

МЕХАНИЗМЫ СТИМУЛЯЦИИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫМ БЕЛКОМ ТЕПЛОВОГО ШОКА 90 (HSP90) МИГРАЦИИ И ИНВАЗИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *in vitro*

© 2018 г. А.В. Снигирева, В.В. Врублевская, М.А. Жмурина, Ю.Ю. Скарга, О.С. Моренков

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

E-mail: morenkov_o@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.18 г.

Экстраклеточный белок теплового шока eHsp90 играет важную роль в клеточной подвижности, инвазии и метастазировании опухолевых клеток. eHsp90 стимулирует миграцию и инвазию клеток посредством взаимодействия с поверхностными рецепторами, что сопровождается активацией многочисленных сигнальных путей, связанных с клеточной подвижностью, а также обеспечивает инвазию клеток посредством активации экстраклеточных матриксных металлопротеиназ. Роль отдельных рецепторов, путей внутриклеточной сигнализации и матриксных металлопротеиназ в eHsp90-зависимой миграции и инвазии отдельных типов клеток изучена недостаточно. В работе показано, что рецептор HER2 участвует в eHsp90-индуцированной стимуляции миграции и инвазии клеток глиобластомы A-172 и фибросаркомы HT1080 человека *in vitro*. eHsp90-индуцированная миграция и инвазия клеток сопровождается активацией ERK1/2-, IKK/NF- κ B-, FAK-, ROCK1- и Src-зависимых сигнальных путей, незначительной активацией JNK, в то время как p38-зависимый сигнальный каскад не активируется. В клетках A-172 eHsp90 также активирует PI3K-Акт-сигнальный путь, в то время как в клетках HT1080 Акт активируется независимо от PI3K. Установлено, что матриксные металлопротеиназы участвуют в eHsp90-зависимой стимуляции инвазии клеток A-172 и HT1080 *in vitro*.

Ключевые слова: экстраклеточный Hsp90, миграция и инвазия клеток *in vitro*, клеточные рецепторы, сигнальные пути, матриксные металлопротеиназы.

DOI: 10.1134/S0006302918060145

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является внутриклеточным молекулярным шапероном, который присутствует в цитозоле как в нормальных условиях, так и при стрессовых воздействиях на клетку, и участвует в фолдинге вновь синтезированных белков, рефолдинге белков, потерявших нативную конформацию, предотвращении агрегации белков, а также их поддержании в нативном реакционноспособном

состоянии [1]. Существует две изоформы Hsp90 – Hsp90 α (индуцибельная форма) и Hsp90 β (конститутивная форма) [2]. У Hsp90 обнаружено более 200 внутриклеточных белков-клиентов, многие из которых участвуют в клеточной сигнализации, регуляции клеточного цикла и клеточной пролиферации [1,2]. Многообразие клиентских белков Hsp90 и их роль в ключевых клеточных процессах (трандукция сигнала, внутриклеточная сигнализация, транскрипция, регуляция экспрессии генов и др.) определяют Hsp90 как один из важнейших белков, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток, клеточной подвижности, морфогенезе, развитии организмов и других фундаментальных биологических процессах [1–3].

Кроме внутриклеточной локализации Hsp90 также секретируется опухолевыми клетками и обнаруживается на поверхности нормальных и опухолевых клеток [4–6]. Мембраноассоциированный и секретированный экстраклеточный Hsp90 (eHsp90) активирует клеточную подвижность, а также инвазию и метастазирование

Сокращения: Hsp90 – белок теплового шока 90, eHsp90 – экстраклеточный Hsp90, LRP1 – белок 1, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (low density lipoprotein receptor-related protein 1), HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (human epidermal growth factor receptor 2), ПЭТ – полиэтилентерефталат, ФСБР – фосфатсодержащий буферный раствор, EGFR – рецептор эпидермального фактора роста, ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка, БСА – бычий сывороточный альбумин, ОП – оптическая плотность, PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа, MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы, ERK – регулируемые внеклеточными сигналами киназы, JNK – c-Jun-NH2-терминальные протеинкиназы, IKK – I κ B-киназа, FAK – киназа фокальных контактов.

опухолевых клеток [7–15]. Механизмы действия eHsp90 на процессы миграции и инвазии клеток весьма разнообразны. eHsp90 может выступать в качестве лиганда поверхностных рецепторов. Идентифицированными рецепторами eHsp90 являются LRP1 (белок 1, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности), который детектируется практически на всех типах клеток [7–13,16], и HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор эпидермального фактора роста человека 2 [17]. После взаимодействия Hsp90 с клеточными рецепторами активируются различные внутриклеточные сигнальные пути, регулирующие миграцию и инвазию клеток [8,10,11,13–15]. Hsp90-зависимая сигнализация усложняется в ряде случаев появлением петель с обратной связью. Так, например, Hsp90-зависимая активация Src может потенцировать активацию рецептора, что наблюдалось в случае интегринов [14] и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [15]. С другой стороны, Hsp90-зависимая активация Src в клетках глиомы стимулирует Akt-опосредованное формирование проинвазивного комплекса между EphA2 и LRP1 [10].

Кроме функционирования в качестве лиганда поверхностных клеточных рецепторов, eHsp90 способен выступать в качестве экстраклеточного шаперона, регулирующего активность ряда экстраклеточных белков. Взаимодействуя с внеклеточными протеазами, eHsp90 влияет на миграцию и инвазию посредством регуляции протеолитического микроокружения клеток. eHsp90 регулирует активность матричных металлопротеиназ MMP2 [18–23], MMP-9 [18, 24] и MMP3 [25]. eHsp90 также связывается с фибронектином и участвует в сборке и/или поддержании его структуры во внеклеточном матриксе [26], участвует в регуляции экспрессии MMP-3 [27] и интегринов [8], в индукции миофибробластов и опухолеассоциированных миофибробластоподобных клеток [27,28].

Таким образом, сложная картина функционирования Hsp90 включает в себя прямое взаимодействие Hsp90 с различными поверхностными клеточными рецепторами и протеолитическими ферментами, проведение сигнала по различным путям сигнализации, взаимодействие участников этих путей сигнализации между собой, с рецепторами и адапторными молекулами. Роль отдельных рецепторов, путей сигнализации и матричных металлопротеиназ в Hsp90-индуцированной миграции и инвазии разных типов клеток изучена недостаточно. В данной работе нами продемонстрировано участие рецептора HER2, а также Akt-, ERK1/2-, IKK/NF- κ B-, FAK-, ROCK1- и Src-зависимых

сигнальных путей и матричных металлопротеиназ в Hsp90-индуцированной миграции и инвазии опухолевых клеток фибросаркомы (HT1080) и глиобластомы (A-172) человека *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы, реактивы и антитела. В работе использовали среду ДМЕМ и эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС) производства HyClone (США). Растворы версена и трипсина – производства компании «Биолот» (Россия). В работе использовали антитела к бета-актину, Akt, JNK, p38 и их фосфорилированным формам, пероксидазные конъюгаты против IgG мышей и кроликов производства Abcam (США), Enzo (США), Millipore (США), SantaCruz (США) и Serotec (США); коллаген VI крысы – производства Trevigen (США). Общелабораторная пластиковая посуда и пластиковая посуда для культивирования клеток (культуральные флаконы, 24-луночные планшеты, чашки Петри, пипетки) были производства компаний Greiner (Австрия) и Corning (США). Вставки в 24-луночные планшеты с полиэтилентерефталатной (ПЭТ, 8 мкм) мембраной были производства Greiner (Австрия). Поливинилиденфторидная мембрана (0,45 мкм) для иммуноблоттинга была производства Millipore (США), камеры для конфокальной микроскопии Lab-Tek II – производства ThermoFisher (США). Используемые в работе ингибиторы протеинкиназ и матричных металлопротеиназ (табл. 1) были закуплены в компании Sellekchem (США). Все остальные химические реактивы приобретали в компании Sigma (США).

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% ЭБС и антибиотики (по 40 ед. пенициллина, стрептомицина и гентамицина) (ДМЕМ–10% ЭБС).

Очистка Hsp90 из мозга мышей. Очистку нативного Hsp90 из мозга мыши проводили с использованием ранее разработанного метода, включающего в себя дифференциальное осаждение сульфатом аммония, хроматографию на тиофильном геле и ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-сефарозе [29].

Определение миграции и инвазии клеток *in vitro*. Эксперименты проводили с использованием вкладышей в 24-луночные планшеты с ПЭТ-мембраной (размер пор 8 мкм, Greiner, Австрия). Для оценки инвазии клеток вкладыши

Таблица 1. Используемые в работе ингибиторы

Ингибитор	Концентрация ингибитора, μM	Молекулярная мишень ингибитора	
		Наименование	Описание мишени
Mubritinib (ТАК 165)	10,0	HER2	Тирозиновая протеинкиназа семейства рецептора эпидермального фактора роста (рецептор eHsp90)
LY294002	20,0	PI3K $\alpha/\delta/\beta$	Фосфатидилинозитол-3-киназа
MK-2206	1,0	Akt1/2/3 (PKB)	Серин-треонин специфические протеинкиназы (протеинкиназа B)
SCH772984	2,0	ERK1/2	Протеинкиназы, регулируемые внеклеточными сигналами
SB203580	5,0	p38 α/β MAPK	Митоген-активируемая протеинкиназа p38
SB202190	5,0		
SP600125	20,0	JNK1/2/3	c-Jun-NH2-терминальные протеинкиназы 1, 2 и 3 (митоген-активируемые проинкиназы 8, 9 и 10)
PP2	10,0	Src	Нерецепторные тирозин киназы Src-семейства
IKK-16	10,0	IKK	IkB киназа (NF- κ B сигнальный путь)
PF-573228	5,0; 10,0	FAK	Киназа фокальных контактов
Y-27632	20,0	ROCK1	Rho-ассоциированная серин-треонин специфическая киназа
Batimastat	0,1	MMP1/2/3/7/9	Матриксные металлопротеиназы 1/2/3/7/9

с ПЭТ-мембраной обрабатывали коллагеном VI в соответствии с рекомендациями изготовителя (Trevigen, США). Перед экспериментом клетки выдерживали в среде ДМЕМ, содержащей 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), в течение 20 ч при 37°C. Клетки снимали с подложки трипсином и промывали в ДМЕМ-БСА. Для анализа базальной (нестимулированной) миграции/инвазии, клетки помещали во вкладыши в среде ДМЕМ-БСА в присутствии или в отсутствие различных ингибиторов в концентрациях, указанных в табл. 1. В качестве хемоаттрактанта в нижнем резервуаре использовали ДМЕМ-5% ЭБС. Миграцию и инвазию клеток оценивали через 6 и 24 ч соответственно. Прошедшие через ПЭТ-мембрану клетки фиксировали метиловым спиртом, окрашивали красителем кристаллическим фиолетовым, лизировали, переносили в лунки 96-луночного планшета и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм (ОП₄₉₅). Базальную миграцию/инвазию оценивали по ОП₄₉₅ клеток, мигрировавших через мембрану, за вычетом ОП₄₉₅ клеток, прошедших через мембрану в отсутствие хемотаксического градиента (спонтанная миграция/инвазия). Влияние ингибиторов оценивали относительно контрольных клеток и выражали в процентах; за 100% принимали базальную миграцию контрольных клеток без ингибиторов.

Для анализа Hsp90-стимулированной миграции/инвазии клетки готовили, как описано выше. Клетки помещали в подготовленные вкла-

дыши в среде ДМЕМ-БСА, содержащей очищенный Hsp90 (50 мкг/мл) для стимуляции миграции/инвазии, в присутствии или отсутствия ингибиторов. Миграцию и инвазию клеток оценивали через 6 и 24 ч соответственно. ОП₄₉₅ клеток, прошедших через мембрану, определяли, как описано выше. Для расчета Hsp90-индуцированной стимуляции миграции/инвазии ОП₄₉₅ спонтанно-мигрировавших клеток вычитали из значений ОП₄₉₅ клеток, прошедших через мембрану по хемотаксическому градиенту. После этого, ОП₄₉₅ нестимулированных клеток вычитали из ОП₄₉₅ Hsp90-стимулированных клеток и разницу выражали в процентах относительно ОП₄₉₅ нестимулированных клеток. Оценку действия ингибиторов на Hsp90-зависимую стимуляцию миграции/инвазии проводили относительно контрольных клеток без ингибиторов; за 100% принимали Hsp90-зависимую стимуляцию миграции/инвазии контрольных клеток.

Вестерн-блот анализ. Клетки выращивали до состояния 50–70% монослоя и обрабатывали ингибиторами путей внутриклеточной сигнализации в течение 2 ч при 37°C. Клетки промывали фосфатсодержащим буферным раствором (ФСБР – 150 мМ NaCl, 12 мМ Na-фосфатный буферный раствор, pH 7,2), лизировали в ФСБР, содержащем 1% тритона X-100, 0,3% додецилсульфата натрия, ингибиторы протеаз (1 мМ фенолметилсульфонилфлюорида, 50 мкМ леупептина, 200 нМ апротинина и 10 мкМ пепстатина А) и ингибиторы фосфатаз (коктейль

ингибиторов фосфатаз 3, Sigma, США). Электрофорез проводили по методу Леммли в полиакриламидных гелях различных концентраций (7,5 и 10% акриламида) в присутствии додецилсульфата натрия [30]. Белки из полиакриламидных гелей переносили электрофоретически на поливинилиденфторидные мембраны. Неспецифическую сорбцию мембран блокировали инкубацией в ФСБР, содержащем 0,05% твин-20 и 1% БСА (ФСБР–Т–БСА). Мембраны инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с первичными антителами к нативным и фосфорилированным формам белков внутриклеточных сигнальных путей. После промывки мембран в ФСБР с добавлением 0,05% твин-20 мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с антивидовыми пероксидазными конъюгатами против IgG мыши или IgG кролика, разведенными в ФСБР–Т–БСА. Визуализацию полос на мембране проводили с помощью раствора диаминобензидина (0,7 мг/мл, 0,02% H₂O₂, 0,05 М трис-HCl-буфер, рН 7,5). Нанесение образцов стандартизировали по бета-актину. Мембраны после окрашивания антителами сканировали и обрабатывали при помощи программы Total Lab v. 2.01 для количественной оценки содержания в клетках специфических белков или их фосфорилированных форм.

Конфокальная микроскопия. Клетки выращивали в камерах для конфокальной микроскопии Lab-Tek II (ThermoFisher, США) до плотности 50–70% от монослоя. Клетки промывали холодным ФСБР–0,01% NaN₃ и инкубировали с мышинными антителами к LRP1, кроличьими антителами к HER2, контрольными негативными мышинными антителами (34/2) или кроличьими иммуноглобулинами из неиммунных животных (rIgG). После промывки клетки инкубировали с Alexa 488-мечеными вторичными антителами против IgG мышей или кроликов. Все инкубации антител проводили по 1 ч при 4°C в ФСБР–NaN₃–1% БСА. После промывки клетки фиксировали 0,5%-м формальдегидом в течение 15 мин при 4°C и анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) с объективом 63х.

Статистическая обработка. Каждый эксперимент по миграции/инвазии 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

В работе оценивали пути активации миграции и инвазии клеток глиобластомы А-172 и фибросаркомы НТ1080 человека *in vitro* в ответ на стимуляцию экстраклеточным Нsp90. Для стимуляции миграции/инвазии клеток использовали нативный Нsp90, очищенный из мозга мыши. Чистота препаратов Нsp90 составляла 95–97%; Нsp90 в концентрации до 1,0 мг/мл не обладал цитотоксичностью и не влиял на пролиферацию клеток А-172 и НТ1080. В работе определяли влияние различных ингибиторов на базальную (неиндуцированную) и Нsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток. Под базальной миграцией/инвазией понимали миграцию клеток *in vitro* через полупроницаемую ПЭТ-мембрану (в случае инвазии – через мембрану с коллагеновым барьером) по хемотаксическому градиенту в отсутствие ростовых факторов (в среде ДМЕМ–БСА). Под Нsp90-индуцированной миграцией/инвазией понимали миграцию по хемотаксическому градиенту через полупроницаемую ПЭТ-мембрану клеток, стимулированных еНsp90.

Общепринято, что основным клеточным рецептором еНsp90 является белок LRP1 [7–13], однако в отдельных работах в качестве рецептора еНsp90 был идентифицирован белок HER2 [17]. Участие HER2 в еНsp90-зависимой стимуляции миграции менее исследовано в сравнении с LRP1. HER-2 является мембранной тирозиновой протеинкиназой семейства EGFR, безлигандным рецептором, образующим гетеродимеры с другими членами EGFR семейства – HER-1, HER-3 и HER-4, связанными с лигандами [31]. Димеризация приводит к автофосфорилированию HER-белков и инициирует многочисленные пути сигнализации, в том числе MAPK- и PI3K/Akt-опосредованные пути сигнализации, что приводит к различным биологическим эффектам [32]. Из литературных данных известно, что клетки А-172 и НТ1080, использованные в наших экспериментах, наряду с LRP1 экспрессируют на поверхности и HER2 [31–35]. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания LRP1- и HER2-специфическими антителами мы подтвердили, что клетки А-172 и НТ1080 экспрессируют на поверхности оба рецептора еНsp90 (рис. 1). Далее мы оценили, участвует ли HER2 в Нsp90-зависимой активации миграции и инвазии клеток А-172 и НТ1080. Ингибитор HER2 мубритиниб (ТАК 165) не влиял на базальную миграцию и инвазию клеток А-172, не влиял на базальную миграцию, а также на базальную миграцию НТ1080, и незначительно снижал базальную инвазию клеток НТ1080 (табл. 2). Напротив,

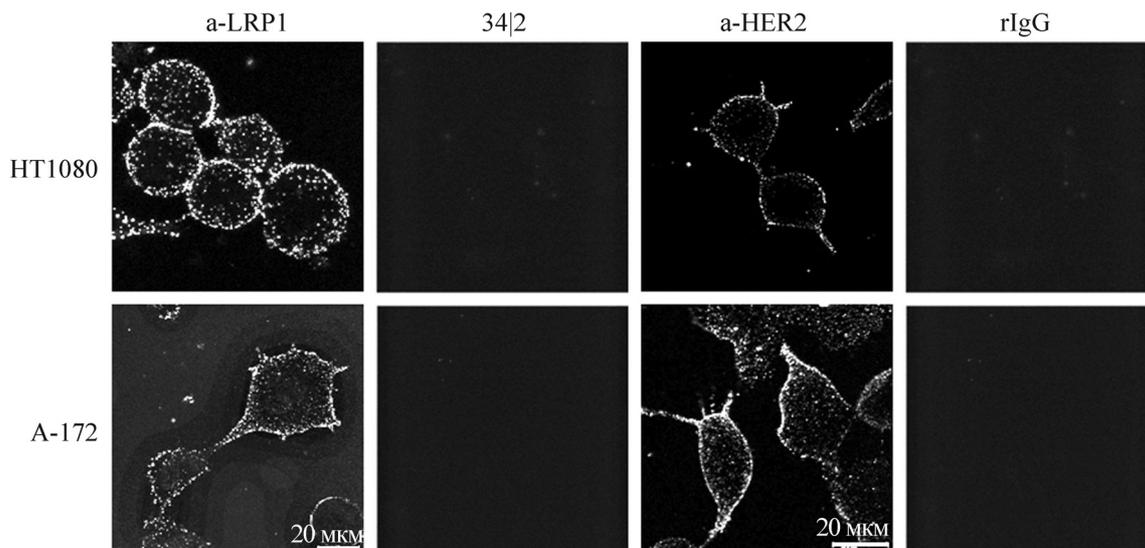


Рис. 1. Экспрессия LRP1 и HER2 на плазматической мембране клеток HT1080 (верхний ряд) и A-172 (нижний ряд): a-LRP1 – мышинное моноклональное антитело к LRP1 (sc-57353); 34|2 – негативное мышинное антитело к гликопротеину gB вируса болезни Ауески; a-HER2 – кроличье поликлональное антитело к HER2 (sc-284); rIgG – антитела из сыворотки крови неиммунных кроликов. Масштаб 20 мкм.

ингибирование HER2 приводило к двукратному снижению Hsp90-индуцированной миграции и к трех–десятикратному снижению eHsp90-индуцированной инвазии клеток A-172 и HT1080 (табл. 3). Это свидетельствовало, что HER2 принимает участие в Hsp90-индуцированной миграции и инвазии клеток HT1080 и A-172. Относительный вклад HER2 и LRP1 в eHsp90-стимулированную миграцию/инвазию на основании полученных данных определить затруднительно, однако, вероятно, вклад HER2 в эти процессы существенный, в особенности для клеток A-172.

Известно, что взаимодействие LRP1 с различными лигандами приводит к активации различных путей сигнализации, в том числе ERK- и JNK-опосредованных каскадов [36–38], FAK-опосредованного сигнального пути [39,40], а также к Src-опосредованной активации цитоплазматических киназ Akt и ERK [41]. HER2-зависимая сигнализация также запускает многочисленные сигнальные пути, основными из которых являются PI3K/Akt-, MAPK- и STAT-киназные пути [42]. Неудивительно, что взаимодействие eHsp90 с клеточными рецепторами активирует в различных типах клеток множество сигнальных путей, регулирующие миграцию и инвазию клеток [8,10,11,13–15]. Ранее роль Akt-опосредованного пути сигнализации в eHsp90-зависимой активации подвижности клеток была продемонстрирована в ряде работ на различных типах клеток [10,11,13]. Мы показали, что при обработке клеток A-172 и HT1080 eHsp90 в течение 2 ч уровень фос-

форилированного Akt (pAkt) увеличивался в два–четыре раза (рис. 2). Ингибитор протеинкиназ B (Akt1/2/3) незначительно влиял на базальную миграцию и инвазию клеток, но выражено ингибировал Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток (табл. 2 и 3). Полученные данные свидетельствовали, что eHsp90 активировал Akt-опосредованную сигнализацию в клетках A-172 и HT1080.

Основным активатором Akt является фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), важнейший регуляторный белок, находящийся на пересечении различных сигнальных путей и контролирующей ключевые функции клетки. Оказалось, что ингибитор PI3K $\alpha/\delta/\beta$ LY294002 по-разному действовал на разные культуры клеток: LY294002 ингибировал базальную и в особенности Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток A-172 (табл. 2 и 3), что свидетельствовало об активации PI3K-Akt-сигнального пути в этих клетках в ответ на обработку eHsp90. Это согласуется с данными работы [8], в которой была установлена роль PI3K в Hsp90-зависимой активации сигнализации через Akt. С другой стороны, LY294002 практически не влиял на базальную и Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток HT1080, свидетельствуя против PI3K-зависимой активации Akt в этой культуре клеток (табл. 2 и 3). Возможно, что в HT1080 наблюдается описанная ранее PI3K-независимая активация Akt, например через нерцепторные тирозинкиназы семейства Src [43,44].

Таблица 2. Ингибиторный анализ базальной миграции и инвазии клеток HT1080 и A-172

Молекулярная мишень ингибитора	Клеточная культура	Базальная миграция, %	Базальная инвазия, %
HER2	HT1080	92 ± 14	54 ± 9
	A-172	93 ± 13	92 ± 11
Akt1/2/3 (PKB)	HT1080	97 ± 12	97 ± 13
	A-172	99 ± 8	77 ± 13
PI3K $\alpha/\delta/\beta$	HT1080	97 ± 15	97 ± 14
	A-172	70 ± 11	78 ± 12
ERK1/2	HT1080	96 ± 12	68 ± 10
	A-172	87 ± 13	73 ± 10
JNK1/2/3	HT1080	78 ± 12	83 ± 12
	A-172	58 ± 9	60 ± 9
p38 α/β MAPK (SB203580)	HT1080	92 ± 14	100 ± 10
	A-172	90 ± 11	85 ± 9
p38 α/β MAPK (SB202190)	HT1080	92 ± 12	100 ± 12
	A-172	93 ± 11	88 ± 14
IKK	HT1080	100 ± 14	66 ± 11
	A-172	86 ± 13	100 ± 14
FAK	HT1080	79 ± 14	67 ± 9
	A-172	47 ± 9	37 ± 7
Src киназа	HT1080	74 ± 10	95 ± 12
	A-172	63 ± 9	84 ± 13
MMP1/2/3/7/9	HT1080	100 ± 14	77 ± 11
	A-172	88 ± 13	70 ± 10
ROCK1	HT1080	85 ± 12	100 ± 13
	A-172	79 ± 12	86 ± 13

Примечание. Базальную миграцию/инвазию клеток в присутствии ингибиторов оценивали относительно базальной миграции/инвазии контрольных клеток, которую принимали за 100%.

Митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) представляют собой семейство консервативных серин/треонин протеинкиназ, вовлеченных в различные фундаментальные клеточные процессы, в том числе в пролиферацию, подвижность, дифференцировку, стрессовый ответ, апоптоз и др. МАРК включают в себя киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK1/2), c-Jun-NH2-терминальные протеинкиназы 1, 2 и 3 (JNK), p38 (изоформы p38 α , β , γ , and δ) и ряд других киназ. ERK-опосредованная сигнализация является ключевым каскадом МАРК-зависимого сигнального пути [45] и является важнейшим компонентом в подвижности клеток [46]. Для клеточных культур рака прямой кишки, первичных дермальных фибробластов, клеток рака простаты и клеток глиобластомы показана активация ERK1/2-опосредованного пути сигнализации в ответ на стимуляцию кле-

ток eHsp90 [8,10,11,13]. Мы также обнаружили, что ингибирование ERK1/2 практически блокировало eHsp90-зависимую активацию клеток A-172 и HT1080, но незначительно влияло на базальную миграцию и инвазию клеток (табл. 2 и 3), что свидетельствует о ключевой роли ERK-опосредованного сигнального пути в eHsp90-зависимой стимуляции миграции и инвазии клеток различного типа.

JNK сигнальный путь является другим путем МАРК-зависимой сигнализации, связанным со стрессовым ответом клеток на внешние воздействия и стимулы [47]. Ингибитор JNK1/2/3 умеренно снижал как базальную, так Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток (табл. 1 и 2). Через 2 ч после активации клеток eHsp90 мы не зарегистрировали увеличения фосфорилированной формы JNK (рис. 2). В совокупности, эти данные позволяют предпо-

Таблица 3. Ингибиторный анализ Hsp90-индуцированной миграции и инвазии клеток HT1080 и A-172

Молекулярная мишень ингибитора	Клеточная культура	Hsp90-индуцированная миграция, %	Hsp90-индуцированная инвазия, %
HER2	HT1080	45	45
	A-172	10	34
Akt1/2/3 (PKB)	HT1080	9	15
	A-172	25	14
PI3K $\alpha/\delta/\beta$	HT1080	95–100	80–100
	A-172	42	65
ERK 1/2	HT1080	0	11
	A-172	0	11
JNK 1/2/3	HT1080	70	45
	A-172	44	69
p38 α/β MAPK (SB203580)	HT1080	91	91
	A-172	91	78
p38 α/β MAPK (SB202190)	HT1080	100	100
	A-172	100	86
IKK	HT1080	0	13
	A-172	15	0
FAK	HT1080	34	43
	A-172	9	9
Src киназа	HT1080	0–5	15
	A-172	0–5	17
ROCK1	HT1080	29	25
	A-172	40	69
MMP1/2/3/7/9	HT1080	89	52
	A-172	79	9

Примечание. Hsp90-индуцированную стимуляцию миграции/инвазии клеток в присутствии ингибиторов оценивали относительно Hsp90-индуцированной стимуляции миграции/инвазии контрольных клеток, которую принимали за 100%.

лагать определенное, но не существенное участие JNK-опосредованного сигнального пути в eHsp90-зависимой активации клеток обеих клеточных культур. В ряде работ, выполненных на линиях рака прямой кишки, также было продемонстрировано, что JNK-сигнализация, вероятно, не играет важной роли в Hsp90-зависимой стимуляции клеток [48].

Сигнализация, опосредуемая p38, является еще одним каскадом MAPK-зависимой сигнализации, активирующимся в ответ на обработку клеток цитокинами и в ответ на многие стрессовые стимулы (ультрафиолетовый свет, температурный и осмотический шок и т.д.) [49]. Мы обнаружили, что два ингибитора p38 α/β MAPK, SB203580 и SB202190, не влияли на базальную и Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток (табл. 2 и 3). Количество фосфорилированной формы p38 также не возрастало в клетках при их обработке eHsp90 (рис. 2). Это

свидетельствовало, что в клетках A-172 и HT1080 p38-зависимая сигнализация не участвует в Hsp90-индуцированной стимуляции клеточной подвижности, что согласуется с данными, полученными на клетках ряда линий рака прямой кишки [48].

Сигнальный NF- κ B-путь связан с активацией транскрипционного фактора NF- κ B цитокинами, T- и B-клеточными митогенами, лигандами TLR (например, липополисахаридами), стрессовыми воздействиями. IKK (IkB-киназа) является местом интеграции многочисленных путей, активирующих NF- κ B-путь [50]. При активации клеток IKK фосфорилирует ингибиторный белок IkB, находящийся в цитоплазме клетки в комплексе с NF- κ B. Фосфорилирование IkB приводит к его деградации и высвобождению NF- κ B, который транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию множества

генов. Блокирование активации ИКК приводит к ингибированию NF- κ B-пути сигнализации. Ранее было установлено, что eHSP90 вызывает ассоциацию LRP1 с ИКК α и ИКК β и активирует LRP1/ИКК/NF- κ B-сигнальный каскад у клеток ряда линий рака прямой кишки [48]. Мы также показали, что ингибирование ИКК практически не влияло на базальную миграцию и инвазию клеток A-172 и HT1080, однако резко снижало eHsp90-зависимую активацию клеток (табл. 2 и 3), что свидетельствует о важной роли NF- κ B-опосредованного пути сигнализации в eHsp90-зависимой стимуляции миграции и инвазии клеток.

Киназа фокальных контактов (ФАК) является цитозольной тирозинкиназой и входит в состав адгезионных контактов клеток с внеклеточным матриксом (фокальных контактов) [51]. В области фокальных контактов ФАК ассоциирована и функционирует совместно с тирозинкиназой Src, запуская несколько ФАК/Src-опосредованных сигнальных путей, участвующих в том числе в обеспечении клеточной подвижности [52]. Ингибитор ФАК снижал базальную миграцию и инвазию клеток HT1080 и в несколько большей степени A-172, подтверждая роль ФАК в клеточной подвижности. Ингибитор ФАК существенно снижал Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток HT1080 и практически полностью блокировал Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток A-172 (табл. 1 и 2). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли ФАК-зависимой сигнализации в eHsp90-зависимой стимуляции клеток A-172 и HT1080, что согласуется с данными работы [11], в которой была установлена важная роль ФАК в проявлении мотогенной активности eHsp90 в клетках рака простаты.

Множество путей сигнальной трансдукции иницируется и модулируется нерецепторными тирозинкиназами семейства Src. Мы показали, что PP2, ингибитор Src, незначительно снижал базальную миграцию и инвазию клеток, но практически блокировал стимуляцию миграции и инвазии клеток, индуцированную eHsp90, что свидетельствует о важной роли тирозинкиназ семейства Src в eHsp90-индуцированной стимуляции клеток A-172 и HT1080 (табл. 2 и 3). Ранее для клеток мультиформной глиобластомы также было продемонстрировано, что eHsp90-LRP1-опосредованная активация Src необходима для последующего фосфорилирования и активации Akt [10]. Важная роль Src в фосфорилировании и активации Akt и, как следствие, в активации Akt-зависимого пути сигнализации установлена при активации клеток другими сти-

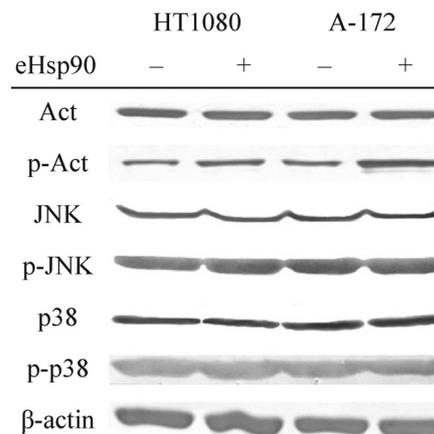


Рис. 2. Влияние стимуляции клеток экстраклеточным Hsp90 на фосфорилирование Akt, p38 и JNK. Клетки обрабатывали eHsp90 (50 мкг/мл) и лизировали. Клеточные лизаты анализировали методом Вестерн-блоттинга с помощью антител к Akt, p38 и JNK и их фосфорилированным формам, а также с антител к бета-актину (контроль нанесения образцов).

мулами [44]. Участие тирозинкиназ семейства Src в eHsp90-зависимой активации миграции и инвазии клеток также может быть связано с их ролью в ФАК/Src-опосредованной сигнализации, обеспечивающей клеточную подвижность [11,52]. Кроме этого, Src может участвовать в Src-Rho-сигнализации. Rho является эффектором Src-сигнализации [53]. В свою очередь, эффекторы Rho стимулируют сборку миозиновых филаментов и стабилизацию взаимодействий актина с миозином [54]. В частности, Rho-ассоциированная серин-треониновая киназа ROCK1 является эффектором малой ГТФазы RhoA и регулирует актомиозиновый цитоскелет клеток, тем самым участвуя в клеточной подвижности и метастазировании [55]. Ранее на клетках глиомы человека было показано, что обработка клеток eHSP90 приводила к активации Src-Rho-сигнализации [56]. Мы также показали, что ингибирование ROCK1 незначительно влияло на базальную миграцию и инвазию клеток, в то время как eHsp90-индуцированная инвазия клеток существенно ингибировалась, в особенности в клетках HT1080 (табл. 2 и 3), что свидетельствует о существенной роли ROCK1 в eHsp90-индуцированной стимуляции клеточной подвижности.

Важную роль в инвазии клеток, в том числе и опухолевых клеток, играют матриксные металлопротеиназы. Кроме этого, матриксные металлопротеиназы являются регуляторными молекулами, принимающими участие в ремоделировании ВКМ, процессинге цитокинов и ростовых факторов, модулирующим активность

лигандов [57]. Мы обнаружили, что ингибирование широкого спектра матриксных металлопротеиназ (ММП1/2/3/7/9) с помощью блатимастата незначительно влияло на базальную миграцию и инвазию клеток, а также на Hsp90-индуцированную миграцию клеток, в то время как Hsp90-индуцированная инвазия клеток существенно снижалась, что было особенно выражено на клетках A-172 (табл. 2 и 3). Это согласуется с литературными данными, указывающими на существенную роль матриксных металлопротеиназ в инвазии клеток, стимулированной eHsp90 [18–25].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что стимуляция клеток eHsp90 является сложным скоординированным процессом, в который вовлечены множество компонентов. eHsp90, выступая в качестве мотогенного лиганда, взаимодействует с различными поверхностными клеточными рецепторами (LRP1, HER2), активируя множество путей внутриклеточной сигнализации, что сопровождается активацией сигнальных путей, обеспечивающих клеточную подвижность (FAK-Src, Src-Rho-ROCK1). eHsp90 также активирует инвазию клеток, взаимодействуя с экстраклеточными протеолитическими ферментами. Для разных типов клеток наблюдаются существенные отличия в путях и механизмах активации отдельных компонентов, связанных с eHsp90-зависимой стимуляцией миграции и инвазии клеток *in vitro*.

ВЫВОДЫ

HER2 участвует в eHsp90-индуцированной стимуляции миграции и инвазии клеток глиобластомы A-172 и фибросаркомы HT1080 человека *in vitro*. eHsp90-индуцированная миграция и инвазия клеток A-172 и HT1080 сопровождается активацией ERK1/2-, IKK/NF-κB-, FAK-, ROCK1- и Src-зависимых сигнальных путей, слабой активацией JNK, в то время как p38-зависимый сигнальный каскад при этом не активируется. eHsp90 активирует в клетках A-172 PI3K-Akt-сигнальный путь, в то время как в клетках HT1080 Akt активируется независимо от PI3K. Матриксные металлопротеиназы также участвуют в процессах eHsp90-индуцированной инвазии клеток A-172 и HT1080 *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- J. Li and J. Buchner, Biomed. J. **36**, 106 (2013).
- A. S. Sreedhar, E. Kalmar, P. Csermely, and Y.F. Shen, FEBS Lett. **562**, 11 (2004).
- D. Picard, Cell. Mol. Life Sci. **59** (10), 1640 (2002).
- W. Li, Y. Li, S. Guan, et al., EMBO J. **26**, 1221 (2007).
- S. Tsutsumi, K. Beebe, and L. Neckers, Future Oncol. **5**, 679 (2009).
- X. Wang, X. Song, W. Zhuo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 21288 (2009).
- S. Basu, R. J. Binder, T. Ramalingam, and P. K. Srivastava, Immunity **14**, 303 (2001).
- J. S. Chen, Y. M. Hsu, C. C. Chen, et al., J. Biol. Chem. **285**, 25458 (2010).
- C. F. Cheng, J. Fan, M. Fedesco, et al., Mol. Cell. Biol. **28**, 3344 (2008).
- U. Gopal, J. E. Bohonowych, C. Lema-Tome, et al., PLoS One **6**, 17649 (2011).
- M. W. Hance, K. Dole, U. Gopal, et al., J. Biol. Chem. **287** (45), 37732 (2012).
- P. Jayaprakash, H. Dong, M. Zou, et al., J. Cell Sci. **128**, 1475 (2015).
- F. Tsen, A. Bhatia, K. O'Brien, et al., Mol. Cell Biol. **33**, 4947 (2013).
- S. Tsutsumi, B. Scroggins, F. Koga, et al., Oncogene **27**, 2478 (2008).
- D. Thuringer, A. Hammann, N. Benikhlef, et al., J. Biol. Chem. **286**, 3418 (2011).
- A. P. Lillis, I. Mikhailenko, and D. K. Strickland, J. Thromb Haemost. **3**, 1884 (2005).
- K. Sidera, M. Gaitanou, D. Stellas, et al., J. Biol. Chem. **283**, 2031 (2008).
- D. Stellas, A. El Hamidieh, and E. Patsavoudi, BMC Cell Biol. **11**, 51 (2010).
- B. K. Eustace, T. Sakurai, J. K. Stewart, et al., Nat. Cell Biol. **6**, 507 (2004).
- Y. Yang, R. Rao, J. Shen, et al., Cancer Res. **68**, 4833 (2008).
- X. Wang, X. Song, W. Zhuo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 21288 (2009).
- J. D. Sims, J. McCready, and D. G. Jay, PLoS One **6**, e18848 (2011).
- X. Song, X. Wang, W. Zhuo, et al., J. Biol. Chem. **285**, 40039 (2010).
- F. Lagarrigue, S. Dupuis-Coronas, D. Ramel, et al., Cancer Res. **70**, 6978 (2010).
- A. L. Correia, H. Mori, E. I. Chen, et al., Genes Dev. **27**, 805 (2013).
- M. C. Hunter, K. L. O'Hagan, A. Kenyon, et al., PLoS One **9**, e86842 (2014).
- J. Bohonowych, M. Hance, K. Nolan, et al., Prostate **74**, 395 (2014).
- M. Schafer and S. Werner, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **9**, 628 (2008).
- Yu. Skarga, V. Vrublevskaia, Y. Evdokimovskaya, and O. Morenkov, Biomed. Chromatogr. **23** (11), 1208 (2009).
- U. K. Laemmli, Nature **227** (5259), 680 (1970).
- A. Citri, K. B. Skaria, and Y. Yarden, Exp. Cell Res. **284**, 54 (2003).
- C. J. Barnes and R. Kumar, Cancer Treat Res. **119**, 1 (2004).
- L. Maletínská, E. A. Blakely, K. A. Bjornstad, et al., Cancer Res. **60** (8), 2300 (2000).

34. R. C. Munch, M. D. Muhlebach, T. Schaser, et al., *Mol. Ther.* **19** (4), 686 (2011).
35. G. Perrot, B. Langlois, J. Devy, et al., *Mol. Cell. Biol.* **32** (16), 3293 (2012).
36. A. P. Lillis, I. Mikhailenko, D. K. Strickland, J. Thromb. Haemost. **3**, 1884 (2005).
37. B. Langlois, G. Perrot, C. Schneider, et al., *PLoS One* **5** (7), e11584 (2010).
38. N. Etique, L. Verzeaux, S. Dedieu, and H. Emonard, *BioMed. Res. Int.* Article ID 152163 (2013).
39. A. W. Orr, C. E. Pedraza, M. A. Pallero, et al., *J. Cell Biol.* **161**, 1179 (2003).
40. B. Thapa, B. H. Koo, Y. H. Kim., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 1696 (2014).
41. Y. Shi, E. Mantuano, G. Inoue, et al., *Sci. Signal.* **2** (68), 18 (2009).
42. A. Adamczyk, A. Grela-Wojewoda, M. Domagaia-Haduch, et al., *J. Cancer* **8** (1), 131 (2017).
43. K. Mahajan and N. P. Mahajan, *J. Cell. Physiol.* **227**, 3178 (2012).
44. T. Jiang and Y. Qiu, *J. Biol. Chem.* **278** (18), 15789 (2003).
45. G. Pagès, S. Guérin, D. Grall, et al., *Science* **286**, 1374 (1999).
46. G. A. Smolen, J. Zhang, M. J. Zubrowski, et al., *Genes Dev.* **24**, 2654 (2010).
47. Y. Keshet and R. Seger, *Methods Mol. Biol.* **661**, 3 (2010).
48. W. S. Chen, C. C. Chen, L. L. Chen, et al., *J. Biol. Chem.* **288** (13), 9001 (2013).
49. A. Cuadrado and A. R. Nebreda, *Biochem. J.* **429** (3), 403 (2010).
50. F. Mercurio, H. Zhu, B. W. Murray, et al., *Science* **278** (5339), 860 (1997).
51. X. Zhao and J. L. Guan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63** (8), 610 (2011).
52. L. A. Cary, J. F. Chang, and J. L. Guan, *J. Cell Sci.* **109** (Pt 7), 1787 (1996).
53. M. D. Haskell, A. L. Nickles, J. M. Agati, et al., *J. Cell Sci.* **114**, 699 (2001).
54. K. Kimura, M. Ito, M. Amano, et al., *Science* **273**, 245 (1996).
55. N. Rath and M. F. Olson, *EMBO Reports* **13** (10), 900 (2012).
56. A. Daoud, U. Gopal, J. Kaur, and J. S. Isaacs, *Oncotarget.* **8** (63), 106807 (2017).
57. S. Löffek, O. Schilling, and C. W. Franzke, *Eur. Respir. J.* **38** (1), 191 (2011).

Mechanisms of Stimulation of Migration and Invasion of Tumor Cells *in vitro* by Extracellular Heat Shock Protein 90 (eHsp90)

A.V. Snigireva, V.V. Vrublevskaia, M.A. Zhmurina, Y.Y. Skarga, and O.S. Morenkov

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

Extracellular heat shock protein 90 (eHsp90) plays an important role in cell motility, invasion and metastasis of tumor cells. eHsp90 stimulates migration and invasion of cells via interaction with surface receptors, which is accompanied by the activation of multiple cell motility-related signaling pathways. In addition, eHsp90 promotes cell invasion by the activation of extracellular matrix metalloproteinases. The role of different receptors, intracellular signaling pathways and matrix metalloproteinases in the eHsp90-dependent migration and invasion of different types of cells is not sufficiently studied. In this study, we demonstrated that HER2 is involved in the eHsp90-mediated stimulation of migration and invasion of human glioblastoma A-172 and fibrosarcoma HT1080 cells *in vitro*. eHsp90-induced migration and invasion of cells are accompanied by the activation of ERK1/2-, IKK/NF- κ B-, FAK-, ROCK1- and Src-mediated signaling pathways and by the limited activation of JNK, while the p38-mediated signaling cascade is not activated. eHsp90 also stimulates PI3K-Akt signaling pathway in A-172 cells, while Akt is activated in HT1080 cells regardless of PI3K. It has been established that matrix metalloproteinases are involved in the eHsp90-dependent stimulation of invasion of A-172 and HT1080 cells *in vitro*.

Keywords: extracellular Hsp90, migration and invasion of cells in vitro, cellular receptors, signaling pathways, matrix metalloproteinases