

НЕПРОНИКАЮЩИЕ В КЛЕТКИ ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ СУРВИВИНА И HSP70/HSP90-ОРГАНИЗУЮЩЕГО БЕЛКА ИНГИБИРУЮТ HSP90-ЗАВИСИМУЮ МИГРАЦИЮ И ИНВАЗИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. В.С. Петренко, А.В. Снигирева, В.В. Врублевская, М.А. Жмурина, Ю.Ю. Скарга, О.С. Моренков

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: morenkov_o@mail.ru

Поступила в редакцию 12.07.2021 г.

После доработки 19.07.2021 г.

Принята к публикации 21.07.2021 г.

Мембрано-ассоциированные и секретированные экстраклеточные белки теплового шока 90 (Hsp90) играют важную роль в миграции, инвазии и метастазировании опухолевых клеток и считаются перспективной терапевтической мишенью для создания противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. Ранее были идентифицированы пептидные фрагменты сурвивина (KHSSGCAFL) и Hsp70/Hsp90-организующего белка (KAYARIGNSYFK), которые обеспечивают связывание этих белков с внутриклеточным Hsp90. Мы исследовали влияние этих Hsp90-связывающих пептидов на миграцию и инвазию клеток фибросаркомы человека HT1080 и глиобластомы человека A-172. Непроникающие в клетки Hsp90-связывающие пептидные фрагменты сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка не проявляли цитотоксичности и антипролиферативной активности, в то время как проникающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды, дополнительно содержащие последовательность гомеодомена Antennapedia, были токсичны для клеток HT1080 и A-172. Непроникающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды незначительно снижали базальную (нестимулированную) миграцию и инвазию клеток, однако выражено ингибировали миграцию/инвазию клеток, стимулированную экстраклеточным Hsp90. Полученные результаты свидетельствуют, что непроникающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды способны ингибировать активность экстраклеточного Hsp90, что приводит к подавлению миграции и инвазии клеток. Такие пептиды обладают потенциалом для создания на их основе противоопухолевых препаратов антиметастатического действия.

Ключевые слова: экстраклеточный Hsp90, сурвивин, Hsp70/Hsp90-организующий белок, пептиды, миграция и инвазия клеток *in vitro*, метастазирование.

DOI: 10.31857/S0006302921050124

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является молекулярным шапероном, выполняющим важные внутриклеточные функции, связанные с контролем фолдинга, стабильности, активации и деградации белков-клиентов Hsp90 [1]. На сегодняшний день идентифицировано около 700 белков-клиентов Hsp90, многие из которых являются онкогенами [2, 3]. Ингибирование внутриклеточного Hsp90 в опухолевых клетках вызывает деграда-

цию его белков-клиентов, нарушение различных сигнальных путей и, как следствие, подавление роста раковых клеток и их гибель [2, 3]. В этой связи проникающие в клетки ингибиторы Hsp90 считаются перспективными препаратами для лечения рака и некоторые из них в настоящее время проходят клинические испытания [4].

Помимо внутриклеточной локализации Hsp90 также обнаруживается на поверхности нормальных и опухолевых клеток и секретруется опухолевыми клетками [5–10]. В опухолевых клетках секреция Hsp90 и его уровень на плазматической клеточной мембране повышены, что коррелирует со способностью клеток к диссеминации из первичной опухоли [5]. Установлено, что экстрак-

Сокращения: Hsp90 – белок теплового шока 90, eHsp90 – экстраклеточный белок теплового шока 90, Shp – пептидный фрагмент 79–87 аа сурвивина, TPR – пептидный фрагмент 301–312 аа Hsp70/Hsp90-организующего белка, Ant – пептид гомеодомена Antennapedia, ДМЕМ – среда Игла в модификации Дальбекко, ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка.

точный Hsp90 (eHsp90) стимулирует миграцию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток [5–12]. Он связывается с рецепторами клеточной поверхности (LRP1, HER2), что приводит к активации сигнальных путей, участвующих в миграции и инвазии клеток [7, 11, 12]. Кроме этого, eHsp90 способен функционировать как шаперон, связываясь с экстраклеточными мембрано-ассоциированными рецепторами, растворенными белками клеточного микроокружения (например, матриксными металлопротеиназами) и белками внеклеточного матрикса, тем самым регулируя их активность [6, 13, 14]. eHsp90 регулирует экспрессию белков, связанных с процессами миграции и инвазии клеток, например, матриксных металлопротеиназ и интегринов [15, 16], а также стимулирует образование миофибробластов (или миофибробласто-подобных опухолеассоциированных фибробластов), участвующих в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса и инвазии [16, 17].

Было показано, что непроницаемые для клеток ингибиторы Hsp90 – низкомолекулярные соединения, такие как DMAG-N-оксид (производное гелданамицина – ингибитора Hsp90) и STA-12-7191 (производное гантеспиба – ингибитора Hsp90), иммобилизованный на гранулах агарозы гелданамицин, а также Hsp90-специфические антитела – связываются с экстраклеточным Hsp90 и замедляют миграцию клеток, инвазию и диссеминацию опухоли в организме животных [6–10, 13]. Гепарин, ингибирующий взаимодействие eHsp90 с гепарансульфат протеогликанами, расположенными на плазматической мембране, также снижает миграцию и инвазию опухолевых клеток [18, 19]. Поскольку миграция и инвазия опухолевых клеток являются ключевыми процессами метастазирования, подавление подвижности опухолевых клеток представляется перспективным подходом в борьбе с метастазированием. В этом контексте eHsp90 рассматривается как новая привлекательная химиотерапевтическая мишень для препаратов антиметастатического действия, подавляющих миграцию и инвазию раковых клеток.

Функционирование внутриклеточного Hsp90 осуществляется посредством взаимодействия с белками-клиентами, различными шаперонами и ко-шаперонами [1–3]. К настоящему времени идентифицированы пептидные фрагменты отдельных белков-клиентов Hsp90, шаперонов и ко-шаперонов, обеспечивающие взаимодействие этих белков с внутриклеточным Hsp90. Присоединение к таким пептидным фрагментам последовательностей CPP (cell-penetrating peptides), таких как TAT-пептид (фрагмент TAT HIV-1) или пенетратин (фрагмент гомеодомена *Antennapedia*), обеспечивает проникновение Hsp90-связывающих пептидов в клетки, что приводит к инги-

бированию взаимодействия Hsp90 с ко-шаперонами и/или белками-клиентами, последующей дестабилизации и деградации белков-клиентов Hsp90. Как следствие, такие проникающие в клетки Hsp90-связывающие пептиды подавляют рост опухолевых клеток и индуцируют клеточную гибель. Например, в последовательности белка сурвивина, который активно экспрессируется во многих типах раковых клеток и участвует в регуляции митоза и подавлении запрограммированной гибели клеток [20], идентифицирован пептидный фрагмент KHSSGCAFL, названный Shepherdin [21]. Проницаемый для клеток вариант этого пептида связывается с внутриклеточным Hsp90 с высокой аффинностью и ингибирует его функционирование, что приводит к дестабилизации ряда внутриклеточных белков-клиентов Hsp90 и гибели клеток [21, 22].

Другим примером пептидомиметиков, подавляющих функционирование внутриклеточного Hsp90, является пептидный фрагмент KAYARIGNSYFK Hsp70/Hsp90-организующего белка, адаптерного белка, который обеспечивает сайты специфического связывания для Hsp90 и Hsp70, что критически необходимо для сборки шаперонной машины Hsp70/Hsp90 [23–25]. Hsp70/Hsp90-организующий белок содержит специфические TPR домены, состоящие из повторяющихся аминокислотных последовательностей; из них домен TPR2A распознает пять остатков на С-конце Hsp90 [23]. Проницаемый для клеток пептидный фрагмент домена TPR2A Hsp70/Hsp90-организующего белка препятствует ассоциации между Hsp90 и Hsp70/Hsp90-организующим белком, что приводит к гибели раковых клеток *in vitro* и в опухолях мышей [24, 25]. Мы предположили, что непроницаемые для клеток Hsp90-связывающие пептиды могут подавлять Hsp90-зависимую миграцию и инвазию клеток за счет связывания с мембрано-ассоциированным eHsp90 и/или свободным eHsp90 из межклеточного пространства и ингибирования их экстраклеточных функций. При этом ингибирование eHsp90 не будет сопровождаться подавлением функционирования внутриклеточного Hsp90. В данной работе мы продемонстрировали, что непроницаемые для клеток Hsp90-связывающие пептидные фрагменты сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка ингибируют миграцию и инвазию клеток фибросаркомы HT1080 и глиобластомы A-172 человека, зависимую от экстраклеточного Hsp90.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и реактивы. Общелабораторная пластиковая посуда и пластиковая посуда для культивирования клеток были производства компаний Greiner (Австрия) и Corning Life Sciences (США). Вставки в 24-луночные планшеты с по-

лиэтилентерефталатной мембраной (размер пор 8 мкм) были производства компании Greiner (Австрия). В работе использовали среду Игла в модификации Дальбекко (среду ДМЕМ) и эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС) производства NuClone (США). Растворы версена и трипсина были производства ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург, Россия). Остальные химические реактивы приобретали в компании Sigma-Aldrich (США).

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

Синтез пептидов и очистка белков. Пептиды синтезировали методом твердофазной химии, очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (чистота > 98%) и анализировали с помощью масс-спектрометрии. В работе использовали следующие пептиды: пептид, соответствующий последовательности сурвивина между Lys-79 и Leu-87 (KHSSGCAFL, Shepherdin (Shp)), и его скремблированный вариант (SKLACFSHG, scr-Shp); пептид, соответствующий последовательности TPR2A Hsp70/Hsp90-организующего белка между Lys-301 и Lys-312 (KAYARIGNSYFK, TPR) и его скремблированный вариант (SYKARNGAFIYK, scr-TPR). Для получения проницаемых для клеток пептидов к ним на N-конце добавляли фрагмент последовательности гомеодомена *Antennapedia* (RQIKIWFQNRMRMKWKK) и получали проникающие в клетки пептиды: RQIKIWFQNRMRMKWKKKHSSGCAFL (Ant-Shp), RQIKIWFQNRMRMKWKKSKLACFSHG (Ant-scr-Shp), RQIKIWFQNRMRMKWKKKAYARIGNSYFK (Ant-TPR) и RQIKIWFQNRMRMKWKKSYKARNGAFIYK (Ant-scr-TPR).

Очистка Hsp90 из мозга коров. Очистку нативного Hsp90 из мозга коров проводили, как описано ранее [26]. Мозг коров получали с местной бойни. Чистота очищенного нативного Hsp90 составляла 95–98%. В очищенном Hsp90 содержались две изоформы Hsp90 – Hsp90a и Hsp90b, в соотношении 9:1. Для экспериментов с культурами клеток очищенный нативный Hsp90 диализовали против среды ДМЕМ. Очищенный Hsp90 не проявлял цитотоксичности и антипролиферативной активности для клеток A-172 и HT1080 при концентрациях до 1.0 мг/мл.

Определение цитотоксичности и антипролиферативной активности пептидов. Синтетические пептиды растворяли в диметилсульфоксиде. Препараты пептидов разводили до необходимых концентраций в среде культивирования. Определе-

ние цитотоксичности и антипролиферативной активности проводили на клетках A-172 и HT1080 с использованием МТТ метода, как описано ранее [27]. IC_{50} рассчитывали как концентрацию пептида, вызывающую гибель 50% клеток за 72 ч.

Определение миграции и инвазии клеток *in vitro*. Эксперименты проводили с использованием вкладышей в 24-луночные планшеты с полиэтилентерефталатной мембраной (размер пор 8 мкм); для оценки инвазии клеток вкладыши с полиэтилентерефталатной мембраной обрабатывали коллагеном VI (Trevigen, США). Для анализа базальной (нестимулированной) миграции/инвазии клетки помещали во вкладыши в среде ДМЕМ с бычьим сывороточным альбумином в присутствии пептидов в разных концентрациях. В качестве хемотаксиканта в нижнем резервуаре использовали ДМЕМ-5% ЭБС. Миграцию и инвазию клеток оценивали через 6 и 24 ч соответственно. Прошедшие через полиэтилентерефталатную мембрану клетки фиксировали метиловым спиртом, окрашивали красителем кристаллическим фиолетовым, лизировали и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм (OP_{595}) с использованием планшетного ридера iMark (Bio-Rad, США). Базальную миграцию/инвазию оценивали по OP_{595} клеток, мигрировавших через мембрану, за вычетом OP_{595} клеток, прошедших через мембрану в отсутствие хемотаксического градиента (спонтанная миграция/инвазия). Величину миграции контрольных клеток без пептидов принимали за 100%.

Оценку Hsp90-стимулированной миграции/инвазии проводили как описано выше, за исключением того, что в среду с клетками добавляли очищенный Hsp90 (50 мкг/мл) для стимуляции миграции. OP_{595} клеток, прошедших через мембрану, определяли, как описано выше. Для расчета Hsp90-индуцированной стимуляции миграции/инвазии OP_{595} спонтанно-мигрировавших клеток вычитали из значений OP_{595} клеток, прошедших через мембрану по хемотаксическому градиенту. После этого OP_{595} нестимулированных клеток вычитали из OP_{595} Hsp90-стимулированных клеток и разницу выражали в процентах относительно OP_{595} нестимулированных клеток. Hsp90-зависимую стимуляцию миграции/инвазии контрольных клеток без пептидов принимали за 100%.

Статистическая обработка. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. Каждая точка представляет собой среднее арифметическое значение трех-пяти повторов \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-теста Стьюдента.

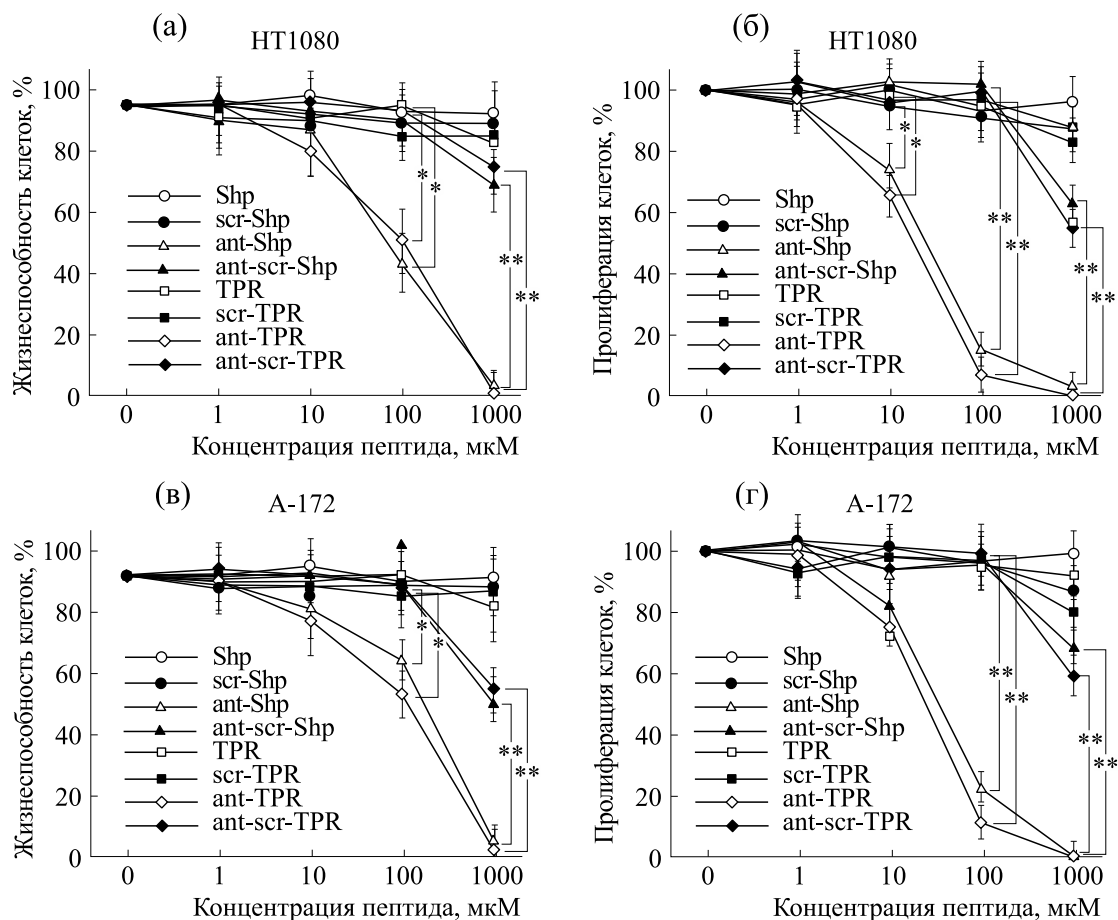


Рис. 1. Цитотоксическая (а, в) и антипролиферативная (б, г) активность Hsp90-связывающих пептидов. Клетки HT1080 и A-172 в состоянии полного монослоя (анализ цитотоксичности) или пролиферирующие клетки HT1080 и A-172 (антипролиферативный анализ) инкубировали в течение 72 ч в присутствии различных пептидов, разведенных в разных концентрациях в среде ДМЕМ-ЭБС. Относительное количество живых клеток определяли с использованием МТТ-метода, оптическую плотность при 550 нм ($ОП_{550}$) выражали в процентах. $ОП_{550}$ в контрольных лунках без пептидов принимали за 100%. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm SD ($n = 4-5$). Звездочки указывают статистически достоверное отличие от контрольных клеток: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проницаемые для клеток пептиды Ant-Shp и Ant-TPR дозозависимым образом ингибировали рост клеток HT1080 и A-172 и оказывали цитотоксическое действие на клетки. Ant-Shp проявлял цитотоксическую (рис. 1а,в) и антипролиферативную (рис. 1б,г) активности против обеих клеточных линий с IC_{50} 80–130 мкМ и 30–50 мкМ соответственно. Ant-TPR также обнаруживал цитотоксическую (рис. 1а,в) и антипролиферативную (рис. 1б,г) активности против обеих клеточных линий с IC_{50} 90–110 мкМ и 40–70 мкМ соответственно. Проницаемые для клеток скремблированные пептиды Ant-scr-Shp и Ant-scr-TPR практически не влияли на жизнеспособность и пролиферацию клеток, что указывает на специфичность цитотоксического и антипролиферативного действия проникающих в клетки Hsp90-связывающих пептидных фрагментов Ant-

Shp и Ant-TPR. Непроницаемые для клеток пептиды Shp и TPR и их скремблированные варианты (scr-Shp и scr-TPR) были не токсичны для клеток и не снижали пролиферацию клеток при концентрациях до 1000 мкМ (рис. 1). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о цитотоксичности проникающих в клетки пептидных фрагментов сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка в отношении различных линий раковых клеток и об отсутствии цитотоксической активности непроницающих в клетки вариантов этих пептидов [21, 22, 24, 25].

Мы предположили, что непроницаемые для клеток пептиды Shp и TPR могут связываться с Hsp90, ассоциированным с клеточной поверхностью, и с Hsp90 в культуральной среде, что может привести к снижению миграции и/или инвазии клеток *in vitro*, поскольку оба пула экстраклеточного Hsp90 участвуют в клеточной подвижности [6–

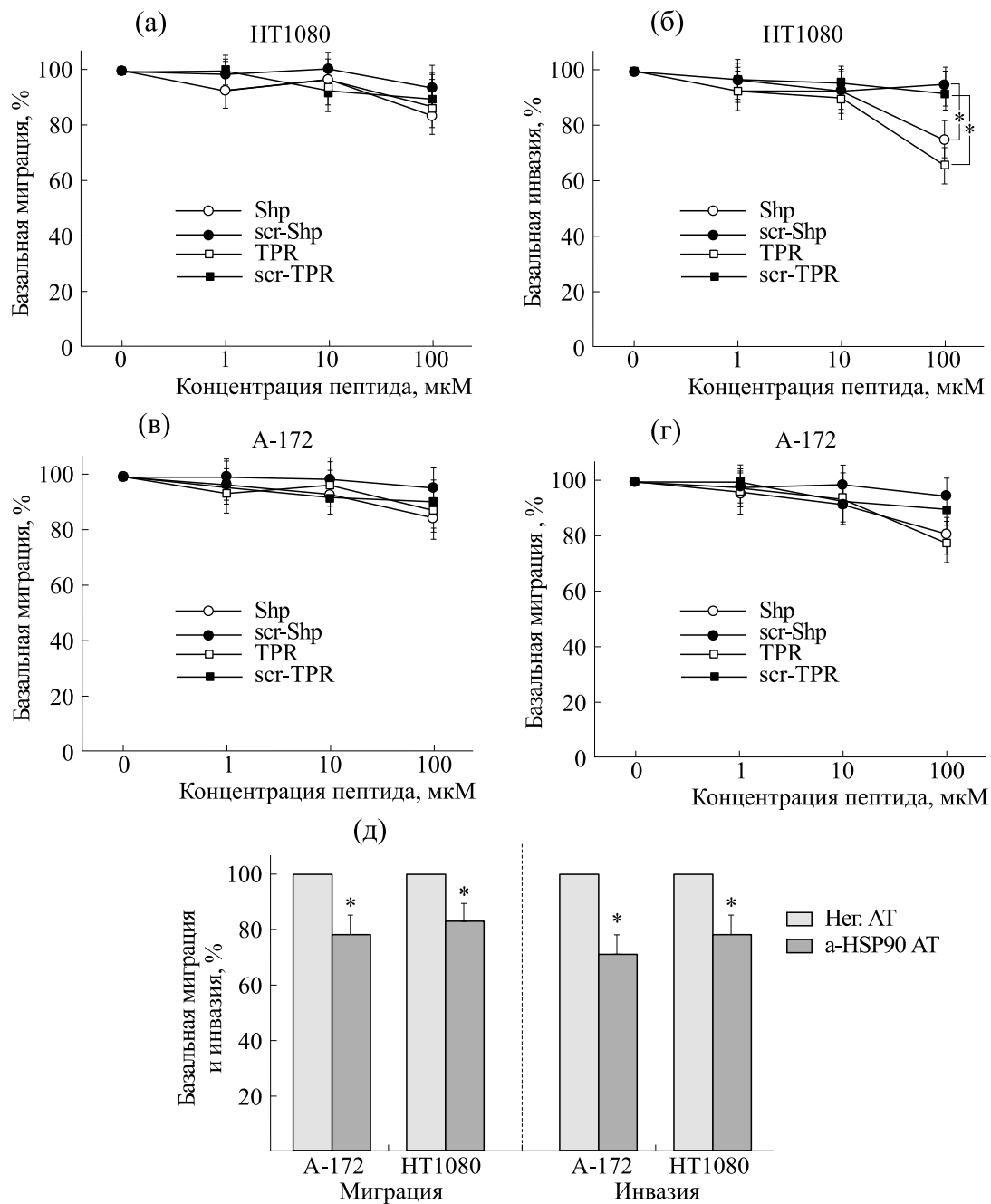


Рис. 2. Влияние непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на базальную миграцию и инвазию клеток HT1080 и A-172. Миграцию и инвазию клеток определяли в среде ДМЕМ с бычьим сывороточным альбумином, содержащей пептиды в разных концентрациях (а–г) или поликлональные антитела против Hsp90 (100 мкг/мл) (д). Миграцию и инвазию контрольных клеток (без пептидов) принимали за 100%. Каждая точка представляет собой среднее значение SD ($n = 4-5$). Звездочки указывают на статистически достоверное отличие от контрольных клеток: * – $p < 0.05$.

15]. Принимая это во внимание, мы исследовали влияние непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на базальную (нестимулированную) миграцию и инвазию клеток (в отсутствие Hsp90 в культуральной среде) и на миграцию/инвазию клеток, стимулированную экстраклеточным нативным Hsp90. В среде ДМЕМ с бычьим сыво-

роточным альбумином, которая практически не содержит факторов роста, оба непроницаемых для клеток пептида Shp и TPR в концентрациях 1–100 мкМ незначительно, но воспроизводимо снижали базальную миграцию обеих клеточных линий (рис. 2а,в), не более чем на 10–15%. Оба пептида вызывали более выраженное ингибирование ба-

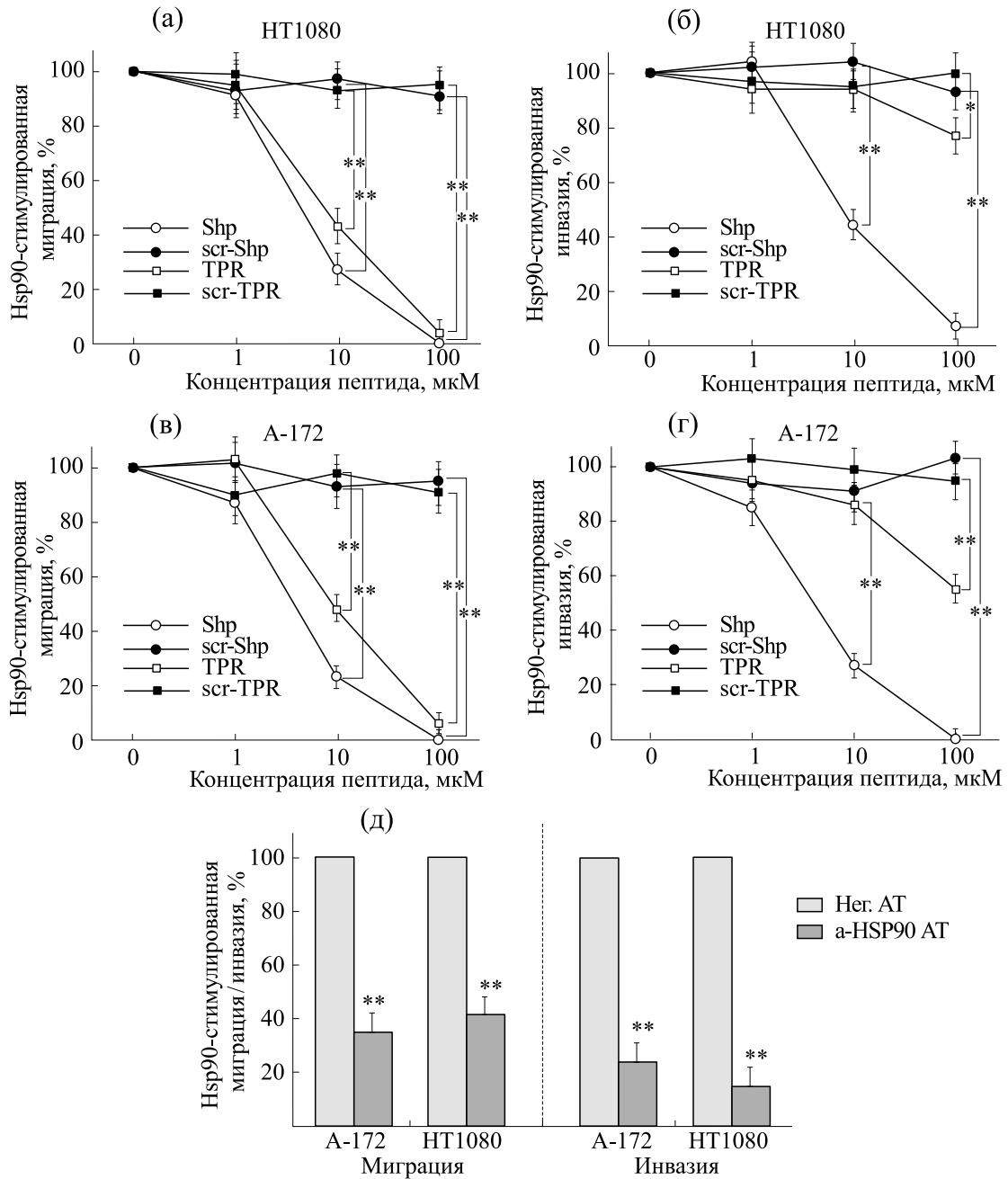


Рис. 3. Влияние непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на Hsp90-индуцированную миграцию и инвазию клеток HT1080 и A-172. Пептиды в разных концентрациях (а–г) и поликлональные антитела против Hsp90 (100 мкг/мл) (д) добавляли в среду вместе с нативным Hsp90 (50 мкг/мл) и оценивали миграцию/инвазию клеток, стимулированную Hsp90. Hsp90-зависимую стимуляцию миграции и инвазии контрольных клеток (без пептидов) принимали за 100%. Каждая точка представляет собой среднее значение ± SD (*n* = 4–5). Звездочки указывают на статистически достоверное отличие от контрольных клеток: * – *p* < 0.05, ** – *p* < 0.01.

зальной инвазии клеток: в концентрации 100 мкМ пептиды Shp и TPR снижали базальную инвазию клеток HT1080 и A-172 на 20–30% (рис. 2б,г). Эффекты пептида Shp были более выражены, чем пептида TPR. Скремблированные непроницаемые для клеток аналоги пептидов не ингибировали базальную миграцию и инвазию клеток обеих кле-

точных линий, что указывает на специфичность эффектов пептидов на базальную (нестимулированную) инвазию клеток. В качестве контроля мы проанализировали ингибирование базальной миграции/инвазии клеток Hsp90-специфическими поликлональными антителами, полученными путем многократной иммунизации кроликов очи-

шенным нативным бычьим Hsp90. Уровень снижения базальной миграции/инвазии клеток Hsp90-специфическими поликлональными антителами (100 мкг/мл) также был не очень высок и составлял 20–30% (рис. 2д). Полученные данные свидетельствовали, что непроницаемые для клеток Hsp90-связывающие пептиды Shp и TPR оказывали определенное ингибирующее влияние на миграцию/инвазию клеток, зависящую от мембрано-ассоциированного экстраклеточного Hsp90.

Далее мы исследовали влияние непроницающих в клетки Hsp90-связывающих пептидов Shp и TPR на миграцию и инвазию клеток, стимулированную Hsp90. Для стимуляции миграции/инвазии клеток использовали очищенный нативный бычий Hsp90. Добавление нативного Hsp90 в среду стимулировало миграцию клеток глиобластомы A-172 и фибросаркомы HT1080 на 30–60% и инвазию обеих клеточных линий на 80–140% соответственно (данные не приведены), подтверждая заметную промотирующую активность нативного Hsp90 для опухолевых клеток, показанную нами ранее [9]. Hsp90-индуцированная стимуляция миграции/инвазии обеих клеточных линий дозо-зависимо снижалась в присутствии обоих непроницаемых для клеток пептидов Shp и TPR. Пептид Shp ингибировал индуцированную Hsp90 стимуляцию миграции и инвазии клеток с IC_{50} 3–8 мкМ для обеих клеточных линий; при этом пептид практически полностью подавлял стимуляцию миграции и инвазии клеток HT1080 и A-172 в концентрации 100 мкМ (рис. 3). Более того, миграция и инвазия клеток иногда снижались ниже нестимулированного контроля на 10–25%, что указывает на то, что пептиды ингибируют оба пула внеклеточного Hsp90 – мембрано-ассоциированный Hsp90 и растворенный в культуральной среде. Пептид TPR был менее эффективен в ингибировании Hsp90-индуцированной стимуляции миграции клеток HT1080 и A-172 (IC_{50} 10–12 мкМ) (рис. 3), однако в концентрации 100 мкМ пептид TPR также практически полностью ингибировал Hsp90-индуцированную стимуляцию миграции клеток обеих культур клеток. Пептид TPR был менее эффективен в подавлении Hsp90-индуцированной стимуляции инвазии клеток HT1080 и A-172 по сравнению с миграцией клеток (рис. 3). Скремблированные пептиды scg-Shp и scg-TPR не влияли на миграцию и инвазию клеток в присутствии нативного Hsp90 в среде, что указывает на специфичность эффектов непроницаемых для клеток пептидов Shp и TPR на подвижность клеток. Hsp90-специфические поликлональные антитела, используемые в качестве контроля, ингибировали стимулированную Hsp90 миграцию/инвазию обеих клеточных линий на 60–90% при концентрации 100 мкг/мл (рис. 3д), что указывает на высокую эффектив-

ность непроницаемых для клеток пептидов Hsp90 в ингибировании Hsp90-зависимой стимуляции подвижности клеток экстраклеточным Hsp90.

Таким образом, мы продемонстрировали, что два Hsp90-связывающих непроницаемых для клеток пептидных фрагмента сурвивина и Hsp70/Hsp90-организующего белка не обладают цитотоксичностью и антипролиферативной активностью в отношении клеток HT1080 и A-172, но подавляют миграцию и инвазию клеток *in vitro*: базальную миграцию/инвазию клеток, зависящую от мембрано-ассоциированного Hsp90, и миграцию/инвазию клеток, стимулированную свободным Hsp90. Механизмы, посредством которых пептиды ингибируют функционирование экстраклеточного Hsp90, неясны и требуют дальнейшего изучения. Гипотетическая модель действия непроницаемых и проницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на Hsp90-зависимую миграцию и инвазию клеток представлена на рис. 4. Связывание таких пептидов с мембрано-ассоциированным или свободным Hsp90 может нарушать взаимодействие Hsp90 с клеточными рецепторами (LRP1 и др.) и, следовательно, активацию сигнальных путей, определяющих клеточную подвижность [7–12, 15]. Взаимодействие пептидов с Hsp90 может приводить к стерическому ингибированию связывания свободного Hsp90 с рецепторами (например, LRP1) и/или клеточными гепарансульфатами, к диссоциации (десорбции) Hsp90, ассоциированных с рецепторами/гепарансульфатами на плазматической мембране. Нельзя также исключать, что присоединение пептидов к Hsp90 может нарушить его способность активировать клеточные рецепторы по неизвестному механизму, например, посредством изменения конформации Hsp90.

Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей, показавших, что различные типы непроницаемых для клеток ингибиторов Hsp90 (Hsp90-специфичные антитела, DMAG-N-оксид, STA-12-7191, иммобилизованный на агарозных гранулах гелданамицин) снижают миграцию и инвазию клеток *in vitro* и диссеминацию опухолевых клеток у мышей [6–10, 13]. Результаты свидетельствуют, что непроницаемые для клеток пептиды, связывающиеся с Hsp90, обладают потенциалом для создания противоопухолевых препаратов антиметастатического действия. Результаты также позволяют предположить, что проницаемые для клеток формы таких пептидов, дополнительно содержащие проникающие в клетки пептиды (пенетратин, ТАТ-пептид), которые обеспечивают проникновение Hsp90-связывающих пептидов в клетки, могут обладать двойной противоопухолевой активностью – прямым цитотоксическим действием за счет ингибирования функционирования внутриклеточного Hsp90 и подавлением мигра-

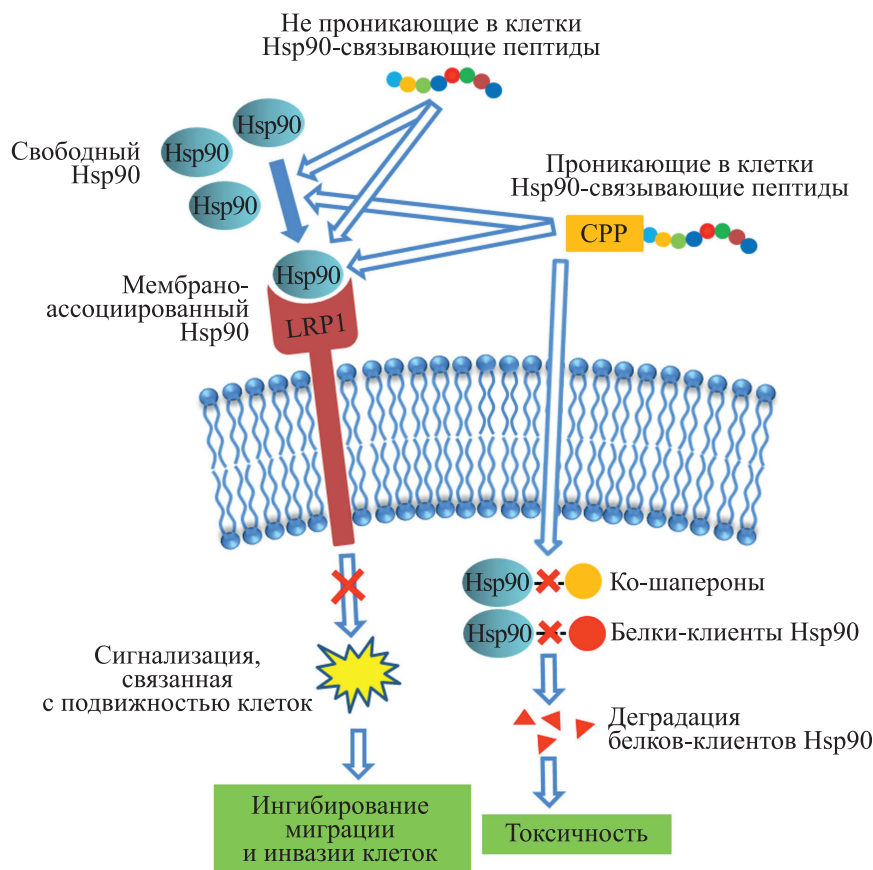


Рис. 4. Гипотетическая модель действия проницаемых и непроницаемых для клеток Hsp90-связывающих пептидов на миграцию и инвазию опухолевых клеток. Непроницаемые для клеток пептиды и проницаемые для клеток пептиды, содержащие проникающий в клетки пептид (CPP), связываются со свободным и/или мембрано-ассоциированным экстраклеточным Hsp90 и нарушают дальнейшую передачу сигналов, связанных с Hsp90-зависимой подвижностью клеток, что приводит к ингибированию их миграции и инвазии. В дополнение к этому проницаемые для клеток Hsp90-связывающие пептиды ингибируют взаимодействие внутриклеточного Hsp90 с белками-клиентами или ко-шаперонами, что приводит к торможению роста и гибели опухолевых клеток.

ции/инвазии опухолевых клеток через нарушение функционирования экстраклеточного Hsp90, ассоциированного с клеточной мембраной или находящегося в межклеточном пространстве в свободном виде.

ВЫВОДЫ

Пептидные фрагменты сурвивина (KHSS-GCAFL) и Hsp70/Hsp90-организующего белка (SYKARNGAFIYK) не проникают внутрь клеток и не обладают цитотоксической и антипролиферативной активностью. Пептиды незначительно снижали базальную (нестимулированную) миграцию и инвазию клеток фибросаркомы HT1080 и глиобластомы A-172 человека *in vitro*, но выражено ингибировали миграцию/инвазию клеток, стимулированную экстраклеточным Hsp90. Результаты свидетельствуют о потенциале Hsp90-связывающих пептидов для разработки противо-

опухолевых препаратов антиметастатического действия.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Li and J. Buchner, *Biomed. J.* **36**, 106 (2013).
2. P. C. Echeverria, A. Bernthaler, P. Dupuis, et al., *PLoS One* **6**, 26044 (2011).
3. P. Workman, *Cancer Lett.* **206**, 149 (2004).

4. J. Sanchez, T. R. Carter, M. S. Cohen, et al., *Curr. Cancer Drug Targets* **20** (4), 253 (2020).
5. B. Becker, G. Multhoff, B. Farkas, et al., *Experim. Dermatol.* **13**, 27 (2004).
6. B. K. Eustace, T. Sakurai, J. K. Stewart, et al., *Nat. Cell Biol.* **6**, 507 (2004).
7. M. Shevtsov M., Z. Balogi, W. Khachatryan, et al., *Cells* **9** (5), 1263 (2020).
8. K. Sidera, M. Gaitanou, D. Stellas, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 2031 (2008).
9. D. Stellas, A. El Hamidieh, and E. Patsavoudi, *BMC Cell Biol.* **11**, 51 (2010).
10. S. Tsutsumi, B. Scroggins, F. Koga, et al., *Oncogene* **27**, 2478 (2008).
11. J. McCready, D. S. Wong, J. A. Burlison, et al., *Cancers (Basel)* **6**, 1031 (2014).
12. C. F. Cheng, J. Fan, M. Fedesco, et al., *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3344 (2008).
13. A. L. Correia, H. Mori, E. I. Chen, et al., *Genes Dev.* **27**, 805 (2013).
14. M. C. Hunter, K. L. O'Hagan, A. Kenyon, et al., *PLoS One* **9**, e86842 (2014).
15. J. S. Chen, Y. M. Hsu, C. C. Chen, et al., *J. Biol. Chem.* **285**, 25458 (2010).
16. J. Bohonowych, M. Hance, K. Nolan, et al., *Prostate* **74**, 395 (2014).
17. M. Schafer and S. Werner, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 628 (2008).
18. A. Snigireva, V. Vrublevskaia, V. Afanasyev, et al., *Cell. Adh. Migr.* **9**, 460 (2015).
19. A. Snigireva, V. Vrublevskaia, Y. Skarga, et al., *Cell Stress Chaperones* **24**, 309 (2019).
20. S. P. Wheatley and D. C. Altieri, *J. Cell Sci.* **132** (7), jcs223826 (2019).
21. J. Plescia, W. Salz, F. Xia, et al., *Cancer Cell.* **17**, 457 (2005).
22. B. Gyurkocza, J. Plescia, C. M. Raskett, et al., *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1068 (2006).
23. J. Li, J. Soroka, and J. Buchner, *Biochim. Biophys. Acta* **3**, 624 (2012).
24. T. Horibe, M. Kohno, M. Haramoto, et al., *J. Transl. Med.* **9**, 8 (2011).
25. A. Ahsan, D. Ray, S. G. Ramanand, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 26879 (2013).
26. Y. Skarga, V. Vrublevskaia, Y. Evdokimovskaya, et al., *Biomed. Chromatogr.* **23**, 1208 (2009).
27. A. Lisov, V. Vrublevskaia, Z. Lisova, et al., *Viruses* **7** (10), 5343 (2015).

Cell-Impermeable Peptide Fragments of Survivin and Hsp70/Hsp90-Organizing Protein Inhibit the Hsp90-Dependent Migration and Invasion of Tumor Cells

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

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

Membrane-associated and secreted extracellular heat shock proteins 90 (Hsp90) have important role in the migration, invasion, and metastasis of tumor cells and are proposed as promising therapeutic target for the development of antimetastatic agents. In previous studies, peptide fragments of survivin (KHSSGCAFL) and Hsp70/Hsp90-organizing protein (KAYARIGNSYFK), that bind these proteins to the intracellular form of Hsp90 have been identified. In this study, we investigated the effects of the Hsp90-binding peptides on the migration and invasion of human fibrosarcoma HT1080 and glioblastoma A-172 cells. Cell-impermeable Hsp90-binding peptide fragments of survivin and Hsp70/Hsp90-organizing protein did not exert cytotoxic and antiproliferative activity against cells, while cell-permeable Hsp90-binding peptides which contain the Antennapedia homeodomain sequence were toxic for HT1080 and A-172 cells. Cell-impermeable Hsp90-binding peptides slightly decreased the basal (unstimulated) cell migration and invasion, although they strongly inhibited the migration/invasion of cells stimulated by extracellular Hsp90. The results demonstrated that cell-impermeable Hsp90-binding peptides are able to inhibit the activity of extracellular Hsp90, thereby leading to the suppression of the migration and invasion of cells. Such peptides have a potential for the development of antimetastatic drugs.

Keywords: extracellular Hsp90, survivin, Hsp70/Hsp90-organizing protein, peptides, cell migration and invasion in vitro, metastasis