

РОЛЬ МЕМБРАНО-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА Hsp90 В МИГРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *in vitro* И УЧАСТИЕ КЛЕТОЧНЫХ ГЕПАРАНСУЛЬФАТОВ В СВЯЗЫВАНИИ ЭТИХ БЕЛКОВ НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ

© 2016 г. А.В. Снигирева, В.В. Врублевская, Ю.Ю. Скарга, О.С. Моренков

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: snigireva.s@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.15 г.

Белок теплового шока Hsp90, обнаруживаемый во внеклеточном пространстве и на клеточной мембране, играет важную роль в клеточной подвижности, миграции, инвазии и метастазировании опухолевых клеток. В настоящее время функциональная роль и молекулярные механизмы ассоциации Hsp90 с плазматической клеточной мембраной неизвестны. С помощью антител, специфичных к двум изоформам Hsp90, Hsp90 α и Hsp90 β , в работе показано, что мембрано-ассоциированные Hsp90 α и Hsp90 β играют важную роль в миграции опухолевых клеток фибросаркомы (HT1080) и глиобластомы (A-172) человека *in vitro*. Нарушение сульфирования клеточных гепарансульфатов, разрушение клеточных гепарансульфатов с помощью гепариназы I/II, а также обработка клеток гепарином приводят к резкому снижению уровня мембранной экспрессии обеих изоформ Hsp90. Кроме этого, гепарин существенно ингибирует миграцию опухолевых клеток. Полученные результаты свидетельствуют об участии двух изоформ мембрано-ассоциированного Hsp90 в миграции опухолевых клеток *in vitro* и важной роли клеточных гепарансульфатов в «заякоривании» Hsp90 α и Hsp90 β на плазматической мембране.

Ключевые слова: мембрано-ассоциированный Hsp90, изоформы Hsp90 α и Hsp90 β , клеточные гепарансульфаты, миграция клеток.

Большинство клеток животных способно активно двигаться. Клеточная подвижность играет ключевую роль во многих нормальных физиологических процессах, включая, например, миграцию клеток в процессе гастрюляции и в процессе регенерации тканей [1]. Во многих типах тканей движение клеток в норме репрессировано, но активируется при ранозаживлении (миграция кератиноцитов в область раны) или при онкогенной трансформации [2,3]. В последнем случае миграция опухолевых клеток является основой таких патологических процессов, как инвазия опухолевых клеток и метастазирование. Миграция клеток является сложным биологическим процессом, в котором центральную роль играет скоординированная реорганизация цитоскелета, мембраны и систем клеточной ад-

гезии [1]. Механизмы регуляции клеточной подвижности изучены недостаточно.

Недавно было показано, что важную роль в регуляции миграции нормальных и опухолевых клеток играют экстраклеточные белки теплового шока 90 (Hsp90) [4–7]. Известно, что внутриклеточный Hsp90 является молекулярным шапероном, участвующим в фолдинге вновь синтезированных белков и рефолдинге белков, потерявших нативную конформацию, предотвращении агрегации белков, а также их поддержании в нативном реакционноспособном состоянии [8–11]. У Hsp90 обнаружено более сотни внутриклеточных белков-клиентов, многие из которых участвуют в клеточной сигнализации, регуляции клеточного цикла и клеточной пролиферации [10,12]. Существуют две изоформы внутриклеточного Hsp90 – Hsp90 α (индуцибельная форма) и Hsp90 β (конститутивная форма). Кроме внутриклеточной локализации, обе изоформы Hsp90 также обнаруживаются во внеклеточном пространстве (секретированный Hsp90) и на поверхности (мембрано-ассоциированный Hsp90) клеток разного типа

Сокращения: Hsp90 – белок теплового шока 90, ГС – гепарансульфаты, ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка, БСА – бычий сывороточный альбумин, ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор, ИФА – иммуноферментный анализ.

в нормальных и стрессовых условиях [13–15]. Установлено, что экстраклеточный секретированный Hsp90 активирует клеточную подвижность, инвазию и метастазирование опухолевых клеток. Так, например, экстраклеточный Hsp90 α способствует миграции эпидермальных и дермальных клеток, образуя комплекс с рецептором LRP-1/CD91 на плазматической мембране клеток [17–19]. Экстраклеточные Hsp90 α и Hsp90 β могут выступать в качестве экстраклеточных шаперонов и регулировать работу таких мембрано-связанных или секретлируемых белков, как матриксные металлопротеиназы, обеспечивая поддержание инвазивного статуса опухолевых клеток [20,21]. Показано взаимодействие поверхностного Hsp90 с внеклеточным доменом HER-2 [6] и влияние этого комплекса на инвазивную способность клеток.

Механизмы секреции Hsp90 и его ассоциации с плазматической клеточной мембраной слабо изучены. У Hsp90 отсутствует лидерный пептид, и секреция Hsp90 осуществляется не по классическому ЭПР/Гольджи-опосредованному пути, а по экзосомальному пути [5,16]. У Hsp90 также нет трансмембранного домена, в связи с чем он не может фиксироваться на плазматической мембране как классические мембранные белки [5,13,16]. К настоящему времени до конца не определена функциональная роль мембрано-ассоциированных Hsp90, однако известно, что мембранная экспрессия Hsp90 существенно повышена у опухолевых клеток и коррелирует с инвазивным статусом клеток [4,7,22,23]. Данные о роли отдельных изоформ экстраклеточного Hsp90 в клеточной подвижности весьма противоречивы [17,24–27].

В данной работе нами впервые показано участие двух изоформ мембрано-ассоциированного Hsp90, Hsp90 α и Hsp90 β , в миграции опухолевых клеток фибросаркомы (HT1080) и глиобластомы (A-172) человека *in vitro* и установлена роль клеточных гепарансульфатов (ГС) в фиксации двух изоформ Hsp90 на плазматической мембране опухолевых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе использовали клеточные линии фибросаркомы (HT1080) и глиобластомы (A-172) человека из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки выращивали в среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) и антибиотики (по 40 ед. пенициллина, стрептомицина, гентамицина) (ДМЕМ-10% ЭБС).

Получение Hsp90-специфических антител. С помощью специальных программ и баз данных (Immune Epitope Database and Analysis Resource, ISPRI Web-based Immunogenicity Screening) был проведен анализ аминокислотных последовательностей двух изоформ Hsp90 млекопитающих и выбраны иммуногенные пептиды из разных областей Hsp90. Синтезированы пептиды, соответствующие фрагментам Hsp90 α (PE-ETQTQDQPM) и Hsp90 β (EEVNHGEEEEVE) человека и мыши, не имеющие гомологии между собой. У всех пептидов на С-конце вводили дополнительный цистеин для конъюгирования с белками с использованием гетеробифункционального кросслинкера Sulfo-SMCC. На основе пептидов получены конъюгаты с бычьим сывороточным альбумином (БСА), овальбумином и гемоцианином. Кроликов многократно иммунизировали конъюгатами пептидов с овальбумином или гемоцианином, а также нативным Hsp90, очищенным из мозга мыши, как описано нами ранее [28]. Для иммуоаффинной очистки антител из гипериммунных сывороток использовали гель агарозы с ковалентно пришитыми Hsp90-специфическими пептидами, конъюгированными с носителем по С-концевым цистеинам с использованием SulfoLink Immobilization Kit для пептидов (Thermo Scientific, США). Для очистки антитела осаждали из антисывороток с помощью 40%-го сульфата аммония, наносили на колонку с гелем, уравновешенную фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР, 150 мМ NaCl, 2 мМ K₂HPO₄ и 5,2 мМ Na₂HPO₄, pH 7,4), колонку промывали ФСБР и Hsp90-специфические антитела элюировали 0,1 М Na-цитратным буфером (pH 3,0). Антитела нейтрализовали трис-основанием и диализовали против ФСБР. Чистоту антител оценивали с помощью электрофореза.

Непрямой и конкурентный иммуоферментный анализ (ИФА). В лунках планшетов для ИФА (NUNC, США) сорбировали Hsp90, очищенный из мозга мыши, в концентрации 3 мкг/мл в буфере для сорбции антигенов (0,05 М Na-карбонатный буфер, pH 9,6). Лунки промывали ФСБР, содержащим 0,05% твин 20 (ФСБР-Т), блокировали неспецифическую сорбцию с помощью ФСБР-Т, содержащего 1% БСА (ФСБР-Т-БСА). Для анализа активности антител в сенсibilизированных лунках последовательно инкубировали антитела в различных разведениях и после промывки, пероксидазный конъюгат против IgG кроликов. Связавшуюся в лунках пероксидазу выявляли с помощью тетраметилбензидина, останавливали реакцию и определяли оптическую плотность при 450 нм (ОП₄₅₀). За титр Hsp90-специфических антител

принимали максимальное разведение антител, при котором ОП₄₅₀ превышала 0,3.

Специфичность пептид-специфических антител оценивали с помощью конкурентного ИФА. Лунки сенсibilizировали нативным очищенным Hsp90, как описано выше. Далее ИФА выполняли, как описано выше, за исключением того, что в лунки к пептид-специфическим антителам добавляли конкурирующие целевые или нецелевые пептиды в концентрации 1–1000 нг/мл. После проведения анализа оценивали процент ингибирования реакции ИФА конкурирующими пептидами.

Иммуноблоттинг (вестерн-блот). Клетки, обработанные хлоратом натрия или гепариназой I/III (см. ниже), и контрольные необработанные клетки лизировали в буфере для нанесения образцов для электрофореза, после чего проводили электрофорез полученных образцов в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [29]. Белки переносили на PVDF-мембраны с использованием «полусухого» блоттинга. Неспецифическую сорбцию мембран блокировали инкубацией в ФСБР-Т-БСА в течение ночи при 4°C. Для выявления белков мембраны инкубировали с Hsp90-специфическими антителами и контрольными антителами к β-актину (Santa Cruz Biotechnology, США) (для стандартизации нанесения образцов) в течение 2 ч при комнатной температуре, затем инкубировали с пероксидазными конъюгатами вторичных антител против IgG мыши или кролика (AbD Serotec, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре. Визуализацию пероксидазы хрена, связавшейся с белками на мембране, проводили с помощью раствора диаминобензидина.

Связывание Hsp90 с гепарин-сефарозой. Очищенный из мозга мыши Hsp90 разводили в ФСБР, содержащем 0,1% тритон X-100 (ФСБР-Tr) и инкубировали в течение 2 ч при 4°C с гепарин-сефарозой, предварительно уравновешенной ФСБР-Tr. После инкубации гепарин-сефарозу промывали в ФСБР-Tr и связавшийся с сорбентом Hsp90 элюировали посредством инкубации гепарин-сефарозы в течение 30 мин при комнатной температуре в ФСБР-Tr, содержащем 2 мг/мл гепарина.

Иммунофлуоресцентное окрашивание мембранных Hsp90. Для экспериментов с использованием конфокальной микроскопии клетки выращивали на камерах для конфокальной микроскопии (Lab-Tech, Thermo Scientific, США), затем подвергали различным обработкам, как описано ниже. После обработок клетки промывали холодным ФСБР, содержащим 0,05% NaN₃ (ФСБР-NaN₃), и инкубировали с первич-

ными специфическими или контрольными антителами. В работе использовали поликлональные антитела, специфичные к α- и β-изоформам Hsp90, а также моноклональное антитело, специфичное к гепарину/гепарансульфатам (clone T320.11, Millipore, Германия). После промывки клетки инкубировали с флуоресцентно-мечеными (Alexa 488) антителами против иммуноглобулинов мыши или кролика (Jackson ImmunoResearch, США). Все инкубации с антителами проводили при температуре 4°C в присутствии ФСБР-Т-БСА. Клетки фиксировали раствором 0,5% формальдегида 15 мин при температуре 4°C и анализировали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия), объектив 63x.

Для анализа клеток методом проточной цитофлуориметрии клетки растили на чашках Петри (Corning, США), затем переводили их в суспензию с использованием 0,05% раствора ЭДТА. После промывки холодным ФСБР-NaN₃ клетки инкубировали с первичными антителами, флуоресцентными антивидовыми конъюгатами и фиксировали раствором формальдегида, как описано выше, промывая клетки между инкубациями с помощью центрифугирования (500 g, 5 мин). Флуоресценцию анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Accuri C6 (Becton Dickinson, США). Для каждой пробы анализировали не менее 50000 клеток. Среднее значение интенсивности флуоресценции определяли с помощью программного обеспечения BD Accuri C6 software.

Обработка клеток хлоратом натрия и гепариназой. Для блокирования сульфирования ГС клетки культивировали в среде ДМЕМ-10% ЭБС с добавлением 30 мМ хлората натрия (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 ч при температуре 37°C. В экспериментах по разрушению клеточных ГС клетки инкубировали с гепариназой I/III (концентрация 0,03 IU/ml, Sigma-Aldrich, США) в среде ДМЕМ-10% ЭБС в течение 1 ч при температуре 37°C. После обработок клетки окрашивали с помощью антител и анализировали методом конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, определяя уровень мембранной экспрессии двух изоформ Hsp90, как описано выше.

Обработка клеток гепарином. Клетки инкубировали в присутствии различных концентраций гепарина (10–100 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США), в течение различного времени при температуре 4°C или 37°C. После обработок клетки окрашивали Hsp90-специфическими антителами и анализировали методом конфокальной мик-

Проверка специфичности антител к Hsp90α- и Hsp90β-пептидам методом конкурентного ИФА

Конкурирующие антитела	Концентрация конкурирующего пептида, нг/мл	Ингибирование связывания антител пептидами на твердой фазе, %	
		Hsp90α-пептид	Hsp90β-пептид
анти-Hsp90α	10,0	22 ± 4	–
	100,0	75 ± 7	–
	1000,0	90 ± 12	–
анти-Hsp90β	10,0	–	61 ± 4
	100,0	–	77 ± 5
	1000,0	–	94 ± 11

Примечание. (–) – Ингибирование менее 10%.

роскопии и проточной цитофлуориметрии, как описано выше.

Определение миграции клеток. Определение миграции клеток проводили с помощью вкладышей с полиэтилентерефталат мембраной (размер пор 8 мкм, CellSert, Millipore, США). Перед экспериментом клетки выдерживали в среде ДМЕМ, содержащей 0,2% БСА (ДМЕМ-БСА) в течение 20 ч при 37°C (голодание). Во вкладыш помещали клетки в среде ДМЕМ-БСА в присутствии или отсутствии антител (10–100 мкг/мл). В качестве хемоаттрактанта в нижнем резервуаре использовали ДМЕМ-5% ЭБС. Прошедшие за 6 ч через PET-мембрану клетки фиксировали метанолом, окрашивали N''-гексаметилпарарозанилином (краситель кристаллический фиолетовый), лизировали, переносили в лунки 96-луночного планшета, измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм и рассчитывали количество клеток, проникших через мембрану. Влияние Hsp90-специфичных антител на миграцию клеток оценивали сравнивая количество клеток, мигрировавших через полиэтилентерефталат мембрану, в контрольных и экспериментальных лунках.

Каждый эксперимент по миграции клеток проводили не менее пяти раз. Каждая точка представляет собой среднее арифметическое значение трех–пяти повторов ± стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-теста Стьюдента (уровень значимости *P* < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследований нами были получены поликлональные антитела, специфичные к двум изоформам Hsp90 – Hsp90α и Hsp90β. В непрямом ИФА на нативном Hsp90

титры антител, полученных к полноразмерному нативному Hsp90, а также к пептидам Hsp90α и Hsp90β, составляли 1:250000 – 1:10000000. Анти-Hsp90α- и анти-Hsp90β-антитела эффективно ингибировались в конкурентном ИФА целевыми пептидами и не ингибировались нецелевыми пептидами (таблица). Все антитела специфически выявляли Hsp90 в вестерн-блоте в лизатах клеток человека HT1080 (рис. 1а). Антитела специфически окрашивали на мембране клетки HT1080 Hsp90α и Hsp90β; окрашивание ингибировалось целевым пептидом и не ингибировалось нецелевым пептидом (рис. 1б). В совокупности полученные данные свидетельствовали о высокой активности всех полученных анти-Hsp90 антител и специфичности антипептидных антител к двум изоформам Hsp90.

Полученные антитела, диализованные против среды ДМЕМ, не обладали цитотоксичностью и не влияли на пролиферацию клеток. Это свидетельствовало о том, что мембрано-ассоциированные Hsp90 не связаны с процессом клеточной пролиферации. С использованием вкладышей с полиэтилентерефталатной мембраной было показано, что обработка клеток антителами к Hsp90α, Hsp90β и полноразмерному Hsp90α/β ингибировала миграцию клеток HT1080 и A-172 на 20–45% (рис. 1в). Контрольные антитела из сыворотки неиммунных кроликов не влияли на миграцию опухолевых клеток. Полученные данные свидетельствовали о важной роли двух изоформ мембрано-ассоциированных Hsp90, Hsp90α и Hsp90β, в миграции опухолевых клеток *in vitro*.

Известно, что Hsp90 связывается с гепарин-сефарозой [30]. Гепарин является структурным аналогом клеточных ГС, присутствующих в большом количестве на всех типах клеток [31]. Клеточные ГС относятся к гликозаминоглика-

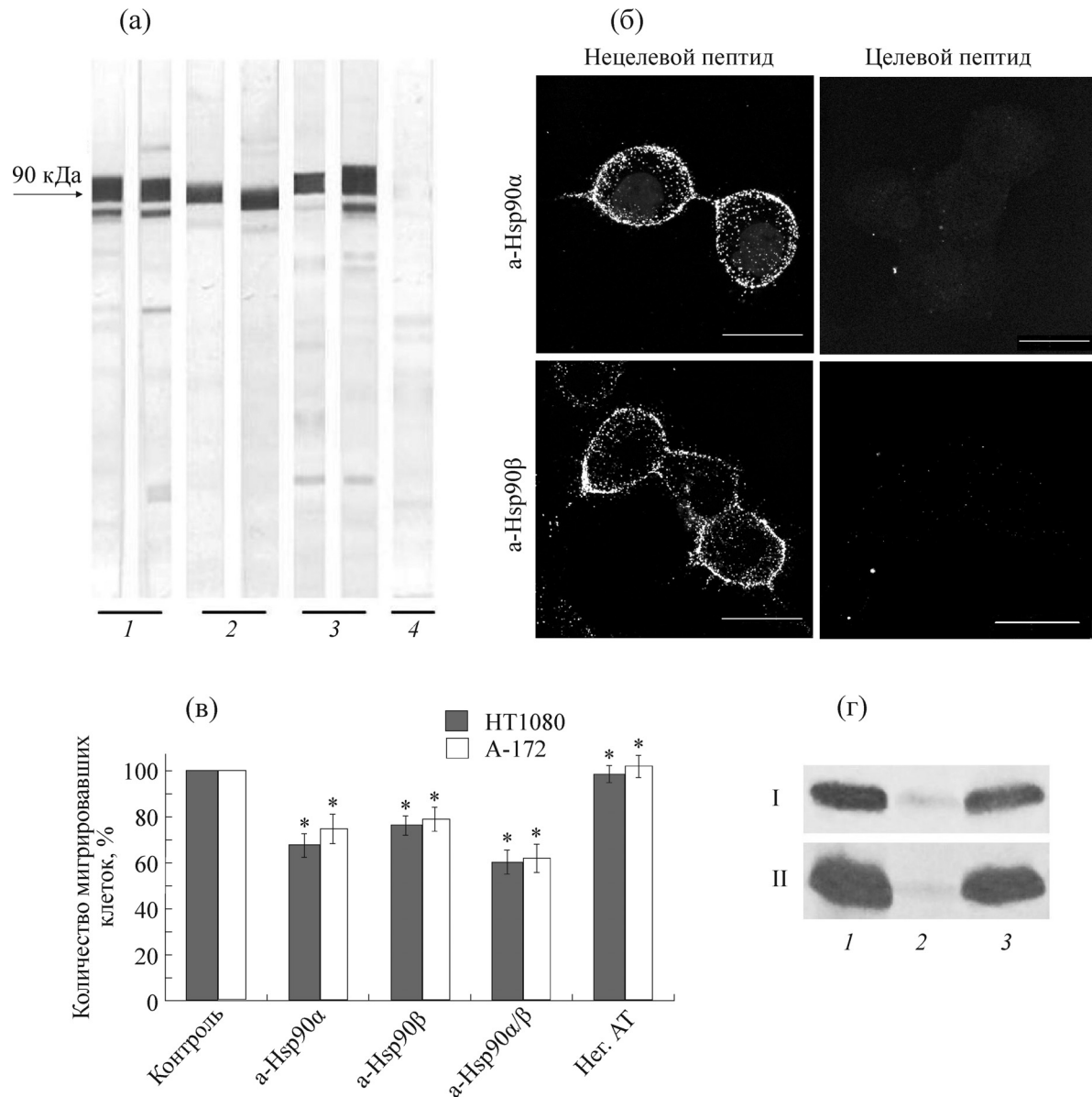


Рис. 1. Характеристика полученных антипептидных антител и их влияние на миграцию опухолевых клеток *in vitro*. (а) – Вестерн-блот-анализ лизатов клеток человека HT1080 с использованием антител к Hsp90α (1), Hsp90β (2), полноразмерному Hsp90α/β (3) и контрольных антител неиммунного кролика (4). (б) – Мембранное окрашивание клеток HT1080 Hsp90α- и Hsp90β-специфическими антителами в присутствии целевых и нецелевых пептидов. Масштаб 20 мкм. (в) – Влияние антител на миграцию опухолевых клеток: * – достоверное отличие от контроля ($P < 0,05$). (г) – Связывание двух изоформ Hsp90 с гепарин-сефарозой. Вестер-блот-анализ исходного препарата Hsp90 α/β (1), фракции, не связавшейся с носителем (2), и элюата (3), с использованием антител к Hsp90α (I) и Hsp90β (II).

нам, которые представляют собой сложные гетерополисахариды, состоящие из длинных сульфированных цепей, ковалентно связанных с белковым кором. Существуют три группы клеточных ГС – синдеканы, глипиканы и перликаны [31–33]. Мы показали, что обе изоформы Hsp90, Hsp90α и Hsp90β, действительно эффективно связываются с гепарин-сефарозой и элюируются гепарином (рис. 1г). С учетом этого мы пред-

положили, что клеточные ГС, присутствующие на плазматической клеточной мембране [31], могут играть роль в фиксации («заякоривании») Hsp90 на плазматической мембране клеток.

Для проверки этого предположения мы исследовали уровень мембранной экспрессии Hsp90α и Hsp90β на клетках HT1080 и A-172 после их обработки различными препаратами, нарушающими структуру ГС или препятствующи-

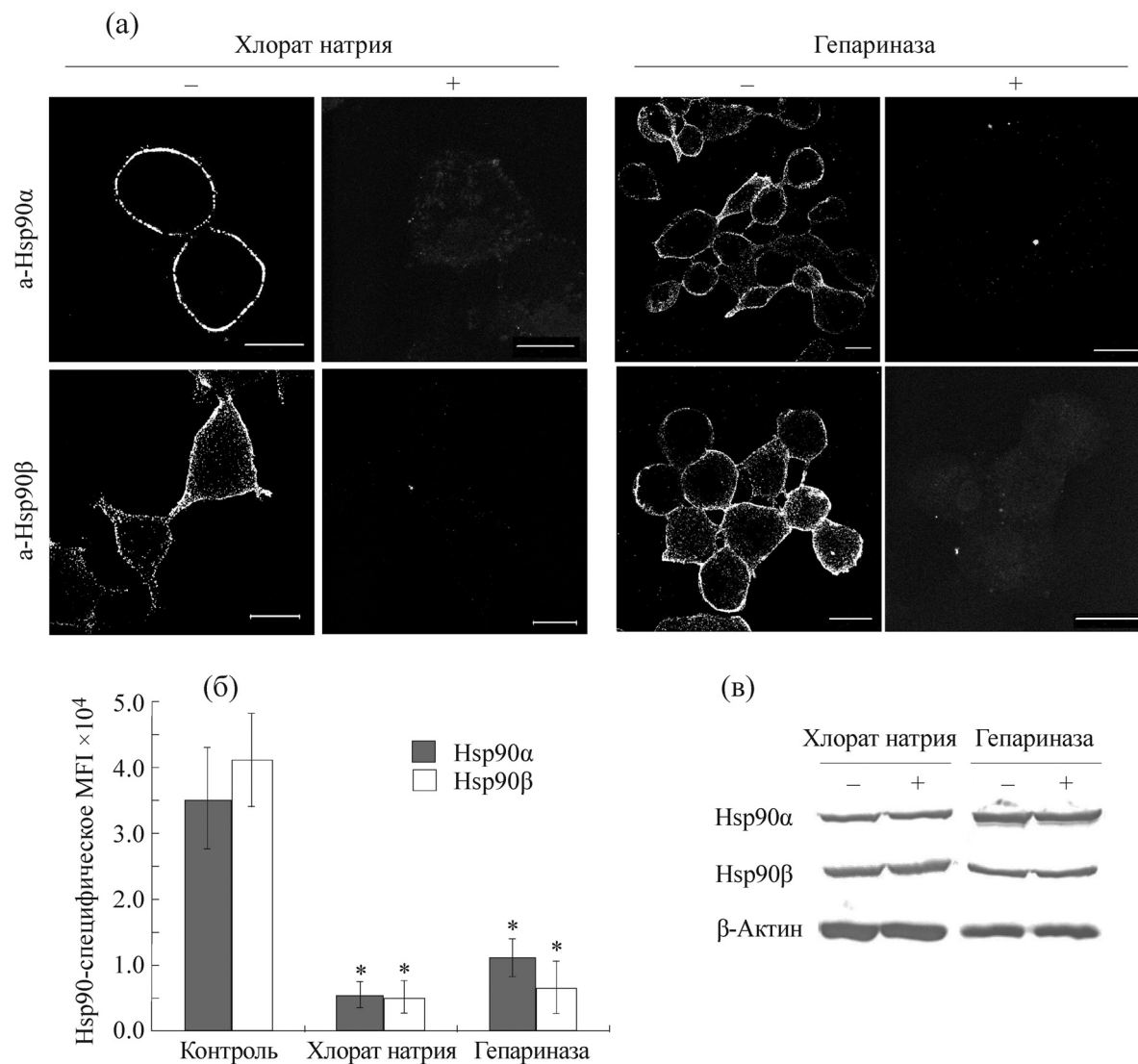


Рис. 2. Экспрессия Hsp90α и Hsp90β на плазматической мембране клеток HT1080 при блокировании сульфирования клеточных ГС хлоратом натрия и разрушении ГС гепариназой I/III. (а) – Изображения, полученные с использованием конфокальной микроскопии для культуры HT1080 после различных обработок. Масштаб 20 мкм. (б) – Представлены значения уровня мембранной экспрессии Hsp90α и Hsp90β, количественно определенные с помощью проточной цитометрии: * – достоверное отличие от контроля ($P < 0,05$). (в) – Оценка уровня внутриклеточного Hsp90α, Hsp90β и β-актина с помощью вестерн-блот-анализа.

щими взаимодействию Hsp90 с ГС. Известно, что хлорат натрия ингибирует сульфирование гепарансульфатов, блокируя АТФ-сульфурилазу [34,35]. Мы показали, что хлорат натрия (30 мМ) не обладал цитотоксичностью и не влиял на пролиферацию опухолевых клеток HT1080 и А-172 (48-часовая инкубация). С использованием ГС-специфических антител методом конфокальной микроскопии и проточной цитометрии показано, что 24-часовая инкубация опухолевых клеток в среде с хлоратом натрия приводила к резкому снижению уровня клеточных ГС. Параллельно с этим для обеих клеточных культур наблюдалось резкое, в 5–

10 раз, снижение мембранной экспрессии двух изоформ Hsp90 – Hsp90α и Hsp90β (рис. 2а,б).

Известно, что гепариназа I расщепляет высокосульфированные участки гепарансульфатов по 2-О-сульфированным уроновым кислотам, в то время как гепариназа III расщепляет нессульфированные участки гепарансульфатов, а именно гликозидные связи, содержащие нессульфированную уроновую кислоту [36,37]. С помощью антитела к гепарину/гепарансульфатам мы показали, что при обработке клеток смесью гепариназ I/III наблюдалось мощное разрушение клеточных ГС, что коррелировало с выраженным снижением количества мембрано-ассо-

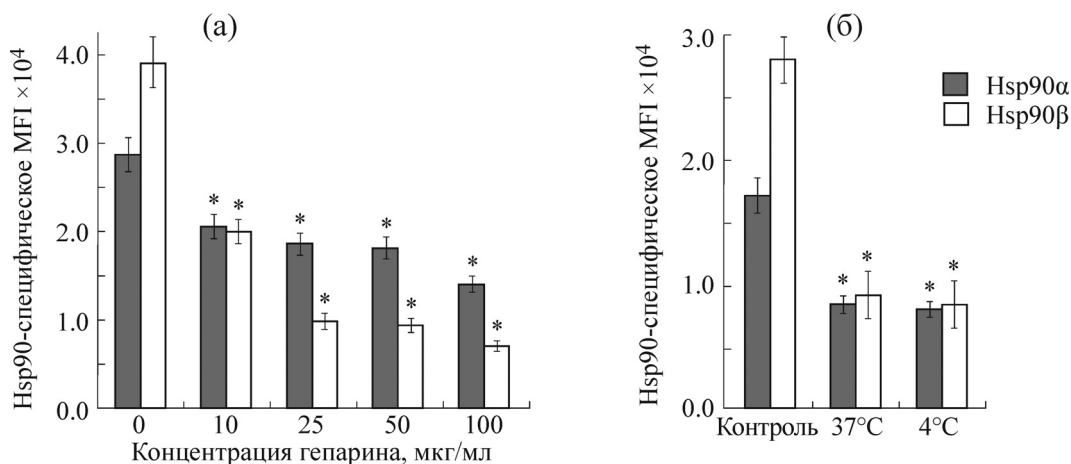


Рис. 3. Влияние гепарина на мембранную экспрессию Hsp90α и Hsp90β. (а) – Влияние различных концентраций гепарина на мембранную экспрессию Hsp90. (б) – Влияние гепарина (50 мкг/мл) на мембранную экспрессию Hsp90 при различных температурах. Представлены значения уровня мембранной экспрессии Hsp90α и Hsp90β, количественно определенные с помощью проточной цитометрии: * – достоверное отличие от контроля ($P < 0,05$).

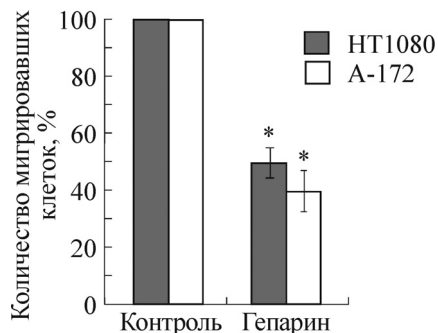


Рис. 4. Влияние гепарина на миграцию клеток HT1080 и A-172. Концентрация гепарина – 50 мкг/мл; * – достоверное отличие от контроля ($P < 0,05$).

цированных Hsp90α и Hsp90β (снижение мембранного уровня в 3,0–3,5 и 3,3–9,0 раза соответственно) (рис. 2а,б). Потенциально обработка клеток гепариназой и особенно хлоратом натрия способна привести к уменьшению внутриклеточного содержания Hsp90, что может отразиться на уровне их мембранной экспрессии. Чтобы исключить данную возможность, с использованием вестерн-блот-анализа мы доказали, что инкубация клеток в среде с хлоратом натрия и обработка клеток гепариназой не влияли на уровень внутриклеточного Hsp90 (рис. 2в).

Гепарин, будучи структурным аналогом клеточных ГС, препятствует связыванию ГС-связывающих белков с клеточными ГС [38]. Мы показали, что обработка клеток гепарином (10–100 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°C приводила к снижению уровня мембранной экспрессии

Hsp90, особенно Hsp90β-изоформы (в 3,5–5,5 раз) (рис. 3а). Эффект наблюдали уже при концентрации гепарина 10 мкг/мл, максимальный эффект наблюдался при концентрациях гепарина 50–100 мкг/мл и не зависел от температуры (рис. 3б). Эффект гепарина был обнаружен даже через 10 мин инкубации клеток, однако достигал максимального уровня через 30–60 мин инкубации. Следует отметить, что и при высоких концентрациях гепарина (100 мкг/мл) часть мембрано-связанного Hsp90 (60–80% Hsp90α и 20–30% Hsp90β) была устойчива к его воздействию, что свидетельствует о наличии двух фракций мембрано-ассоциированного Hsp90 – гепарин-устойчивой и гепарин-чувствительной. Очевидно, что Hsp90 находится в тесной ассоциации не только с ГС клеточной поверхности, но и с какими-то другими клеточными рецепторами, не являющимися гепарансульфатами.

В результате данные трех экспериментальных подходов позволили сделать вывод об участии клеточных ГС в «заякоривании» двух изоформ Hsp90, Hsp90α и Hsp90β, на плазматической мембране опухолевых клеток. Мы также обнаружили, что гепарин не только снимает часть Hsp90 с клеточной поверхности, но и существенно снижает миграцию клеток фибросаркомы и глиобластомы человека на 49,8–77,5% (рис. 4). Это свидетельствует в пользу важной биологической роли ГС-ассоциированных Hsp90. Роль клеточных ГС в сигнализации Hsp90 не ясна. Возможно, клеточные ГС выполняют функцию депо Hsp90, которое удерживает Hsp90, создавая необходимую плотность Hsp90 в мембране. В случае необходимости

(например, активация клеток) Hsp90 рекрутируется из депо и связывается с рецепторами (например, LRP-1/CD91), активируя клеточную миграцию. Не исключено, что клеточные ГС являются ко-рецепторами, необходимыми для функционирования комплекса Hsp90-рецептор. Роль ГС-чувствительной и ГС-устойчивой фракции мембрано-ассоциированного Hsp90 предстоит выяснить.

ВЫВОДЫ

Впервые показана важная роль двух изоформ мембрано-ассоциированного Hsp90, Hsp90 α и Hsp90 β , в миграции опухолевых клеток *in vitro* и участие клеточных гепарансульфатов в закоривании Hsp90 α и Hsp90 β на поверхности плазматической мембраны опухолевых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. J. Mitchison and L. P. Cramer, *Cell* **84** (3), 371 (1996).
2. C. F. Cheng, D. Sahu, F. Tsen, et al., *J. Clin. Invest.* **121**, 4348 (2011).
3. W. Li, F. Tsen, D. Sahu, et al., *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **303**, 203 (2013).
4. B. Becker, G. Multhoff, B. Farkas, et al., *Experim. Dermatology* **13**, 27 (2004).
5. J. McCready, J. D. Sims, D. Chan, et al., *BMC Cancer* **10**, 294 (2010).
6. K. Sidera, M. Gaitanou, D. Stellas, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 2031 (2008).
7. D. Stellas, A. El Hamidieh, and E. Patsavoudi, *BMC Cell Biol.* **11**, 51 (2010).
8. J. L. Johnson, *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 607 (2012).
9. J. Li and J. Buchner, *Biomed. J.* **36**, 106 (2013).
10. P. Csermely, T. Schnaider, C. Soti, et al., *Pharmacol. Ther.* **79** (2), 129 (1998).
11. L. H. Pearl and C. Prodromou, *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 271 (2006).
12. D. Picard, *Cell. Mol. Life Sci.* **59** (10), 1640 (2002).
13. W. Li, Y. Li, S. Guan, et al., *The EMBO J.* **26**, 1221 (2007).
14. S. Tsutsumi, K. Beebe, and L. Neckers, *Future Oncol.* **5**, 679 (2009).
15. X. Wang, X. Song, W. Zhuo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21288 (2009).
16. A. Clayton, A. Turkes, H. Navabi, et al., *J. Cell Sci.* **118**, 3631 (2005).
17. C. F. Cheng, J. Fan, M. Fedesco, et al., *Mol. Cell Biol.* **28**, 3344 (2008).
18. S. Basu, R. J. Binder, T. Ramalingam, et al., *Immunity* **14**, 303 (2001).
19. J. S. Chen, Y. M. Hsu, C. C. Chen, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 25458 (2010).
20. A. L. Correia, H. Mori, E. I. Chen, et al., *Genes Dev.* **27**, 805 (2013).
21. X. Song, X. Wang, W. Zhuo, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 40039 (2010).
22. K. Sidera and E. Patsavoudi, *Curr. Signal Transd. Ther.* **4**, 51 (2009).
23. S. Tsutsumi and L. Neckers, *Cancer Sci.* **98**, 1536 (2007).
24. B. K. Eustace and D. G. Jay, *Cell Cycle* **3**, 1098 (2004).
25. W. Li, D. Sahu, and F. Tsen, *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 730 (2012).
26. R. Biaoxue, J. Xiling, Y. Shuanying, et al., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31** (1), 70 (2012).
27. K. Sidera, M. Samiotaki, E. Yfanti, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 45279 (2004).
28. А. В. Снигирева, В. В. Врублевская, Ю. Ю. Скарга и др., *Современные проблемы науки и образования* **2**, (2013). URL: www.science-education.ru/108-8674.
29. U. K. Laemmli, *Nature* **227**, 680 (1970).
30. A. Menoret and G. Bell, *J. Immunol. Methods* **237**, 119 (2000).
31. S. Tumova, A. Woods, and J. R. Couchman, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 263 (2000).
32. S. Sarrazin, W. C. Lamanna, and J. D. Esko, *Heparan sulfate proteoglycans* (Cold Spring Harb. Perspect. Biol.), 3:a004952 (2011).
33. J. R. Bishop, M. Schuksz, and J. D. Esko, *Nature* **446**, 1030 (2007).
34. P. A. Baeuerle and W. B. Huttner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141** (2), 870 (1986).
35. K. M. Keller, P. R. Brauer, and J. M. Keller, *Biochemistry* **28** (20), 8100 (1989).
36. H. B. Nader, M. A. Porcionatto, I. L. Tersariol, et al., *J. Biol. Chem.* **265** (28), 16807 (1990).
37. M. E. Silva and C. P. Dietrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56** (4), 965 (1974).
38. Z. Shriver, I. Capila, G. Venkataraman, et al., *Handb. Exp. Pharmacol.* **207**, 159 (2012).

The Role of Membrane-Bound Heat Shock Proteins Hsp90 in Migration of Tumor Cells *in vitro* and Involvement of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans in Protein Binding to Plasma Membrane

A.V. Snigireva, V.V. Vrublevskaya, Y.Y. Skarga, and O.S. Morenkov

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Heat shock protein Hsp90, detected in the extracellular space and on the membrane of cells, plays an important role in cell motility, migration, invasion and metastasis of tumor cells. At present, the functional role and molecular mechanisms of Hsp90 binding to plasma membrane are not elucidated. Using isoform-specific antibodies against Hsp90, Hsp90 α and Hsp90 β , we showed that membrane-bound Hsp90 α and Hsp90 β play a significant role in migration of human fibrosarcoma (HT1080) and glioblastoma (A-172) cells *in vitro*. Disorders of sulfonation of cell heparan sulfates, cleavage of cell heparan sulfates by heparinase I/III as well as treatment of cells with heparin lead to an abrupt reduction in the expression level of Hsp90 isoforms. Furthermore, heparin significantly inhibits tumor cell migration. The results obtained demonstrate that two isoforms of membrane-bound Hsp90 are involved in migration of tumor cells *in vitro* and that cell surface heparan sulfate proteoglycans play a pivotal role in the «anchoring» of Hsp90 α and Hsp90 β to the plasma membrane.

Key words: membrane-bound Hsp90, Hsp90 α and Hsp90 β isoforms, cell surface heparan sulfate proteoglycans, cell migration