активация HRE-luc может отражать стадии, отличные от стабилизации HIF-белка (см. ниже в разделе «Материалы и методы»).

В данной работе была проанализирована способность металлов активировать клеточные репортеры обоих типов и, следовательно, стабилизировать и активировать HIF. Была изучена активация репортеров в широком диапазоне концентраций под действием ионов цинка, марганца, никеля, меди, кобальта, кадмия, свинца, золота, олова, и ртути. Полученные результаты хорошо объясняют, почему именно обработка клеток ионами кобальта так широко используется для моделирования (имитации) гипоксии.

Материалы и методы

Реактивы. В работе использовали следующие соли металлов:

HgCl₂, H[Au(Cl)₄], SnCl₂×2H₂O, CuCl₂,
MnCl₂×4H₂O, Pb(CH₃COO)₂×3H₂O,
CdSO₄×8/3H₂O, CoCl₂×6H₂O, Ni(NO₃)₂×6H₂O,
Zn(CH₃COO)₂.

Растворы металлов сначала готовили в воде, а

затем разбавляли в Трис-HCl-буфере (pH 7,4) для получения запасных растворов (5 мМ). Все химические реактивы были приобретены у фирмы «Sigma-Aldrich» (США), за исключением реактивов для работы с клеточными культурами («Gibco», США), а также буфера для лизиса клеток и люциферазного реагента BrightGlo™ («Promega», США).

Репортерный анализ HIF1 ODD-luc. Использовали клеточную линию нейробластомы человека SH-SY5Y, стабильно экспрессирующую репортер HIF1 ODD-luc [7]. Клетки культивировали до конfluence, затем разбавляли в 20 раз средой для культивирования DMEM/F12+GlutaMAX («Gibco», США) и засеивали по 100 мкл в стерильные белые 96-луночные микропланшеты плотностью 25 000 клеток на лунку, потом дополнительно культивировали в течение 16 ч при 37 °С в присутствии 5% CO₂. Добавляли аликваты стоков солей металлов до желаемой конечной концентрации и инкубировали в тех же условиях 4 или 24 ч. По окончании инкубации клетки разрушали и измеряли люминесцентный сигнал на спектрофотометре «SpectraMax M5e» («Molecular Devices», США) с помощью люциферазного реагента фирмы «Promega» (США). В качестве положительного контроля использовали циклопирокс. Люминесцентный сигнал в присутствии ионов металлов нормировали на фоновый сигнал репортера в отсутствие добавок.

Репортерный анализ HRE-luc. Вектор для экспрессии гена люциферазы светляков под контролем промотора гена енолазы, содержащего элемент гипоксического отклика (HRE, 5'-RCTGT-3'), был сконструирован ранее в целях скрининга активаторов HIF с разными механизмами действия [5]. Клеточная линия на основе иммортализованных нейронов гиппокампа мыши HT22, стабильно экспрессирующая репортер HRE-luc, позволяет идентифицировать активаторы HIF, которые работают по механизму активации транскрипции, активации связывания HIF с HRE, активации и стабилизации белка HIF (ингибиторы HIF PHD, pVHL, протеасомы). Проведение данного репортерного анализа аналогично предыдущему, за исключением того, что плотность засева составляет 10 000 клеток на лунку. Все эксперименты проводились в тройном повторе.

Результаты и обсуждение

Изучение влияния ионов металлов, имеющих высокое сродство к сульфгидрильным группам, таких как Au³⁺, Pb²⁺, Sn²⁺ и Hg²⁺ (рис. 3, А) пока-

зало, что эти металлы являются очень слабыми активаторами репортера и, следовательно, слабо конкурируют с железом за активный центр HIF PHD, формируемый карбоксильными остатками и двумя остатками гистидина (рис. 1). Данные ионы хорошо проникают через клеточную мембрану, и небольшая активация отражает их слабую конкуренцию по отношению к железу активного центра.

Ионы металлов, которые гораздо хуже проникают через клеточную мембрану (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), вызывают активацию репортера при очень высоких концентрациях (рис. 3, Б). При этом наибольшей амплитудой активации (в 3–4 раза) отличаются ионы Mn^{2+} и Zn^{2+} , а ионы Cu^{2+} и Ni^{2+} даже при высоких концентрациях активируют репортер незначительно. Как хорошо известно, ионы Mn^{2+} и Zn^{2+} способны замещать железо в активном центре железосодержащих ферментов, включая гем-содержащие ферменты, такие как пероксидазы растений, поэтому мож-

но было ожидать значительной активации репортера уже при их микромолярной концентрации. Отсутствие такой активации можно считать следствием низкой проницаемости клеточной мембраны для этих ионов металлов.

Наибольшие амплитуды активации (в 5–7 раз) наблюдались для ионов Co^{2+} и Cd^{2+} (рис. 3, В). При этом Cd^{2+} токсичен при концентрациях выше 100 мкМ, а Co^{2+} не проявляет токсичности и при 500 мкМ. Следует отметить, что все эксперименты проводились при трехчасовой инкубации, чтобы детектировать стабилизаторы репортера прямого действия, т.е. действующие именно как ингибиторы HIF PHD, которые конкурируют за железо активного центра фермента. В связи с высокой активностью кобальта и кадмия было проведено их дополнительное исследование с использованием двух клеточных репортеров – HIF1 ODD-luc и HRE-luc (рис. 4) в более низком диапазоне концентраций и при инкубации разной продолжительности (4 и 24 ч), в качестве

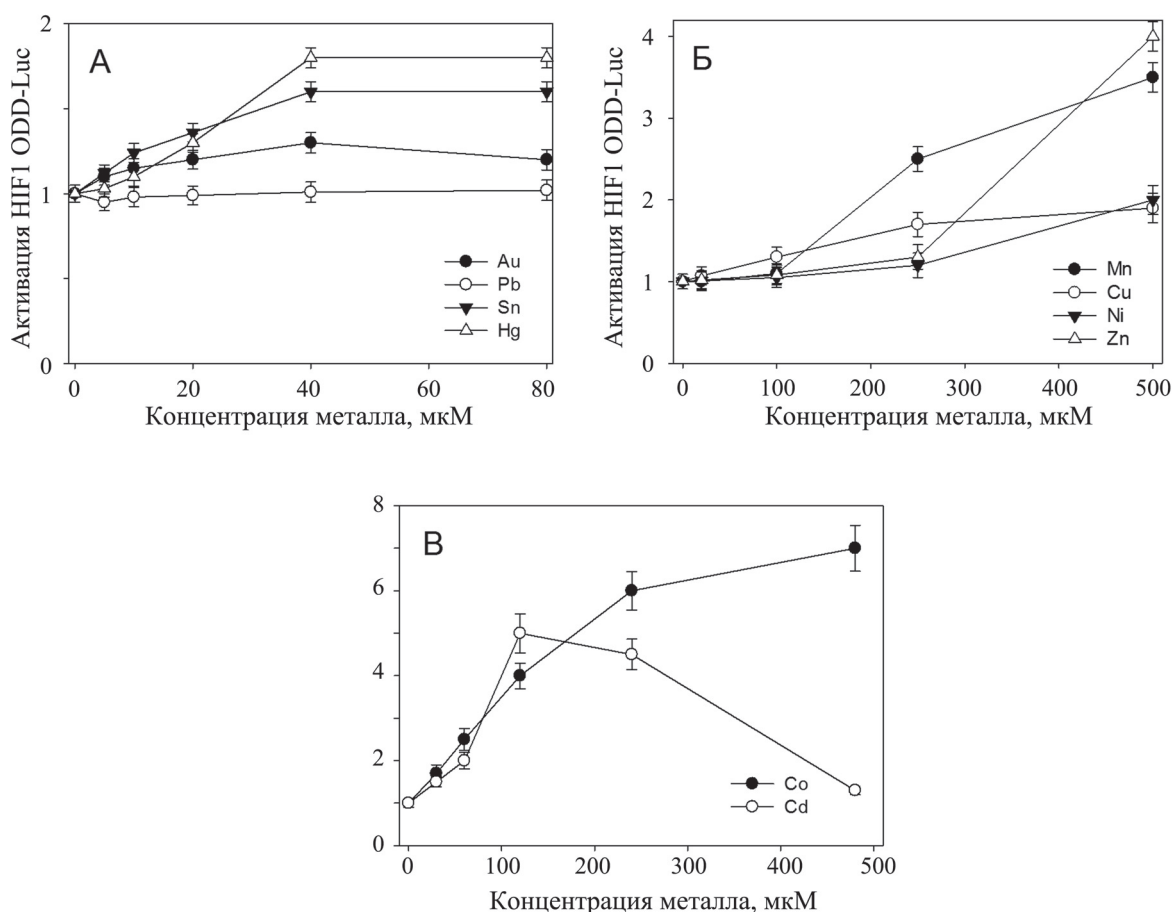


Рис. 3. Активация репортера HIF1 ODD-luc под действием переходных и тяжелых металлов (инкубация 3 ч)

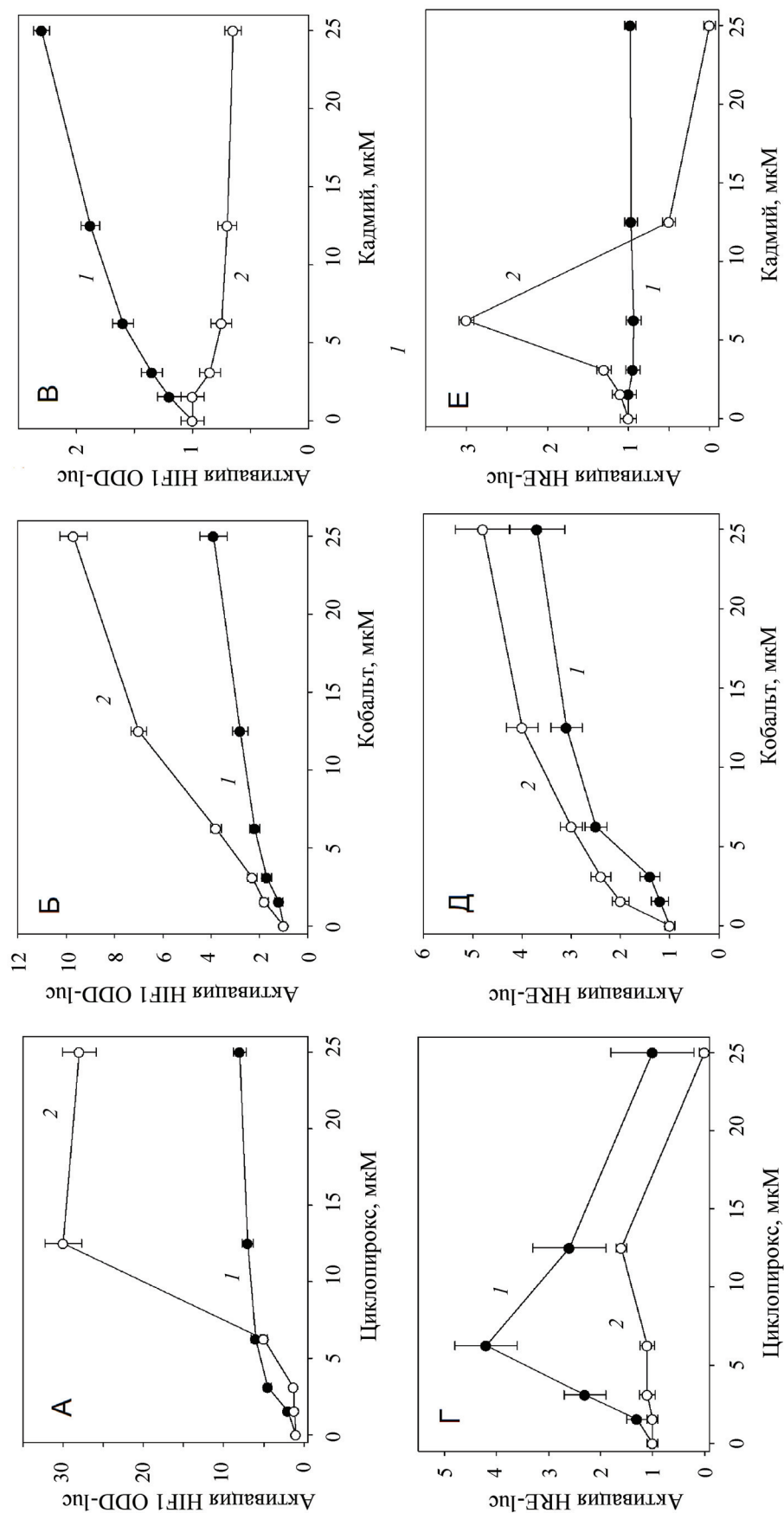


Рис. 4. Активация репортеров NIF1 ODD-luc (А–В) и HRE-luc (Г–Е) под действием циклопирокса (А, Г), кобальта (Б, Д), и кадмия (В, Е) при 4 (1) и 24 (2) ч инкубации

контрольного ингибитора активности фермента был выбран циклопирокс – сильный хелатор железа (с константой около 50 мкМ), способный встраиваться в активный центр фермента в соответствии с результатами компьютерного моделирования [9].

Как следует из данных рис. 4, А–В, циклопирокс, Co^{2+} и Cd^{2+} активны в микромолярном диапазоне уже при 4 ч инкубации, однако циклопирокс в три раза превосходит данные металлы по амплитуде активации. При увеличении продолжительности активации до 24 ч амплитуда активации под действием циклопирокса увеличивается во много раз, но при концентрациях выше 10 мкМ появляется токсичность (рис. 4, А). Такой вывод подтверждается при рассмотрении отклика интегрального репортера HRE-luc (рис. 4, Г) – активация HIF-зависимой транскрипции под действием циклопирокса достигает пика при 5 мкМ и 4-часовой инкубации, а затем резко падает при дальнейшем увеличении концентрации ингибитора. При 24-часовой инкубации в данном диапазоне концентраций вообще не наблюдается активации транскрипции. Полученные результаты хорошо объясняют тот факт, что сильные хелаторы железа представляют опасность как активаторы антигипоксической программы, поскольку железо участвует во многих внутриклеточных процессах в составе различных белков и ферментов и его продолжительное хелатирование вызывает смерть клеток. В данном конкретном случае циклопирокс из-за высокой токсичности, появляющейся при продолжительной инкубации, не может быть предложен в качестве ингибитора, моделирующего гипоксию.

Похожая ситуация наблюдается и для Cd^{2+} (рис. 4, В, Е): при продолжительной инкубации клетки гибнут, и стабилизации гибридного белка не наблюдается (рис. 4, В). Отклик интегрального репортера HRE-luc (рис. 4, Е) довольно интересен: стабилизация транскрипционного фактора под действием Cd^{2+} (рис. 4, В) оказывается недостаточной для активации транскрипции в течение 4-часовой инкубации, но при 24-часовой инкубации наблюдается активация транскрипции с пиком при концентрации 7 мкМ Cd^{2+} . (рис. 4, Е). Характер активации прямо указывает на наличие сильной токсичности. Вероятно, Cd^{2+} оказывает влияние на многие вну-

триклеточные процессы, в том числе замедляет транскрипцию генов.

Что же касается эффектов Co^{2+} , то они исключительно положительны в плане активации обоих репортеров (рис. 4, Б, Д) – токсичности не наблюдается в диапазоне концентраций до 25 мкМ при 24-часовой инкубации. Напротив, продолжительная инкубация способствует как дополнительной стабилизации транскрипционного фактора (рис. 4, Б), так и его активации (рис. 4, Д). Эффект усиления стабилизации и активации при увеличении времени инкубации позволяет предполагать, что внутриклеточная концентрация Co^{2+} растет с течением времени. Это предположение находит хорошее подтверждение в литературе: Co^{2+} проходит через внутриклеточную мембрану в результате активного АТФ-зависимого транспорта, что приводит к многократному (в 20 раз) увеличению его внутриклеточной концентрации, которая стабилизируется примерно через 10 ч [10]. Таким образом, именно многократная концентрация Co^{2+} внутри клетки позволяет ему эффективно конкурировать с субмикромолярным количеством железа за активность обсуждаемого фермента.

Инкубация с Co^{2+} в изученном диапазоне концентраций может рассматриваться как эффективный способ моделирования гипоксии. Однако анализ литературных данных показывает, что для имитации гипоксии используются гораздо более высокие концентрации (от 30 до 300 мкМ) в зависимости от типа клеточной культуры, при этом наблюдается активация как антигипоксической программы, контролируемой HIF1, так и антиоксидантной программы, контролируемой транскрипционным фактором Nrf2, и некоторых других [11]. Концентрация Co^{2+} 1–2 mM считается острой токсической для клеток. При такой высокой концентрации из 85 генов, активированных под действием Co^{2+} , только 7 генов были общими с набором генов, активированных гипоксией [12]. На основании полученных в нашем исследовании данных можно рекомендовать значительно более низкие (микромолярные) концентрации Co^{2+} для имитации гипоксии, поскольку уже при таких концентрациях происходит 3–4-кратная активация транскрипции HIF-зависимых генов и не наблюдается токсичности вплоть до установления концентрации 25 мкМ при инкубации продолжительностью более суток.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-10226).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rose N.R., McDonough M.A., King O.N.F., Kawamura A., Schofield C.J. // Chem. Soc. Rev. 2011. Vol. 40. P. 4364.
- Semenza G.L., Wang G.L. // Mol.Cell.Biol. 1992. Vol. 12. P. 5447.
- Wang G.L., Semenza G.L. // J.Biol.Chem. 1993. Vol. 268. P. 21513.
- Bruick R.K., McKnight S.L. // Science. 2001. Vol. 294. P. 1337.
- Semenza G.L., Jiang B.H., Leung S.W., Passantino R., Concordet J.P., Maire P., Giallongo A. // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 32529.
- Smirnova N.A., Haskew-Layton R.E., Basso M., Hushpalian D.M., Payappilly J.B., Speer R.E., Ahn Y.H., Rakhman I., Cole P.A., Pinto J.T., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // Chem. Biol. 2011. Vol. 18. P. 752.
- Smirnova N.A., Rakhman I., Moroz N., Basso M., Payappilly J., Kazakov S., Hernandez-Guzman F., Gaisina I.N., Kozikowski A.P., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // Chem. Biol. 2010. Vol. 17. P. 380.
- Smirnova N.A., Kaidery N.A., Hushpalian D.M., Rakhman I.I., Poloznikov A.A., Tishkov V.I., Karuppagounder S.S., Gaisina I.N., Pekcec A., Leyen K.V., Kazakov S.V., Yang L., Thomas B., Ratan R.R., Gazaryan I.G. // Aging Dis. 2016. Vol. 7. P. 745.
- Ma T.C., Langley B., Ko B., Wei N., Gazaryan I.G., Zareen N., Yamashiro D.J., Willis D.E., Ratan R.R. // Neurobiol. Dis. 2013. Vol. 49. P. 13.
- Kasten U., Hartwig A., Beyersmann D. // Arch.Toxicol. 1992. Vol. 66. P. 592.
- Permenter M.G., Dennis W.E., Sutto T.E., Jackson D.A., Lewis J.A., Stallings J.D. // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e83751.
- Malard V., Berenguer F., Prat O., Ruat S., Steinmetz G., Quemeneur E. // BMC. Genomics. 2007. Vol. 8. P. 147.

Поступила в редакцию 22.11.17

METAL IONS AS ACTIVATORS OF HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR

A.I. Osipyants^{1*}, N.A. Smirnova¹, A.Yu. Khristichenko¹, S.V. Nikulin¹,
A.A. Zakhariants³, V.I. Tishkov^{2,3*}, I.G. Gazaryan^{1,2}, A.A. Poloznikov¹

(¹D. Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Healthcare Ministry of Russia; ²M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Faculty; ³Innovations and High Technologies MSU Ltd; *e-mail: osssip@gmail.com, vitishkov@gmail.com)

Activation of antihypoxic program under the action of a number of transition and heavy metals has been studied using cell-based HIF1 ODD-luc and HRE-luc reporters. It has been demonstrated that Au³⁺, Pb²⁺, Sn²⁺, Hg²⁺ are weak HIF1 ODD-luc activators, likely reflecting their weak competition for the iron-binding site in the active center of HIF prolyl hydroxylase. Metals capable of replacing iron – Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ и Ni²⁺ – activate at high submillimolar concentrations, which indicates low permeability of the cell membrane for transition metals. The highest activation is observed for Co²⁺ and Cd²⁺, however, Cd²⁺ is highly toxic even at 10 μM, in contrast to Co²⁺, which activates both reporters without toxicity signs up to 25 μM for 24 h. A significant activation by Co²⁺ is observed already in low micromolar range of concentrations, which can be recommended for use in hypoxia mimicking.

Key words: luciferase, reporter assay, transition metals, heavy metals, cobalt.

Сведения об авторах: Осипьянц Андрей Игоревич – науч. сотр. лаборатории биохимии и энзимологии ФГБУ «Национальный медицинско-исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии (НМИЦ ДГОИ) им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ (osssip@gmail.com); Смирнова Наталья Алексеевна – ст. науч. сотр. лаборатории биохимии и энзимологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, канд. биол. наук (nasmirno@yahoo.com); Христиченко Анна Юрьевна – лаб.-иссл. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ (hristik14@gmail.com); Никулин Сергей Вячеславович – мл. науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ (nikulin.s.b@gmail.com); Захарянц Арпенник Ашотовна – мл. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (arpesha@inbox.ru); Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com); Газарян Ирина Георгиевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, сотр. ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; вед. науч. сотр. ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (igazaryan@gmail.com); Полозников Андрей Александрович – зав. лабораторией биохимии и энзимологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, канд. хим. наук (andrey.poloznikov@gmail.com).